

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON  
ANNEE 2010

Doctorat d'Université en Sciences de la vie et de la Santé  
Ecole Doctorale « Homme Environnement Santé »

**Etude des interactions initiales entre moisissures et cellules  
épithéliales respiratoires dans les pathologies fongiques  
infectieuses (aspergillose invasive) et immuno-allergiques  
(pneumopathies d'hypersensibilité).**

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 mars 2010 par

**Anne-Pauline Bellanger**

Membres du Jury :

Pr Bretagne Stéphane	Juge	Créteil
Pr Dalphin Jean-Charles	Juge	Besançon
Pr Gangneux Jean-Pierre	Rapporteur	Rennes
Pr Tillie-Leblond Isabelle	Rapporteur	Lille
Pr Laurence Millon	Directeur de thèse	Besançon



# Remerciements

Aux Professeurs GANGNEUX et TILLIE-LEBLOND, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Au Professeur BRETAGNE, pour tout ce que vous m'avez appris pendant mon passage dans votre laboratoire au CHU Henri Mondor à Créteil, un grand merci.

Au Professeur DALPHIN, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'apporter votre point de vue sur ce travail.

Au Professeur Laurence MILLON, pour notre collaboration enrichissante, pendant ces 3 années de thèse. Un grand merci pour ta disponibilité, ton soutien et tes conseils avisés. Je me réjouis de pouvoir continuer ces recherches à plus long terme.

---

A Gabriel REBOUX, pour ses remarques toujours pertinentes.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Besançon, pour leur accueil chaleureux et leurs encouragements tout au long de ce travail.

A Sophie LAUNAY et à l'équipe du L2 de l'IBCT, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

A ma famille et mes amis, pour leur soutien inconditionnel.



# Table des matières

<b>Abréviations</b>	6
<b>Liste des tableaux</b>	8
<b>Liste des figures</b>	9
<b>Introduction</b>	11
<b>Synthèse bibliographique</b>	14
<b>I Mécanismes physiopathologiques au niveau de l'épithélium respiratoire</b>	15
1 <i>Les cellules de défenses immunitaires pulmonaires</i>	15
a) <u>Immunité innée</u>	15
b) <u>Immunité acquise du système respiratoire</u>	20
2 <i>Principales pathologies aspergillaires</i>	22
A. <i>Exemple d emécanisme infectieux : l'aspergillose invasive</i>	23
a) <u>L'aspergillose invasive : principales pathologies, épidémiologie, manifestations cliniques et critères diagnostiques</u>	23
b) <u>Mécanismes physiopathologiques de l'infection aspergillaire</u>	25
c) <u>Prise en charge, prévention et perspectives</u>	31
B <i>Mécanisme allergique : Exemple des alvéolites allergiques extrinsèques</i>	34
a) <u>Pneumopathies d'hypersensibilité : pathologies principales, épidémiologie, manifestations cliniques et critères diagnostiques</u>	34
b) <u>Mécanismes physiopathologiques</u>	41
c) <u>Prise en charge, prévention et perspectives</u>	46
<b>II Outils et techniques utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques au niveau respiratoire</b>	49
1 <i>Modèles de culture des cellules épithéliales respiratoires</i>	49
a) <u>Culture primaire</u>	49
b) <u>Lignées cellulaires épithéliales respiratoires</u>	51
2 <i>Modèles animaux</i>	55

a) <u>Généralités</u>	55
b) <u>Modèles animaux dans l'étude de l'aspergillose invasive</u>	55
c) <u>Modèles animaux dans l'étude des pneumopathies d'hypersensibilité</u>	55
3 <i>Les techniques d'analyse</i>	65
a) <u>Analyse de la production de médiateurs solubles</u>	65
b) <u>Analyse de l'expression de gènes</u>	68
c) <u>Analyse des molécules de surface cellulaire</u>	73
<b>III Travaux de recherche</b>	76
1 <i>Rôle de la germination des conidies aspergillaires dans la physiopathologie de l'aspergillose invasive</i>	77
a) <u>Contexte et objectif</u>	77
b) <u>Matériels et méthodes</u>	78
c) <u>Résultats</u>	81
d) <u>Discussion</u>	84
2 <i>Etude des interactions initiales entre les cellules épithéliales respiratoires et les moisissures impliquées dans la maladie du Poumon de Fermier</i>	86
2A <i>Réponse cytokinique initiale de l'épithélium respiratoire et rôle étiologique de différentes moisissures impliquées dans la maladie du Poumon de Fermier</i>	86
a) <u>Contexte et objectif</u>	86
b) <u>Matériels et méthodes</u>	87
c) <u>Résultats</u>	89
d) <u>Discussion</u>	96
2B <i>Comparaison de la réponse cytokinique initiale de l'épithélium respiratoire exposé à différentes formes de développement d'E. amstelodami</i>	98
a) <u>Contexte et objectif</u>	98
b) <u>Matériels et méthodes</u>	100
c) <u>Résultats</u>	103
d) <u>Discussion</u>	105

<i>3 Comparaison de la réponse cytokinique initiale de l'épithélium respiratoire exposé à des pollens avec ou sans éléments traces métalliques</i>	106
a) <u>Contexte et objectif</u>	106
b) <u>Matériels et méthodes</u>	107
c) <u>Résultats</u>	110
d) <u>Discussion</u>	112
<b>Conclusions et perspectives</b>	114
<b>Annexes</b>	117
<b>Publications</b>	133
<b>Références bibliographiques</b>	134



## **Abréviations**

<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AI</b>	Aspergillose Invasive
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BALT</b>	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin
<b>DLCO</b>	Capacité de diffusion du monoxyde de carbone
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EORTC</b>	European Organization for Research and Treatment of Cancer
<b>ETM</b>	Eléments Traces Métalliques
<b>G CSF</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor
<b>GM CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>GVHD</b>	Graft Versus Host Disease
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>ICAM</b>	Molécule d'Adhésion Intra-Cellulaire
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL-</b>	Interleukine-
<b>LBA</b>	Lavage Broncho-Alvéolaire
<b>LPS</b>	LipoPolySaccharide
<b>MBL</b>	Mannose Binding Lectin
<b>MBP</b>	Mannose Binding Protein
<b>MIP</b>	Macrophage Inflammatory Protein
<b>MCP</b>	Monocyte Chemotactic Protein
<b>My88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88

<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NFκB</b>	Nuclear Factor kappa B
<b>NHLBI</b>	National Heart Lung and Blood Institute
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>ORD</b>	Office of Rare Diseases
<b>PAMP</b>	Pathogen associated molecular patterns
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptors
<b>PHS</b>	Pneumopathie d'HyperSensibilité
<b>PDF</b>	Poumon De Fermier
<b>PEO</b>	Poumon Eleveurs d'Oiseaux
<b>PID</b>	Pneumopathie Interstitielle Diffuse
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RT</b>	Transcription Inverse (Reverse Transcription)
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>Th</b>	Lymphocytes T Helper
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>Treg</b>	Cellules T régulatrices
<b>WT</b>	Wild Type

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Molécules à activité antimicrobienne présentes dans l'arbre respiratoire	p17
Tableau 2 : Défense innée vis-à-vis des différents phénotypes d' <i>A. fumigatus</i>	p27
Tableau 3: Principaux résultats obtenus grâce aux cultures de cellules épithéliales pulmonaires dans l'aspergillose invasive et les pneumopathies d'hypersensibilité	p53
Tableau 4 : Principaux résultats obtenus grâce aux modèles murins dans l'aspergillose invasive et les pneumopathies d'hypersensibilité	p57
Tableau 5 : Résultats obtenus après exposition des cellules A549 à <i>A. fumigatus</i> avec et sans dexaméthasone et à <i>P chrysogenum</i>	p83
Tableau 6 : Gamme de concentrations des extraits totaux hydrosolubles de <i>S. rectivirgula</i> , <i>A. corymbifera</i> et <i>E. amstelodami</i> sur la lignée A549	p91
Tableau 7: Ensemble des résultats obtenus par RT-qPCR temps réel après exposition de la lignée A549 aux extraits totaux hydrosolubles de <i>S. rectivirgula</i> , <i>A. corymbifera</i> , <i>E. amstelodami</i> et <i>W. sebi</i>	p94
Tableau 8 : Résultats des dosages ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après exposition à <i>S. rectivirgula</i> et <i>A. corymbifera</i>	p95
Tableau 9 : Ensemble des résultats obtenus pour l'IL-8 par RT-qPCR temps réel et par ELISA après exposition aux extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d' <i>E. amstelodami</i>	p103
Tableau 10 : Ensemble des résultats obtenus par RT-qPCR temps réel après exposition aux grains de pollen de bouleau seul et après marquage au Plomb (dose 30 et 60) sur la lignée A549	p111
Tableau 11 : Résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires chez les patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse	p119
Tableau 12 : Résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires dans le sang des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier	p120
Tableau 13 : Résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires dans les LBA des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier	p121

## Liste des figures

Figure 1 : L'arbre trachéobronchique, dualité anatomo-immunologique	p16
Figure 2 : Principales pathologies aspergillaires en fonction du statut immunitaire	p22
Figure 3 : Réponse immune lors de l'inhalation de conidies aspergillaires	p28
Figure 4 : Réponse immune lors des pneumopathies d'hypersensibilité	p45
Figure 5 : Epithélium cilié provenant d'un explant de trachée de lapin	p49
Figure 6 : Illustration de la technologie Luminex™	p68
Figure 7 : Illustration de la technologie puce à ADN	p72
Figure 8 : Illustration de la technologie cytométrie en flux	p74
Figure 9 : Induction de l'IL-8, du TNF $\alpha$ et du GM-CSF au cours de la croissance des conidies d' <i>A.fumigatus</i>	p82
Figure 10 : Absence d'induction de l'IL-8, du TNF $\alpha$ et du GM-CSF en présence de conidies d' <i>A.fumigatus</i> et de dexaméthasone	p82
Figure 11 : Quantification relative des ARNm de l'IL-8 lors de l'exposition aux extraits totaux hydrosolubles de <i>S. rectivirgula</i> , <i>A. corymbifera</i> , <i>E. amstelodami</i> et de <i>W. sebi</i> , au cours du temps	p92
Figure 12 : Dosage ELISA de la forme protéique de l'IL-8 dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux extraits totaux hydrosolubles de <i>S. rectivirgula</i> et de <i>A. corymbifera</i>	p92
Figure 13 : Quantification relative des ARNm de l'IL-13 lors de l'exposition aux extraits totaux hydrosolubles de <i>S. rectivirgula</i> , <i>A. corymbifera</i> , <i>E. amstelodami</i> et de <i>W. sebi</i> , au cours du temps	p93
Figure 14 : Cycle de développement d' <i>E. amstelodami</i>	p99
Figure 15 : Courbe ROC illustrant la capacité des extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d' <i>E. amstelodami</i> à discriminer les patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier et les témoins exposés non malades	p99
Figure 16 : Quantification relative des ARNm de l'IL-8 lors de l'exposition aux extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d' <i>E. amstelodami</i> pendant 8h	p104
Figure 17 : Dosage de la forme protéique de l'IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d' <i>E. amstelodami</i>	p104

Figure 18 : Quantification relative des ARNm de l'IL-5 lors de l'exposition aux grains de pollen de bouleau avec et sans Plomb (dose 30 et 60) sur la lignée A549

p111



# **Introduction**



Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquitaires présents dans l'environnement qui peuvent être responsables de pathologies fongiques caractérisées par des manifestations cliniques variées. Les mécanismes de défense immunitaire contre les agents fongiques sont nombreux, allant de mécanismes protecteurs, mis en jeu immédiatement (immunité innée) à des mécanismes adaptatifs sophistiqués qui sont induits spécifiquement pendant l'infection (immunité adaptative cellulaire). L'importance relative de la contribution de l'immunité cellulaire par rapport à l'immunité humorale dans les infections fongiques a longtemps été débattue. A présent, il est établi que le système immunitaire fonctionne comme un tout et que divers éléments contribuent à la défense de l'organisme de l'hôte. Le type d'immunité cellulaire induit (Th1 ou Th2) reste déterminant. Ainsi, une immunité cellulaire de type Th1, qui induit la production de médiateurs inflammatoires et active les cellules phagocytaires professionnelles, est nécessaire pour lutter efficacement contre l'agent fongique alors qu'une réponse immunitaire de type Th2 va généralement mener à une réponse allergique ou à un développement de l'infection.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de l'épithélium respiratoire, première ligne de défense de l'hôte lors de l'inhalation d'agents fongiques, dans deux situations, l'une aboutissant à un mécanisme infectieux, l'aspergillose invasive, et l'autre à une réponse d'hypersensibilité retardée avec dépôts d'immuns complexes, la maladie du Poumon de Fermier.

Le premier travail de recherche réalisé a porté sur l'étude du rôle de l'épithélium respiratoire lors de l'inhalation de conidies, capables de se développer à 37°C, et responsables d'infections profondes, en prenant comme exemple le cas de l'aspergillose invasive. Ce premier travail, qui a mis en évidence l'importance de la germination des conidies dans le développement d'une réaction inflammatoire adaptée, a été réalisé en collaboration avec l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Henri Mondor (Pr S Bretagne, Dr F Botterel).

Les techniques acquises grâce à ce travail collaboratif ont été mises en place à Besançon et mises à profit pour l'étude du rôle pathogène de moisissures environnementales dans la maladie du Poumon de Fermier. En effet, la maladie du Poumon de Fermier est la plus fréquente des pneumopathies d'hypersensibilité rencontrées en France et, depuis vingt ans, les services de Parasitologie-Mycologie et de Pneumologie du CHU de Besançon se consacrent à l'étude de son épidémiologie, à l'identification d'agents étiologiques et au développement de techniques diagnostiques. En effet, alors que *Saccharopolyspora rectivirgula*, actinomycète thermophile, est reconnu comme agent étiologique dans la maladie du Poumon de Fermier, le rôle des moisissures environnementales, telles *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* et *Wallemia sebi*, suggéré par des études sérologiques et épidémiologiques antérieures, n'a jamais été étudié *in vitro*. Ainsi, dans la continuité de la recherche dans cette thématique, nous nous sommes intéressés au rôle de l'épithélium respiratoire lors de l'inhalation d'antigènes fongiques impliqués dans la maladie du Poumon de Fermier. Des premiers essais ont comparé la réponse de l'épithélium respiratoire, au cours du temps, à différents agents étiologiques potentiels de la maladie du Poumon de Fermier (*A.corymbifera*, *E. amstelodami*

et *W.sebi*). Les essais suivants avaient comme objectif de comparer la capacité à induire une réponse cellulaire des différentes formes de développement d'*Eurotium amstelodami*, soit la forme sexuée (ascospores), asexuée (conidies) et végétative (filaments). Ces tests complémentaires avaient également pour objectif d'utiliser des fractions protéiques plutôt que de l'extrait hydrosoluble total, dans un souci de standardisation des inoculums.

La maîtrise des techniques d'étude de la réponse immune sur des lignées épithéliales respiratoires a permis de réaliser, en collaboration avec le laboratoire de Pallynologie de l'UMR Chrono-Environnement, un travail comparant le pouvoir allergisant de grains de pollens de bouleau porteurs ou non d'éléments traces métalliques (ETM).

Après une présentation synthétique des données bibliographiques sur les mécanismes physiopathologiques, en cas d'infection (exemple de l'aspergillose invasive) et en cas de réaction d'hypersensibilité (exemple de la maladie du Poumon de Fermier) et des outils (modèles cellulaires et techniques analytiques) permettant d'étudier ces mécanismes physiopathologiques, les différents travaux de recherche effectués au cours de ce travail de thèse seront présentés et discutés.

# **Synthèse bibliographique**



# I Mécanismes physiopathologiques au niveau de l'épithélium respiratoire

## 1 Les cellules de défenses immunitaires pulmonaires

### a) Immunité innée

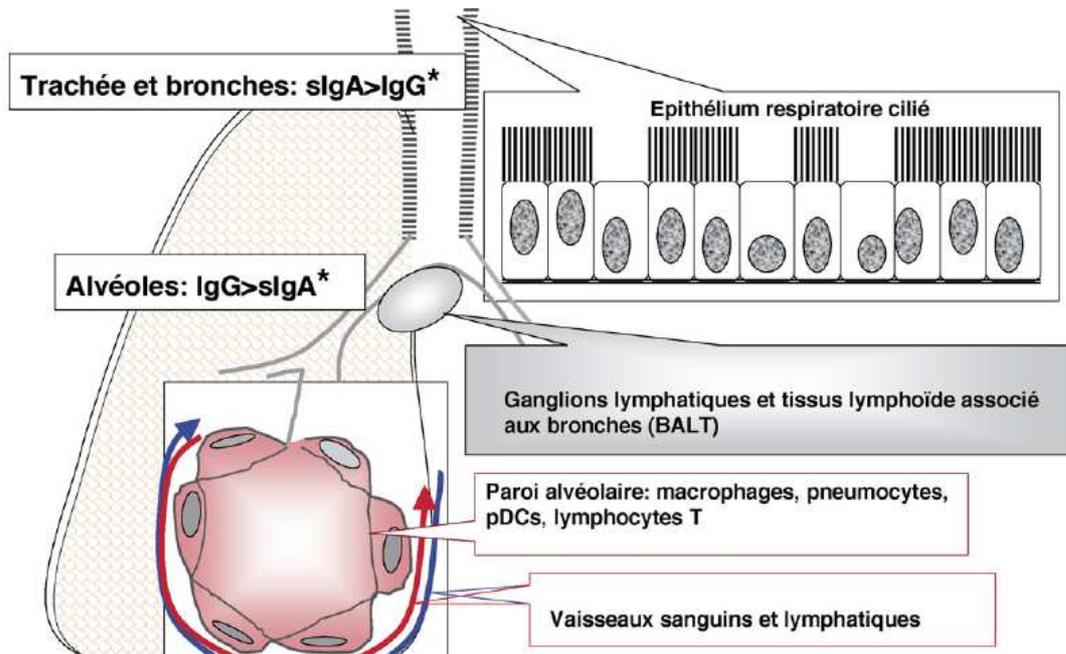
#### *Homéostasie de l'arbre respiratoire*

Les épithéliums respiratoires, par le développement d'une surface d'environ 1.5 m<sup>2</sup> chez le nouveau-né et atteignant environ 100 m<sup>2</sup> chez l'adulte, sont constamment exposés à des infections potentiellement invasives, à partir de la dizaine de litres d'air inhalée chaque jour. Les infections respiratoires peuvent rester limitées (bronchites, pneumonies) ou être le point de départ d'infections invasives (bactériémies et méningites). Ces formes invasives sont dues au fait que les effecteurs de l'immunité locale ont été débordés et les défenses immunitaires systémiques, humorales et cellulaires, constituent dès lors les derniers éléments indispensables au contrôle du processus invasif et toxinique. L'arbre respiratoire peut être considéré, sur le plan immunologique, comme un organe à deux compartiments, chacun exerçant des fonctions effectrices distinctes (Alonso 2008).

Dans la partie supérieure, le tractus trachéobronchique prolonge le naso-oropharynx en conservant le même type d'épithélium cylindrique sécrétoire pseudostratifié et comporte des formations lymphoïdes constituant le tissu lymphoïde associé aux bronches (bronchial associated lymphoid tissue, BALT) (Figure 1, p16). Ces formations lymphoïdes ne sont pas organisées en follicules, comme les plaques de Peyer de la paroi intestinale, mais on trouve, en outre, des ganglions péribronchiques où aboutissent les vaisseaux lymphatiques drainants. Dans le tractus trachéobronchique, les anticorps sécrétoires de la classe des IgA sont majoritaires par rapport aux IgG, exsudées du plasma, dont la concentration augmente avec l'inflammation (Renegar et al. 2004). Ce compartiment ouvert à l'air atmosphérique est colonisé par une flore bactérienne commensale, dont certaines espèces peuvent devenir pathogènes par décompensation de l'équilibre microécologique, à l'occasion du déclenchement de déficits immunitaires.

Le compartiment pulmonaire proprement dit comporte les bronchioles et les alvéoles (Figure 1). Ce compartiment est normalement exempt de microorganismes. L'alvéole pulmonaire possède une paroi constituée de pneumocytes de type 1 et de type 2, de macrophages résidents, de cellules dendritiques plasmacytoïdes, de cellules T et est couverte d'un film comportant de nombreux produits, tels que le surfactant et la phospholipase A2, protégeant les cellules et possédant des fonctions microbicides. Le compartiment alvéolaire est en contact direct avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cette proximité des vaisseaux expose à la dissémination des agents infectieux atteignant l'alvéole, mais permet inversement aux anticorps sériques, aux phagocytes et aux lymphocytes recrutés de faire barrière à la dissémination de ces agents.

Figure 1 : L'arbre trachéobronchique, dualité anatomo-immunologique (Renegar et al. 2004)



### *Mécanismes d'exclusion du système respiratoire*

Le premier système de défense anti-infectieuse pulmonaire est le système d'exclusion qui a pour but d'empêcher l'adhésion et la colonisation de l'épithélium respiratoire par les agents pathogènes. Ce système comporte tout d'abord l'excalator muco-ciliaire trachéobronchique qui est présent de la trachée aux bronchioles respiratoires et les IgA sécrétoires. Le mucus piège les particules inhalées de plus de 5µm de diamètre qui se déposent sur les parois trachéobronchiques. Ces particules sont ensuite transportées activement par le battement des cils vers le carrefour oro-pharyngé où elles sont dégluties. Les particules de moins de 5µm de diamètre peuvent atteindre les alvéoles. A ce niveau, les macrophages et de nombreuses molécules à activité anti-microbienne, sécrétées par les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques, jouent un rôle important dans l'exclusion des microorganismes (Tableau 1, p17) (Ganz 2002).

Tableau 1 : Molécules à activité antimicrobienne présentes dans l'arbre respiratoire (Ganz 2002).

<b>Molécules</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Origine</b>
<b>Lysozyme</b>	Lyse du peptidoglycane	Epithélium, monocytes, polynucléaires neutrophiles
<b>Lactoferrine, Transferrine</b>	Captation du fer	
<b>Phospholipase A2</b>	Lyse des phospholipides membranaires	Epithélium, polynucléaires neutrophiles
<b>Défensines et cathélicidines</b>	Destruction de la membrane cytoplasmique	
<b>Collectines, Protéines A et D du surfactant</b>	Oponisation, phagocytose, modulation de la production de cytokines, production de radicaux oxygénés	Pneumocytes de type 2
<b>IgA, IgG</b>	Neutralisation, opsonisation, phagocytose, activation du complément	Lymphocytes B, plasmocytes
<b>Complément</b>	Oponisation, phagocytose, lyse des membranes cytoplasmiques, chémotactisme des polynucléaires neutrophiles	Pneumocytes de type 2, macrophages, fibroblastes
<b>Fibronectine</b>	Oponisation, phagocytose, chémotactisme des polynucléaires neutrophiles, inhibition de l'adhérence	Macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales

## *Les macrophages alvéolaires*

Les macrophages alvéolaires représentent plus de 90% des cellules intra-alvéolaires chez le sujet sain. Ils jouent un rôle primordial dans les défenses anti-infectieuses grâce à leurs activités de phagocytose, la synthèse de peptides antimicrobiens et leur capacité à reconnaître les agents infectieux induisant la synthèse de signaux activateurs de l'immunité innée et acquise. Schématiquement, les macrophages peuvent avoir deux types de comportements en cas d'agression par des agents infectieux (Sibille and Marchandise 1993, Moore et al. 2001).

Dans le cas où l'inoculum est faible ou l'agent infectieux peu virulent, la phagocytose des macrophages suffit à contrôler l'infection. Ce phénomène survient sans déclencher de réaction inflammatoire. Ceci illustre bien le fait que le milieu alvéolaire est physiologiquement contrôlé par un ensemble de signaux immunosuppresseurs, ce qui prévient la survenue d'une réaction inflammatoire inappropriée en cas d'inhalation de particules non pathogènes. Mal connus, ces signaux immunosuppresseurs semblent résulter de l'action des lipides du surfactant (McCormack and Whittsett 2002).

Dans le cas où l'inoculum est important ou l'agent infectieux possède des facteurs de virulence lui permettant d'échapper aux systèmes d'exclusion, les macrophages synthétisent immédiatement des signaux permettant de mettre en jeu les populations cellulaires de l'immunité innée. Ces signaux intracellulaires sont les cytokines de la phase aiguë de l'inflammation (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6...), les chémokines (IL-8) et les métabolites de l'acide arachidonique (leucotroène B4) qui initient la réponse inflammatoire et recrutent les polynucléaires neutrophiles ainsi que les monocytes/macrophages.

« *Pattern recognition receptors* » (PRR) et « *pathogen associated molecular patterns* » (PAMP)

Reconnaître un agent infectieux sans l'avoir jamais rencontré est une caractéristique fondamentale du système de défense innée. Cette fonction essentielle de l'immunité innée repose sur l'existence d'un ensemble de récepteurs regroupés sous l'appellation de « PRR » pour « Pattern Recognition Receptors ». Les PRR sont synthétisés de manière constitutive et caractérisés par leur capacité à reconnaître des « molécules-signature » des agents pathogènes, appelés « PAMP » pour « Pathogen Associated Molecular Patterns ». Ces molécules signent le « non-soi infectieux » et sont par définition absentes des cellules de l'hôte. A la différence des antigènes reconnus par l'immunité spécifique acquise, les PAMP ne sont pas spécifiques d'une espèce ou d'un genre de microorganismes (Netea et al. 2004). En fonction de leur mode d'action, les PRR peuvent être classés en trois groupes :

- les PRR sécrétés qui neutralisent les agents pathogènes par activation du complément ou facilitation de la phagocytose
- les PRR membranaires des macrophages, médiateurs de la phagocytose
- les PRR qui induisent un signal intracellulaire (PRR de transduction) dont font partie les Toll like récepteurs (TLRs).

Les TLRs sont des récepteurs trans-membranaires qui comportent un domaine extracellulaire (récepteur) et un domaine intracellulaire, dont le rôle est la transduction du signal à la cellule lors de la fixation d'un ligand à la partie extracellulaire du TLR. Les TLRs se distinguent des récepteurs spécifiques de l'immunité acquise par trois caractéristiques principales : ils sont exprimés à la surface de nombreux types cellulaires, leur expression n'est pas clonale et ils ont toujours la même architecture moléculaire. La reconnaissance d'un PAMP par les TLRs, comme celle du LPS par le TLR4, induit un signal aboutissant à une activité effectrice immédiate de la cellule. Cette réponse cellulaire est dans la plupart des cas médiée par l'activation du facteur de transcription nucléaire NFκB. Ce facteur de transcription régule la synthèse inductible de nombreuses cytokines impliquées dans l'immunité innée ainsi que dans la mise en jeu de signaux capables d'initier une immunité acquise.

#### *Autres populations cellulaires impliquées dans l'immunité innée*

- Les polynucléaires neutrophiles ont comme rôle principal d'éliminer les agents pathogènes par phagocytose. A l'état basal, il n'existe que quelques polynucléaires neutrophiles dans l'espace alvéolaire (Sibille and Marchandise 1993). Ces cellules circulent dans le secteur vasculaire et sont recrutées dans les tissus au niveau des sites d'infection, en réponse à la production locale de facteurs chimiotactiques et à la surexpression des molécules d'adhésion vasculaires. Des études expérimentales animales ont montré que des infections bactériennes ou fongiques entraînent un recrutement rapide de polynucléaires neutrophiles dans le poumon : en 3 à 4 heures, ils représentent 60 à 80% des cellules recueillies par lavage broncho-alvéolaire. Ces polynucléaires neutrophiles recrutés acquièrent une activité bactéricide optimale sous l'influence de signaux activateurs comme le G-CSF, le TNFα, l'IL-8 et MIP 2. Les polynucléaires neutrophiles jouent également un rôle dans la régulation de l'inflammation par la production de cytokines inflammatoires (Xing et al. 1994). Après avoir rempli leur fonction, les polynucléaires neutrophiles deviennent apoptotiques et sont éliminés par les macrophages alvéolaires, prévenant ainsi le relargage de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques qu'ils contiennent.
- Les cellules NK jouent un rôle important dans la lyse et l'induction de l'apoptose des cellules infectées par les agents pathogènes, notamment grâce à leur capacité de synthèse d'IFNγ, cette lyse est anticorps indépendante.
- Les cellules épithéliales ont la capacité de sécréter des polypeptides antimicrobiens, des défensines, mais aussi d'induire la réponse inflammatoire non spécifique par la synthèse de cytokines et de métabolites de l'acide arachidonique (Cromwell et al. 1992, Madsen et al. 2000).

## b) Immunité acquise du système respiratoire

L'immunité spécifique acquise ou « adaptative » est une arme de haute spécificité de cible. Cette caractéristique et son délai de mise en œuvre (4 à 7 jours en moyenne) n'en font pas un système approprié pour la détection et la prise en charge immédiate du « tout-venant » infectieux (Moore et al. 2001). La fonction de l'immunité acquise est de renforcer et de réguler les mécanismes de défense innée et de construire une mémoire immunologique permettant de surmonter toute nouvelle agression par un agent pathogène déjà rencontré. L'immunité acquise est particulièrement importante pour lutter contre certains microorganismes virulents, capables d'échapper au contrôle de l'immunité innée. Le développement de ce type de défense nécessite la sélection et l'amplification clonale de lymphocytes spécifiques lors de la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices de l'antigène (Moore et al. 2001).

### *Initiation de la réponse immunitaire spécifique : rôle des cellules dendritiques*

Chez l'homme, les lymphocytes de l'arbre trachéobronchique sont majoritairement présents au sein des structures ganglionnaires et donc à distance des foyers infectieux. Les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans pulmonaires jouent un rôle d'initiation et de développement de l'immunité acquise. En effet, elles phagocytent l'agent pathogène, élaborent, transportent et présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes et elles orientent le type de réponse immune développée en fonction de la production de différentes cytokines immunomodulatrices.

Les cytokines immunomodulatrices peuvent être classées en deux groupes à activités opposées. Les cytokines Th1 sont impliquées dans l'activation des macrophages et des polynucléaires neutrophiles et orientent vers une réaction immunitaire spécifique de type cellulaire. A l'inverse, les cytokines Th2 inhibent une grande variété de fonctions de l'immunité innée incluant l'activité des macrophages et des polynucléaires neutrophiles et orientent vers une réponse immune humorale. L'équilibre entre les cytokines Th1 et Th2 produites lors de l'inflammation va moduler l'intensité de la réponse innée et orienter le type de réponse immune acquise. Les cellules dendritiques peuvent produire ces deux types de cytokines lors de la présentation de l'antigène, en particulier l'IL-12 (phénotype Th1) et l'IL-10 (phénotype Th2), induisant la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en deux sous-populations à actions opposées.

### *Réponse immunitaire spécifique par les lymphocytes T : polarisation Th1-Th2*

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup>Th1 sont impliqués dans l'immunité acquise à médiation cellulaire (hypersensibilité retardée), dans la réponse aux agents pathogènes bactériens, viraux et fongiques. Ils augmentent l'activité bactéricide des macrophages, activent les cellules T cytotoxiques, et favorisent la synthèse des immunoglobulines IgG2a par les lymphocytes B.

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup>Th2 activent les mastocytes et les éosinophiles (réponse antiparasitaire, hypersensibilité immédiate) et induisent la maturation des lymphocytes B vers une réponse humorale de type IgG1-IgG3 et la production d'IgA et d'IgE (Moore et al. 2001).

### *Immunité acquise humorale : immunoglobulines spécifiques*

Les immunoglobulines spécifiques font partie des défenses acquises et agissent soit par mécanisme d'exclusion en empêchant l'adhérence aux cellules épithéliales, soit par opsonisation, permettant une activation du complément et favorisant la phagocytose. Les IgA et les IgG sont les principales immunoglobulines présentes dans la lumière de l'arbre trachéo-bronchique (Renegar et al. 2004). La synthèse des immunoglobulines est assurée par les plasmocytes présents dans la *lamina propria* de l'épithélium bronchique. Ils fabriquent les chaînes lourdes et les chaînes légères des immunoglobulines ainsi que la pièce de jonction. Les IgA s'assemblent à la pièce de jonction sous forme dimérique alors que les IgM s'assemblent sous forme pentamérique. Elles traversent l'épithélium par diffusion ainsi qu'une faible proportion d'IgG, IgD et IgE.

Les lymphocytes B matures peuvent être activés directement lorsqu'ils rencontrent un antigène présent dans le milieu extérieur par interaction directe avec le récepteur des cellules B (BCR). Ce mécanisme est alors dit « T indépendant ». Les antigènes T indépendants sont des structures répétitives, généralement faisant partie de la paroi des agents infectieux (lipoprotéines, polysaccharide, LPS...). Les immunoglobulines produites en réponse sont souvent de type IgG2.

La réponse humorale vis-à-vis des antigènes protéiques (toxines, protéines de membrane externe...) nécessite une coopération cellulaire entre les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes B. Les immunoglobulines produites en réponse sont dits « T dépendants » et sont souvent des IgA, des IgG1 et des IgG3.

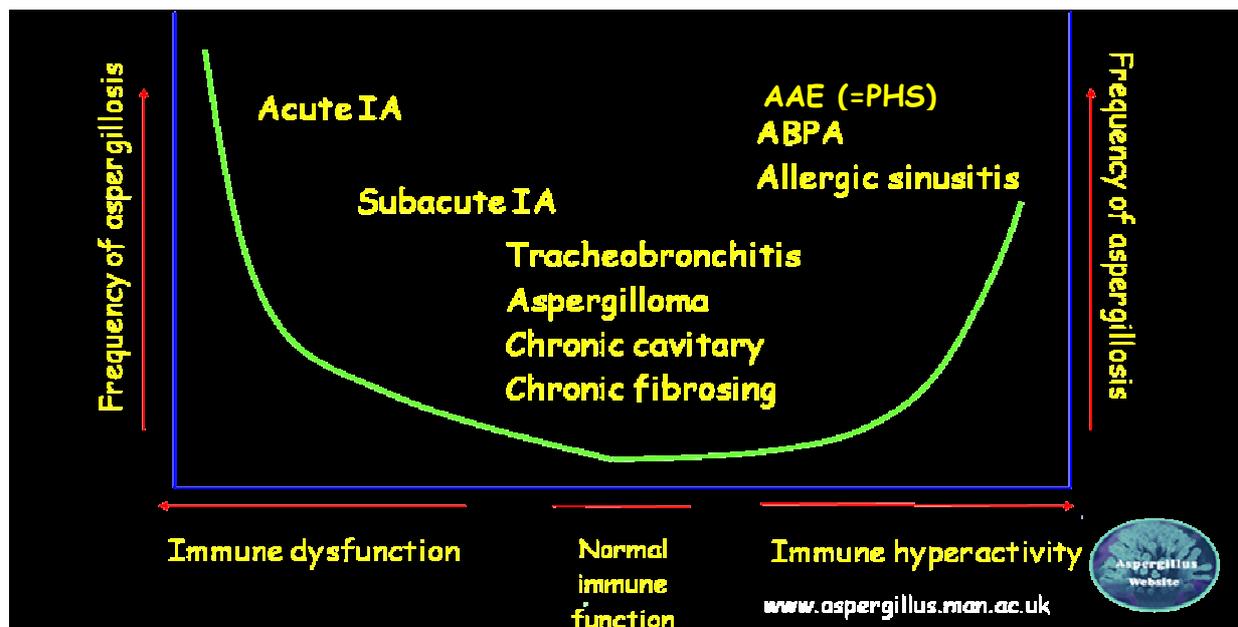
## 2 Principales pathologies aspergillaires

Le terme d'aspergillose englobe un large spectre de pathologies liées aux facteurs d'hôtes (Figure 2) (Segal 2009). L'aspergillose invasive aiguë est rapidement progressive, souvent fatale et survient chez les patients profondément immunodéprimés. En revanche, les formes chroniques d'aspergillose pulmonaire (dont par exemple, l'aspergillose chronique nécrosante ou fibrocavitaire) se développent chez des patients sans altération immunitaire sévère, progressent sur plusieurs années et nécessitent des traitements antifongiques prolongés (Denning et al. 2003, Sambatakou et al. 2006).

L'aspergillome est une masse fongique qui se développe dans une cavité pulmonaire pré-existante. Les traitements antifongiques n'ont pas démontré leur efficacité dans les aspergillomes. En cas d'hémoptysies persistantes et abondantes, la résection chirurgicale de la cavité pulmonaire atteinte est recommandée (Walsh et al. 2008).

Chez les sujets immunocompétents, les espèces aspergillaires peuvent induire des réactions allergiques telles que sinusites ou asthme aspergillaire. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) est une maladie allergique sévère, due à une réponse Th2 excessive, qui survient chez 1 à 2% des patients asthmatiques et chez 1 à 15% des patients atteints de mucoviscidose (Stevens et al. 2003). Les alvéolites allergiques extrinsèques (AAE), ou pneumopathies d'hypersensibilité (PHS), sont des alvéolites lymphocytaires provoquées par l'inhalation massive et répétée de spores chez des sujets non atopiques.

Figure 2. Principales pathologies aspergillaires en fonction du status immunitaire. D'après Denning W, 2006, Conférences de l'ISHAM, diaporama disponible sur le site Website Aspergillus (<http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?education/slides.htm~main>)



## 2.A. Exemple de mécanisme infectieux : l'aspergillose invasive

### a) L'aspergillose invasive : principales pathologies, épidémiologie, manifestations cliniques et critères diagnostiques

#### *Epidémiologie de l'aspergillose invasive pulmonaire*

Les patients à haut risque de développer une aspergillose invasive pulmonaire sont ceux présentant une neutropénie prolongée, les transplantés (allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organe solide) et les patients avec un déficit immunitaire acquis ou une granulomatose septique chronique (Segal and Walsh 2006). L'incidence des aspergilloses invasives diffère selon le terrain.

Chez les patients neutropéniques, l'intensité et la durée de la neutropénie est un facteur prédictif du risque d'aspergillose invasive. Les chimiothérapies cytotoxiques intensives (induction des leucémies aiguës) provoquent des neutropénies prolongées. Une incidence d'aspergillose invasive d'environ 5% a été rapportée par une étude multicentrique portant sur des patients atteints de leucémie aiguë (Pagano et al. 2007).

Chez les patients allogreffés, on distingue trois périodes particulièrement à risque d'aspergillose invasive : 1) dans les 40 premiers jours post-greffe qui correspondent à la neutropénie qui suit le conditionnement, 2) dans les 40-100 jours post-greffe où peut se développer une réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVHD), 3) plus de 100 jours après la greffe, où la GVHD peut être chronique (Segal and Walsh 2006, Garcia-Vidal et al. 2008). Le degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur est un facteur important de développement d'une GVHD, or, le risque de développer une aspergillose invasive est plus élevé en cas de GVHD, du fait de sa sévérité et des traitements immunosuppresseurs mis en place (Morgan et al. 2005, Garcia-Vidal et al. 2008).

Chez les patients transplantés d'organe, l'incidence de l'aspergillose invasive est plus élevée pour les greffes de poumon (Morgan et al. 2005). Chez ces patients, le risque de développement d'une aspergillose invasive tardive, 3 mois après la transplantation, est reconnu et est associé à l'intensité des traitements immunosuppresseurs appliqués pour traiter les rejets (Gavalda et al. 2005, Singh et al. 2006).

Les patients non transplantés, mais traités par immunosuppresseurs pour des troubles immunitaires sévères (par exemple vascularite), développent beaucoup plus rarement une aspergillose invasive (Segal and Sneller 1997, Filler et al. 2005). Cependant, plusieurs études rapportent qu'un nombre croissant de patients graves, hospitalisés en unités de soins intensifs, mais n'ayant pas les facteurs de risque classiques (allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organe solide, leucémie) développent une aspergillose invasive (Vandewoude et al. 2006, Meersseman et al. 2008). Parmi ces patients, certains souffraient de maladie pulmonaire chronique obstructive, de cirrhose hépatique ou étaient traités au long cours par des corticoïdes.

### *Manifestations cliniques et critères diagnostiques*

L'aspergillose invasive se manifeste principalement par une atteinte des tractus pulmonaires et sinusiens, ce qui reflète le fait que la contamination se fait généralement par inhalation de conidies. Le tractus gastro-intestinal et la peau sont d'autres portes d'entrées possibles mais beaucoup plus rares. L'aspergillose invasive pulmonaire est de loin la forme la plus fréquente et des signes cliniques non-spécifiques tels que fièvre, toux et dyspnée sont souvent présents. Une infection mal contrôlée pourra s'étendre par dissémination hémotogène et toucher tous les organes. L'atteinte du système nerveux central est une conséquence extrêmement grave de l'aspergillose invasive disséminée (Segal 2009).

Le diagnostic de l'aspergillose invasive reste difficile du fait de la non-spécificité des manifestations cliniques. Les signes radiologiques peuvent orienter le diagnostic mais ne sont pas pathognomoniques et les cultures mycologiques des prélèvements respiratoires manquent souvent de sensibilité. Seule la mise en évidence histologique de filaments mycéliens et la culture positive d'un site normalement stérile (par exemple liquide pleural), sont des preuves d'une infection fongique invasive. Des tests sérologiques détectant, soit le galactomannane soit le beta-glucane de la paroi fongique, aident au diagnostic de l'aspergillose invasive probable et évitent parfois la mise en œuvre de procédures invasives.

Le diagnostic d'aspergillose invasive probable nécessite la combinaison de facteurs d'hôtes (par exemple neutropénie prolongée, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques), des signes radiologiques (signe du halo, nodule, croissant gazeux) et des critères mycologiques (culture positive, recherche d'antigène aspergillaire de type galactomannane ou beta glucane par méthode ELISA, dans le sérum ou le liquide de lavage broncho-alvéolaire) (De Pauw et al. 2008). Les techniques de biologie moléculaire ne sont utilisées actuellement qu'à titre de recherche. Ces techniques présentent des avantages (obtention d'un résultat rapide, avec diagnostic d'espèce et possibilité d'identification de gènes de virulence) mais le manque de standardisation, l'absence de distinction entre colonisation et infection ainsi que le risque de contamination par de l'ADN fongique, restent des limites à leur généralisation à titre diagnostique (Bretagne and Costa 2005, 2006, Einsele and Loeffler 2008).

Les chances de survie sont accrues par la précocité de la mise en place du traitement antifongique spécifique, par voie systémique, dès que l'infection est suspectée, même si les tests diagnostiques ne permettent pas de prouver l'infection aspergillaire de façon formelle (Caillot et al. 2001).

## b) Mécanismes physiopathologiques de l'infection aspergillaire

### *Immunité innée*

L'épithélium respiratoire constitue la première ligne de défense de l'hôte lors de l'inhalation de conidies aspergillaires. En effet, les cellules épithéliales respiratoires jouent un rôle de barrière anatomique, favorisent la clairance muco-ciliaire et ingèrent les conidies aspergillaires inhalées. La capacité des espèces aspergillaires à survivre dans les cellules épithéliales pulmonaires pourrait représenter un mode d'échappement aux cellules phagocytaires (Wasylnka and Moore 2002). Il a également été montré *in vitro* qu'*Aspergillus fumigatus* pouvait sécréter des facteurs capables d'endommager les cellules épithéliales et de ralentir les battements ciliaires (Amitani et al. 1995).

Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense phagocytaire mise en jeu par l'hôte vis-à-vis des conidies inhalées (Schaffner et al. 1982). L'élimination des conidies par les macrophages est hautement efficace, avec 90% des conidies éliminées en 30 heures (Schaffner et al. 1983). Les macrophages sont capables d'éliminer aussi bien des conidies dormantes que des conidies en germination (Balloy and Chignard 2009). Les monocytes et les polynucléaires neutrophiles sont ensuite rapidement recrutés sur le site de l'infection. Après germination des conidies en filaments, ce sont les polynucléaires neutrophiles qui prédominent pour lutter contre les filaments et empêcher le développement d'une infection invasive fongique (Schaffner et al. 1982). Les cellules Natural Killer (NK) sont recrutées rapidement au niveau pulmonaire suite à la production de chemokines dans l'aspergillose expérimentale et jouent également un rôle important dans la défense de l'hôte (Morrison et al. 2003).

La NADPH oxydase des cellules phagocytaires est essentielle pour défendre l'hôte contre l'aspergillose, comme cela a été démontré chez des patients atteints de granulomatose septique chronique, caractérisée par un déficit héréditaire de NADPH oxydase. Les patients atteints de granulomatose septique chronique font de manière répétée des infections bactériennes et fongiques et l'aspergillose invasive pulmonaire est une cause majeure de décès chez ces patients (Segal et al. 1998). L'activation de la NADPH oxydase permet de transformer l'oxygène en anions superoxydes et donc de générer des radicaux oxydants ayant une activité antimicrobienne. Pour les polynucléaires neutrophiles, l'activation de la NADPH oxydase est couplée à l'activation de protéases antimicrobiennes séquestrées dans des granules primaires (Reeves et al. 2002). La NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles est activée par les constituants de la membrane cellulaire fongique et est nécessaire à l'altération des filaments mycéliens. En revanche, l'inhibition de la germination des conidies par les polynucléaires neutrophiles ne dépend pas de l'action de la NADPH oxydase mais de celle de la lactoferrine, capable de séquestrer le fer nécessaire à la croissance microbienne. Ceci illustre la spécificité de l'activité antifongique des polynucléaires neutrophiles selon le stade de croissance du microorganisme à éliminer (Zarembek et al. 2007). En parallèle de son activité de défense de l'hôte, la NADPH oxydase modère la réaction inflammatoire induite par les constituants de la membrane cellulaire fongique (Morgenstern et al. 1997, Romani et

al. 2008), cette fonction est probablement en partie liée à l'activation du catabolisme du tryptophane (Romani et al. 2008).

De nombreux PRR (Pattern Recognition Receptors) sont mis en jeu dans la défense innée de l'hôte au cours de l'aspergillose invasive. L'action combinée de ces différentes familles de récepteurs est essentielle à la reconnaissance et l'élimination d'*A. fumigatus* (Figure 3, p28).

Parmi les PRR sécrétés capables d'interagir avec *A. fumigatus*, on distingue la pentraxine 3 et les collectines.

- La pentraxine 3 est une molécule sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules endothéliales et les cellules dendritiques, en réponse à des stimuli inflammatoires. La pentraxine 3 favorise la reconnaissance des conidies aspergillaires par les macrophages de l'hôte (Garlanda et al. 2002).
- Les collectines impliquées dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* incluent les protéines A et D du surfactant (SP-A et SP-D), produites par les pneumocytes de type II et les cellules de Clara. Il a été montré *in vitro* que la liaison de SP-A et SP-D aux conidies d'*A. fumigatus* augmente la capacité des macrophages et des polynucléaires neutrophiles à les phagocyter et à les éliminer (Balloy and Chignard 2009). La MBL, ou Mannose Binding Lectin, est une collectine sérique qui est capable de se lier aux conidies d'*A. fumigatus in vitro* (Neth et al. 2000).

Parmi les PRR membranaires capables d'interagir avec *A. fumigatus*, on distingue DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non integrin) et la Dectine 1.

- Le DC-SIGN est un récepteur de type lectine essentiellement exprimé par les cellules dendritiques. Il facilite la liaison de ces cellules aux conidies aspergillaires et leur internalisation (Serrano-Gomez et al. 2004).
- La Dectine 1 est un récepteur transmembranaire exprimé par les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, qui reconnaît les beta 1-3 glucanes, composants majeurs de la paroi cellulaire fongique. La Dectine 1 est reconnue comme étant un récepteur essentiel de la défense innée contre *A. fumigatus*, dont les conidies gonflées et en germination sont riches en beta 1-3 glucane (Steele et al. 2005).

Les autres PRR vont induire des signaux intracellulaires et déclencher une réponse inflammatoire, ce qui va renforcer la défense innée et initier la défense adaptative. Parmi ce type de PRR, on inclue les TLRs mais aussi la Dectine 1, du fait de son interaction avec les TLRs.

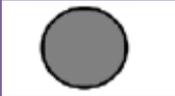
- Les cellules épithéliales respiratoires, les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles expriment tous les TLRs, à l'exception du TLR3, qui n'est pas exprimé par les polynucléaires neutrophiles. Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont

généralement localisés au niveau de la membrane cellulaire alors que les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont plutôt dans les compartiments intracellulaires, comme les endosomes. Cependant, la distribution des TLRs est variable, ainsi, par exemple, le TLR4 est généralement exprimé au niveau intracellulaire dans les cellules épithéliales respiratoires (Balloy and Chignard 2009).

Wang et al (Wang et al. 2001) furent les premiers à évoquer le rôle des TLRs dans la reconnaissance d'*A. fumigatus*. Ensuite, une étude sur des macrophages péritonéaux a montré que le TLR4 était impliqué dans la reconnaissance des conidies alors que le TLR2 reconnaissait à la fois conidies et hyphes (Netea et al. 2003), suggérant ainsi une capacité d'*A. fumigatus* à échapper aux défenses de l'hôte moyennant la présentation de différents phénotypes au cours de son développement (Tableau 2) (Netea et al. 2004). En utilisant une lignée de cellules humaines transfectées par des gènes codants les TLRs 1 à 10, Meier et al (Meier et al. 2003) ont confirmé l'implication des TLR2 et TLR4 ainsi que la production de médiateurs pro-inflammatoires TLR2 et TLR4 dépendants. Plus récemment, des études ont identifié le TLR9 comme étant un PRR important dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* (Ramirez-Ortiz et al. 2008, Ramaprakash et al. 2009).

- La Dectine 1 va interagir avec les TLRs et moduler la réponse immune. Elle coopère tout particulièrement avec le TLR2 dans l'induction de médiateurs inflammatoires par les macrophages exposés à *A. fumigatus* (Gersuk et al. 2006).

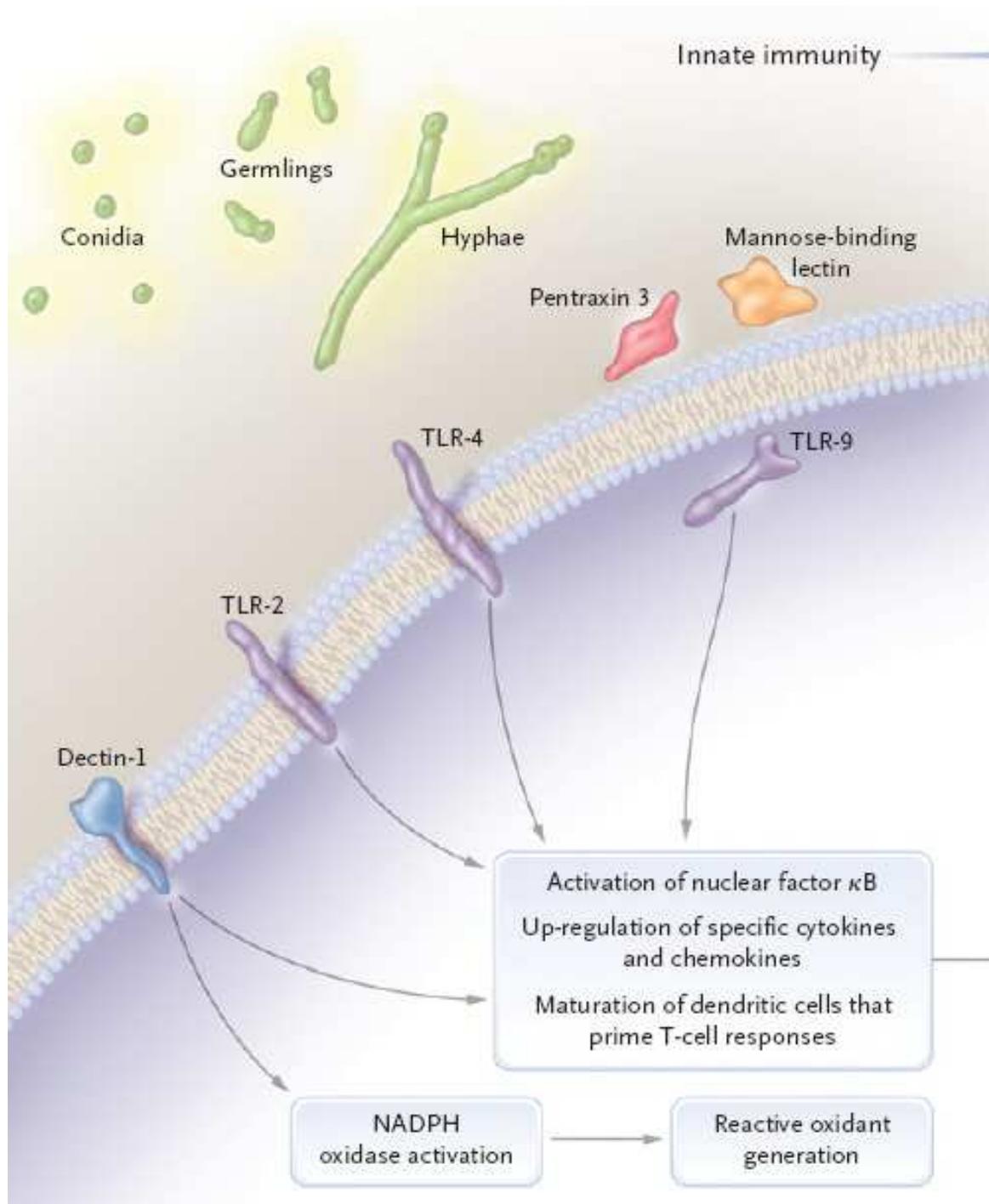
Tableau 2 : Défense innée vis-à-vis des différents phénotypes d'*A. fumigatus* (Balloy and Chignard 2009) .

	Conidie dormante	Conidie gonflée	Conidie germante	Hyphe
				
<b>Reconnaissance</b>	DC-SIGN ?	Dectine1, TLR2, TLR4, DC-SIGN	Dectine1, TLR2, TLR4	Dectine1, TLR2, TLR4
<b>Phagocytose</b>	MA, PNN, CE	MA, PNN		
<b>Mort intracellulaire</b>		MA, PNN, CE ?		
<b>Mort extracellulaire</b>			PNN	PNN

MA : macrophages alvéolaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; CE : cellules épithéliales

Figure 3. Réponse immunitaire lors de l'inhalation de conidies aspergillaires (Segal 2009).

Les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sont les premières défenses pulmonaires de l'hôte rencontrées par les conidies inhalées. Les PRR comme les TLRs, la Dectine 1 et la pentraxine 3 reconnaissent des motifs fongiques spécifiques. La reconnaissance de ces motifs par les PRR généralement initie la production de cytokines et de chemokines qui activent et recrutent les cellules phagocytaires professionnelles. La NADPH oxydase peut être activée par la Dectine 1 mais aussi par des PRR comme le TLR4.



## *Immunité acquise*

- Réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T

L'activation des PRR induit généralement la maturation de cellules présentatrices d'antigènes ce qui amorce la réponse des cellules T. L'interféron  $\gamma$  est la principale cytokine produite par les lymphocytes T helper (Th) 1 et stimule l'immunité cellulaire. Dans les modèles d'aspergillose expérimentale, la différenciation des cellules T en lymphocytes CD4<sup>+</sup> survient par étapes. D'abord en réponse à des signaux TLR-indépendants de différenciation Th1 au niveau pulmonaire, puis au niveau des nodules lymphatiques suite à une activation TLR-dépendante (Rivera et al. 2006). Dans l'aspergillose murine, l'augmentation de la réponse Th1, par administration ou déplétion de cytokines spécifiques, potentialise les défenses antifongiques de l'hôte (Segal et al. 2006).

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> producteurs d'IL-17 constituent un sous-groupe distinct de lymphocytes T helper qui sont impliqués dans les maladies auto-immunitaires (Kastelein et al. 2007). L'IL-17 stimule la production de facteur de croissance myélopoïétique spécifique ainsi que de cytokines et de chemokines qui contribuent au recrutement des polynucléaires neutrophiles. Mais, paradoxalement, l'IL-17 peut altérer la défense de l'hôte au cours de l'aspergillose (Zelante et al. 2007, Romani et al. 2008). L'équilibre entre l'induction d'une réponse cytokinique spécifique et le développement d'une population spécifique de lymphocyte T module l'intensité et la nature de la réponse immunitaire générée vis-à-vis des espèces aspergillaires.

- Cytokines immunomodulatrices

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de facteurs de croissance intervient dans l'efficacité de la réponse de l'organisme à éliminer les conidies fongiques. Le profil cytokinique induit durant une infection murine avec *A. fumigatus* dépend du statut de l'immunité de la souris (immunodéprimée ou immunocompétente) et du type d'immunosuppression. Généralement, chez les souris immunocompétentes, on retrouve les cytokines et chimiokines suivantes au niveau pulmonaire : TNF $\alpha$ , IL-12, IFN $\gamma$ , IL-18, IL-6, IL1 $\beta$ , IL-10, GM-CSF, MIP1 $\alpha$ , MCP1, MIP2 (Duong et al. 1998, Balloy et al. 2005). Chez les souris rendues neutropéniques ou traitées par corticoïdes, les profils cytokiniques observés sont différents (Duong et al. 1998, Balloy et al. 2005).

Le TNF $\alpha$  est une cytokine sécrétée principalement par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales pulmonaires. Plusieurs études ont démontré l'importance de cette cytokine dans la défense de l'hôte contre *A. fumigatus*. La production du TNF $\alpha$  est observée après administration intrapulmonaire de conidies d'*A. fumigatus* (Balloy et al. 2005) et sa neutralisation mène à une augmentation de la charge fongique, une diminution du recrutement des polynucléaires neutrophiles et une augmentation de la mortalité (Mehrad et al. 1999a). Les effets bénéfiques de l'administration de TNF $\alpha$  *in vivo* seraient dus à la capacité de cette cytokine à augmenter la fongicidie des polynucléaires neutrophiles et l'activité phagocytaire des macrophages.

Le GM-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique, utilisé pour traiter les neutropénies, puisqu'il favorise la prolifération des cellules myéloïdes et leur différenciation en thrombocytes, polynucléaires neutrophiles, macrophages, monocytes, éosinophiles et basophiles. Le GM-CSF a été mis en évidence dans les poumons de souris infectées par *A. fumigatus* et sa neutralisation par des anticorps spécifiques a induit une diminution du recrutement des polynucléaires neutrophiles et une augmentation de la charge fongique (Schelenz et al. 1999).

L'IL-10 est une cytokine pléiotrope produite essentiellement par les lymphocytes Th2 mais aussi par les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les souris présentant des taux sériques élevés d'IL-10 sont plus à risque de développer une aspergillose invasive et sont protégées par la neutralisation de cette cytokine (Cenci et al. 1998). Il a également été montré que les souris déficientes en IL-10 présentaient un plus faible risque de développer une aspergillose invasive et qu'en cas d'infection systémique à *A. fumigatus*, les charges fongiques étaient faibles (Clemons et al. 2000).

L'IL-8, aussi connue sous CXCL-8, est une chimiokine produite par les cellules du système pulmonaire inné comme les cellules épithéliales, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, mais aussi par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les lymphocytes T. L'IL-8 est un médiateur inflammatoire puissant du fait de ses effets sur les polynucléaires neutrophiles (fort effet chimiotactique, expression de molécules d'adhésion, dégranulation des lysosomes, production de radicaux oxygénés, libération d'enzymes) et des multiples stimuli induisant sa production. Plusieurs études ont montré la production d'IL-8 aussi bien par des cellules respiratoires humaines stimulées par des protéases sécrétées par *A. fumigatus* (Balloy et al. 2008) ou par des filaments fongiques que par des polynucléaires neutrophiles stimulés par des antigènes d'*A. fumigatus* (Braedel et al. 2004).

- Immunité acquise humorale dans l'aspergillose invasive

Bien que quelques études suggèrent un rôle protecteur des anticorps, il s'avère que l'immunité humorale ne joue pas un rôle important lors de l'invasion fongique (Casadevall 1995). Toutefois, les anticorps peuvent intervenir par opsonisation et /ou activation du complément (Polonelli et al. 2000). Leur présence, parfois utile dans un but diagnostique, traduit plus l'immunisation que l'immunité.

### c)Prise en charge et prévention de l'aspergillose invasive

#### *Prise en charge thérapeutique de l'aspergillose invasive*

Le voriconazole est recommandé comme traitement de première intention en cas d'aspergillose invasive (Walsh et al. 2008). Le voriconazole a en effet démontré une efficacité supérieure aux formes lipidiques de l'amphotéricine B en première intention et a été associé à un taux de survie plus élevé (71% vs 58%) dans un essai randomisé (Herbrecht et al. 2002). Le dosage du voriconazole au cours du traitement est recommandé, afin d'éviter échec thérapeutique et toxicité médicamenteuse (Smith et al. 2006a, Pascual et al. 2008). Afin d'éviter des interactions médicamenteuses dues à l'inhibition du cytochrome P-450 et en particulier de l'isoenzyme CYP3A4, les posologies des autres molécules métabolisées par cette voie doivent être adaptées (cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus etc...) (Kulemann et al. 2005, Marty et al. 2006).

En pratique, les formes lipidiques de l'amphotéricine B sont souvent préférées en cas d'atteinte des sinus, du fait de leur activité contre les espèces aspergillaires mais aussi vis-à-vis des zygomycètes, au moins en attendant les résultats de la culture et de l'histologie (Kontoyiannis et al. 2005). L'itraconazole et le posaconazole, autres dérivés azolés, ou les échinocandines, qui inhibent la synthèse des beta-glucanes, sont des alternatives possibles de traitement en 2<sup>ème</sup> intention. Peu de données cliniques sont disponibles concernant la place des associations médicamenteuses dans le traitement de l'aspergillose invasive.

La durée du traitement recommandée est d'au moins 6 à 12 semaines (Walsh et al. 2008). Le traitement doit être maintenu tant que le patient est immunodéprimé et jusqu'à disparition des lésions. De plus, chez un patient ayant un antécédent d'aspergillose invasive, le traitement antifongique doit être repris lors des épisodes d'immunosuppression ultérieurs (nouvelle cure de chimiothérapie cytotoxique, nouvelle allogreffe), afin d'éviter une reprise de l'infection (Walsh et al. 2008).

Lorsque cela est possible, une diminution des doses d'immunosuppresseurs (en particulier des corticostéroïdes) est recommandée et des traitements additionnels par facteurs de croissance des lignées myéloïdes doivent être envisagés chez les patients neutropéniques développant une infection sévère telle l'aspergillose invasive (Smith et al. 2006b).

### *Prévention de l'aspergillose invasive*

La prévention de l'aspergillose invasive repose d'une part sur la surveillance environnementale afin de réduire l'exposition des patients aux conidies présentes dans l'air (Sullivan et al. 2001). Les systèmes de traitement de l'air (filtres de haute efficacité, High Efficacy Particulate Air Filtration (HEPA), flux laminaire, haut renouvellement d'air, pression positive) doivent être surveillés selon une démarche globale d'assurance qualité. Les conditions de surveillance mycologique de l'environnement en milieu hospitalier ne sont pas encore définies avec précision, que ce soient les modalités de prélèvement, les conditions de culture ou l'interprétation des résultats en fonction des locaux prélevés. Plusieurs établissements de santé ont rédigé des procédures locales, mais aucune standardisation ni aucun consensus n'existe à ce jour. Toutefois la surveillance de la contamination mycologique environnementale associe généralement l'analyse de prélèvements d'air, qui informent sur la présence de spores aéroportées au moment du recueil, et de prélèvements de surfaces, témoins de la sédimentation des spores fongiques. Cette surveillance de la contamination fongique environnementale doit être constante, rigoureuse et renforcée en cas de travaux. En effet, tous travaux, qu'ils soient importants ou limités, s'accompagnent d'une remise en suspension de spores fongiques dans l'air et représentent donc des circonstances associées à un risque aspergillaire élevé. Tous les travaux doivent faire l'objet d'une déclaration afin de mettre en place des mesures de protection. L'efficacité de ces mesures doit être évaluée par un protocole de surveillance de la pollution fongique environnementale coordonné par le Comité Local de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLLIN). Un dialogue avec les différents services concernés (services cliniques, laboratoires de mycologie et d'hygiène, services techniques, services administratifs) est indispensable et doit s'accompagner d'une information des responsables de chantier.

D'autre part, l'administration de traitements antifongiques prophylactiques chez les patients à haut risque est possible. Dans ce cas, le posaconazole, dérivé azolé de spectre d'activité large et uniquement disponible par voie orale, a démontré son efficacité en prophylaxie chez les patients neutropéniques et ceux atteints de GVHD sévères (Cornely et al. 2007, Ullmann et al. 2007). Cependant, l'utilisation systématique d'une prophylaxie antifongique chez tous les patients à risque reste controversée. En effet, outre le risque d'interactions médicamenteuses et le coût généré, quelle thérapie curative mettre en place chez un patient développant une aspergillose sous posaconazole? Par ailleurs, existe-il un risque de sélectionner des espèces fongiques résistantes au posaconazole? Quid du risque de négativer les premiers signes biologiques d'une aspergillose débutante (antigène galactomannane par exemple) ? Le rapport bénéfice/risque de la mise en place d'une prophylaxie systématique chez tous les patients à risque *versus* une approche préemptive avec mise en place d'un traitement précocement chez tous les patients présentant des signes biologiques ou radiologiques, reste donc encore en débat.

## *Perspectives*

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques sera facilité par la connaissance des caractéristiques de l'hôte mais aussi du pathogène impliqué dans le développement de la maladie. Une meilleure compréhension de l'ensemble des voies de l'immunité innée et cellulaire seront peut-être à l'origine de stratégies immunomodulatrices voire de développement de vaccins (Segal et al. 2006).

Ainsi, les travaux de von Bernuth et al. (von Bernuth et al. 2008) montrent que les enfants avec un déficit autosomal récessif de MyD88, facteur de différenciation myéloïde présent en aval des cascades de signalisation d'une grande majorité des TLRs, souffrent d'infections bactériennes récidivantes graves alors qu'ils sont par ailleurs en bonne santé et ont une résistance normale aux autres pathogènes. Ces résultats suggèrent que des voies indépendantes des TLRs seraient suffisantes pour assurer une protection efficace. Par ailleurs, deux études récentes se sont intéressées à l'activité immunomodulatrice des échinocandines, capables d'augmenter la présentation des beta-1,3-glucanes, et donc l'activation de PRR comme la Dectine 1. Ces résultats pourraient être exploités sur le plan clinique et thérapeutique. Les travaux de Hohl et al (Hohl et al. 2008) montrent en effet que la caspofungine augmente la réponse inflammatoire vis-à-vis des filaments d'*A. fumigatus* et ceci à des doses compatibles avec une utilisation en thérapeutique.

Une meilleure connaissance des polymorphismes génétiques de l'hôte intervenant dans l'immunité innée peuvent influencer de manière non négligeable le risque de développer une aspergillose invasive lors d'une période d'immunosuppression. Par exemple, Bochud et al. (Bochud et al. 2008), ont mis en évidence que l'haplotype de TLR4 du donneur en cas d'allogreffe intervenait dans le risque de développer une aspergillose invasive. De la même façon, Zaas et al (Zaas et al. 2008) ont montré une influence du polymorphisme allélique du plasminogène dans le risque de développer une aspergillose invasive en cas de greffe de moelle osseuse. La connaissance de ces facteurs génétiques est une voie d'avenir importante afin de mieux cibler les traitements prophylactiques, de guider la sélection des donneurs et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Enfin, une meilleure compréhension des caractéristiques génétiques et biochimiques fongiques semble mener à des stratégies thérapeutiques, comme l'inhibition de la molécule Hsp90 (Cowen and Lindquist 2005) ou la calcineurine (Steinbach et al. 2007) . Par ailleurs, la découverte récente qu'*A. fumigatus* a un cycle de reproduction sexué apporte de nouveaux éléments sur son patrimoine génétique et ouvre ainsi des nouvelles possibilités d'analyse de sa pathogénicité (O'Gorman et al. 2009). De plus, des analyses génomiques montrent une très grande diversité au sein des différentes espèces aspergillaires (Fedorova et al. 2008), ce qui par comparaison des génomes entre les espèces pathogènes et non pathogènes, devrait permettre l'identification de gènes de virulence pouvant être utilisés pour le développement d'agents thérapeutiques.

## 2.B. Exemple de mécanisme allergique : alvéolites allergiques extrinsèques

### a)Alvéolites allergiques extrinsèques : pathologies principales, manifestations cliniques et critères diagnostiques

#### *Pathologies principales et agents étiologiques*

Les pneumopathies d'hypersensibilité, ou alvéolites allergiques extrinsèques, sont des pneumopathies aiguës ou subaiguës pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire chronique. Elles résultent de l'inhalation chronique de quantités élevées de substances antigéniques, le plus souvent organiques, parfois chimiques.

Initialement, ces maladies étaient associées au monde agricole et particulièrement à l'exposition à des poussières de foin, de pailles ou de grains moisiss lors de la distribution des fourrages, d'où le terme de maladie de Poumon de Fermier (Pepys 1969). Cette forme de pneumopathie d'hypersensibilité reste la plus fréquente mais, progressivement, de multiples autres formes ont été décrites, dont les dénominations dépendent de l'antigène en cause, du réservoir antigénique ou des circonstances étiologiques. L'identification de nouvelles étiologies a permis d'établir que les pneumopathies d'hypersensibilité peuvent se rencontrer dans la plupart des professions, et qu'elles peuvent aussi atteindre les personnes dans leur domicile. En effet, les travaux de Pepys au début des années 1960 (Pepys et al. 1963) avaient montré qu'un nombre limité de substances était susceptible de provoquer une pneumopathie d'hypersensibilité, essentiellement des actinomycètes thermophiles (*Sacchropolyspora rectivirgula*) et quelques moisissures. Depuis, de nombreuses autres espèces ont été mises en cause, principalement des moisissures du genre *Aspergillus* et de l'ordre des mucorales.

Les *Aspergillus* sont impliqués dans les pneumopathies d'hypersensibilité professionnelles d'origine agricole, par exemple le poumon de compost et le poumon des ouvriers du tabac, mais aussi dans des pneumopathies d'hypersensibilité professionnelles non agricoles, comme la maladie des climatiseurs et des humidificateurs, ainsi que dans des pneumopathies d'hypersensibilité d'origine domestique. Les *Penicillium*, qui sont utilisés dans la fabrication des fromages et des saucissons peuvent provoquer des pneumopathies d'hypersensibilité d'origine professionnelle (Campbell et al. 1983). Les mucorales peuvent être des agents étiologiques du poumon des ouvriers du paprika et de la maladie des scieurs de bois (Hedenstierna et al. 1986). Les levures sont également capables de provoquer des pneumopathies d'hypersensibilité : *Trichosporon cutaneum* est l'agent étiologique spécifique de la fièvre d'été au Japon, des levures du genre *Candida*, *Geotrichum* et *Rhodotorula* ont été décrites comme agents étiologiques de pneumopathies d'hypersensibilité liées à l'utilisation de climatiseurs, d'humidificateurs ou de saunas. Les macromycètes peuvent aussi provoquer des pneumopathies d'hypersensibilité chez les personnes travaillant dans les champignonnières (Saikai et al. 2002). *Mycobacterium immunogenum* est suspecté d'être un agent étiologique de pneumopathies d'hypersensibilité professionnelles dues à l'exposition des fluides de coupe utilisés dans la métallurgie (Rosenman 2009). Le rôle des actinomycètes, qui furent les premiers agents décrits pour les pneumopathies d'hypersensibilité, est toujours

d'actualité, en particulier chez les professions manipulant des végétaux en décomposition (poumon de compost) ou de la canne à sucre (bagassose). Enfin, certaines protéines animales sont impliquées dans le poumon d'éleveur d'oiseaux mais aussi dans d'autres alvéolites, par exemple, dans les formes du poumon de fromager liées à des antigènes d'acariens, ou chez les travailleurs manipulant des déjections de rongeurs.

Nombreux sont les facteurs, tels que les beta-glucanes, les particules ultrafines, les composés organiques volatiles microbiens, les mycotoxines, l'ergostérol et autres composants bioactifs, pouvant affecter le système immunitaire et moduler la réponse vis-à-vis des antigènes inhalés. Ainsi, les pneumopathies d'hypersensibilité peuvent résulter de l'inhalation simultanée ou séquentielle de plusieurs facteurs de nature diverse. Par exemple, il a été montré que l'exposition préalable aux endotoxines renforce la réponse lors d'expositions ultérieures aux spores fongiques. Cependant, toutes les substances inhalées ayant des propriétés antigéniques ne sont pas responsables de pneumopathies d'hypersensibilité. En effet, elles doivent présenter un certain nombre de caractéristiques générales qui les distinguent, par exemple, de celles des antigènes impliqués dans les réactions d'hypersensibilité immédiate comme l'asthme (Pepys 1994). Ces caractéristiques incluent leur taille, leur solubilité, leur forme, leur composition et leur capacité à provoquer des réactions inflammatoires non spécifiques et une réaction immunitaire spécifique (Salvaggio 1994, Selman and Vargas 1998). Les spores qui présentent ces antigènes ont une taille habituellement inférieure à 5µm (*Aspergillus*, *Penicillium*) et peuvent de ce fait atteindre les voies aériennes distales et les alvéoles, à partir desquelles l'épuration lymphatique favoriserait la réponse immunitaire humorale (Kaltreider et al. 1977). Par opposition, les antigènes responsables d'asthme allergique sont généralement de taille plus élevée et se déposent dans les voies aériennes proximales où ils peuvent induire une réaction immunologique IgE médiée chez les sujets atopiques. Cependant, cela reste très schématique puisque des substances de très petites tailles peuvent se déposer au niveau proximal et qu'un même antigène peut parfois induire les deux types de réponse (Dalphin 2003).

L'aspect quantitatif et le mode d'exposition sont également importants. En milieu agricole, plusieurs études ont permis d'observer un lien entre le risque de développer une maladie du Poumon de Fermier et la concentration en micro-organismes : les agriculteurs atteints d'une maladie du Poumon de Fermier sont exposés à des concentrations importantes, plusieurs heures par jour, plusieurs jours par semaine, et pendant plusieurs semaines (Kotimaa et al. 1984, Dalphin et al. 1991, Malmberg et al. 1993, Reboux et al. 2001). Le caractère chronique de l'exposition semble obligatoire, à la différence de l'*organic dust toxic syndrome*, qui survient après une exposition massive et inhabituelle.

## *Epidémiologie*

Les pneumopathies d'hypersensibilité font partie des maladies orphelines. L'analyse épidémiologique des pneumopathies d'hypersensibilité, en particulier l'évaluation de leur prévalence, est limitée par les difficultés suivantes (Dalphin 2003):

- Une grande diversité des agents étiologiques potentiels, dont la liste continue de s'accroître.
- La fréquence de la maladie varie d'un pays à l'autre, et dépend des conditions climatiques et géographiques, de la saison, des coutumes locales, des conditions socio-professionnelles et du tabagisme des populations considérées.
- De grandes différences dans la classification des maladies respiratoires des fermiers par des médecins de différents pays européens (Farebrother et al. 1985).

Une majorité des études utilisées pour évaluer la fréquence de la maladie sont transversales. Toutes ces études utilisent un questionnaire pour obtenir des données sur l'exposition et les symptômes. Les questionnaires sont utilisés seuls ou le plus souvent en association avec des investigations complémentaires (radiologie, exploration fonctionnelle respiratoire, précipitines sériques).

Dans le cas de la maladie du Poumon de Fermier, provoquée par l'inhalation, pendant la période hivernale, de microorganismes présents dans les poussières de foin, de pailles ou de graines moisies, la prévalence dépend des types d'agriculture, des variables géographiques et des pratiques agricoles (Reboux et al. 2006). Dans les régions d'élevage situées en zone tempérée ou froide, la plupart des études épidémiologiques indiquent une prévalence qui se situe entre 2 et 4.5% de la population agricole. Des valeurs extrêmes de plus de 10% sont rapportées dans la région de Dafeng en Chine (Tao et al. 1988). La prévalence de la maladie du Poumon de Fermier chez les agriculteurs du Doubs est égale à 1.4% (Dalphin et al. 1993). En Finlande en 1980, l'incidence annuelle standardisée des cas de maladie du Poumon de Fermier conduisant à une hospitalisation était de 5/10 000 agriculteurs (Terho et al. 1983). En Suède, l'incidence des cas de maladie du Poumon de Fermier diagnostiqués à la suite d'un bilan hospitalier est évaluée à 2-3/10 000 sujets par an (Malmberg et al. 1988). La plupart des cas de maladie du Poumon de Fermier se déclarent pendant la période de stabulation du bétail. Le nombre de nouveaux cas de maladie du Poumon de Fermier diagnostiqués est le plus élevé à partir des mois de Janvier et Février, ce qui correspond à la période où la prolifération des microorganismes est maximale (Roussel et al. 2004). Deux études scandinaves rapportent également une prédominance de cas de maladie du Poumon de Fermier pendant la saison hivernale, avec un nombre maximal de cas en Avril et minimal en Octobre (Terho et al. 1987, Rask-Andersen 1989).

### *Facteurs promoteurs et protecteurs*

Parmi les sujets exposés à des quantités élevées d'antigènes susceptibles de provoquer une pneumopathie d'hypersensibilité, seulement 5 à 10% développent la maladie. En revanche, un pourcentage plus élevé développe des réactions humorales (présence de précipitines sériques) et cellulaires (alvéolite lymphocytaire dans le lavage broncho-alvéolaire), sans pour autant développer la maladie (Dalphin 2003). Cela suggère la mise en jeu de facteurs promoteurs et protecteurs de la maladie.

- Facteurs de risque individuels et génétiques

Plusieurs travaux ont suggéré des liens entre haplotype HLA et pneumopathie d'hypersensibilité avec une sur-représentation d'HLA DR7 chez les éleveurs de pigeon dans une population mexicaine (Selman et al. 1987), d'HLA B8 chez des sujets caucasiens atteints de la maladie du Poumon de Fermier ou de pneumopathies aviaires (Flatherty et al. 1975, Rittner et al. 1975) et d'HLA DQw3 dans la fièvre d'été au Japon (Ando et al. 1989).

Des études plus récentes étudiant les polymorphismes génétiques de gènes clés suggèrent la mise en jeu de variants du promoteur  $TNF\alpha^{-308}$  chez des patients atteints de la maladie du Poumon d'éleveurs d'oiseaux, associé à une surproduction de  $TNF\alpha$  (Camarena et al. 2001); de variants de l'allèle CD14/-159, associé à une fonction pulmonaire diminuée chez les agriculteurs exposés aux endotoxines (LeVan et al. 2005); et des variants du gène TAP (Transporter associated with antigen processing)1, associé à un risque supérieur de développer une pneumopathie d'hypersensibilité (Aquino-Galvez et al. 2008).

- Infection virale concomitante

De nombreux patients souffrant de pneumopathies d'hypersensibilité rapportent des symptômes initiaux de type infection respiratoire virale lors du premier épisode de la maladie. De plus, les antigènes viraux sont plus exprimés dans les tissus pulmonaires des patients atteints de pneumopathies d'hypersensibilité que chez les sujets sains (Dakhama et al. 1999). Des tests chez la souris ont également montré une réponse exacerbée à *S. rectivirgula* en cas d'infection concomitante par le Sendai virus (Cormier et al. 1994). Le mécanisme physiopathologique en cause semblerait être une surexpression de la molécule CD86 chez les cellules présentatrices d'antigènes et donc, des interactions augmentées avec le CD28 des lymphocytes T, ce qui est une étape clé de l'activation et du recrutement lymphocytaire.

- Nicotine

L'effet protecteur de la cigarette, suggéré par une moindre fréquence des pneumopathies d'hypersensibilité chez les fumeurs, a été confirmé par plusieurs études. Plusieurs explications ont été proposées : le tabac semble réduire la réponse humorale aux agents inhalés, altère la cascade de réactions cytokiniques et surtout, réduit l'activation macrophagique (Anderson et al. 1988, McCrea et al. 1994, Israel-Assayag et al. 1999). L'altération de l'efficacité phagocytaire des macrophages alvéolaires est responsable d'une moindre production de cytokines comme l'IL-1 et le TNF (Yamaguchi et al. 1993, McCrea et al. 1994).

## *Manifestations cliniques et critères diagnostiques*

Les pneumopathies d'hypersensibilité réalisent histologiquement une infiltration cellulaire inflammatoire et granulomateuse de l'interstitium et des espaces aériens terminaux. Les patients atteints de pneumopathies d'hypersensibilité peuvent présenter une grande variété de symptômes et d'anomalies fonctionnelles ou radiologiques qui dépendent à la fois du stade auquel la maladie est diagnostiquée ainsi que du type et du mode d'exposition antigénique. Plusieurs classifications cliniques ont été proposées mais celle décrivant trois présentations cliniques (aiguë, subaiguë et chronique) est la plus utilisée (Richerson et al. 1989, Dalphin 2003, Lacasse Y et al. 2004, Girard et al. 2009).

La présentation aiguë réalise un syndrome respiratoire pseudogrippal qui associe une toux habituellement sèche, une dyspnée d'intensité variable, une fébricule ou une fièvre, et un panel de symptômes inconstants : céphalée, arthralgie, myalgie, douleurs thoracique, photophobie, obstruction nasale. Ces symptômes surviennent de façon semi-retardée (4-10 heures) après contact antigénique. Quand l'exposition persiste, les symptômes récidivent sans phénomène de tolérance. Ils ont tendance à s'accroître, et s'accompagnent d'une altération de l'état général avec asthénie marquée, anorexie et amaigrissement. La forme subaiguë est dominée par la dyspnée qui s'aggrave progressivement sur plusieurs semaines. La toux peut s'accompagner d'une expectoration. La relation temporelle avec l'exposition antigénique est moins évidente. L'atteinte de l'état général est marquée et peut dominer le tableau : anorexie, asthénie et amaigrissement sont constants. La forme chronique peut être la conséquence à long terme de l'une ou l'autre des deux premières formes. Elle correspond au stade d'insuffisance respiratoire chronique par fibrose intersticielle diffuse ou par bronchopneumopathie chronique obstructive. Les symptômes sont peu spécifiques : toux, dyspnée, expectorations, oppression thoracique avec sifflements, altération de l'état général sont diversement associés.

Plusieurs recommandations de critères diagnostiques majeurs et mineurs ont été proposées (Richerson et al. 1989, Cormier et al. 1996, Schuyler and Cormier 1997). Les critères diagnostiques proposés ci-dessous ont été adaptés et actualisés à partir de ceux proposés en 1986 par Terho (Terho 1986) et correspondent aux 5 critères majeurs retenus par le GERM "O" P (Groupe d'études et de recherche sur les maladies « orphelines » pulmonaires, site web: <http://germop.univ-lyon1.fr>):

- 1) Preuve d'une exposition antigénique : retenue soit par la présence de précipitines, soit par l'interrogatoire qui retrouve la notion d'une exposition chronique et à des concentrations probablement importantes d'antigènes connus pour être source de pneumopathie d'hypersensibilité, soit éventuellement par des prélèvements aérobiologiques
- 2) Symptômes respiratoires compatibles
- 3) Alvéolite lymphocytaire au lavage broncho-alvéolaire
- 4) Diminution de la diffusion du CO rapportée au volume alvéolaire (coefficient de transfert)
- 5) Imagerie compatible (radiographie ou tomodensitométrie haute résolution).

La première étape de l'investigation d'un patient présentant un syndrome pulmonaire compatible avec une pneumopathie d'hypersensibilité débute par une anamnèse ainsi qu'un examen physique détaillé. L'interrogatoire professionnel ainsi que le questionnaire environnemental recherche un contact étroit avec un antigène potentiel.

La radiographie pulmonaire permet d'exclure d'autres pathologies pouvant imiter une pneumopathie d'hypersensibilité. Cependant, 20% des patients en phase aiguë de la maladie présentent une radiographie pulmonaire normale (Hodgson et al. 1989). La tomодensitométrie (TDM), toujours anormale, permet un diagnostic plus précis que la radiographie standard dans les pneumopathies infiltrantes diffuses. Dans les états aigus et subaigus, l'aspect le plus souvent observé associe une dissémination de micronodules centro-lobulaires à contours mal définis et des opacités en verre dépoli. Dans les formes chroniques, les lésions élémentaires sont des opacités réticulaires, des kystes ou des images d'emphysème, associées à des signes de rétraction. La fréquence respective des lésions en fibrose et d'emphysème dépend du type et du mode d'exposition (Dalphin 2003). Ainsi, en cas d'exposition continue et longue comme c'est le cas dans les pneumopathies domestiques liées aux pigeons, la fibrose prédomine, alors qu'en cas d'exposition intermittente, par exemple dans la maladie du Poumon de Fermier, l'emphysème est plus fréquent.

Des tests fonctionnels pulmonaires font généralement partie du bilan. Dans les formes aiguës et subaiguës, l'exploration fonctionnelle respiratoire révèle un trouble ventilatoire restrictif avec une diminution variable des capacités pulmonaires totales et vitales, une diminution de la compliance pulmonaire et de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO). Cette baisse de la DLCO est l'anomalie fonctionnelle la plus sensible et prédit la désaturation en oxygène à l'effort (Hapke et al. 1968, Cormier et al. 1986). L'existence d'une obstruction bronchique, notamment distale, est commune. Dans les formes chroniques avec dommage pulmonaire séquellaire, on peut observer des profils fonctionnels variables, restrictif par fibrose pulmonaire ou obstructif en cas de maladie broncho-emphysémateuse.

L'analyse cytologique des liquides de lavage broncho-alvéolaire permet de mettre en évidence la présence d'une alvéolite lymphocytaire et d'évaluer le ratio  $CD4^+/CD8^+$ . La présence d'une alvéolite lymphocytaire est retrouvée chez 20 à 50% des sujets exposés non malades mais elle est constante chez les sujets malades, si bien que son absence permet d'éliminer le diagnostic (Lacasse Y et al. 2004). Cependant, si la présence d'une alvéolite lymphocytaire de très forte intensité représente un argument de poids en faveur d'une pneumopathie d'hypersensibilité, elle ne signe pas non plus le diagnostic. Il s'agit d'une anomalie non spécifique retrouvée également dans d'autres pathologies telles que la sarcoïdose, des pneumopathies médicamenteuses, pneumonies à *Pneumocystis jiroveci*, pneumopathies liées aux collagénoses, silicoses, etc...(Semenzato et al. 1990, Lacasse Y et al. 2004). Il était communément admis qu'une prédominance de lymphocytes  $CD8^+$  ainsi qu'un ratio  $CD4^+/CD8^+$  inférieur à 1 étaient en faveur d'une pneumopathie d'hypersensibilité (Trentin et al. 1990). Cependant, des études récentes suggèrent que ce ratio  $CD4^+/CD8^+$  bas serait associé aux formes chroniques de la maladie et retrouvé chez les sujets exposés asymptomatiques

alors qu'une prédominance de CD4<sup>+</sup> et un ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> élevé serait caractéristique des formes aiguës (Lacasse Y et al. 2004, Ismail et al. 2006). Par ailleurs, en plus du stade de la maladie, le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dépendrait également du type et de la dose d'antigènes inhalés (Cormier and Israel-Assayag 2004, Ismail et al. 2006).

La détection des anticorps (IgG spécifiques) peut être réalisée par différentes techniques : double diffusion, immuno-électrophorèse, ELISA, électrosynérèse, western blot (Reboux et al. 2007). Aucune de ces techniques n'est standardisée et les valeurs seuils utilisées varient d'un laboratoire à l'autre. La présence d'une réaction immunologique forte vis-à-vis d'un antigène donné n'indique pas forcément que l'individu a, ou développera la maladie. En effet, seul 1 à 15% des patients exposés aux antigènes impliqués dans les pneumopathies d'hypersensibilité développeront la maladie alors que la majorité auront une réaction immunologique mais resteront asymptomatiques (Cormier et al. 1984, Cormier et al. 1985, Girard et al. 2009). Cependant, la mise en évidence de cette réaction immunologique, dans le bilan d'une pneumopathie d'hypersensibilité, est un critère diagnostique important (Lacasse et al. 2003). Les panels antigènes testés sont souvent adaptés dans chaque centre aux types d'expositions locales, ce qui permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité des résultats (Kawai et al. 1984, Ojanen 1992, Reboux et al. 2001, Lacasse et al. 2003, Roussel et al. 2009a).

## b) Mécanismes physiopathologiques des pneumopathies d'hypersensibilité

L'évènement initial dans la physiopathologie des pneumopathies d'hypersensibilité est la sensibilisation à un antigène inhalé. Après cette première étape de sensibilisation, les expositions suivantes à cet antigène génèreront les signes et les symptômes de la maladie, par la mise en jeu de réactions immunitaires cellulaires et humorales. Les mécanismes d'hypersensibilité de type III, avec dépôts de complexes immuns (classification Gell et Coombs) ont été les premiers identifiés et sont à l'origine de la classification des pneumopathies d'hypersensibilité dans les « maladies à immuns complexes ». Depuis, il a été établi que les réactions inflammatoires et cellulaires jouent également un rôle déterminant dans le développement de granulomes, notamment du fait des mécanismes d'hypersensibilité de type IV (classification Gell et Coombs).

### *Réaction d'hypersensibilité de type III et formation de complexes immuns*

L'inhalation répétée d'antigènes exogènes (antigènes de moisissures, de végétaux ou d'animaux) mène à la production d'anticorps spécifiques de type IgG (et non de type IgE, impliqués dans les réactions d'hypersensibilité de type I, comme l'asthme). Lorsque l'antigène est à nouveau inhalé, il se forme des complexes immuns qui se déposent dans les alvéoles pulmonaires (Figure 4, p45). Ces complexes immuns seront à l'origine de réactions inflammatoires et de fibrose, par activation du complément et mise en jeu de cellules effectrices (Male et al. 2007). En effet, ils sont capables :

- d'interagir directement avec les basophiles et les plaquettes par leur récepteur Fc, ce qui génère la libération d'amines vasoactives.
- de stimuler les macrophages qui vont libérer deux cytokines en particulier : l'IL-1 et le TNF $\alpha$ , tous deux importants dans l'inflammation.
- de fixer le complément, entraînant la libération des fragments C3a et C5a.

### *Réaction d'hypersensibilité de type IV et formation de granulomes*

Suite à la persistance de l'antigène, les macrophages se différencient en cellules épithéloïdes, et fusionnent pour former des cellules géantes. La formation de granulome est induite par l'activation de cellules T, de type Th1, agissant sur les macrophages (Male et al. 2007). Le rôle de chaque cytokine a pu être analysé chez des souris rendues déficientes en une seule cytokine par inactivation génique. Il a ainsi été montré que l'IFN $\gamma$ , et le TNF $\alpha$  sont nécessaires à la formation et au maintien des granulomes (Male et al. 2007).

## *Immunité innée*

Après reconnaissance d'un antigène donné, les cellules inflammatoires s'accumulent dans les poumons des patients et des mécanismes complexes impliquant des interactions, cellules-antigènes, cellules-cellules et cellules-médiateurs inflammatoires, surviennent (Lacasse Y et al. 2004). Lors des pneumopathies d'hypersensibilité, la nature des cellules présentes au niveau pulmonaires reflète le stade de la maladie. Le contact avec l'agent étiologique produit initialement un recrutement de polynucléaires neutrophiles au niveau alvéolaire (Ismail et al. 2006). Ainsi, chez la souris exposée à *S. rectivirgula*, les polynucléaires neutrophiles amplifient la réaction immunitaire et libèrent des facteurs solubles impliqués dans la formation de granulomes, comme l'interféron gamma (Nance et al. 2005). L'élastase, une protéase sérique, est également produite par les polynucléaires neutrophiles. Dans la pneumopathie d'hypersensibilité, cette enzyme destructive et pro-inflammatoire, contribue à l'altération de l'élasticité des fibres et promeut le développement de l'emphysème, présent dans les formes chroniques de la maladie (Lalancette et al. 1993). Les polynucléaires neutrophiles jouent également un rôle dans l'activation des macrophages capables de générer des radicaux libres oxydants, qui altèrent les tissus et font le lit de la fibrose, également retrouvée dans la pneumopathie d'hypersensibilité chronique (Tremblay et al. 1991, Lalancette et al. 1993).

Les macrophages jouent également un rôle important dans la physiopathologie de la pneumopathie d'hypersensibilité. Après exposition aux agents étiologiques, les antigènes solubles se fixent aux IgG spécifiques ce qui active la voie du complément. La formation de la fraction C5 active les macrophages alvéolaires qui relarguent alors de multiples médiateurs pro-inflammatoires dont l'IL-8, RANTES, CCL18, MCP-1 et MIP-1 $\alpha$ , ce qui entretient et amplifie le recrutement et l'activation d'autres macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans les 4 à 6 heures (Gudmundsson et al. 1998b, Gudmundsson et al. 1998a, Gudmundsson and Hunninghake 1999, Israel-Assayag et al. 1999, Fink 2000, Schuyler et al. 2003, Schuyler et al. 2004). Les macrophages humains exposés *in vitro* à *S. rectivirgula* produisent du TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor), de l'IL-1 et de l'IL-6 (Shijubo et al. 1995). Les macrophages de patients atteints de pneumopathie d'hypersensibilité produisent spontanément ces cytokines (Lavolette et al. 1991). Les macrophages de souris exposés à *S. rectivirgula* expriment des taux élevés de TGF $\beta$ , qui en plus d'être une cytokine inflammatoire, induit fortement la synthèse de collagène et la fibrose (Denis and Ghadirian 1992). Les macrophages sont en général considérés comme des cellules présentatrices d'antigènes peu efficaces mais cette fonction est pourtant nettement augmentée en cas de pneumopathie d'hypersensibilité (Israel-Assayag et al. 1999). A la suite du contact avec l'antigène impliqué dans la pneumopathie d'hypersensibilité, les macrophages incorporent les particules antigéniques et les présentent aux lymphocytes, qui seront activés et proliféreront. La molécule d'adhésion intracellulaire de type 1 (ICAM-1) et l'expression des molécules de co-stimulation B7 (CD80 et CD86) sont également augmentées pour les macrophages des patients atteints de pneumopathie d'hypersensibilité ce qui prouve également leur rôle dans l'activation des lymphocytes (Israel-Assayag et al. 1999, Popper et al. 2002).

## *Immunité acquise*

- Réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T

La lymphocytose alvéolaire est une caractéristique majeure des pneumopathies d'hypersensibilité. Les lymphocytes sont les principales cellules impliquées dans la physiopathologie des pneumopathies d'hypersensibilité et représentent 60 à 90% des cellules présentes dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des patients (Godard et al. 1981, Robinson et al. 1987). Les lymphocytes apparaissent en général dans les 24 à 48 heures qui suivent l'exposition antigénique et leur taux reste augmenté longtemps, jusqu'à plusieurs années (Ismail et al. 2006). Leur taux diminue cependant progressivement si le patient n'est plus exposé à cet antigène (Cordeiro et al. 2007). Au cours des pneumopathies d'hypersensibilité, l'alvéolite lymphocytaire n'est pas seulement causée par un afflux massif de cellules et de chemokines, qui influent la progression clinique de la maladie (Cormier and Israel-Assayag 2004), mais aussi par une inhibition des processus apoptotiques lymphocytaires (Laflamme et al. 2003). Des liquides de lavage broncho-alvéolaire riches en lymphocytes peuvent également être observés chez des sujets asymptomatiques exposés. La présence de cette lymphocytose ne signe pas une pneumopathie d'hypersensibilité mais constitue un marqueur d'exposition aux antigènes (Cormier et al. 2004).

Au cours de la pneumopathie d'hypersensibilité, les lymphocytes expriment des marqueurs d'activation. L'IL-2 est une cytokine impliquée dans la prolifération lymphocytaire dont des taux élevés sont retrouvés dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des patients. Une surexpression du récepteur de l'IL-2 (sous unité p75) est également observée sur les lymphocytes CD8<sup>+</sup> des patients (Trentin et al. 1990, Dakhama et al. 1998, Cormier and Israel-Assayag 2004). Ces lymphocytes sont spécifiques de l'antigène en cause et des lymphocytes T mémoires CD45 RO sont retrouvés chez les individus exposés (Suga et al. 1997). CCL-18 est une chemokine produite par les macrophages permettant le recrutement de lymphocytes. Des taux élevés de CCL-18 sont retrouvés dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des patients. CCL-18 est la chemokine la plus abondante durant la phase subaiguë de la maladie, pendant laquelle la lymphocytose atteint un maximum dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire et s'accompagne d'un syndrome inflammatoire net (Pardo et al. 2001).

La production d'IL-1, d'IL-8, de TNF, d'IL-12, d'IL-6, de MCP-1 et de MIP-1 $\alpha$  par les macrophages joue un rôle important dans le développement des pneumopathies d'hypersensibilité en déclenchant la réaction inflammatoire et le recrutement lymphocytaire (Cormier and Israel-Assayag 2004, Ismail et al. 2006). La libération de ces facteurs solubles semble être responsable de la surexpression de la molécule d'adhésion ICAM-1 chez les macrophages des patients, ce qui augmente leur capacité de présentation antigénique (Popper et al. 2002). Le recrutement lymphocytaire est également favorisé par l'augmentation des interactions entre les macrophages, dont les molécules de costimulation B7 (CD80 et CD86) augmentent, et les lymphocytes, qui surexpriment le CD28 (Israel-Assayag et al. 1999).

Bien que les macrophages et les lymphocytes soient principalement retrouvés, d'autres cellules jouent également un rôle important dans la physiopathologie des pneumopathies d'hypersensibilité.

Ainsi, les cellules T NK peuvent influencer le développement de la réponse immune. Ces cellules NK peuvent moduler la sécrétion de l'IL-4 et de l'IFN $\gamma$  (Hwang et al. 2006). Ainsi, dans un modèle murin de la maladie du Poumon de Fermier, il a été montré que les cellules T NK sécrétaient de l'IL-4 tout en diminuant la production d'IFN $\gamma$  par les polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, des cellules NK CD56<sup>+</sup>, retrouvées en grande quantité dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de patients, ont diminué en cas de corticothérapie ou d'éviction de l'antigène en cause (Trentin et al. 1990, Denis et al. 1993, Ratjen et al. 2003).

Les cellules dendritiques, qui constituent les plus efficaces des cellules présentatrices d'antigènes au niveau pulmonaire, jouent probablement un rôle important au cours des pneumopathies d'hypersensibilité (Banchereau and Steinman 1998, Harris and Ronchese 1999, Lambrecht 2001). Les cellules dendritiques participent à l'activation des lymphocytes (Harris and Ronchese 1999). En particulier, les cellules dendritiques de type myéloïde semblent influencer sur la balance Th1/Th2 en faveur d'une orientation Th1, avec, entre autre, production d'IL-1, d'IL-8, de TNF, d'IL-12, d'IL-6, de MCP-1 et de MIP-1 $\alpha$  (Buczowski et al. 2003). Par ailleurs, ces cellules pourraient être impliquées dans la tolérance vis-à-vis d'antigènes habituellement en cause dans la maladie chez des sujets exposés asymptomatiques (Levings et al. 2005, Girard et al. 2009). Le mécanisme conduisant à cette tolérance est encore mal compris mais semble passer par la différenciation de cellules T en cellules T-régulatrices, capables de freiner la prolifération des cellules Th1 activées en libérant deux cytokines dotées de propriétés immunosuppressives, l'IL-10 et le TGF $\beta$  (O'Garra and Vieira 2004).

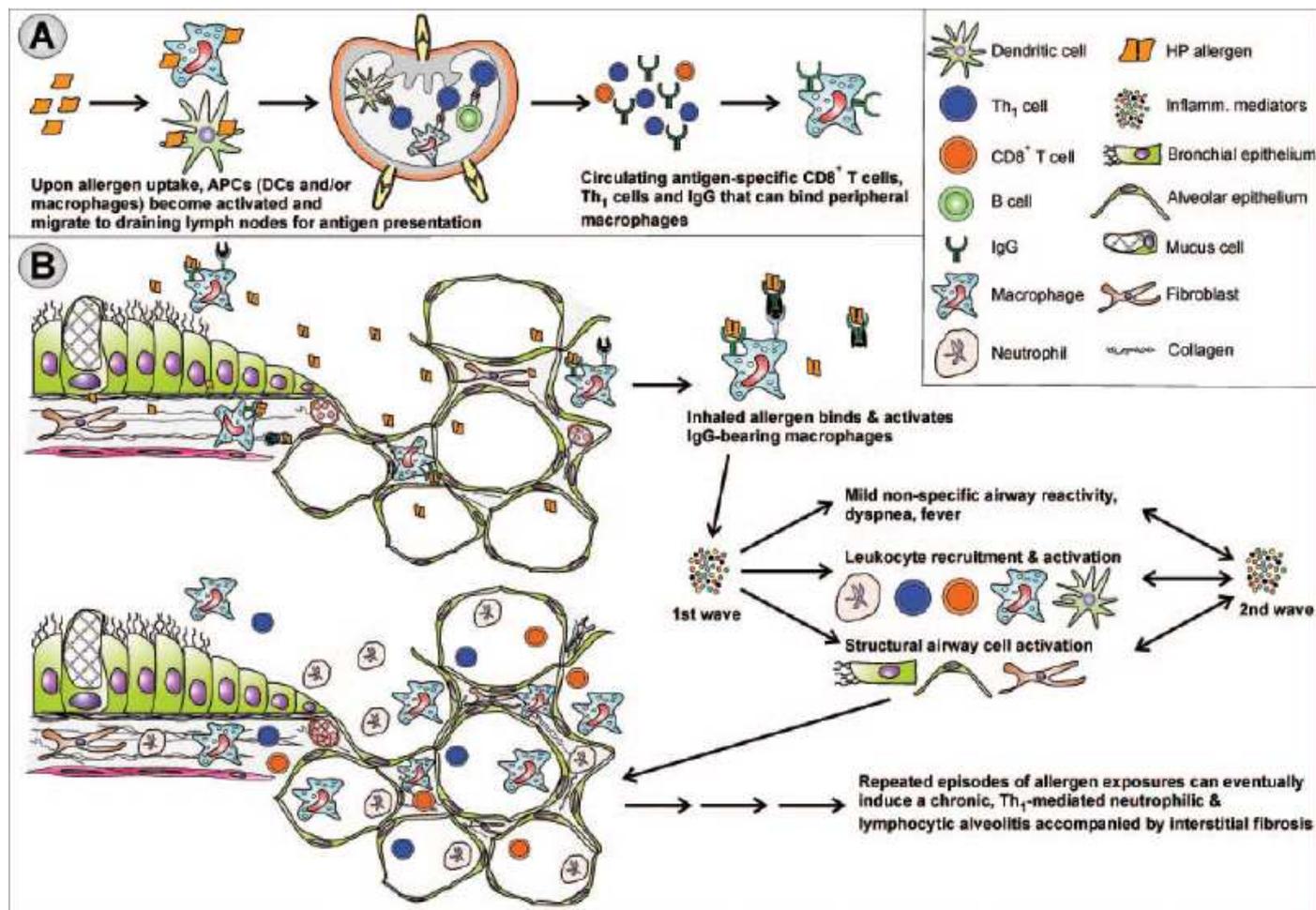
- Immunité acquise humorale

Le type d'anticorps spécifiques produits est de type IgG (et non de type IgE, impliqués dans les réactions d'hypersensibilité de type I, comme l'asthme) (Bogaert et al. 2009).

Des taux élevés d'anticorps spécifiques de l'agent étiologique sont trouvés à la fois dans le sérum et dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients (Pepys J and PA 1965, Reynolds et al. 1991). La quantité d'anticorps spécifiques de l'antigène en cause retrouvée dans les alvéoles est corrélée à la sévérité de la pneumopathie d'hypersensibilité (Fenoglio et al. 2007, Reboux et al. 2007, Girard et al. 2009). Cependant, des anticorps spécifiques d'agents étiologiques sont également retrouvés chez des individus exposés mais asymptomatiques (Camarena et al. 2001, Kurup et al. 2006).

Figure 4 : Réponse immune lors des pneumopathies d'hypersensibilité (Bogaert et al. 2009).

- A** : Exposition primaire à l'allergène. Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) vont prendre en charge l'antigène, être activées, et migrer vers les ganglions lymphatiques. La présentation de ces antigènes va entraîner la production de cellules T activées (Th1 et CD8+) et d'IgG, pouvant se lier aux macrophages.
- B** : L'inflammation des voies aériennes supérieures est initiée lors des expositions antigéniques suivantes. Les complexes immuns antigènes-IgG activent la cascade du complément et les macrophages alvéolaires, ce qui génère la production de radicaux libres oxygénés et la libération de médiateurs inflammatoires dont le TNF $\alpha$  et l'IL-12. Les cellules Th1 et CD8+ seront alors activées, recrutées et vont être à l'origine de l'infiltrat cellulaire de polynucléaires neutrophiles caractéristiques des pneumopathies d'hypersensibilité.



### c)Prise en charge thérapeutique, prévention et perspectives

#### *Prise en charge thérapeutique*

Le traitement le plus efficace des pneumopathies d'hypersensibilité repose sur l'éviction antigénique. Cet objectif est cependant bien souvent difficile à atteindre.

Dans les formes liées à une exposition non professionnelle, domestique ou de loisir, l'éviction est possible et le praticien doit insister sur l'importance de cette éviction, même si des conséquences psychologiques peuvent survenir; c'est souvent le cas des patients atteints de la maladie du Poumon Eleveurs d'Oiseaux. Il en est de même pour les ouvriers salariés, car il existe des possibilités de reclassement. Le problème est différent pour les non-salariés, en particulier pour les exploitants agricoles, chez qui l'éviction antigénique signifie l'abandon de la profession. En pratique, les agriculteurs sont généralement opposés à une reconversion professionnelle et font le choix de poursuivre leur profession. Cela a eu pour conséquence la remise en cause du dogme de l'éviction antigénique absolue. En effet, plusieurs études sur la maladie du Poumon de Fermier et sur la maladie du Poumon Eleveurs d'Oiseaux, ont établi que la poursuite des activités professionnelles était possible, sans risque respiratoire important, sous réserve de réaménagement des conditions de travail et/ou de port de masque de protection respiratoire adapté (Monkare and Haahtela 1987, Bouchard et al. 1995, Dalphin et al. 2009).

La corticothérapie par voie systémique est considérée comme le traitement symptomatique de référence. Plusieurs études rétrospectives ou prospectives ont suggéré que la corticothérapie débutée à la phase initiale pouvait accélérer le retour à des valeurs fonctionnelles normales, sans modifier le pronostic à moyen ou long terme (Monkare et al. 1985, Monkare and Haahtela 1987, Cormier and Desmeules 1994). Les corticoïdes par voie générale sont indiqués dans les formes récentes sévères, hypoxémiantes, à une posologie initiale de 40 à 60 mg par jour. Cette corticothérapie n'est pas une alternative à l'éviction antigénique qui reste impérative, surtout au cours des premiers mois suivant le diagnostic, jusqu'à normalisation de l'imagerie et de la fonction respiratoire (à l'exception de la DLCO). Il a été suggéré que les corticoïdes en nébulisation pouvaient avoir une certaine efficacité (Ramirez-Venegas et al. 1995). Par ailleurs, une étude expérimentale sur modèle murin suggère l'intérêt de l'érythromycine comme traitement, du fait de sa capacité à diminuer significativement l'influx de poynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire (Miyajima et al. 1999).

### *Prévention collective*

Chez les fermiers, il est illusoire d'envisager des processus technologiques susceptibles de faire totalement disparaître le développement de micro-organismes pathogènes dans les produits agricoles. Cependant, un certain nombre de techniques, en général associées à une volonté de modernisation et de mécanisation des tâches, peut contribuer à réduire le risque de développer la maladie. Par exemple, le séchage artificiel du foin, qui présente également l'avantage de libérer les fermiers des contraintes climatiques, s'accompagne d'une réduction significative de l'aéro-contamination en actinomycètes thermophiles dans l'environnement de travail (Dalphin et al. 1991). Des traitements chimiques ont également été proposés afin de modifier la charge fongique des foins. Le salage, technique traditionnelle couramment utilisée dans les régions de production laitière a fait l'objet d'une évaluation : l'utilisation de sel n'a pas réduit significativement la quantité d'actinomycètes et de moisissures des foins (Roussel et al. 2005a). Le traitement des balles de foin par de l'acide propionique permet de réduire le développement des espèces fongiques (par réduction du pH) mais augmente les concentrations en actinomycètes mésophiles (Reboux et al. 2002). Ce type de produit chimique a par ailleurs un potentiel corrosif important et présente un danger en cas d'inhalation, il est donc utilisé avec modération.

Plusieurs études ont montré que les agriculteurs exploitant des fermes modernes (locaux plus spatieux, mieux ventilés et outillage réduisant la manipulation directe du foin) présentaient une meilleure fonction respiratoire que ceux travaillant dans des fermes traditionnelles (Dalphin et al. 1994, Mauny et al. 1997).

### *Prévention individuelle*

L'utilisation d'un masque de protection respiratoire peut être considérée comme une méthode de prévention primaire dans certains secteurs professionnels, comme les grands silos industriels à céréales. Chez les exploitants agricoles, en revanche, il s'agit le plus souvent d'une méthode de prévention secondaire qui est proposée aux malades qui poursuivent leurs activités professionnelles. Les heaumes à ventilation assistée sont certainement les protections les plus efficaces mais ils sont onéreux, lourds et encombrants. Les masques à usage unique sont généralement préférés mais il faut s'assurer du respect de leur durée d'utilisation, qui est brève, et de l'adéquation de leurs caractéristiques techniques avec l'indication (normes de filtration AFNOR FFP2).

## II Outils et techniques utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques au niveau respiratoire

### 1 Modèles de culture des cellules épithéliales respiratoires

#### a) Culture primaire

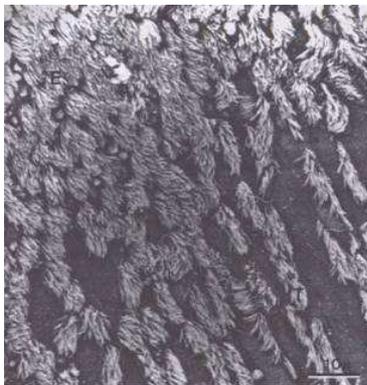
Les différents modèles décrits dans la littérature permettent, selon des paramètres particuliers (support, conditionnement) et des conditions de culture précises (milieux, facteurs de croissance), d'étudier la prolifération et la migration cellulaire ainsi que les mécanismes de réparation et de différenciation.

#### *Cultures d'explants*

Les explants d'épithélium respiratoire sont obtenus par dissection de petits fragments d'épithélium nasal, trachéal ou bronchique d'origine humaine ou animale (rat, lapin, cobaye, porc...). Ils sont déposés sur un support matriciel qui est nécessaire à la migration et à la prolifération des cellules épithéliales (Devalia et al. 1990, Baeza-Squiban et al. 1994, Boland et al. 1996). L'épaisseur du tapis cellulaire obtenu dépend de la nature de ce support. Ainsi, sur un gel épais de collagène, on obtient plusieurs couches cellulaires orientées vers la différenciation épidermoïde, alors que sur un gel fin de collagène, on obtient un nombre de strates nettement moindre (Bourgeois et al. 1993, Baeza-Squiban et al. 1994). Dans ce type de culture primaire où les cellules épithéliales sont continuellement immergées dans le milieu de culture, les cellules migrent et prolifèrent à partir de l'explant vers la périphérie (Baeza-Squiban et al. 1991) (Figure 5). On distingue la présence des cellules ciliées et sécrétrices provenant de l'explant, et des cellules à caractère migratoire en particulier en périphérie. Au cours du temps, le nombre de cellules du tapis cellulaire augmente mais atteint un plateau au bout de quelques jours de culture, coïncidant avec un arrêt de la prolifération cellulaire.

**Avantages de ce modèle :** il permet la reconstitution rapide d'un tapis épithélial, et offre un modèle potentiel pour l'étude de la prolifération et de la migration cellulaire (Laoukili and Marano 2003).

Figure 5. Observation en microscopie électronique d'un épithélium cilié provenant d'un explant de trachée de lapin en culture primaire. (Baeza-Squiban et al. 1994).



## *Perspectives*

L'étude des pneumopathies d'hypersensibilité représente un défi aussi bien sur le plan clinique que sur le plan fondamental. De nombreuses avancées restent en effet nécessaires afin d'améliorer les tests diagnostiques par l'identification moléculaire détaillée des antigènes en cause et l'utilisation d'antigènes recombinants (Fink et al. 2005). Au plan fondamental, l'importance relative de l'immunité innée, humorale et cellulaire reste confuse. Les facteurs de susceptibilité de l'hôte influençant l'apparition, le développement et la sévérité de la maladie n'ont pas encore été identifiés. De la même façon, les facteurs promoteurs environnementaux, comme les infections virales, restent peu explorés.

L'évolution des techniques de biologie moléculaire, et notamment l'utilisation de puces ADN, pourraient permettre d'analyser simultanément des milliers de gènes à partir de biopsies pulmonaires et de liquides de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de pneumopathies d'hypersensibilité. Grâce à ces analyses, la description moléculaire détaillée des événements survenant dans le micro-environnement pulmonaire lors de cette maladie pourrait être mieux appréhendée (Agostini et al. 2004). Ces nouveaux outils pourraient ainsi permettre d'identifier des cibles thérapeutiques d'intérêt.

Ainsi, dans le cadre de la recherche de molécules immunomodulatrices pouvant être des cibles thérapeutiques, certaines études ont montré que la cyclosporine et les inhibiteurs de cyclo-oxygénase pouvaient limiter le développement des granulomes (Dalphin 2003). Une étude récente suggère l'intérêt de la cathelicidine LL-37, un peptide antimicrobien capable d'interagir avec le lipopolysaccharide (LPS), comme étant une cible thérapeutique potentielle dans les pathologies pulmonaires (Golec 2007). Par ailleurs, des essais murins ont permis de mettre en évidence un effet protecteur d'une surexpression de GATA-3, un facteur de transcription qui oriente la spécialisation des cellules T vers un profil Th2 (Matsuno et al. 2007).

Jusqu'à présent, très peu de travaux se sont intéressés à l'étude des interactions initiales entre cellules épithéliales pulmonaires et agents étiologiques des pneumopathies d'hypersensibilité.

### *Cultures de cellules respiratoires dissociées*

Les cellules de surface sont dissociées par incubation pendant plusieurs heures (16 à 20 heures généralement), à 4°C, dans du milieu contenant de la pronase (2mg/mL). L'action de la pronase est ensuite arrêtée par ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture. Les cellules dissociées sont alors dispersées dans un flacon de culture et maintenues environ 2 heures à 37°C afin de favoriser l'adhésion des fibroblastes au plastique. Les cellules épithéliales peuvent alors être récupérées dans le milieu et êtreensemencées sur gel de collagène (Laoukili and Marano 2003).

- Cellules épithéliales dissociées et modèles de culture en « interface air-liquide ».

Après dissociation par digestion enzymatique, les cellules sontensemencées sur des membranes poreuses couvertes d'un support de collagène (Wu et al. 1985). Ce système a été décrit pour des cellules épithéliales respiratoires d'espèces et d'origines diverses : nasales (Schmidt et al. 1996), trachéales (Moller et al. 1989, Adler et al. 1990, Kaartinen et al. 1993, Clark et al. 1995) ou bronchiques (de Jong et al. 1994). Dans ce modèle, les cellules prolifèrent jusqu'à former un tapis cellulaire confluent. La création d'une « interface air-liquide » par élimination du milieu de culture au-dessus du filtre et la présence de certains facteurs solubles dans le milieu de culture (généralement l'acide rétinoïque) permettent d'obtenir une différenciation mucociliaire *in vitro* (Kaartinen et al. 1993). Des travaux utilisant des cultures de cellules épithéliales nasales humaines en « interface air-liquide » ont été réalisées dans le cadre de la recherche sur l'aspergillose invasive afin d'étudier la phagocytose des conidies d'*A. fumigatus* (Botterel et al. 2008) ainsi que la modification des propriétés électro-physiologiques induites par le verrucogène, mycotoxine produite par *A. fumigatus* (Khoufache et al. 2007).

**Avantage de ce modèle :** Ce modèle permet de « mimer » l'environnement des cellules épithéliales respiratoires.

- Cellules épithéliales dissociées et modèles de culture de « sphéroïdes » en suspension.

Ce type d'application a été décrit exclusivement pour des cellules épithéliales respiratoires d'origine humaine (Jorissen et al. 1991, Boxberger et al. 1993). Les cellules dissociées obtenues à partir de cornets ou de polypes nasaux humains sont reprises dans du milieu additionné de Fungizone® et d'antibiotiques, puis sontensemencées dans des flacons de culture recouverts d'un gel de collagène. Les cultures prolifèrent au cours des deux premières semaines et lorsque la confluence du tapis cellulaire est atteint, le gel de collagène est digéré par de la collagénase. Les tapis cellulaires sont alors découpés avec un grattoir et placés en agitation rotationnelle afin de provoquer le repliement des tapis en sphéroïdes. Le processus de différenciation mucociliaire est observé dès la première semaine qui suit la confluence et la proportion de cellules différenciées (cellules ciliées, cellules sécrétrices) augmente progressivement au cours du temps (Jorissen and Bessems 1995, Laoukili and Marano 2003).

**Avantages de ce modèle :** 1) Il permet de séparer dans le temps une phase de prolifération des cellules épithéliales, sélectionnées lors de l'ensemencement par leur capacité à adhérer à la matrice de collagène, et une phase de différenciation « normale », sécrétrice et ciliée. 2) Les sphéroïdes épithéliaux peuvent être maintenus en culture plusieurs semaines. 3) Différents marqueurs de différenciation peuvent être suivis tels que les centrines (Laoukili et al. 2000), les tubulines (Million et al. 1999) et les mucines (Lamblin et al. 1992).

**Les modèles de culture primaire de cellules épithéliales sont les seuls à permettre l'obtention d'une différenciation mucociliaire normale.**

#### b) Lignées cellulaires épithéliales respiratoires

L'utilisation des cultures primaires permet, certes, d'étudier certaines fonctions des cellules épithéliales, et en particulier, de suivre la différenciation mucociliaire, cependant, il existe plusieurs limites à ces modèles. Ces cellules ont une durée de vie limitée, et se divisent peu ou pas, après un faible nombre de passages. Chaque expérience dépend d'une nouvelle culture où les variations individuelles sont difficiles à contrôler. C'est pourquoi, des lignées épithéliales dérivées de carcinomes respiratoires ou des lignées transformées ont été développées. Aucune de ces lignées n'est capable de différenciation terminale ciliée.

#### *Lignées cellulaires provenant de carcinomes respiratoires*

Les lignées dérivées de carcinomes respiratoires présentent le plus souvent une morphologie de cellules non différenciées, et n'expriment aucun marqueur spécifique des cellules épithéliales respiratoires (Gruenert et al. 1995). La lignée A549, par exemple, fait partie de ces lignées. Elle a été celle utilisée dans différents travaux de recherche qui ont permis de mieux appréhender le développement de l'infection par *A. fumigatus* au cours de l'aspergillose invasive (Kogan et al. 2004, Zhang et al. 2005, Berkova et al. 2006, Alekseeva et al. 2009) ainsi que les mécanismes moléculaires à l'origine de la réponse inflammatoire dans la maladie du Poumon de Fermier (Gudmundsson and Hunninghake 1999).

**Avantage de ces lignées :** Ces lignées sont faciles à manipuler et robustes. Ainsi, leur cinétique de division reste stable, même après plusieurs passages et après congélation pour conservation.

Une de ces lignées, appelée CALU-3, a conservé certaines fonctions liées aux cellules glandulaires sécrétrices respiratoires. Ces cellules épithéliales expriment les ARNm et les protéines correspondant à la mucine MUC2 et produisent un niveau important de la protéine CFTR, « protéine canal » assurant le transport actif de l'ion chlore vers le milieu extracellulaire.

**Avantage de la lignée CALU-3:** cette lignée est préférentiellement choisie pour les études comparatives sur la mucoviscidose du fait de la production de la protéine CFTR (Shen et al. 1994, Poirier 2008).

### *Lignées épithéliales respiratoires transformées*

Différents moyens ont été utilisés pour transformer des cellules épithéliales respiratoires, le plus souvent d'origine bronchique. L'utilisation de constructions moléculaires contenant des oncogènes d'origine virale est le plus souvent privilégiée. Cependant, il semblerait que ces oncogènes modifient de manière importante les caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules (Yoakum et al. 1985, Amstad et al. 1988, Pfeifer et al. 1991).

Plusieurs lignées respiratoires épithéliales respiratoires ont été obtenues après transfection de cellules épithéliales bronchiques humaines par l'antigène T du virus SV40 (Simian Virus 40) ou par un hybride adénovirus 12-SV40 (Ke et al. 1988, Reddel et al. 1988, Reddel et al. 1991). Une de ces lignées, BEAS-2B, exprime des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales tels que les kératines et des mucines, lorsqu'elle est cultivée sur une matrice de collagène (Reddel et al. 1988). Une autre lignée, 16HBE14o-, expriment des cytokératines, des molécules d'adhésion spécifiques des jonctions serrées et la protéine CFTR (Cozens et al. 1994).

**Inconvénient de ces lignées :** La transformation des cellules épithéliales respiratoires induit une instabilité de leur caryotype qui interfère avec l'expression et la régulation normale d'une multitude de gènes (Gruenert et al. 1995).

Tableau 3: Principaux résultats obtenus grâce aux cultures de cellules épithéliales pulmonaires dans l'aspergillose invasive et les pneumopathies d'hypersensibilité.

<b>Aspergillose invasive</b>			
<b>Références</b>	<b>Type de cellules</b>	<b>Techniques d'analyse</b>	<b>Principal résultat</b>
<b>(Tomee et al. 1997)</b>	A549	ELISA	Les protéases d'Af* induisent une réponse inflammatoire
<b>(Borger et al. 1999)</b>	A549	ELISA et PCR	Facteurs transcriptionnels activés en réponse aux protéases d'Af*
<b>(Kauffman et al. 2000)</b>	A549 et CENH**	ELISA	Confirmation du rôle des protéases fongiques dans la réponse inflammatoire
<b>(Yang et al. 2000)</b>	A549	Test de liaison à la laminine et au fibrinogène	La composition de la paroi des conidies d'Af* influe sur leur fixation aux cellules épithéliales
<b>(Botterel et al. 2002)</b>	CENH** interface air-liquide	Immunofluorescence et mesure des paramètres électro-physiologiques	Altération de l'intégrité morphologique et électro-physiologiques par du filtrat d'Af*
<b>(Kogan et al. 2004)</b>	A549	Immunofluorescence	Altération de l'intégrité morphologique des pneumocytes par les protéases d'Af*
<b>(Zhang et al. 2005)</b>	A549	ELISA	Absence de réponse inflammatoire aux filaments inactivés d'Af*
<b>(Berkova et al. 2006)</b>	A549, CHEB***, CENH**	Cytométrie de flux	Inhibition de l'apoptose par les conidies d'Af*
<b>(Khoufache et al. 2007)</b>	CENH** interface air-liquide	HPLC, Spectrométrie de masse et paramètres électro-physiologiques	Modifications électro-physiologiques induites par le verruculogène

<b>(Botterel et al. 2008)</b>	CENH** interface air-liquide	Immunofluorescence	Preuve de la phagocytose des conidies d'Af*
<b>(Seidler et al. 2008)</b>	CHEB***	Immunofluorescence	Af* induit la formation de biofilms ce qui diminue le passage des antifongiques
<b>(Bellanger et al. 2009b)</b>	A549	RT-qPCR temps réel	La surexpression des ARNm d'IL-8 augmente avec la croissance des conidies d'Af* en filaments
<b>(Alekseeva et al. 2009)</b>	A549, CENH**	RT-qPCR temps réel ELISA	Surexpression des ARNm des $\beta$ défensines lors de l'exposition aux conidies en germination d'Af*

\*Af : *Aspergillus fumigatus*

\*\*CENH : Cellule Epithéliales Nasales Humaines

\*\*\*CHEB : Cellules Humaines Epithéliales Bronchiques

### Pneumopathie d'hypersensibilité

Références	Type de cellules	Techniques d'analyse	Principal résultat
<b>(Gudmundsson and Hunninghake 1999)</b>	A549	ELISA	Production d'IL-8 en réponse à l'extrait total de <i>S. rectivirgula</i>
<b>(Bellanger et al. 2009a)</b>	A549	Rt-qPCR temps réel	Surexpression des ARNm d'IL-8 et d'IL-13 en réponse à l'extrait total d' <i>A. corymbifera</i>

## 2 Modèles animaux

### a) Généralités

Les travaux réalisés sur culture cellulaire ont le mérite de cerner un problème spécifique en le traitant de façon isolée mais le problème de l'extrapolation des connaissances acquises sur cellules isolées et cultivées *in vitro* reste posé. Les modèles animaux permettent d'appréhender le développement d'une pathologie en considérant le contexte général d'un organisme. Ces modèles rendent possible l'étude d'une exposition chronique à un pathogène et permettent d'étudier la chronologie du développement d'une maladie. L'obtention d'animaux transgéniques élargit les possibilités d'études des mécanismes physiopathologiques développés en cas d'infection.

Cependant, les modèles animaux requièrent l'utilisation de matériels et de procédures sophistiqués et il est souvent difficile d'obtenir une standardisation optimale.

Parmi les différents animaux pouvant être utilisés (rats, cobayes, lapins, vaches, porcs etc...), les souris sont généralement privilégiées, probablement pour des raisons pratiques (petite taille, facilité à manipuler, large choix de produits et réactifs adaptés) (Denis et al. 1991, Clemons and Stevens 2005, Lewis and Wiederhold 2005).

### b) Modèles animaux dans l'étude de l'aspergillose invasive

Afin de créer un terrain immunitaire adéquat au développement d'une maladie aspergillaire, les animaux peuvent être traités par des immunosuppresseurs, comme l'acétate de cortisone en injection sous cutanée (Schmitt et al. 1988) ou le cyclophosphamide en intra-péritonéal (Leenders et al. 1996). Les souris peuvent également être génétiquement modifiées. Ainsi, par exemple, les souris peuvent être déficientes en gènes codant l'IL-6, IL-12 et l'IFN $\gamma$  et donc avoir une réponse Th1 altérée (Cenci et al. 2001). Les modifications génétiques sont plus onéreuses mais permettent d'avancer dans l'identification de gènes ou de facteurs solubles d'intérêt. Plusieurs systèmes expérimentaux d'inhalation de conidies aspergillaires ont été testés afin de standardiser au mieux la quantité de conidies administrées (Schaffner et al. 1982, Tang et al. 1993, Sheppard et al. 2004, Steinbach et al. 2004). Actuellement, le procédé du Microsprayer<sup>®</sup> (PennCentury<sup>™</sup>) semble le plus prometteur puisqu'il ne lèse pas les muqueuses respiratoires de l'animal, ne nécessite pas d'anesthésie générale longue, ni de trachéotomie, et permet l'instillation d'un inoculum calibré de conidies, *in situ*, dans la trachée (Chandenier et al. 2009).

### c) Modèles animaux dans l'étude des pneumopathies d'hypersensibilité

Le modèle murin défini par l'équipe de Denis et al (Denis et al. 1991) est le modèle de référence pour l'étude des pneumopathies d'hypersensibilité (Simonian et al. 2009b). Une instillation intra-nasale de 150  $\mu$ g de *S. rectivirgula* est administrée à des souris C57BL/6 trois fois par semaine pendant trois semaines, afin d'induire une maladie du Poumon de Fermier. Dans un premier temps, ce modèle a permis de comprendre la chronologie de la maladie et d'étudier l'évolution de la composition cytologique des liquides de lavage

broncho-alvéolaire ainsi que d'identifier la progression des lésions histologiques au niveau pulmonaire (Denis et al. 1991, Denis et al. 1992, Denis and Ghadirian 1992). Actuellement, des essais comparatifs sont réalisés entre des souris C57BL/6 de phénotype sauvage et des souris C57BL/6 modifiées génétiquement. Ce type d'études permet de mieux appréhender les mécanismes moléculaires et immunologiques mis en jeu (Nance et al. 2008, Simonian et al. 2009b). Récemment, un nouveau système a été décrit afin d'améliorer la standardisation de l'inoculum inhalé (Golec et al. 2009).

Tableau 4 : Principaux résultats obtenus grâce aux modèles murins dans l'aspergillose invasive et les pneumopathies d'hypersensibilité.

Aspergillose invasive (AI)			
Référence	Type de souris	Techniques d'analyse	Principal résultat
(Denis et al. 1991)	C57BL/6	ELISA, histopathologie	Rôle du TNF $\alpha$ dans la défense de l'hôte
(de Repentigny et al. 1993)	BALB/c	Western blot, dosage H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Rôle des macropahges dans la défense de l'hôte
(Cenci et al. 1997)	BALB/c ( <i>H-2<sup>d</sup></i> ), DBA ( <i>H-2<sup>d</sup></i> ), C57BL/6 ( <i>H-2<sup>d</sup></i> )	ELISA, RT-PCR	Importance de l'IL-4 dans le développement de l'AI
(Denning et al. 1997)	CD-1	Culture, durée de survie	Corrélation entre la sensibilité d'Af* <i>in vitro</i> et l'efficacité <i>in vivo</i> de l'itraconazole
(Mehrad et al. 1999a)	BALB/c	ELISA, Immuno-histo-chimie	Rôle protecteur du TNF $\alpha$
(Cenci et al. 1999)	BALB/c (WT, IL-4 <sup>-/-</sup> , IL-5 <sup>-/-</sup> , IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> , IL-12 <sup>-/-</sup> )	ELISA, cytométrie de flux, RT-PCR	Importance de l'IL-4 dans le développement de l'AI
(Mehrad et al. 1999b)	C57BL/6, KC CC51 <sup>+/+</sup> , B6D2	ELISA, Immuno-histo-chimie, durée de survie	Rôle du MIP-2 dans le recrutement des neutrophiles
(Schelenz et al. 1999)	BALB/c	ELISA, RT-PCR	Rôle du TNF $\alpha$ et du GM-CSF dans le recrutement des neutrophiles
(Clemons et al. 2000)	C57BL/6 (WT, IL-10 <sup>-/-</sup> )	Histologie semi-quantitative	Rôle protecteur de l'IL-10
(Mehrad et al. 2000)	C57BL/6	Cytométrie de flux, ELISA, Immuno-histo-chimie	Rôle du MIP1- $\alpha$ dans la défense de l'hôte

<b>(Johnson et al. 2000)</b>	CD-1	Durée de survie, culture	Manque de corrélation entre la sensibilité d'Af* <i>in vitro</i> et l'efficacité <i>in vivo</i> de l'amphotéricine B
<b>(Cenci et al. 2000)</b>	BALB/c ( <i>H-2<sup>d</sup></i> )	ELISA, RT-PCR	Absence de réponse Th1 à l'ag Asp f 2
<b>(Madan et al. 2001)</b>	BALB/c	Durée de survie	Rôle protecteur de la protéine D du surfactant
<b>(Bowman et al. 2001)</b>	DBA/2J	qPCR	Mise au point d'un PCR quantitative comme outil diagnostic
<b>(Cenci et al. 2001)</b>	C57B/6 (IL-6 <sup>-/-</sup> , IL-6 <sup>+/+</sup> )	ELISA, culture	Rôle de l'IL-6
<b>(Blease et al. 2001)</b>	CBA/J	ELISA, histopathologie	Rôle de MCP-1 dans la réponse immune
<b>(Bozza et al. 2002a)</b>	BALB/c ( <i>H-2<sup>d</sup></i> )	cytométrie de flux, ELISA	Rôle des cellules dendritiques
<b>(Centeno-Lima et al. 2002)</b>	CD-1	RT-PCR, Southern blot, Immunofluorescence	Evaluation de l'expression de l'IFN $\gamma$ , l'IL-12, l'IL-4 et l'IL-10
<b>(Bozza et al. 2002b)</b>	BALB/c ( <i>H-2<sup>d</sup></i> )	Cytométrie de flux, ELISA	Essai d'élaboration d'un vaccin en utilisant des protéines d'Af* et des CpG oligodeoxynucleotides
<b>(Cenci et al. 2002)</b>	C3H/HeJ, DBA/2	Cytométrie de flux	Evaluation d'un ac monoclonal anti-idiotypique
<b>(BitMansour and Brown 2002)</b>	C57BL/6	Culture, durée de survie	Evaluation de l'amphotéricine B liposomale en prophylaxie
<b>(Ito and Lyons 2002)</b>	CF-1	Durée de survie	Evaluation d'une préparation vaccinale
<b>(Lewis et al. 2002)</b>	Swiss Webster	Histopathologie,	Evaluation d'un pre-

		HPLC**	traitement par itraconazole
<b>(Philippe et al. 2003)</b>	C57BL/6 (WT, iNOS <sup>-/-</sup> ), P47 <sup>phox-/-</sup> 129Sv, Swiss OF1	Immuno-histochimie	Rôle de la NADPH oxydase
<b>(Morrison et al. 2003)</b>	C57BL/6, BALB/c (WT, CCR2 <sup>-/-</sup> )	Immuno-histochimie, cytométrie de flux, ELISA	Rôle des chemokines dans le recrutement des cellules NK
<b>(Hummel et al. 2004)</b>	BALB/c	Nested PCR	Mise au point de nested PCR comme outil diagnostic
<b>(Wiederhold et al. 2004)</b>	Swiss Webster	Histopathologie, qPCR temps réel	Evaluation de la caspofungine
<b>(Gaziano et al. 2004)</b>	BALB/c, C3H/HeJ	ELISA, cytométrie de flux, RT-PCR	Evaluation de la pentraxine 3
<b>(Sionov et al. 2005)</b>	ICR	Histopathologie, culture, ag galactomannane, durée de survie	Evaluation d'une combinaison de polyène, caspofungine et de G-CSF
<b>(Chaturvedi et al. 2005)</b>	BALB/c	ELISA, Western blot, Immuno-fluorescence	Essai de développement d'acs monoclonaux protecteurs
<b>(Lewis et al. 2005)</b>	Swiss Webster	Durée de survie, qPCR, spectrométrie de masse	Evaluation de la gliotoxine comme marqueur pronostic et diagnostique de la maladie
<b>(te Dorsthorst et al. 2005)</b>	CD-1	Durée de survie, culture	Evaluation de la flucytosine en monothérapie
<b>(Dabur et al. 2005)</b>	BALB/c	Durée de survie, culture	Evaluation du 2-1 methylethyl pentanoate comme agent antifongique
<b>(Arber et al. 2005)</b>	BALB/c	Cytométrie de flux, culture	Rôle protecteur des facteurs de croissance myéloïdes
<b>(Balloy et al.</b>	C57BL/6 (WT ,	Histologie,	Rôle du TLR2

2005)	TLR2 <sup>-/-</sup> )	Immuno-histo- chimie, dosage du galactomannane	
(Balloy et al. 2005)	BALB/c	Immuno-histo- chimie, ELISA, RT-PCR	Role de l'IFN $\gamma$
(Rivera et al. 2005)	C57BL/6	ELISA, Cytométrie de flux, histologie	Réponse des cellules T CD4 <sup>+</sup> différente si conidies vivantes ou non
(Carpenter and Hogaboam 2005)	C57BL/6 (WT, CCR8 <sup>+/+</sup> , CCR4 <sup>+/+</sup> )	ELISA, histologie, cytométrie de flux	Effet immunosuppresseur de CCL17
(Dubourdeau et al. 2006)	C57BL/6 (WT, TLR2 <sup>-/-</sup> , TLR4 <sup>-/-</sup> , Myd88 <sup>-/-</sup> )	ELISA, cytométrie de flux, durée de survie	Rôle des MAP kinases
(Tansho et al. 2006)	ICR	Histopathologie, durée de survie, HPLC**	Evaluation de l'itraconazole par voie intra-veineuse
(Olson et al. 2006)	DBA/2	Histopathologie, culture, HPLC**	Comparaison de différentes formulations lipidiques d'amphotéricine B
(Chiang et al. 2006)	BALB/c	Durée de survie, histopathologie	Evaluation des ambrucitines comme agent antifongique
(Hoeben et al. 2006)	ICR	HPLC**, durée de survie	Evaluation d'aérosols d'itraconazole en prophylaxie
(Dennis et al. 2006)	C57BL/6 P47 <sup>phox-/-</sup>	Histopathologie, qPCR temps réel	Evaluation de l'association d'amphotéricine B et micafungine
(Kaur et al. 2007)	BALB/c	ELISA	Rôle protecteur de la MBL
(Lewis et al. 2007b)	BALB/c	Histopathologie, qPCR temps réel, Fungitell	Comparaison de différentes formulations lipidiques d'amphotéricine B
(Lewis et al.	BALB/c	Histopathologie,	Rôle protecteur des

<b>2007a)</b>		qPCR temps réel	liposomes vides
<b>(Phadke et al. 2007)</b>	C57BL/6 (WT, CCR6 <sup>-/-</sup> , CCR6 <sup>+/+</sup> )	Cytométrie de flux	Rôle du CCR6 dans le recrutement des DCs*** au niveau pulmonaire
<b>(Mattila et al. 2008)</b>	C57BL/6	Durée de survie	Test de Dectin-1 Fc
<b>(Wiederhold et al. 2008)</b>	ICR	Fungitell	Evaluation de la mesure du beta-glucane comme test diagnostique de l'AI
<b>(Lewis et al. 2008a)</b>	BALB/c	Histopathologie, qPCR temps réel	Evaluation de la caspofungine et de la micafungine
<b>(Lewis et al. 2008b)</b>	BALB/c	Histopathologie, qPCR temps réel	Evaluation de l'intérêt d'une dose isolée d'amphotéricine B liposomale ou de micafungine en prophylaxie
<b>(Mouton et al. 2009)</b>	CD-1	Durée de survie	Comparaison de 3 formulations d'amphotéricine B
<b>(Park et al. 2009)</b>	C57BL/6 (WT, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> , RAG-1 <sup>-/-</sup> )	Cytométrie de flux, ELISA	Rôle de l'IFN $\gamma$
<b>(Werner et al. 2009)</b>	129/SvEv (WT, dectin-1 <sup>-/-</sup> )	RT-qPCR temps réel, Luminex, histologie	Rôle du récepteur dectine-1 beta-glucane
<b>(Ramaprakash et al. 2009)</b>	BALB/c (WT, TLR9 <sup>-/-</sup> , TLR9 <sup>+/+</sup> )	ELISA, RT-qPCR temps réel	Rôle du TLR9 dans la réponse immunitaire vis-à-vis des conidies en germination
<b>(Rivera et al. 2009)</b>	C57BL/6 (WT, IL-10R2 <sup>-/-</sup> , IL-10 <sup>-/-</sup> )	Cytométrie de flux, Immunofluorescence	Modification de la répartition des cellules T CD4 <sup>+</sup> en absence d'IL-10
<b>(Singh et al. 2009)</b>	BALB/c	Histopathologie, ELISA	Effets thérapeutique de la protéine D du surfactant.

(Nagasaki et al. 2009)	ICR	Ag GM, histopathologie, culture	Evaluation de l'association micafungine et amphotéricine B
Xu (2009)	BALB/c	ELISA	La N-acetyl-cysteine influe sur le stress oxydatif
(Yang et al. 2009)	BALB/c	RT-qPCR temps réel, Western blot, Immunofluorescence	Le cyclophosphamide réduit l'expression de la dectine-1 au niveau pulmonaire

\*Af : *A. fumigatus* \*\*HPLC : Chromatographie liquide haute performance \*\*\*DCs Cellules dendritiques (WT : Wild type)

Pneumopathie d'hypersensibilité			
Référence	Type de souris	Techniques d'analyse	Principal résultat
(Takizawa et al. 1989)	C57BL/6	Histopathologie, ELISA	Rôle des cellules mastocytaires
(Denis 1992)	C57BL/6	Histopathologie, ELISA	Rôle de l'IL-6 dans la réaction inflammatoire
(Lukacs et al. 1996)	CBA/j	ELISA	Rôle de RANTES et de MIP-1 $\alpha$ dans le recrutement des éosinophiles
(Gudmundsson et al. 1998b)	C57BL/6 (WT, IL-10 <sup>-/-</sup> )	Histopathologie, Northern blot, PCR	Rôle modérateur de l'IL-10
(Miyajima et al. 1999)	C57BL/6	Cytométrie de flux, immuno-histo-chimie	Evaluation de l'érythromycine comme agent thérapeutique
(Pan et al. 2000)	C3H/He	Histopathologie, immuno-histo-chimie, cytométrie de flux	Rôle ligand des sélectines dans la réaction inflammatoire

<b>(Chouchakova et al. 2001)</b>	C57BL/6 (WT, FcγRIII <sup>-/-</sup> , TNFαRI <sup>-/-</sup> )	ELISA, cytologie	Rôle de la production de TNFα, indépendamment de celle de chemokines
<b>(Schuyler et al. 2002)</b>	BALB/c (WT et IL12p40 <sup>-/-</sup> )	ELISA, histopathologie	L'IL-12 n'est pas nécessaire au développement de la maladie
<b>(Shvedova et al. 2002)</b>	B6C3F1	Mesures des fonctions pulmonaires, HPLC, histopathologie	Influence de l'alimentation et de l'exposition aux fluides de coupe
<b>(Butler et al. 2002)</b>	C57BL/6, DBA/2, BALB/cAnCr	ELISA	Différence d'expression de l'IL-4 entre les types de souris
<b>(Schuyler et al. 2003)</b>	C57BL/6 (WT, CCR2 <sup>-/-</sup> )	ELISA, histopathologie	Rôle de MCP-1 et de son récepteur CCR2 dans la réponse immune
<b>(Irifune et al. 2003)</b>	BALB/c	ELISA	Rôle des Th1 dans le développement de l'alvéolite
<b>(Blanchet et al. 2004)</b>	C57BL/6	Histopathologie, RT-PCR, cytométrie de flux	Rôle protecteur de la nicotine
<b>(Nance et al. 2005)</b>	C57BL/6 (WT, IFNγ <sup>-/-</sup> , RAG-1 <sup>-/-</sup> )	Histopathologie, cytométrie de flux, Luminex, RT-qPCR temps réel	Importance de l'IFNγ dans la réponse immune innée
<b>(Lin et al. 2006b, Lin et al. 2006a)</b>	BALB/cByJNarl	ELISA	Influence de l'orientation Th1/Th2 de la réponse immune par ajout de <i>Ganoderma tsugae</i> dans l'alimentation
<b>(Hwang et al. 2006)</b>	C57BL/6 (WT, CD1d <sup>-/-</sup> , IL-4 <sup>-/-</sup> , IFNγ <sup>-/-</sup> )	Cytométrie de flux, RT-qPCR temps réel,	Rôle protecteur de la production d'IL-4

ELISA			
<b>(Gordon et al. 2006)</b>	C57BL/6, BALB/c	Histopathologie	Rôle de <i>Mycobacterium immungenum</i> comme agent étiologique
<b>(Thorne et al. 2006)</b>	C57BL/6	Histopathologie, Luminex	Rôle des fluides de coupe contaminés par des mycobactéries comme agent étiologique
<b>(Matsuno et al. 2007)</b>	C57BL/6, GATA-3-tg	Histopathologie, RT-qPCR temps réel, cytométrie de flux	Rôle protecteur de l'expression de GATA-3
<b>(Nance et al. 2008)</b>	C57BL/6 (WT, MyD88 <sup>-/-</sup> , TLR2 <sup>-/-</sup> )	Immuno-histo-enzymologie, Luminex, cytométrie de flux	Rôle de MyD88 dans le recrutement des neutrophiles
<b>(Vasconcelos et al. 2008)</b>	BALB/c	Histopathologie, ELISA	Evaluation du lupeol comme agent thérapeutique
<b>(Jiao et al. 2009)</b>	BALB/c et C57BL/6	Histopathologie, RT-PCR, cytométrie de flux	Rôle des cellules dendritiques
<b>(Joshi et al. 2009)</b>	C57BL/6 (WT et IL17 <sup>-/-</sup> )	RT-qPCR temps réel, Luminex, cytométrie de flux, histologie	Rôle de l'IL-17 dans la réponse immune
<b>(Simonian et al. 2009b, Simonian et al. 2009a)</b>	C57BL/6 (WT, TCRβ <sup>-/-</sup> , TCRγ <sup>-/-</sup> )	Cytométrie de flux, immuno-fluorescence, histologie, Luminex	Rôle des Th17 dans la réponse immune
<b>(Golec et al. 2009)</b>	C57BL/6	Histopathologie, sérologie	Mise au point d'un nouveau dispositif d'inhalation

(WT : Wild type)

### 3 Les techniques d'analyse

#### a) Mesure de la production de médiateurs solubles

La quantification des médiateurs solubles, sous leurs formes protéiques, peut être effectuée soit dans les surnageants de culture cellulaire (modèles cellulaires) soit dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (modèles animaux).

#### *Dosage par techniques ELISA*

Les techniques ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) sont faciles à mettre en œuvre et peuvent être appliquées au dosage de médiateurs dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire ou dans les surnageants de culture cellulaire. Chaque médiateur est dosé individuellement, un volume moyen de 100  $\mu$ L est nécessaire en moyenne pour chaque dosage et les sensibilités rapportées varient de 2 à 50 pg/mL selon les kits et le médiateur à doser (Carpenter and Hogaboam 2005, Shalit et al. 2006). Les dosages ELISA sont peu adaptés lorsqu'il s'agit d'étudier un grand nombre de médiateurs différents et leur sensibilité est souvent insuffisante pour détecter des variations fines et précoces. Ces techniques sont le plus souvent utilisées en complément d'autres techniques d'analyses, notamment afin de confirmer la production de la forme protéique d'un médiateur en cas d'obtention de premiers résultats sur l'induction d'un gène (puces à ADN, RT-qPCR temps réel, PCR, cytométrie de flux) (Borger et al. 1999, Cenci et al. 1999, Poirier 2008, Alekseeva et al. 2009, Ramaprakash et al. 2009).

#### *Dosage utilisant la technologie Luminex<sup>TM</sup>*

La technologie Luminex<sup>100</sup> microsphere system<sup>®</sup> (Luminex Corporation, Austin, USA) est une nouvelle technologie, qui allie la technique de cytométrie en flux à deux lasers (Luminex<sup>100</sup> Analyzer<sup>TM</sup>, Luminex Corporation) et une utilisation de microbilles en polystyrène (Moalic et al. 2004).

- Les microsphères

Il s'agit de billes de polystyrène de 5.6  $\mu$ m de diamètre. Lors de leur fabrication, deux fluorochromes, émettant dans le rouge et l'infrarouge, sont incorporés à l'intérieur des billes. Pour chaque bille, il existe un ratio précis de la quantité des deux fluorochromes incorporés. Les billes, mélangées au début de l'analyse, sont entraînées dans la veine liquide, séparées et identifiées pendant la phase d'acquisition des données. A la sortie de la veine liquide, les billes excitées par le laser rouge à 633 nm vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille réémet d'une façon différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux. Chaque bille a ainsi son propre code couleur et d'identification. Chaque bille peut servir de support solide à des molécules différentes (anticorps, antigènes, sondes nucléiques) et plusieurs billes différentes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube : l'analyse simultanée de nombreux paramètres différents est donc possible.

- Le cytomètre

Le terme « cytomètre » est quelque peu mal choisi pour la dénomination de cet appareil, car il n'y a pas d'analyses cellulaires. Cependant, le principe est identique, puisqu'une suspension de billes subit l'aspiration, puis le trajet dans une veine liquide. A la sortie de la veine liquide, les billes sont excitées par un jeu de lasers, ayant chacun un rôle précis (Fig 6A, p68) :

- ✓ Le laser rouge à diode (633 nm), qui excite les fluorochromes incorporés aux billes de polystyrène, émettant dans le rouge et l'infrarouge, correspondant au code couleur de chaque bille, et permettant l'identification précise de chacune ;
- ✓ Le laser vert, qui excite le fluorochrome qui est couplé à une molécule « reporter ». Cette molécule « reporter » (anti-immunoglobuline ou produit d'amplification) permet de détecter l'antigène-anticorps ou sonde-amplicon se produisant à la surface de la bille, après addition d'un conjugué marqué avec un fluorochrome émettant dans le vert. Généralement, il s'agit de la phycoérythrine qui, excitée à 532 nm, réémet à 575 nm. La fluorescence émise témoigne alors de la réaction en surface, et détermine la positivité de la réaction en fonction d'un seuil de fluorescence propre à chaque bille. La fluorescence émise par le fluorochrome « reporter » est détectée par un photomultiplicateur à la sortie de la veine liquide.

- Le lecteur de microplaques et l'ordinateur pilotant le logiciel d'acquisition des données

Des plaques de 96 puits (type ELISA) sont utilisées. Une aiguille descend dans chaque puits, aspire le mélange réactionnel dans la veine liquide. Les billes sont excitées à la sortie du flux, par le jeu de deux lasers. Les billes sont détectées et comptées jusqu'à ce que chacune d'entre elles ait été détectée au moins 100 fois, soit au moins 10 000 événements comptés (100 x 100) (Fig 6B, p68). Pendant cette lecture, on peut suivre en temps réel cette acquisition, par la progression du pic d'acquisition des données. Le logiciel d'acquisition permet de détecter et d'éliminer les doublets de billes, qui ne sont pas utilisés dans le pic d'acquisition (Fig 6C, p68). Pendant l'acquisition, il est également possible de suivre le positionnement du nuage de billes au sein d'un masque pré-établi, chaque nuage correspondant à un lot de microsphères (Fig 6D, p68).

- Caractéristiques de cette méthodologie

- ✓ Spécificité : elle dépend de la qualité des antigènes purifiés, des anticorps ou des sondes qui recouvrent les billes.
- ✓ Sensibilité : elle dépend de la qualité du marquage fluorescent et de la stabilité de celui-ci. Il faut savoir que les billes sont très sensibles à la lumière. Les

lavages effectués au sein de certains protocoles peuvent également influencer la sensibilité de la méthode (perte de billes).

- ✓ Temps de manipulation : Chaque plaque de réaction contient 96 puits et le temps moyen de lecture d'un puits varie de 20 secondes à 1 minute 30 en moyenne.
- ✓ Multiplexages des analyses : il est possible de quantifier le taux de 15 cytokines dans un seul tube ou de détecter les différents allèles d'un locus HLA. Les possibilités de multiplexage offrent la possibilité d'avoir jusqu'à 100 billes différentes dans le même tube.

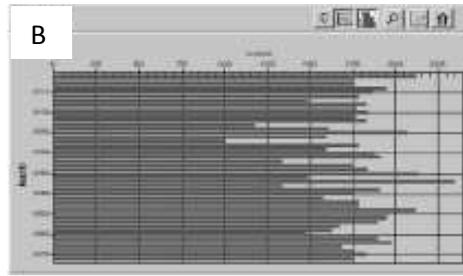
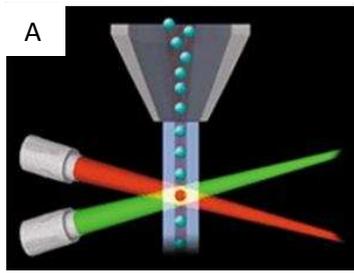
- Applications

Cette méthodologie est principalement utilisée pour la détection d'anticorps anti-HLA. Mais de plus en plus d'applications se développent quantifiant les cytokines dans le surnageant de cultures cellulaires ou *in vivo* dans le sérum des animaux. Ainsi, une étude récente rapporte la détection et la quantification de 15 cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, TNF $\gamma$ , TNF), simultanément dans le surnageant de culture de cellules mononuclées de sujets sains et de patients atteints de maladies auto-immunes (de Jager et al. 2003).

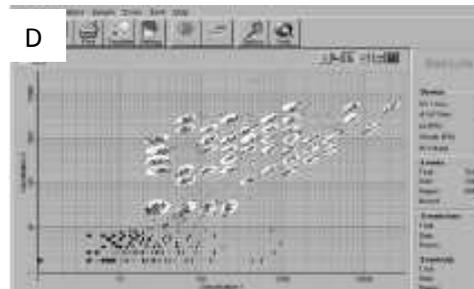
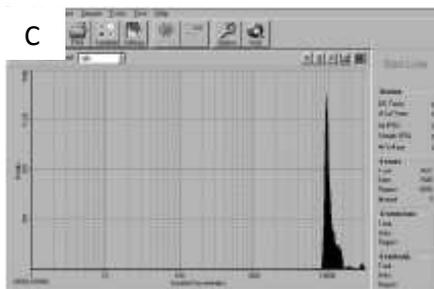
Il s'agit donc d'un système multi-analytique puissant, capable d'identifier et de quantifier, plus d'une dizaine de cytokines et de chemokines, dans le même puits et ce, avec un volume d'échantillon bien inférieur à celui utilisé avec les tests ELISA. Toutefois, cette méthodologie nécessite un équipement coûteux (Scholander et al. 2002) et la sensibilité est variable selon les études : sensibilité comparable à celle d'un test ELISA (Ray et al. 2002, de Jager et al. 2003) ou sensibilité meilleure (Coggins et al. 2002).

Figure 6 : Illustration de la technologie Luminex™ (Moalic et al. 2004).

A. Lasers rouge et vert excitant une microsphère. B. Comptage des billes lors de l'acquisition.



C. Pic d'acquisition des données D. Classification des nuages de billes selon les fluorescences rouge et infrarouge émises



## b)Analyse de l'expression de gènes

### *RT-qPCR temps réel*

L'étude de l'expression de gènes par la quantification relative d'ARNm de cytokines et de facteurs transcriptionnels peut être réalisée par transcription inverse-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Cette technique représente un intermédiaire entre le simple dosage ELISA et les puces à ADN, puisque l'expression d'une sélection de plusieurs gènes cibles peut être quantifiée simultanément selon une sensibilité compatible avec la mesure de variations fines et précoces (Stordeur et al. 2002, Asselah et al. 2005, Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005). L'obtention de la quantification relative de l'expression des ARNm utilise le calcul du «  $\Delta\Delta Ct$  » qui permet de normaliser l'expression des gènes cibles par rapport à des gènes de référence, dans des puits exposés par rapport à des puits témoins (détail du calcul en annexe 13). Parmi les recommandations à respecter afin d'assurer la validité des résultats, l'utilisation de plusieurs gènes de référence lors du calcul du «  $\Delta\Delta Ct$  » est fortement recommandée (Vandesompele et al. 2002).

Cette technique d'analyse a déjà été utilisée plusieurs fois dans le cadre de l'étude de la physiopathologie de l'aspergillose invasive (Cortez et al. 2006, Alekseeva et al. 2009, Lee et al. 2009) et des pneumopathies d'hypersensibilité (Prasse et al. 2006, Gupta et al. 2009).

## *Puces ADN*

Les puces à ADN sont des petites surfaces solides sur lesquelles un grand nombre de sondes ont été fixées les unes après les autres, de manière ordonnée. Leur principe repose sur l'hybridation de sondes à leurs cibles complémentaires. Elles sont utilisées pour étudier l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt ou pour mettre en évidence une variation dans une séquence donnée (analyse de mutations ou de polymorphismes bi-alléliques) (Figure 7, p72). Deux procédés de fabrication ont été utilisés:

-la synthèse *in situ* des puces à oligos, « oligochips » : cette stratégie consiste à utiliser des oligonucléotides de 20 à 25 mères, spécifiques de chaque région de gène d'intérêt, qui sont synthétisés directement sur la puce. L'avantage de ce procédé est que des milliers d'oligonucléotides spécifiques peuvent être synthétisés et fixés sur une seule puce, permettant ainsi une analyse élargie d'un grand nombre de gènes ainsi qu'un grand potentiel de miniaturisation. Son inconvénient réside dans le fait que la taille de ces oligonucléotides est courte, et leur prix de revient élevé.

-la préparation d'ADN complémentaire (ADNc) et leur fixation sur un support solide : les banques de clones d'ADNc spécifiques d'un grand nombre de gènes sont synthétisées par transcription inverse des ARN messagers (ARNm) de différentes cellules et tissus d'intérêt. Les clones d'ADNc sont amplifiés par PCR puis déposés par un robot sur une surface solide. Cette stratégie de fabrication présente des avantages : le prix des puces ainsi fabriquées est peu élevé comparé à celui des puces à oligonucléotides et le système est très flexible. Les inconvénients majeurs de ce système résident dans la gestion et le maintien des clones d'ADNc et des produits PCR, contamination des banques de clones par certains bactériophages.

- Support

Trois types de support sont utilisés dans la fabrication des puces : les supports en plastique (principalement les polymères), le silicium et les lames de verre. Les lames de verre sont souvent préférées puisqu'elles ont l'avantage d'être rigides et transparentes, ce qui facilite leur manipulation et la lecture.

- Sondes

Les sondes fixées à un support peuvent être de deux types :

- ✓ ADN préparés par amplification génique (PCR)
- ✓ Clones d'ADN complémentaires (oligonucléotides dont les séquences varient entre 20 et 70 bases), issus d'une synthèse chimique.

Une puce ou « array » peut contenir des millions de sondes.

- Cibles

Les cibles sont des extraits d'acides nucléiques (ADN ou ARN) à tester. Leur nature, comme celle des sondes, dépend des applications que l'on veut faire. Pour l'étude de l'expression de gènes, les cibles sont des ADNc issus de RT-PCR d'ARNm de différentes cellules et tissus d'intérêt.

- Marquage

Différents types de marquages ont été utilisés pour la détection des produits hybridés à leurs cibles complémentaires. La méthode de marquage dépend du type de puce utilisée. Par exemple, les puces à oligonucléotides sont marquées par les fluorophores Cy3 et Cy5. Pour les puces composées de support en nylon, le marquage se fait par incorporation d'éléments radioactifs ( $P^{32}$ ) ou par colorimétrie grâce à l'emploi de différentes enzymes.

Chacun de ces marquages présente des avantages et des inconvénients. Le marquage par des fluorophores permet l'hybridation simultanée de deux sondes, marquées par deux fluorophores distincts. Ceci peut être particulièrement intéressant pour différencier deux entités au sein d'une même expérience, par exemple des gènes provenant d'un tissu sain de ceux d'un tissu tumoral. La colorimétrie présente également cet avantage. Le marquage radioactif, en revanche, est dénué de cet avantage, cependant, sa sensibilité supérieure permet la détection de quantités plus faibles (quelques dizaines de copies).

En pratique, après l'hybridation de la sonde à sa cible et plusieurs étapes de lavage, les différents signaux d'hybridation sont captés par différents systèmes de détection tels que des scanners classiques ou les scanners laser avec optiques confocales. Quel que soit le système de détection utilisé, l'intensité du signal émis est proportionnelle à la quantité de cible hybridée à sa cible complémentaire.

- Méthodes d'analyse des résultats

Le traitement du signal émis par les différents complexes sondes-cibles nécessite l'emploi d'outils mathématiques et biostatistiques sophistiqués. Un grand nombre de méthodes d'analyse de données utilisant les algorithmes a été décrit. Les deux méthodes les plus utilisées pour l'analyse des données sont :

- ✓ L'analyse supervisée: dans ce cas, le modèle d'algorithme utilisé va permettre de prédire l'appartenance du tissu ou de l'échantillon étudié à des classes de gènes ou de tumeurs préalablement définies;
- ✓ L'analyse non supervisée: est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des profils d'expression de gènes par puces à ADN.

- Caractéristiques de cette méthodologie
  - ✓ Avantages : la technologie des puces à ADN présente de nombreux avantages : rapidité, facilité d'utilisation, automatisation, précision. Sa capacité d'analyse à grande échelle permet d'étudier simultanément des milliers de gènes. La miniaturisation du système facilite grandement la manipulation des échantillons.
  - ✓ Limites : malgré d'importantes améliorations apportées aux différentes méthodes de fabrication des puces, aux différents systèmes de contrôle, de détection du signal, cette technologie demande encore de nombreuses approches de validation. Il existe une grande hétérogénéité des échantillons, des supports et des méthodes d'analyse statistiques utilisés d'une étude à l'autre. Des efforts de standardisation à l'échelle internationale sont prévus, afin d'harmoniser les techniques, la représentation des données et de créer des bases de données accessibles à tous les laboratoires utilisant des puces. Ces efforts de standardisation devraient permettre de comparer les résultats obtenus sur des plates-formes différentes.
- Applications

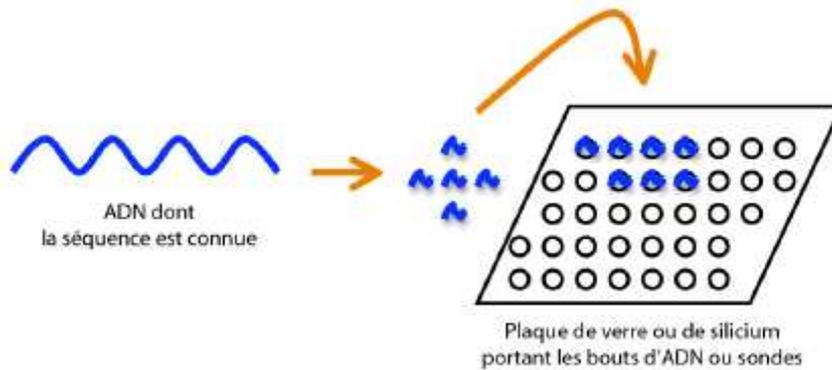
Les puces à ADN sont principalement utilisées dans le domaine de la recherche fondamentale, pour la caractérisation des gènes responsables de maladies héréditaires et l'étude de l'expression de gènes, mais elles sont aussi utilisées en clinique, comme outils de pratique courante pour l'aide au diagnostic, pour caractériser un marqueur pronostic, et pour l'étude de nouvelles cibles thérapeutiques. L'application des puces à ADN la plus répandue actuellement est l'étude de l'expression de gènes. Grâce cette technologie, il est possible d'étudier simultanément, le niveau d'expression de milliers de gènes dans un tissu sain ou tumoral et de déterminer avec précision quels gènes sont spécifiquement sur- ou sous-exprimés dans certaines cellules.

Les puces à ADN sont donc très utilisées en cancérologie où elles permettent de comparer l'expression des gènes entre les tissus sains et tumoraux et d'établir la signature génétique de chaque type de tumeur (Jelinek et al. 2003, Ramaswamy et al. 2003). Une analyse par puces à ADN a également permis de mieux appréhender la réponse initiale de l'hôte lors de l'exposition à des conidies aspergillaires (Cortez et al. 2006). De la même façon, les puces à ADN ont permis de mettre en évidence des profils d'expressions de gènes différents en cas de pneumopathies interstitielles diffuses et de pneumopathies d'hypersensibilité (Selman et al. 2006, Studer and Kaminski 2007).

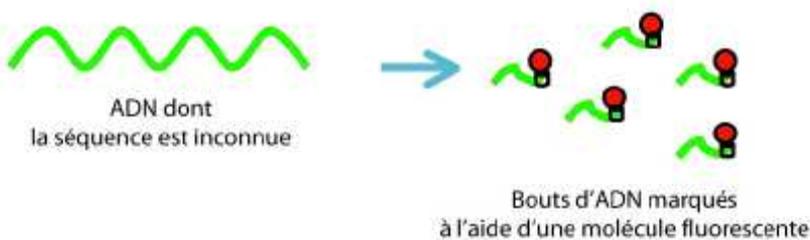
Cette technologie reste très coûteuse et génère une quantité de résultats impressionnante et parfois d'interprétation difficile. Bien souvent, les premiers résultats issus d'une analyse par puce à ADN sont ensuite confirmés par d'autres techniques telles que le dosage ELISA ou la RT-qPCR temps réel.

Figure 7 : Illustration de la technologie puce à ADN.

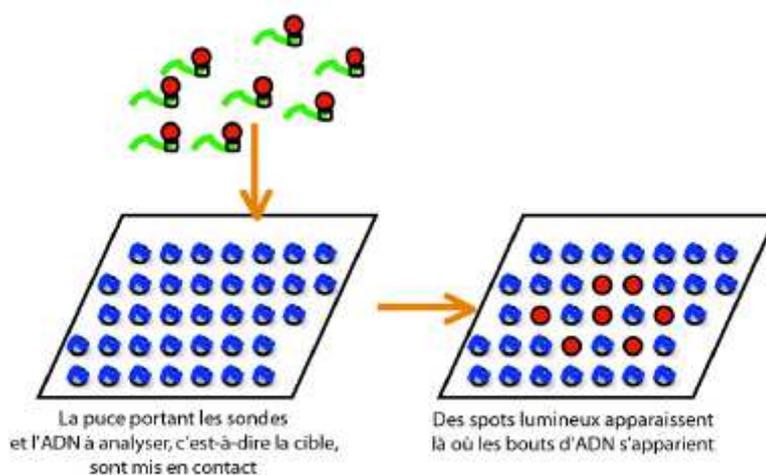
1. La puce : des sondes (ici, ADNc de séquence connue) sont fixées sur un support.



2. La cible : ADN simple brin de séquence inconnue, marqué par un fluorophore



3. L'hybridation: lorsque la cible est en contact avec la sonde, seuls les séquences d'ADN complémentaires vont s'hybrider. La puce est lavée plusieurs fois afin qu'il ne reste sur la lame que les brins parfaitement appariés. Là où les deux brins d'ADN s'apparient apparaît un spot lumineux.



## c) Identification des populations cellulaires et analyse des molécules de surface cellulaire

### *Cytométrie en flux*

Initialement développée pour le dénombrement de cellules en suspension et l'évaluation de leur taille, la cytométrie en flux a rapidement été appliquée à l'analyse, la caractérisation et la séparation des cellules.

La théorie de la cytométrie en flux repose sur deux principes fondamentaux :

- La focalisation hydrodynamique, qui assure le défilement « en file indienne » des cellules dans une gaine liquide.
- L'utilisation d'un système d'illumination et de détection suffisamment performant pour effectuer l'analyse d'une cellule donnée en un temps très court (quelques microsecondes) (Boutonnat et al. 2003).

- Principe général de fonctionnement (Figure 8, p74)

Les cellules (ou constituants cellulaires) isolées, et en suspension, sont entraînées sous pression vers un projecteur où elles sont centrées dans l'axe d'un jet liquide grâce à un flux laminaire liquide. L'illumination des cellules ainsi que l'analyse des signaux correspondants (diffusion, fluorescence) interviennent à la sortie de l'injecteur. La transformation des signaux lumineux en signaux électriques et leur amplification conduisent à la représentation de la population analysée sous la forme de figures de distribution (histogramme mono-paramétrique ou bi-paramétrique).

- Différents types d'analyse

- ✓ Diffusion

La cytométrie de flux distingue deux types de diffusion

-diffusion « petit angle » : est directement liée à la taille des cellules.

-diffusion « grand angle » : reflète la structure interne de la cellule (granularité, rapport nucléo-cytoplasmique).

- ✓ Fluorescence

Les cellules animales sont peu fluorescentes par elles-mêmes aux longueurs d'onde d'excitation fournies par les lasers, mais il existe des composés chimiques, fluorescents à ces longueurs d'onde, qui ont la propriété de se fixer spécifiquement sur certains constituants cellulaires.

- Différentes modalités de tri cellulaire

- ✓ Tri par cytométrie en flux : la cytométrie de flux permet le tri physique de cellules ou de constituants cellulaires. Les sous-populations sont délimitées par

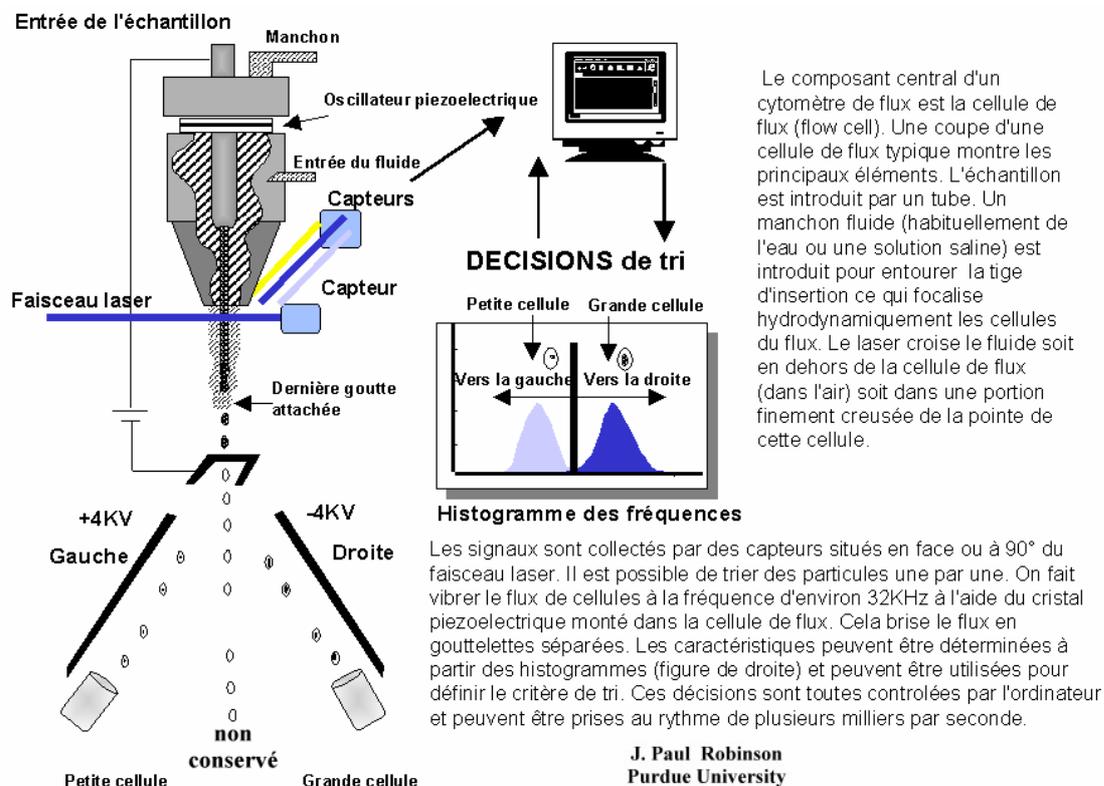
des fenêtres pour être triées. Les cellules ainsi triées peuvent conserver leur viabilité, selon la nature du fluorochrome employé, et être maintenues en culture ou faire l'objet d'analyses structurales et fonctionnelles (Boutonnat et al. 2003). Cette possibilité est un des avantages majeurs de la cytométrie de flux. Le tri peut s'effectuer de différentes manières (tri avec / sans gouttelette, tri magnétique, élutriation).

- Exemples d'applications

Cette technologie est celle qui est utilisée pour caractériser la composition cytologique en lymphocyte CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> des liquides de lavage broncho-alvéolaire prélevés chez les patients atteints de pneumopathie d'hypersensibilité (Mroz et al. 2008) et pour identifier les molécules de surface présentes sur les lymphocytes prélevés au niveau pulmonaire chez des souris exposées à *S. reactivus* (Prasse et al. 2006, Nance et al. 2008, Simonian et al. 2009b). La cytométrie en flux a été utilisée pour étudier le rôle des TLRs (Netea et al. 2003) et de l'apoptose (Berkova et al. 2006) dans le développement de l'aspergillose invasive.

La cytométrie de flux est une technique dont les champs d'applications sont vastes. Ces analyses multiparamétriques sur de grands échantillons permettent une meilleure approche de la complexité du fonctionnement cellulaire.

Figure 8 : Illustration de la technologie cytométrie en flux (<http://pedagogie.ac-amiens.fr/svt/info/logiciels/cytometrie/tri.png>).



### *Autres techniques*

La caractérisation immunologique des molécules présentes à la surface des cellules *in vitro* ou *in vivo* peut également être réalisée par un grand nombre de méthodes immunologiques. Parmi celles les plus fréquemment utilisées dans le cadre de la recherche sur l'aspergillose pulmonaire et les pneumopathies d'hypersensibilité, on trouve :

- Les immunotransferts (Western blot) : cette technique permet la détection d'antigènes membranaires ou cytoplasmiques, préalablement séparés par électrophorèse à une ou deux dimensions, par réaction de ces antigènes par les anticorps monoclonaux correspondants. Dans un premier temps, les molécules cellulaires sont extraites et solubilisées, puis soumises à une séparation en gel de polyacrylamide. Puis, les antigènes séparés sur gel sont transférés sous l'action d'un champ électrique sur un filtre de nitrocellulose où ils se lient. La présence sur la feuille de nitrocellulose de l'antigène est révélée par un anticorps correspondant, puis un sérum anti-immunoglobuline préalablement marqué par un radio-isotope ou la peroxydase.
- L'immunofluorescence directe: cette technique consiste à appliquer sur les cellules un immun-sérum préalablement combiné à un colorant fluorescent. Les globulines anticorps fluorescentes se fixent à l'antigène ; les globulines non anticorps, également fluorescentes, sont éliminées par lavage. Observée au microscope, la cellule est devenue fluorescente. Cette technique présente l'avantage de mettre rapidement en évidence un antigène donné, son inconvénient étant que pour chaque type d'antigène étudié, un sérum fluorescent spécifique doit être préparé.
- L'immuno-histo-enzymologie : ces techniques utilisent le même principe que l'immunofluorescence mais l'utilisation d'enzyme comme marqueur d'anticorps offre des avantages. En effet, les colorations histochimiques de ces enzymes permettent l'observation au microscope optique et électronique, avec une localisation précise, des constituants cellulaires. De plus, l'enzyme est facilement dosable et permet également une analyse quantitative. Lorsqu'on utilise les enzymes comme marqueurs, que ce soit pour la détection ou pour le dosage de constituants, il faut respecter les critères suivants pour obtenir une bonne efficacité : 1) l'enzyme doit avoir une grande activité spécifique qu'elle ne doit pas perdre après la réaction de couplage 2) elle doit être relativement stable à la température du laboratoire 3) il faut pouvoir la trouver facilement dans le commerce sous de grandes garanties de pureté. L'enzyme de premier choix est la peroxydase, puis viennent la phosphatase alcaline extraite d'*Escherichia coli* et la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (Avrameas and Ternynck 1971). Cependant, la peroxydase, comparées aux autres enzymes, permet une localisation ultrastructurale plus précise, est très stable, se conserve longtemps et peut être détectée à très faibles doses (Kalil et al.).



# **Travaux de recherche**



## *1Rôle de la germination des conidies aspergillaires dans la physiopathologie de l'aspergillose invasive*

### a) Contexte et objectif

L'aspergillose invasive pulmonaire est une infection opportuniste dont l'incidence augmente parallèlement à l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (Lin et al. 2001). Les facteurs de risques majeurs de l'aspergillose invasive pulmonaire sont la neutropénie et la corticothérapie prolongée à dose élevée. Le développement d'une réponse inflammatoire appropriée est donc la base de la défense contre l'invasion fongique. Plusieurs auteurs ont souligné le rôle crucial joué par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles dans le contrôle de l'infection (Romani 2004, Walsh et al. 2005). La libération de molécules impliquées dans l'immunité innée par ces cellules phagocytaires professionnelles au cours de l'infection par *A. fumigatus* a également fait l'objet de plusieurs travaux (Meier et al. 2003, Pylkkanen et al. 2004, Cortez et al. 2006).

Cependant, l'épithélium respiratoire reste la première barrière de défense rencontrée par les conidies lors de l'inhalation et joue donc probablement aussi un rôle important dans le développement d'une réponse inflammatoire efficace. Les modèles animaux ont d'ailleurs démontré que la plus grande partie des conidies inhalées restent bloquées dans le tractus respiratoire supérieur du fait de la coopération efficace entre l'épithélium respiratoire et le recrutement de macrophages alvéolaires (Stephens-Romero et al. 2005). Quelques études se sont intéressées à la production de médiateurs inflammatoires sur la lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 après exposition aux moisissures ou aux extraits fongiques (Borger et al. 1999, Kauffman et al. 2000, Huttunen et al. 2003, Zhang et al. 2005, Tai et al. 2006). Ces études se sont concentrées sur des espèces fongiques bien plus allergisantes qu'*A. fumigatus* (Kauffman et al. 2000).

Les conidies d'*A. fumigatus* sont généralement quantitativement moins représentées dans l'air inhalé par rapport à d'autres espèces fongiques. Pourtant, *A. fumigatus* est la principale espèce étiologique des aspergilloses invasives pulmonaires. Ainsi, les différences de réponse observées lors de l'inoculation de conidies d'*A. fumigatus* et de conidies d'une autre espèce fongique, non pathogène, pourraient aider à mieux comprendre pourquoi *A. fumigatus* est un agent étiologique fréquent des infections invasives.

L'objectif de l'étude était donc d'étudier la réponse inflammatoire précoce des cellules épithéliales pulmonaires après exposition aux conidies d'*A. fumigatus* en utilisant la PCR temps réel pour quantifier l'expression de médiateurs inflammatoires choisis (Stordeur et al. 2002, Asselah et al. 2005). Dans notre étude, nous avons utilisé *Penicillium chrysogenum*, comme contrôle de l'effet induit par l'adsorption de conidies (Botterel et al. 2008). *P. chrysogenum* est une moisissure prédominante dans l'environnement, avec une taille conidienne (3-4  $\mu\text{m}$  de diamètre) similaire à celle d'*A. fumigatus*. Bien que *P. chrysogenum* puisse pousser à 37°C (de Hoog GS et al. 2000), cette moisissure est rarement responsable d'infection invasive. D'autre part, nous avons également étudié l'effet des stéroïdes sur le

développement de la réponse inflammatoire générée par les cellules A549 exposées aux conidies d'*A. fumigatus*.

## b) Matériels et Méthodes

L'ensemble des milieux de culture, réactifs, matériels et protocoles utilisés sont référencés en annexe (annexe 1).

*Préparation des suspensions de conidies d'A. fumigatus et de P. chrysogenum* (annexe 2a).

Des souches de référence d'*A. fumigatus* (IP2279-94) et de *P. chrysogenum* (IP 1652.86) ont été mises en culture sur tubes Malt agar 2% (DIFAL, Seysses, France) et incubées à leur température optimale de croissance respective (37°C pour d'*A. fumigatus* et 26°C pour *P. chrysogenum*). Après 7 jours de culture, les conidies de chaque espèce ont été récupérées dans du PBS tween 0.01% (Sigma France®). Les suspensions de conidies ont été comptées en cellule de Malassez et calibrées à 10<sup>6</sup>conidies/mL.

Pour *A. fumigatus*, des suspensions de 10<sup>6</sup>conidies/mL après inactivation par la chaleur (1h à 100°C) ont également été préparées.

*Préparation des cellules épithéliales pulmonaires* (annexe 3a) :

La lignée cellulaire utilisée, A549, issue d'un carcinome pulmonaire alvéolaire, est constituée de pneumocytes de type II et a été obtenue auprès de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne).

Les cultures cellulaires ont été réalisées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture Dulbecco modifié (DMEM, Invitrogen®, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Biowest®, Nuillé, France) et de 25µg/mL de gentamicyne (Sigma Aldrich®, St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été ensemencées à raison de 2.10<sup>4</sup>cellules/mL, entretenues dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (Dutscher®, Brumath Cedex, France) et cultivées dans des plaques de 24 puits pour les expériences d'exposition (Dutscher®). Tous les deux jours, le milieu de culture était changé. Les cellules étaient à confluence en 5 jours. L'absence de contamination par des mycoplasmes a été vérifiée une fois par mois par PCR (Venor GeM Mycoplasma Detection Kit, Biovalley®, Marne-la-Vallée, France) (annexe 3b).

### *Exposition des cellules aux conidies d'A. fumigatus et de P. chrysogenum*

Les expositions ont été réalisées à J5 de culture, lorsque les cellules étaient à confluence, dans des plaques de 24 puits (1 mL/puits). Pour chaque exposition, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par du milieu de culture contenant l'agent à tester. Chaque condition d'exposition a été réalisée lors de trois expériences indépendantes sur deux puits de culture.

Les cellules A549 à confluence ont été exposées à des suspensions de conidies calibrées à  $10^6$  conidies/mL. Des suspensions de conidies d'*A. fumigatus*, vivantes et tuées par la chaleur, ainsi que des suspensions de conidies de *P. chrysogenum* ont été testées. Dans chaque cas, les cellules A549 ont été exposées pour des durées de 2h, 4h, 8h ou 24 h. Des tests d'exposition aux suspensions de conidies d'*A. fumigatus* vivantes ont également été réalisés en présence de dexaméthasone (Sigma Aldrich®) aux concentrations  $10^{-6}$ M et  $10^{-7}$ M. Dans chaque cas, afin d'optimiser et de standardiser le contact entre les conidies et les cellules, les plaques de culture étaient centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Lors de chaque expérience d'exposition, au moins un puits non exposé (calibrateur), contenant uniquement du milieu de culture, a été réalisé.

### *Dosage des ARNm de cytokines*

- *Lyse cellulaire et extraction des ARN* (annexe 4)

Les ARN totaux ont été extraits des cellules A549 avec le kit RNable™ (Eurobio®, Courtaboeuf, France) qui contient du phénol et du thiocyanate de guanidine. Les cellules présentes dans les puits cellulaires ont été lysées et la séparation de l'ARN a reposé sur la capacité à précipiter de l'ARN et de l'ADN en fonction du pH. Dans les conditions acides, l'ARN reste en solution aqueuse, l'ADN et les protéines se trouvent alors à l'interphase. Ainsi, l'homogénat a été séparé en phase aqueuse (ARN) et organique (ADN et protéines) par l'ajout de chloroforme. Une centrifugation en présence d'isopropanol a permis la récupération des ARN purs et non dégradés. Le culot contenant les ARN a été lavé à l'alcool 75°C. La qualité et la quantité des ARN ainsi obtenus ont été évaluées par dosage spectrophotométrique sur le Nanodrop ND 1000™ (Thermo Scientific®). D'autre part, une électrophorèse en gel d'agarose à 1% a permis de visualiser l'absence de « smear » (ARN dégradés) pour les fractions 28S, 18S et 16S après coloration par le bromure d'éthidium (BET). Les ARN obtenus ont été dilués dans de l'eau RNase free afin d'obtenir des solutions calibrées à 250 ng/μL.

- *Transcription inverse (RT)* (annexe 5).

Les ADNc ont été obtenus par transcription inverse avec amorces aléatoires (random hexamer) permettant une amplification globale de tous les ARNm présents dans l'extrait. La réaction a été réalisée sur un thermocycleur MasterCycler Personal, Eppendorf® dans un volume final de 20 μL : 4 μL d'ARNm ont été ajoutés à 2 μL de Dithiothreitol (DTT) 0.1M (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France), 0.5 μL de Superscript II RnaseH-Reverse transcriptase H-200 U/μL (Invitrogen®), 4 μL First Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM

KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen<sup>®</sup>), 2 µL dNTP mix 5 mM (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>, Uppsala, Sweden), 6 µL random hexamers pd(N)<sub>6</sub> 0.5 µg/µL (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>), 0.5 µL RNAsin<sup>®</sup> 40 U/µL (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA). Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C. Un témoin sans reverse transcriptase et un témoin sans ARNm ont été inclus dans chaque série.

- *Quantification relative par qPCR temps réel* (annexe 6a).

Les ADNc ont été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure avant amplification. La quantification des ARNm cibles a été réalisée par qPCR en temps réel, par quantification relative sur LightCycler 2.0<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Meylan, France) dans un volume final de 20 µL : 2µL Fast Start SYBR Green Buffer 10X (Fast Start SYBR Green Kit<sup>TM</sup>, Roche Diagnostics<sup>®</sup>), 1.6 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM, concentration finale 3mM), 0,08 µL d'amorces sens et antisens (concentration 50 µM), 8 µL d'ADNc (dilué au 1/20<sup>ème</sup>) et de l'eau stérile. Les conditions d'amplification étaient : 10 minutes de dénaturation à 95°C, 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes et 65°C pendant 1 minute). Les valeurs quantitatives étaient obtenues à partir du cycle seuil (Ct). Chaque échantillon a été testé en duplicate. Après amplification, les courbes de fusion ont été étudiées afin de valider la spécificité des produits de qPCR en temps réel. Les amorces utilisées proviennent des publications du Pr I. Bieche (Faculté de Paris V) (Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005) (annexe 6b) et ont été dessinées avec le programme Oligo 5.0. Deux gènes référents ont été utilisés pour la quantification relative : le gène P0 (RPLP0, 36B4, numéro d'accès GenBank NM\_001002), codant une phosphoprotéine ribosomale et TBP (numéro d'accès GenBank NM\_003194) qui code une protéine de liaison à l'ADN du complexe TFIID.

L'interprétation des résultats a été réalisée par la technique du  $\Delta\Delta C_t$  qui permet d'exprimer la production d'ARNm d'un gène cible par rapport à un gène de référence au sein de chaque puits cellulaire. Cette valeur est ensuite rapportée à celle des puits calibrateurs (« témoins non exposés ») afin de déterminer la valeur de ratio normalisé « N », qui traduit l'expression du gène cible dans les puits exposés par rapport aux puits non exposés. La normalisation par rapport à un gène de référence va permettre dans une certaine mesure de s'affranchir des erreurs liées à la quantité initiale d'échantillon, à l'extraction, à la dégradation de l'ARN, aux erreurs de pipetage et de rendement de reverse transcription. Par exemple pour N=3, les cellules du puits observé transcrivent 3 fois plus d'ARNm du gène étudié que les cellules des puits calibrateurs (cellules non exposées). (Détail du calcul en annexe 6c).

#### *Analyse statistique des résultats*

Les variations d'ARNm au cours du temps ont été comparées statistiquement par test ANOVA. Les différences observées ont été considérées comme significatives pour p<0.05.

### c) Résultats

Les cellules ont été incubées en présence d'une suspension de  $10^6$  conidies/mL d'*A.fumigatus* ou de *P. chrysogenum* pendant 2h, 4h, 8h et 24h. L'étude au cours du temps permettait d'évaluer une éventuelle réponse cellulaire directement liée au contact avec les conidies (temps 2h) et ensuite, d'évaluer la réponse cellulaire tout au long de la formation du mycélium, avec, pour le temps maximum d'incubation de 24h, une bonne extraction des ARN cellulaires sans envahissement des puits par les filaments aspergillaires.

Nous avons observé une augmentation de la réponse inflammatoire parallèlement à la croissance d'*A.fumigatus* avec l'induction des ARNm du TNF $\alpha$ , de l'IL-8 et du GM-CSF dès 8h d'incubation (Figure 9, p82: à 8h  $N_{\text{TNF}\alpha}=3.29$  ;  $N_{\text{IL-8}}=3.31$  ;  $N_{\text{GM-CSF}}=4.12$ ). Cette induction était maximale à 24h (Figure 9, p82 : à 24h,  $N_{\text{TNF}\alpha}=7.5$  ;  $N_{\text{IL-8}}=9.36$  ;  $N_{\text{GM-CSF}}=7.72$ ).

Cette réponse inflammatoire n'a pas été observée lorsque les cellules étaient exposées à des conidies d'*A.fumigatus* inactivées par la chaleur (Tableau 5, p83 : à 24h,  $N_{\text{TNF}\alpha}=1.4$  ;  $N_{\text{IL-8}}=0.7$ ;  $N_{\text{GM-CSF}}=2$ ).

Aucune réponse inflammatoire significative n'a été observée au cours du temps lors du contact avec les conidies de *P. chrysogenum* (Tableau 5, p83 : à 24h,  $N_{\text{TNF}\alpha}=1.86$  ;  $N_{\text{IL-8}}=1.4$ ;  $N_{\text{GM-CSF}}=1.8$ ).

Lorsque les cellules ont été exposées aux conidies d'*A.fumigatus* en présence de dexaméthasone ( $10^{-7}$  M), la réponse inflammatoire a été réprimée (Figure 10, p82: à 24h,  $N_{\text{TNF}\alpha}=0.05$  ;  $N_{\text{IL-8}}=1.82$  ;  $N_{\text{GM-CSF}}=0.7$ ).

Figure 9 : Induction de l'IL-8, du TNF $\alpha$  et du GM-CSF au cours de la croissance des conidies d'*A.fumigatus*. \* : augmentation significative de N à 8h (IL-8 p=0.005 ; TNF $\alpha$  p=0.002 ; GM CSF p=0.003) et  $\alpha$  : augmentation significative de N à 24h (p=0.0001 pour IL-8, TNF $\alpha$  et GM CSF).

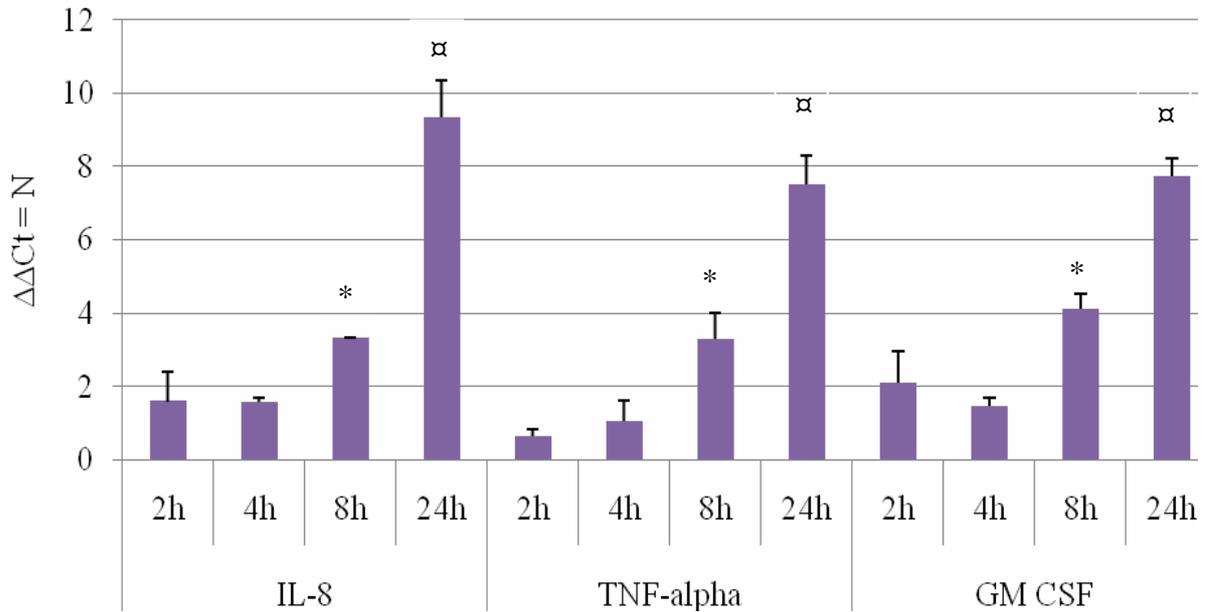


Figure 10 : Absence d'induction de l'IL-8, du TNF $\alpha$  et du GM-CSF en présence de conidies d'*A.fumigatus* et de dexaméthasone.  $\alpha$  : diminution significative de N à 24h (p=0.0001 pour IL-8, TNF $\alpha$  et GM CSF).

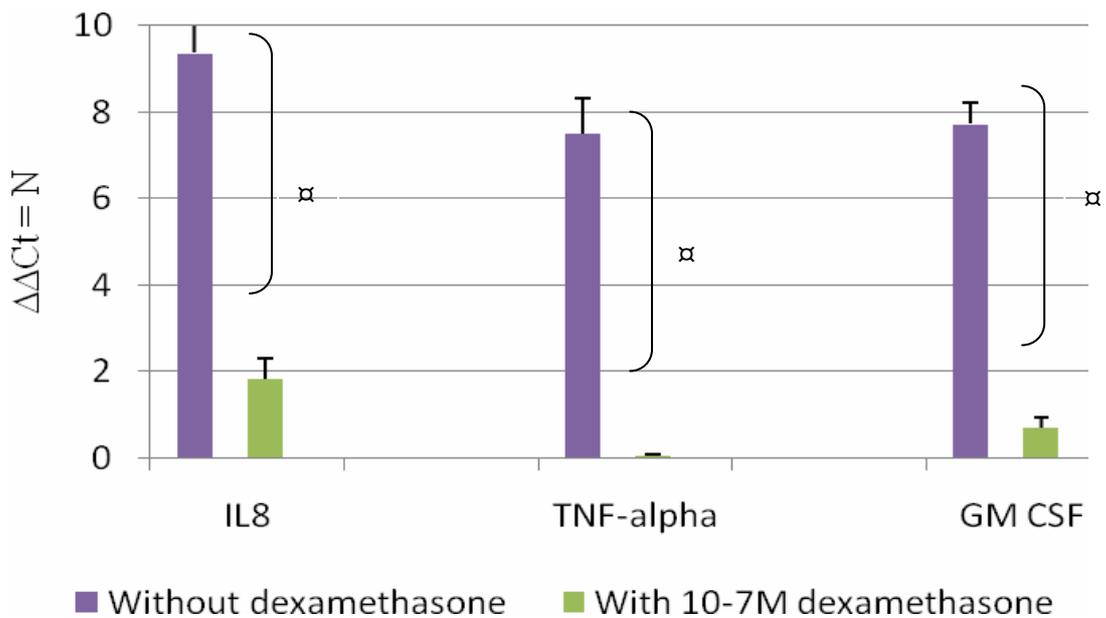


Tableau 5 : Résultats obtenus après exposition des cellules A549 à *P. chrysogenum* et à *A. fumigatus* (conidies viables et inactivées par la chaleur), avec et sans dexaméthasone.

Type d'exposition		TNF $\alpha$		IL-8		GM-CSF	
		N	<i>Ecart-type</i>	N	<i>Ecart-type</i>	N	<i>Ecart-type</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>2h</b>	0.63	<i>0.19</i>	1.59	<i>0.79</i>	2.1	<i>0.84</i>
	<b>4h</b>	1.04	<i>0.56</i>	1.57	<i>0.13</i>	1.47	<i>0.22</i>
	<b>8h</b>	3.29	<i>0.73</i>	3.31	<i>0.02</i>	4.12	<i>0.4</i>
	<b>24h</b>	7.5	<i>0.81</i>	9.36	<i>0.99</i>	7.72	<i>0.49</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> + desxamethasone (10 <sup>-7</sup> M)	<b>2h</b>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	<b>4h</b>	0.13	<i>0.1</i>	0.7	<i>0.19</i>	0.33	<i>0.03</i>
	<b>8h</b>	0.3	<i>0.25</i>	1.54	<i>0.07</i>	0.64	<i>0.26</i>
	<b>24h</b>	0.05	<i>0.01</i>	1.82	<i>0.48</i>	0.7	<i>0.22</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> Inactivation par la chaleur	<b>2h</b>	0.3	<i>0.1</i>	0.9	<i>0.2</i>	0.9	<i>0.1</i>
	<b>4h</b>	1	<i>0.2</i>	0.5	<i>0.4</i>	1.1	<i>0.4</i>
	<b>8h</b>	0.9	<i>0.8</i>	1.4	<i>0.3</i>	1.9	<i>1</i>
	<b>24h</b>	1.4	<i>0.4</i>	0.7	<i>0.2</i>	2	<i>1.5</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<b>2h</b>	0.74	<i>0.16</i>	3.2	<i>2.9</i>	0.7	<i>0.14</i>
	<b>4h</b>	1.47	<i>1</i>	2.6	<i>0.6</i>	2	<i>1.1</i>
	<b>8h</b>	1.4	<i>0.6</i>	2.58	<i>0.6</i>	1.3	<i>1.1</i>
	<b>24h</b>	1.86	<i>1.2</i>	1.4	<i>0.3</i>	1.8	<i>1.2</i>

NR : Non Réalisé

#### d) Discussion

Une augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-8, de TNF-alpha et de GM-CSF a été quantifiée au cours du temps par RT-qPCR temps réel après exposition de cellules épithéliales pulmonaires A549 à une suspension de conidies d'*A. fumigatus*. Cette augmentation a débuté dès 8h d'exposition et a atteint un maximum au temps 24h. Cette surexpression d'ARNm n'a pas été observée lorsque les cellules ont été exposées aux conidies de *P. chrysogenum* et aux conidies d'*A. fumigatus* inactivées par la chaleur. Aucune augmentation des taux d'ARNm d'IL-8, de TNF-alpha et de GM-CSF n'a été mesurée après 24h d'exposition aux conidies d'*A. fumigatus* en présence de dexaméthasone ( $10^{-7}$  M).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à trois médiateurs dont le rôle dans le développement d'une réponse inflammatoire est établi. Ainsi, l'IL-8 est une chemokine impliquée à la fois dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles et dans la stimulation de leur capacité à phagocyter les conidies d'*A. fumigatus* (Richardson and Patel 1995), le TNF-alpha est une cytokine jouant un rôle important dans la production de chemokines et l'activation des polynucléaires neutrophiles (Mehrad and Standiford 1999, Phadke and Mehrad 2005) et le GM-CSF est un facteur de croissance connu pour son rôle crucial dans la maturation des granulocytes et des macrophages (Walsh et al. 2005). Ces trois médiateurs sont impliqués dans la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, qui régule l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires et cytotoxiques.

La phagocytose des conidies par les cellules A549 aurait pu être le facteur déclenchant la réponse inflammatoire. En effet, une surexpression de chemokines et récepteurs de ces chemokines (IL-8, CCL4, CXCL20, CXCL2) a été décrite dès 2h de contact avec *A. fumigatus* sur des monocytes humains (Cortez et al. 2006). Cependant dans notre étude, une augmentation marquée et progressive des taux d'ARNm d'IL-8, de TNF-alpha et de GM-CSF n'est apparue qu'après 8 heures d'exposition. Ce délai correspond à la croissance mycélienne d'*A. fumigatus* en milieu liquide (Manavathu et al. 1999). Le fait que *P. chrysogenum* pousse moins bien à 37°C, comme la plupart des *Penicillium* spp, peut expliquer la différence de réponse observée entre ces deux moisissures. De la même façon, l'exposition des cellules aux conidies d'*A. fumigatus* inactivées par la chaleur, n'a induit aucune variation significative des taux d'ARNm quantifiés. Des résultats négatifs similaires ont été obtenus lors de l'exposition de cellules A549 à des fragments de mycéliums inactivés (Zhang et al. 2005). Nous ne pouvons pas exclure que l'inactivation par la chaleur des conidies ait pu modifier les structures des épitopes ou détruire des molécules sensibles à la chaleur, comme les protéases, qui semblent jouer un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Cependant, nos résultats sont en accord avec un rapport récent sur le rôle des conidies en germination sur le système immunitaire inné (Hohl et al. 2005). Par ailleurs, des tests d'exposition avec les hyphes et non les conidies, a montré une stimulation des cellules endothéliales avec production *in vitro* d'IL-8 et de TNF alpha (Chiang et al. 2008).

L'exposition des cellules A549 aux conidies d'*A. fumigatus* en présence de dexaméthasone ( $10^{-7}$  M) s'est accompagnée d'une absence de réponse inflammatoire à 8h et à 24h. Par

ailleurs, il a été vérifié que la dexaméthasone ne modifiait pas la croissance d'*A. fumigatus* pour des concentrations allant de  $10^{-3}$  M à  $10^{-7}$  M. L'absence de réponse inflammatoire lors de l'exposition simultanée de conidies d'*A. fumigatus* et de dexaméthasone, conforte l'hypothèse que la corticothérapie soit un facteur de risque majeur de développer une aspergillose invasive pulmonaire, non seulement en limitant l'efficacité des macrophages, mais également par une action au niveau de l'épithélium respiratoire (Nissen and Yamamoto 2000). Bien que le mécanisme d'action le plus probable soit une inhibition de la voie de signalisation NFκB par les corticostéroïdes, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une inhibition de la synthèse d'un produit fongique spécifique qui serait responsable de la réponse immune des A549.

Ces premiers résultats démontrent donc que les conidies d'*A. fumigatus*, lors de leur germination, stimulent la surexpression d'ARNm de médiateurs proinflammatoires par les cellules épithéliales pulmonaires dans les 24 heures d'exposition. Des travaux ultérieurs restent nécessaires afin d'affiner et de compléter la connaissance des voies de signalisation impliquées (chemokines, molécules d'adhésion, récepteurs associés). Cependant, ces résultats confirment le rôle important de l'épithélium respiratoire dans l'initiation de la réponse innée pour prévenir la survenue d'une aspergillose invasive pulmonaire. Ces résultats renforcent également la notion que les corticostéroïdes sont capables de modifier la réponse inflammatoire normale des cellules épithéliales pulmonaires exposées aux conidies d'*A. fumigatus*, ce qui explique, au moins en partie, pourquoi la corticothérapie est un facteur de risque majeur de l'aspergillose invasive pulmonaire.

*Ce travail a fait l'objet d'un article publié en 2009 dans Journal of Medical Microbiology :*

*“Aspergillus fumigatus germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549”*

**Bellanger, AP, Millon L, Khoufache K, Rivollet D, Bièche I, Laurendeau I, Vidaud M, Botterel F et Bretagne S**

**J Medical Microbiol, 2009, 58(Pt2) :174 :9 (Impact factor 2).**

## *2 Etude des interactions initiales entre cellules épithéliales respiratoires et moisissures impliquées dans la maladie du Poumon de Fermier*

La maladie du Poumon de Fermier est une forme d'alvéolite allergique extrinsèque ou pneumopathie d'hypersensibilité, résultant d'une exposition répétée à des microorganismes présents dans les poussières de foin, de pailles ou de graines moisies (Pepys et al. 1963). Dans la forme aiguë, des symptômes pseudo-grippaux prédominent et apparaissent dans les 2 à 9h suivant l'exposition (Girard et al. 2009). Les mécanismes immunologiques et allergiques de la maladie du Poumon de Fermier sont complexes et restent peu connus. Le fait que les modèles cellulaires *in vitro* puissent faire avancer la connaissance des mécanismes en jeu a été souligné lors de la dernière conférence NHLBI/ORD (National Heart Lung and Blood Institute and the Office of Rare Diseases) (Fink et al. 2005). Dans un premier temps, le rôle étiologique de différentes moisissures environnementales a été étudié en analysant leur capacité respective à induire la production de médiateurs de la réponse immune sur l'épithélium respiratoire (lignée A549, pneumocytes de type II). Puis, dans un deuxième temps, les réponses induites par différentes formes de développement (ascospores, conidies et filaments) d'une de ces moisissures, *E. amstelodami*, ont été comparées.

### *2A Réponse cytokinique initiale de l'épithélium respiratoire et rôle étiologique de différentes moisissures environnementales*

#### a) Contexte et objectif

*S. rectivirgula*, actinomycète thermophile, est communément admis comme étant l'agent étiologique principal de la maladie du Poumon de Fermier depuis les travaux de Pepys dans les années 60 (Pepys et al. 1963, Kotimaa et al. 1984). Des moisissures environnementales telles *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et *W. sebi* sont suspectées de jouer un rôle étiologique dans la maladie du Poumon de Fermier sur des arguments mycologiques et sérologiques (Reboux et al. 2001, Roussel et al. 2005b). En effet, ces moisissures sont fréquemment retrouvées en culture dans le foin des agriculteurs malades et une réponse sérologique spécifique vis-à-vis de ces moisissures a été retrouvée chez des agriculteurs malades. Cependant, aucune étude *in vitro* ou *in vivo* n'a vérifié leur rôle dans la physiopathologie de la maladie du Poumon de Fermier jusqu'à présent. En effet, tous les travaux réalisés dans le cadre de la recherche sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans cette maladie étudient exclusivement la réponse à *S. rectivirgula*. La plupart des travaux antérieurs ont étudié la production de cytokines par les macrophages alvéolaires en réponse à une exposition à *S. rectivirgula* (Girard et al. 2009). Seule une équipe s'est intéressée à la réponse de l'épithélium pulmonaire, en utilisant la lignée A549 (Gudmundsson and Hunninghake 1999). L'épithélium pulmonaire est pourtant la première barrière de défense de l'organisme rencontrée lors de l'inhalation de substances antigéniques et cette première interaction est probablement importante dans l'initiation du recrutement cellulaire à l'origine du développement de la maladie du Poumon de Fermier. A notre connaissance, aucun travail sur la réponse des cellules A549 vis-à-vis d'autres agents étiologiques potentiels de la maladie du Poumon de Fermier n'a été réalisé jusqu'à présent.

L'objectif de ce travail était d'étudier la réponse inflammatoire et allergique des cellules épithéliales pulmonaires en réponse à l'exposition à des extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et *W. sebi*. La technique de RT-qPCR temps réel a été utilisée afin de quantifier l'expression des gènes codant l'IL-8, chemokine pro-inflammatoire impliquée principalement dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles (voie Th1), et l'IL-13 (voie Th2), sélectionnée pour son rôle clé dans l'hyperréactivité des voies aériennes supérieures (Wilson et al. 2007).

## b) Matériels et Méthodes

L'ensemble des milieux de culture, réactifs, matériels et protocoles utilisés sont référencés en annexe (annexe 1).

*Préparation des extraits totaux hydrosolubles de S. rectivirgula, A. corymbifera, E. amstelodami et W. sebi* (annexe 2b).

La souche de Lacey de *S. rectivirgula* (DSMZ 43114) a été utilisée ainsi que trois espèces de moisissures isolées de foin de patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier en Franche-Comté : *A. corymbifera* (BBCM/IHEM 3809), *E. amstelodami* (BBCM/IHEM 16286) et *W. sebi* (BBCM/IHEM 16284). Ces souches de référence ont été cultivées pendant une semaine dans les conditions suivantes : sur milieu R8 (Amner et al. 1989) à 44°C pour *S. rectivirgula*, sur milieu DG18 (Oxoid, Unipath, Basingstoke, England) à 30°C pour *A. corymbifera* et *E. amstelodami*, et sur milieu Sabouraud (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) à 20°C pour *W. sebi*. Ces milieux sélectifs et températures d'incubation ont été choisis afin d'optimiser la culture de chacune des espèces étudiées.

Après 7 jours de culture, des suspensions microbiologiques denses (> 2 Mc Farland) ont été obtenues pour chaque espèce. Ces suspensions ont été congelées à -20°C pendant une nuit, puis lyophilisées (Appareil Labconco®, Kansas City, USA) et enfin réhydratées dans de l'eau stérile. Après centrifugation pendant 2 minutes à 10 000 rpm, les surnageants de ces suspensions ont été conservés : ils constituent les extraits totaux hydrosolubles qui ont été utilisés pour l'exposition cellulaire. Les extraits totaux hydrosolubles ont été conservés à -20°C en attendant d'être dosés et utilisés pour les expériences d'exposition.

*Préparation des cellules épithéliales pulmonaires* (annexe 3a) :

La lignée cellulaire utilisée, A549, issue d'un carcinome pulmonaire alvéolaire, est constituée de pneumocytes de type II et a été obtenue auprès de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne). Les cultures cellulaires ont été réalisées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture Dulbecco modifié (DMEM, Invitrogen®, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de Sérum de veau fœtal décomplémenté (Biowest®, Nuaille, France) et de 25µg/mL de gentamicyne (Sigma Aldrich®, St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été ensemencées à raison de 2.10<sup>4</sup> cellules/mL, entretenues dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (Dutscher®, Brumath Cedex, France) et cultivées dans des plaques de 24 puits pour les

expériences d'exposition (Dutscher®). Tous les deux jours, le milieu de culture était changé. Les cellules étaient à confluence en 5 jours. L'absence de contamination par des mycoplasmes a été vérifiée une fois par mois sur culot cellulaire et sur surnageant de culture, par PCR temps réel, au laboratoire d'Onco-Hématologie Moléculaire de l'EFS Bourgogne-Franche-Comté.

#### *Exposition aux extraits totaux hydrosolubles de S. rectivirgula, A. corymbifera, E. amstelodami et W. sebi*

Les expositions ont été réalisées à J5 de culture, lorsque les cellules étaient à confluence, dans des plaques de 24 puits (1mL/puits). Pour chaque exposition, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par du milieu de culture contenant l'agent à tester. Chaque condition d'exposition a été réalisée lors de trois expériences indépendantes sur deux puits de culture.

Les extraits totaux hydrosolubles obtenus pour *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et *W. sebi* ont été dosés par la technique de Lowry en utilisant le kit DC Protein Assay™ (Biorad®, Marne la Coquette, France) (annexe 2c). Ce dosage a permis de calibrer les inoculums en fonction de leur contenu en protéines solubles. Des gammes de concentrations croissantes pour différentes espèces (10, 50, 75 et 100 µg/mL) ont été réalisées après 8h d'exposition (temps suffisant à la production de médiateurs au niveau cellulaire et correspondant au délai avant le début des symptômes en clinique) (Tableau 6). Ces gammes de concentrations croissantes ont permis de choisir la dose de 50µg/mL, première dose pour laquelle un effet était observé pour chaque espèce testée. Dès lors, les cellules A549 ont été exposées à des inoculums d'extrait hydrosoluble total calibrés à 50µg/mL de protéines, pour des durées de 30 minutes, 2h, 4h et 8h. Lors de chaque expérience d'exposition, au moins un puits non exposé (calibrateur), contenant uniquement du milieu de culture, a été réalisé.

#### *Dosage des ARNm de cytokines*

- *Lyse cellulaire et extraction des ARNm*

Après élimination du surnageant, chaque puits cellulaire a été lysé par 200 µL de tampon de lyse fourni dans le kit MagNa Pure RNA Isolation kit™ (Roche Diagnostics®, Meylan, France). Le fond de chaque puits était gratté afin de recueillir au mieux l'ensemble du lysat cellulaire, maintenu à 4°C jusqu'à l'extraction. L'extraction des ARNm a été faite sur automate MagNa pure Compact™ (Roche Diagnostics®), capable de traiter 8 échantillons simultanément. Les lysats cellulaires ont été placés dans l'automate ainsi que les tubes destinés à recevoir les extraits (volume d'élution 50 µL). Les cartouches contenant l'ensemble des réactifs (MagNa Pure RNA Isolation kit™, Roche Diagnostics®) ont été placées dans l'automate ainsi que 20 µL de DNase par échantillon. Les extraits ont ensuite été dosés sur Nanodrop ND 1000™ (Thermo Scientific®) afin de déterminer la concentration en ARNm et la pureté des extraits (R=260/280 nm, spectre). Les extraits ont été conservés à -80°C.

- *Transcription inverse (RT)* (annexe 5).

Les ADNc ont été obtenus par transcription inverse avec amorces aléatoires (random hexamer) permettant une amplification globale de tous les ARNm présents dans l'extrait. La réaction a été réalisée sur un thermocycleur MasterCycler Personal, Eppendorf® dans un volume final de 20 µL : 4 µL ARNm ont été ajoutés à 2 µL de Dithiothreitol (DTT) 0.1M (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France), 0.5 µL de Superscript II RnaseH-Reverse transcriptase H-200 U/µL (Invitrogen®), 4 µL First Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen®), 2 µL dNTP mix 5 mM (Amersham Pharmacia®, Uppsala, Sweden), 6 µL random hexamers pd(N)<sub>6</sub> 0.5 µg/µL (Amersham Pharmacia®), 0.5 µL RNAsin® 40 U/µL (Promega®, Madison, WI, USA). Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C. Un témoin sans reverse transcriptase et un témoin sans ARNm ont été inclus dans chaque série.

- *Quantification relative par qPCR temps réel* (annexe 6a).

Les ADNc ont été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure avant amplification. La quantification des ARNm cibles a été réalisée par qPCR en temps réel, par quantification relative sur Applied 7500 Fast™ (Applied Biosciences®) dans un volume final de 20 µL : 10 µL Power SYBR Green PCR Master Mix 2X™ (Applied Biosciences®), 0,08 µL d'amorces sens et antisens (concentration 50 µM), 8 µL d'ADNc (dilué au 1/20<sup>ème</sup>) et de l'eau stérile. Les conditions d'amplification étaient 10 minutes de dénaturation à 95°C, 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes et 65°C pendant 1 minute). Les valeurs quantitatives étaient obtenues à partir du cycle seuil (Ct). Chaque échantillon a été testé en duplicat. Après amplification, les courbes de fusion ont été étudiées afin de valider la spécificité des produits de qPCR en temps réel. Les amorces utilisées proviennent des publications du Pr I. Bieche (Faculté de Paris V) (Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005) (annexe 6b). Deux gènes référents ont été utilisés pour la quantification relative : le gène P0 (RPLP0, 36B4, numéro d'accès GenBank NM\_001002), codant une phosphoprotéine ribosomale et TBP (numéro d'accès GenBank NM\_003194) qui code une protéine de liaison à l'ADN du complexe TFIID.

L'interprétation des résultats a été réalisée par la technique du  $\Delta\Delta C_t$ , qui permet d'exprimer la production d'ARNm d'un gène cible par rapport à un gène de référence au sein de chaque puits cellulaire. Cette valeur est ensuite rapportée à celle des puits calibrateurs (« témoins non exposés ») afin de déterminer la valeur de ratio normalisé « N », qui traduit l'expression du gène cible dans les puits exposés par rapport aux puits non exposés. La normalisation par rapport à un gène de référence va permettre dans une certaine mesure de s'affranchir des erreurs liées à la quantité initiale d'échantillon, à l'extraction, à la dégradation de l'ARN, aux erreurs de pipetage et de rendement de reverse transcription (détail du calcul annexe 6c).

#### *Dosage ELISA dans les surnageants de culture cellulaire*

Dans tous les cas où une augmentation de la production d'ARNm de l'IL-8 et de l'IL-13 a été constatée, les formes protéiques de l'IL-8 et de l'IL-13 ont été recherchées dans les

surnageants de culture cellulaire à l'aide de kits spécifiques ELISA (Thermo Scientific®, Rockford, USA). Ces kits ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon a été testé en duplicat. La limite de détection de l'IL-8 était de 2 pg/mL et celle de l'IL-13 était de 5 pg/mL.

#### *Analyse statistique des résultats*

Les résultats obtenus par RT-qPCR temps réel et par dosage ELISA ont été comparés statistiquement par test ANOVA. Les différences observées ont été considérées comme significatives pour  $p < 0.05$ .

#### c) Résultats

##### *Gammes de concentration*

Les résultats des essais préliminaires, correspondant aux gammes de concentrations croissantes (de 10 à 100 µg/mL) pour trois espèces fongiques (*S. rectivirgula*, *A. corymbifera* et *E. amstelodami*) après 8 heures d'exposition, sont présentés dans le tableau 6 (p91). Ces essais ont permis de décider d'exposer les cellules A549 à des inoculums calibrés à 50 µg/mL de protéines, première dose pour laquelle un effet a été observé pour chaque espèce testée.

##### *Quantification des ARNm d'IL-8 et d'IL-13*

Les cellules ont été incubées en présence d'une concentration de 50 µg/mL d'extraits totaux hydrosolubles soit de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* ou de *W. sebi* pendant 30 min, 2h, 4h et 8h. Le temps 30 min avait pour objectif de détecter une réponse cellulaire précoce dès la mise en contact avec les substances antigéniques présentes dans l'inoculum et le temps d'exposition 8h correspondait au délai à partir duquel les premiers signes cliniques chez les patients sont décrits dans la littérature (Girard et al. 2009).

Nous avons observé une réponse inflammatoire en réponse à l'exposition à l'extrait total hydrosoluble de *S. rectivirgula* dès 4h d'incubation avec un maximum après 8h (Figure 11, p92 et tableau 7, p94: à 4h  $N_{IL-8}=3.7$  et à 8h  $N_{IL-8}=8.1$ ). Seule l'exposition à l'extrait total hydrosoluble d'*A. corymbifera* a généré à la fois l'induction d'ARNm codant l'IL-8 et l'IL-13 (Figure 11, p92 et 13, p93 : à 8h  $N_{IL-8}= 8.75$  et  $N_{IL-13}=3.56$ ). Aucune variation significative n'a été observée pour les deux autres moisissures testées.

##### *Dosage de l'IL-8 et de l'IL-13 par ELISA*

Les dosages ELISA de la forme protéique de l'IL-8 dans les surnageants de culture cellulaire ont montré une production naturelle d'IL-8 au cours du temps par les cellules A549 (Tableau 8, p95), ce qui avait déjà été rapporté par d'autres équipes (Borger et al. 1999, Gudmundsson and Hunninghake 1999). Des concentrations élevées d'IL-8 ont été mesurées dans les surnageants cellulaires après exposition à *S. rectivirgula* pendant 4h et 8h (Figure 12, p92 et Tableau 8, p95: 351 pg/mL à 4h et 923 pg/mL à 8h). Après exposition pendant 8h à *A. corymbifera*, des concentrations élevées d'IL-8 ont également été mesurées dans les

surnageants cellulaires (Figure 12, p92 et tableau 8, p95 : 551 pg/mL à 8h). Les dosages de la forme protéique de l'IL-8 ont donc permis de confirmer les résultats obtenus par RT-PCT temps réel. En revanche, la forme protéique de l'IL-13 n'a pas été détectée par dosage ELISA dans les surnageants de culture cellulaire recueillis après exposition à *A. corymbifera*.

Tableau 6 : Gamme de concentrations des extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera* et à *E. amstelodami* sur la lignée A549.

Type d'exposition		IL-8		IL-13	
Extrait total hydrosoluble 8h	Quantité (µg/mL)	N	Ecart-type	N	Ecart-type
<i>S. rectivirgula</i>	10	7.43	0.13	2.44	0.42
	50	8.53	0.27	0.93	1.03
	75	10.67	0.01	0.87	0.02
	100	12.61	1.73	1.24	1.06
<i>A. corymbifera</i>	10	2.68	0.76	2.24	1.65
	50	8.75	0.04	3.56	0.04
	75	6.36	0.12	4.96	0.01
	100	4.12	0.9	5.96	0.57
<i>E. amstelodami</i>	10	1.55	0.7	2.11	0.56
	50	3.76	1.55	2.55	0.68
	75	2.55	0.01	3.99	0.01
	100	5.1	1.27	6.09	0.39

Figure 11: Quantification relative des ARNm de l'IL-8 lors de l'exposition aux extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et de *W. sebi*, au cours du temps \* : augmentation significative de N à 8h ( $p < 0.0001$  pour *S. rectivirgula* et *A. corymbifera*),  $\alpha$  : augmentation significative de N à 4h ( $p < 0.01$  pour *S. rectivirgula*).

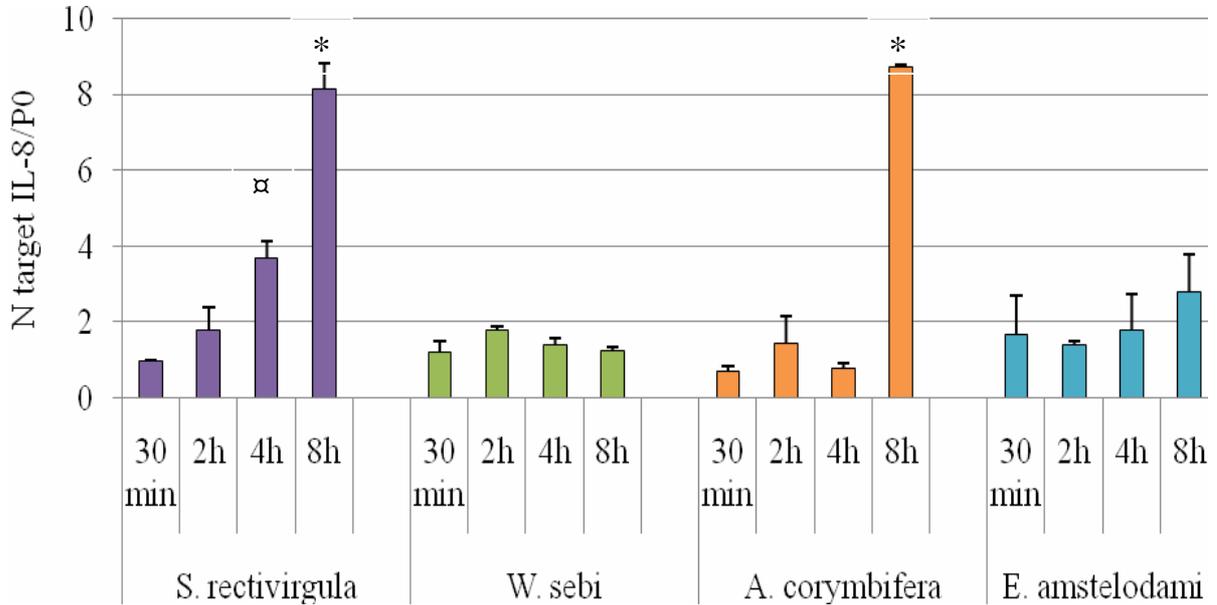


Figure 12 : Dosage de l'IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula* et d'*A. corymbifera*.  $\alpha$  : augmentation significative des concentrations d'IL-8 après 4h d'exposition à *S. rectivirgula* ( $p < 0.0001$ ) et \* : augmentation significative des concentrations d'IL-8 après 8h d'exposition à *S. rectivirgula* et *A. corymbifera* ( $p < 0.0001$ ).

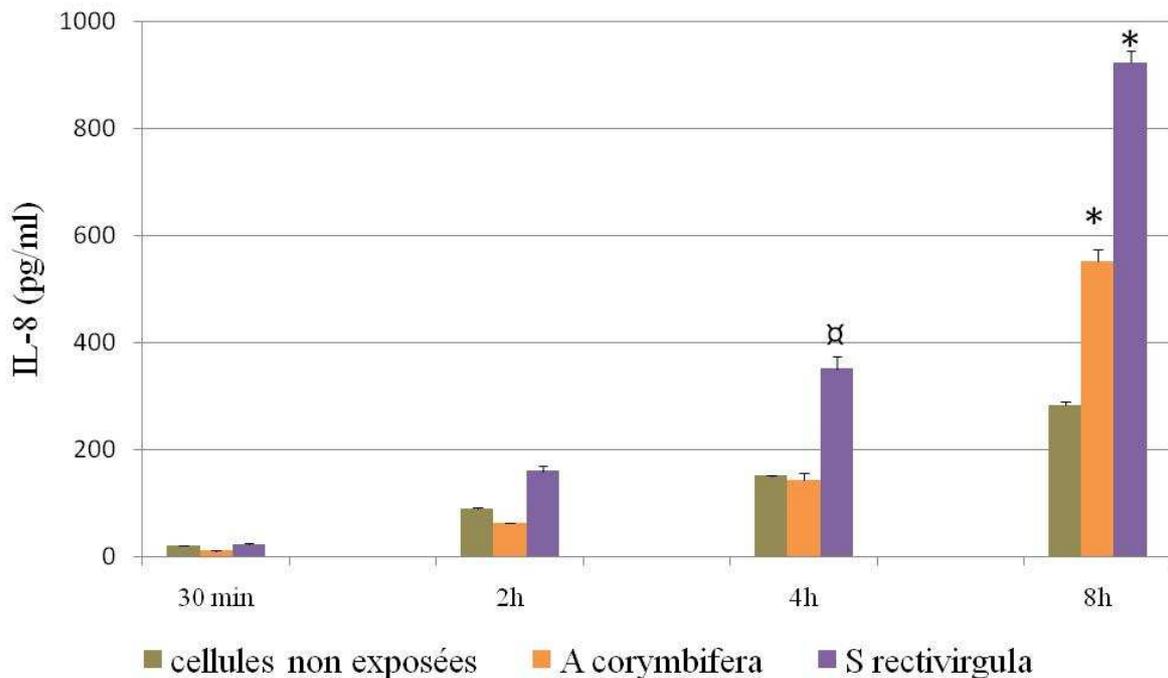


Figure 13 : Quantification relative des ARNm de l'IL-13 lors de l'exposition aux extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et de *W. sebi*, au cours du temps. \* : augmentation significative de N à 8h ( $p < 0.0001$ ) pour *A. corymbifera*.

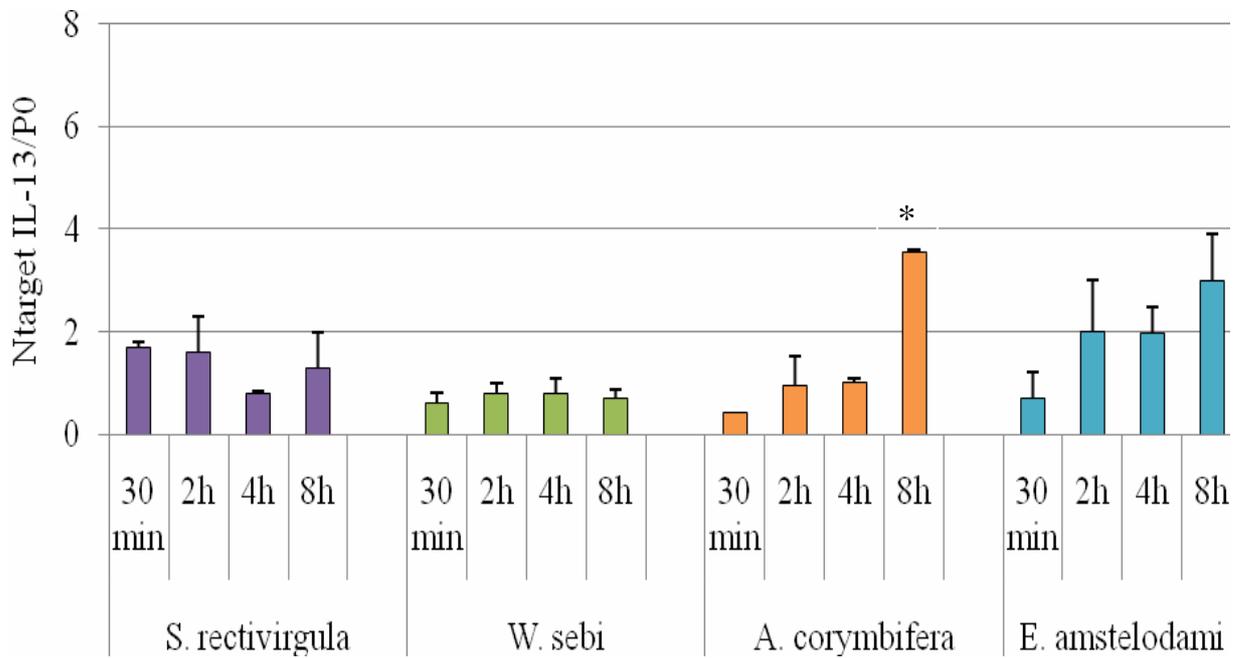


Tableau 7 : Ensemble des résultats obtenus par RT-qPCR temps réel après exposition de la lignée A549 aux extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* et de *W. sebi*, au cours du temps.

Type d'exposition		IL-8		IL-13	
Extraits hydrosolubles (50 µg/mL)	totaux Temps	N	<i>Ecart-type</i>	N	<i>Ecart-type</i>
<i>S. rectivirgula</i>	30 min	0.95	0.05	1.7	0.1
	2h	1.8	0.6	1.6	0.7
	4h	3.7	0.5	0.8	0.04
	8h	8.13	0.7	1.3	0.7
<i>A. corymbifera</i>	30 min	0.72	0.13	0.43	0.02
	2h	1.44	0.74	0.95	0.56
	4h	0.78	0.14	1	0.09
	8h	8.75	0.04	3.56	0.04
<i>E. amstelodami</i>	30 min	1.7	1	0.7	0.5
	2h	1.41	0.1	2	1
	4h	1.79	0.14	1.97	0.5
	8h	2.8	1	3	0.9
<i>W. sebi</i>	30 min	1.2	0.3	0.6	0.2
	2h	1.8	0.1	0.8	0.2
	4h	1.4	0.2	0.8	0.3
	8h	1.27	0.1	0.7	0.16

Tableau 8 : Résultats des dosages ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux extraits totaux hydrosolubles de *S. rectivirgula* et d'*A. corymbifera*.

Type d'exposition		Forme protéique de l'IL-8		
Extraits hydrosolubles totaux (50 µg/mL)	Temps	Concentration		
		pg/mL	<i>Ecart-type</i>	
<i>S. rectivirgula</i>	30 min	23	2,3	
	2h	159	11,3	
	4h	351	25	
	8h	923	22	
<i>A. corymbifera</i>	30 min	11	1,4	
	2h	63	3,2	
	4h	143	2,5	
	8h	551	6,7	
Cellules non exposées	30 min	20	1,4	
	2h	90	3,2	
	4h	150	2,5	
	8h	283	6,7	

#### d)Discussion

Une augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-8 a été quantifiée par RT-qPCR temps réel après 8h d'exposition des cellules épithéliales pulmonaires A549 aux extraits totaux hydrosolubles d'*A. corymbifera* et de *S. rectivirgula*. Ceci a été confirmé par la mise en évidence de la forme protéique de l'IL-8 dans les surnageants de culture cellulaire correspondants.

L'identification d'agents étiologiques potentiels de la maladie du Poumon de Fermier repose généralement sur des arguments mycologiques et sérologiques. Ainsi, les résultats d'études antérieures suggèrent qu'*A. corymbifera*, *E. amstelodami* et *W. sebi*, présents en grande quantité dans les foins et capables d'induire la production d'anticorps sériques spécifiques, soient des agents étiologiques de la maladie du Poumon de Fermier (Kotimaa et al. 1991, Lappalainen et al. 1998, Reboux et al. 2001). Deux études basées sur des tests sérologiques, une finlandaise (Erkinjuntti-Pekkanen et al. 1999), et une française (Reboux et al. 2001), ont souligné l'importance d'*A. corymbifera*. Cependant, jusqu'à présent, seul *S. rectivirgula* a été utilisé dans les modèles étudiant la physiopathologie de la maladie du Poumon de Fermier, probablement en partie, parce qu'il est plus facile de standardiser des inoculums bactériens que des inoculums fongiques pour les tests *in vitro* et *in vivo*.

L'induction de l'IL-8 après exposition à *S. rectivirgula*, déjà rapportée par Gudmundsson et al (Gudmundsson and Hunninghake 1999), a été confirmée dans ce travail. *A. corymbifera* a été le seul à générer une augmentation du taux d'ARNm de l'IL-8 similaire, en intensité et en délai d'apparition, à celle mesurée lors de l'exposition à *S. rectivirgula*. De plus, la production de la forme protéique de l'IL-8 a été vérifiée par dosage ELISA. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'*A. corymbifera* joue un rôle important dans le développement de la maladie du Poumon de Fermier.

L'exposition des cellules épithéliales pulmonaires aux extraits hydrosolubles totaux de *E. amstelodami* et *W. sebi* a induit des variations des taux d'ARNm d'IL-8 bien moins marquées que lors de l'exposition des cellules à *S. rectivirgula* et *A. corymbifera*. Bien que deux études (Lappalainen et al. 1998, Reboux et al. 2001), basées sur des tests sérologiques et mycologiques, soient en faveur du rôle étiologique d'*E. amstelodami* et *W. sebi*, ces deux moisissures n'ont induit que peu d'effets sur les cellules épithéliales respiratoires au cours de ce travail. Cette discordance pourrait être le fait de réactions croisées entre espèces survenues lors des tests sérologiques utilisant des antigènes fongiques (Kaukonen et al. 1993). Cependant, la nature de l'inoculum utilisé dans cette étude, soit des extraits totaux hydrosolubles, pourrait être à l'origine de la faible réponse observée *in vitro*. En effet, les extraits totaux hydrosolubles utilisés ici sont en réalité des mélanges complexes et la calibration de l'inoculum a été basée uniquement sur le contenu en protéines (dosage colorimétrique basée sur la technique de Lowry évaluant les groupements amines), or d'autres composants de ce mélange (polyosides, pigments par exemple) ont pu interférer avec la réponse immunologique observée. L'utilisation d'extraits protéiques purifiés voire même de protéines recombinantes est envisagée afin de s'affranchir de ce biais possible lors des

prochains travaux étudiant les interactions entre les protéines fongiques et les cellules épithéliales pulmonaires.

L'exposition à *A. corymbifera* a également induit une augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-13. Or, la validation de ce résultat est limitée par l'absence de détection de la forme protéique de l'IL-13 par dosage ELISA dans les surnageants de culture cellulaire. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat : Manque de sensibilité du kit ELISA (limite de détection 7 pg/mL) ? Manque de spécificité des amorces IL-13 utilisées ? Conformation post-traductionnelle incomplète de la protéine IL-13 par les cellules A549, responsable d'une modification antigénique et empêchant sa liaison avec les anticorps spécifiques du kit ELISA utilisés dans cette étude ? Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous envisageons de rechercher la forme protéique de l'IL-13 dans les surnageants de culture cellulaire en utilisant d'autres kits ELISA et par la technique Luminex (afin de tester des anticorps spécifiques de l'IL-13 différents).

Ce type d'expérience *in vitro* reste cependant utile afin de mieux appréhender l'intensité de la réponse immune induite pour chaque espèce microbiologique suspectée et donc de mieux caractériser celles qui présentent un danger réel pour les patients exposés. Une meilleure connaissance des microorganismes d'intérêt permet de mieux les cibler lors des traitements de décontamination du foin, de la paille ou des grains moisissus (Duchaine et al. 1999, Reboux et al. 2002, Roussel et al. 2005a). Les mesures de prévention sont en effet très importantes dans les pneumopathies d'hypersensibilité telle la maladie du Poumon de Fermier puisque le traitement reste basé sur l'éviction antigénique, parfois associée à une corticothérapie.

En conclusion, les enquêtes environnementales et les études sérologiques sont des données essentielles afin d'identifier des microorganismes susceptibles de jouer un rôle important dans les pneumopathies d'hypersensibilité. Cependant, tester ensuite la capacité de chacun de ces agents étiologiques potentiels à initier une réponse immuno-allergique *in vitro* permet de sélectionner les espèces réellement impliquées dans le développement de la maladie. Ainsi, *A. corymbifera* devrait, à notre sens, être considéré comme un agent étiologique de la maladie du Poumon de Fermier, au moins aussi important que *S. rectivirgula*.

*Ce travail a fait l'objet d'un article actuellement soumis à Medical Mycology (novembre 2009)*

***“New proof of the involvement of *Absidia corymbifera* in farmer's lung disease”***

***Bellanger, AP, Reboux G, Botterel F, Candido C, Roussel S, Rognon B, Dalphin JC, Bretagne S et Millon L.***

## 2B. Comparaison de la réponse cytokinique initiale de l'épithélium respiratoire vis-à-vis de différentes formes de développement d'*E. amstelodami*

### a) Contexte et objectif

*E. amstelodami* est suspecté d'être un agent étiologique important de la maladie du Poumon de Fermier sur la base d'arguments mycologiques et sérologiques. En effet, plusieurs études réalisées en Europe et en Finlande (Kaukonen et al. 1993, Reboux et al. 2001, Radon et al. 2002, Reboux et al. 2007) ont permis de mettre en évidence la présence de cette moisissure en grande quantité dans les foin moisissés des agriculteurs malades ainsi que des réactions immunologiques fortes vis-à-vis d'*E. amstelodami* chez ces mêmes agriculteurs. *E. amstelodami* peut être trouvé dans la nature sous trois formes de développement (forme sexuée, asexuée et végétative) (Figure 14, p99). La reproduction sexuée de cette moisissure se caractérise par la formation de cléistothèces contenant des ascospores portant chacun 8 ascospores. La multiplication asexuée est assurée par des conidies produites par des têtes aspergillaires. La croissance végétative est effectuée par des hyphes septés. Ascospores, conidies et fragments de filaments peuvent tous être inhalés (taille < 5µm) et donc être impliqués dans la maladie du Poumon de Fermier.

La présence de fragments de filaments fongiques a souvent été considérée comme mineure dans les études d'exposition fongique professionnelle (Sorenson et al. 1987, Li and Kendrick 1995, Robertson 1997). Cependant, une étude norvégienne récente met en évidence des quantités importantes de filaments fongiques lors de la distribution des fourrages (Halstensen et al. 2007). Plus récemment, grâce à une nouvelle technique d'immunodétection, de nouvelles preuves concernant la prédominance des fragments mycéliens dans l'air et leur potentiel allergisant ont été rapportées (Green et al. 2005, Green et al. 2006). Cependant, une étude récente, réalisée en Franche-Comté par notre équipe, basée sur des tests sérologiques (tests ELISA), comparant le pouvoir discriminant d'antigènes produits à partir des trois formes de développement d'*E. amstelodami*, a mis en évidence que seuls les antigènes produits à partir des ascospores permettaient de distinguer les agriculteurs malades des agriculteurs exposés non malades alors que les antigènes obtenus à partir de filaments permettaient de distinguer les sujets exposés des sujets non exposés (Figure 15, p99 issue de (Roussel et al. 2009b)).

Afin de préciser le rôle des fractions protéiques d'intérêt diagnostique dans la réponse initiale de l'épithélium respiratoire, une étude visant à comparer la réponse cytokinique observée *in vitro* lors de l'exposition à chacun des extraits protéiques issus des formes de développement d'*E. amstelodami* (filament, ascospore, conidie) a été mise en œuvre. La technique de RT-qPCR temps réel a été utilisée afin de quantifier l'expression des gènes codant l'IL-8, chemokine pro-inflammatoire impliquée notamment dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles (voie Th1). La production de la forme protéique de l'IL-8 a été vérifiée par dosage ELISA.

Figure 14 : Cycle de développement d'*Eurotium amstelodami*.

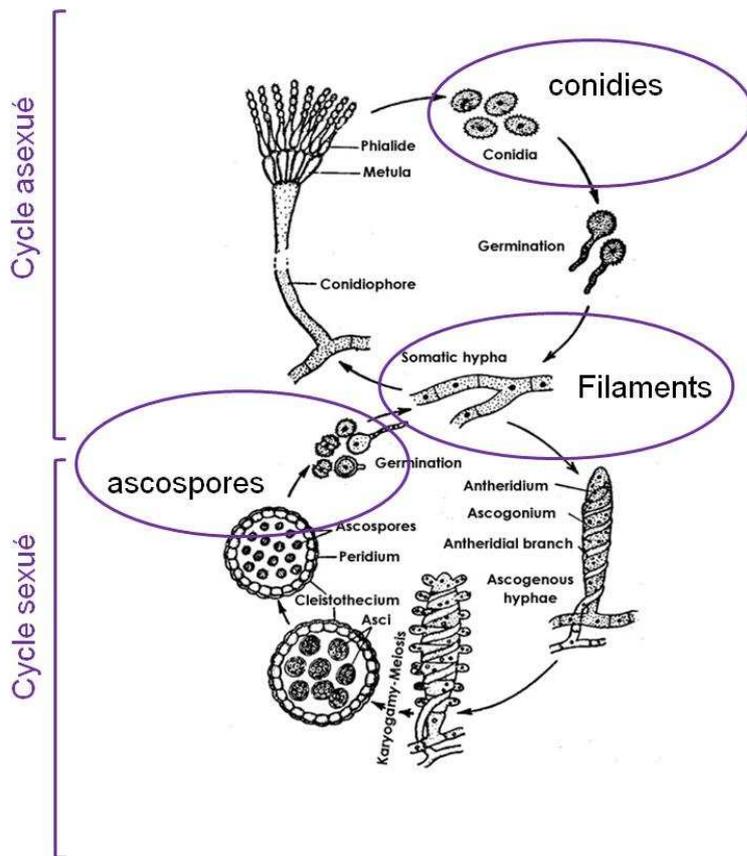
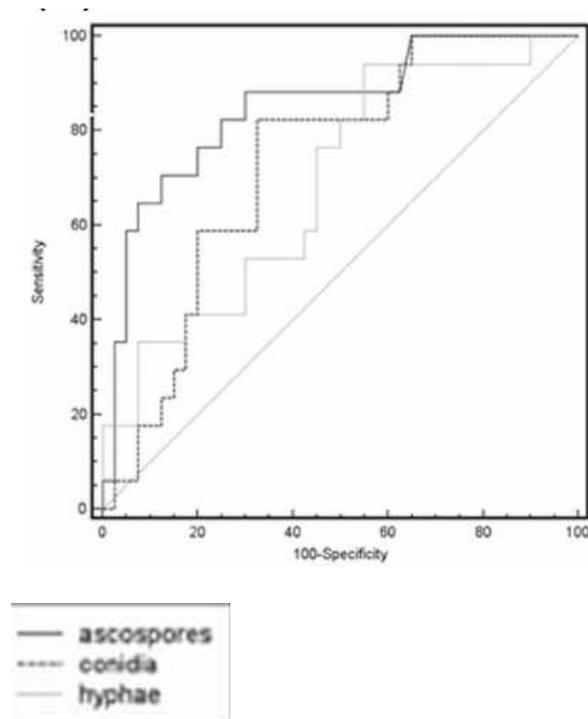


Figure 15 : Courbes ROC illustrant la capacité des antigènes d'ascospores, de conidies et de filaments d'*E. amstelodami* à discriminer les patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier des contrôles exposés non malades (Roussel et al. 2009b)



## b) Matériels et Méthodes

L'ensemble des milieux de culture, réactifs, matériels et protocoles utilisés sont référencés en annexe (annexe 1).

*Préparation des extraits protéiques des différentes formes de développement d'E. amstelodami* (annexe 2d).

La souche de référence *E. amstelodami* (BBCM/IHEM 16286) a été cultivée sur trois milieux distincts, chacun favorisant l'obtention d'une culture pure soit d'ascospores (forme sexuée), soit de conidies (forme asexuée), soit de filaments (forme végétative) (Roussel et al. 2009b):

Ainsi, une culture pure d'ascospores a été obtenue sur milieu DG 18 (Oxoid, Unipath, Basingstoke, England), une culture pure de conidies a été obtenue sur milieu Malt Agar (DIFAL, Seysses, France) et une culture pure de filaments a été obtenue après incubation dans du Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson, NJ, France).

Dans chaque cas, les structures fongiques obtenues ont dans un premier temps été précipitées dans un tampon sodium phosphate acide (pH 6) à 4°C. Une lyse a ensuite été réalisée par incubation en présence d'une beta-1,3-glucanase (Lyticase, 20 U/μL, MP Biomedicals<sup>®</sup>, Irvine California) pendant une heure à température ambiante. Après trois centrifugations successives (3 minutes, 13 000g, 4°C), les protéines ont été obtenues par précipitation dans de l'acide trichloroacétique (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin Fallavier, France) additionné de deoxycholate 0.15% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). Les extraits protéiques ont été conservés à -20°C en attendant d'être dosés et utilisés pour les expériences d'exposition.

*Préparation des cellules épithéliales pulmonaires* (annexe 3a) :

La lignée cellulaire utilisée, A549, issue d'un carcinome pulmonaire alvéolaire, est constituée de pneumocytes de type II et a été obtenue auprès de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne). Les cultures cellulaires ont été réalisées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture Dulbecco modifié (DMEM, Invitrogen<sup>®</sup>, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de Sérum de veau fœtal décomplémenté (Biowest<sup>®</sup>, Nuaille, France) et de 25 μg/mL de gentamicine (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont étéensemencées à raison de 2.10<sup>4</sup>cellules/mL, entretenues dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (Dutscher<sup>®</sup>, Brumath Cedex, France) et cultivées dans des plaques de 24 puits pour les expériences d'exposition (Dutscher<sup>®</sup>). Tous les deux jours, le milieu de culture était changé. Les cellules étaient à confluence en 5 jours.

L'absence de contamination par des mycoplasmes a été vérifiée une fois par mois sur culot cellulaire et sur surnageant de culture, par PCR temps réel, au laboratoire d'Onco-Hématologie Moléculaire de l'EFS Bourgogne-Franche-Comté.

*Exposition aux extraits protéiques issus d'ascospores, de conidies ou de filaments d'E. amstelodami.*

Les expositions ont été réalisées à J5 de culture, lorsque les cellules étaient à confluence, dans des plaques de 24 puits (1 mL/puits). Pour chaque exposition, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par du milieu de culture contenant l'agent à tester. Chaque condition d'exposition a été réalisée lors de trois expériences indépendantes sur deux puits de culture.

Les extraits protéiques hydrosolubles obtenus pour les différentes formes de développement d'*E. amstelodami* ont été solubilisés dans 30  $\mu$ L de NaOH 1M et 500  $\mu$ L d'eau stérile, puis dosés par la technique de Lowry, en utilisant le kit DC Protein Assay (Biorad<sup>®</sup>, Marne la Coquette, France) (annexe 2c). Ce dosage a permis de calibrer les inoculums en fonction de leur contenu en protéines solubles. Les cellules ont été exposées pendant 8h à des inoculums calibrés à 50  $\mu$ g/mL. Lors de chaque expérience d'exposition, au moins un puits non exposé (calibrateur), contenant du milieu de culture et une quantité de NaOH égale à celle utilisée pour la solubilisation de l'extrait protéique a été réalisé.

*Dosage des ARNm de cytokines*

- *Lyse cellulaire*

Après élimination du surnageant, chaque puits cellulaire a été lysé par 200  $\mu$ L de tampon de lyse fourni dans le kit MagNa Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Meylan, France). Le fond de chaque puits était gratté afin de recueillir au mieux l'ensemble du lysat cellulaire, maintenu à 4°C jusqu'à l'extraction.

- *Extraction des ARNm*

L'extraction des ARNm a été faite sur automate MagNa pure Compact (Roche<sup>®</sup>), capable de traiter 8 échantillons simultanément. Les lysats cellulaires ont été placés dans l'automate ainsi que les tubes destinés à recevoir les extraits (volume d'élution 50  $\mu$ L). Les cartouches contenant l'ensemble des réactifs (MagNa Pure RNA Isolation kit, Roche Diagnostics<sup>®</sup>) ont été placées dans l'automate ainsi que 20  $\mu$ L de DNase par échantillon. Les extraits ont ensuite été dosés sur Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) afin de déterminer la concentration en ARNm et la pureté des extraits ( $R=260/280$  nm, spectre). Les extraits ont été conservés à -80°C.

- *Transcription inverse (RT)* (annexe 5).

Les ADNc ont été obtenus par transcription inverse avec amorces aléatoires (random hexamer) permettant une amplification globale de tous les ARNm présents dans l'extrait. La réaction a été réalisée sur thermocycleur MasterCycler Personal, Eppendorf<sup>®</sup> dans un volume final de 20  $\mu$ L : 4  $\mu$ L (400  $\mu$ g) ARNm ont été ajoutés à 2  $\mu$ L de Dithiothreitol (DTT) 0.1M (Invitrogen<sup>®</sup>, Cergy Pontoise, France), 0.5  $\mu$ L de Superscript II RnaseH-Reverse transcriptase H-200 U/ $\mu$ L (Invitrogen<sup>®</sup>), 4  $\mu$ L First Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen<sup>®</sup>), 2  $\mu$ L dNTP mix 5 mM (Amersham

Pharmacia<sup>®</sup>, Uppsala, Sweden), 6 µL random hexamers pd(N)6 0.5 µg/µL (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>), 0.5 µL RNAsin<sup>®</sup> 40 U/µL (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA). Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C. Un témoin sans reverse transcriptase et un témoin sans ARNm ont été inclus dans chaque série.

- *Quantification relative par qPCR temps réel* (annexe 6a).

Les ADNc ont été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure avant amplification. La quantification des ARNm cibles a été réalisée par qPCR en temps réel, par quantification relative sur Applied 7500 Fast (Applied Biosciences<sup>®</sup>) dans un volume final de 20 µL : 10 µL Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosciences<sup>®</sup>), 50 µM d'amorces sens et antisens, 8 µL d'ADNc (dilué au 1/20<sup>ème</sup>) et de l'eau stérile. Les conditions d'amplification étaient : 10 minutes de dénaturation à 95°C, 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes et 65°C pendant 1 minute). Les valeurs quantitatives étaient obtenues à partir du cycle seuil (Ct). Chaque échantillon a été testé en duplicat. Après amplification, les courbes de fusion ont été étudiées afin de valider la spécificité des produits de qPCR en temps réel. Les amorces utilisées proviennent des publications du Pr I. Bieche (Faculté de Paris V) (Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005) (annexe 6b). Deux gènes référents ont été utilisés pour la quantification relative : le gène P0 (RPLP0, 36B4, numéro d'accès GenBank NM\_001002), codant une phosphoprotéine ribosomale et TBP (numéro d'accès GenBank NM\_003194) qui code une protéine de liaison à l'ADN du complexe TFIID.

- *Interprétation des résultats*

L'interprétation des résultats est réalisée par la technique du  $\Delta\Delta C_t$  permettant d'exprimer la production d'ARNm d'un gène cible par rapport à un gène de référence au sein de chaque puits cellulaire. Cette valeur est ensuite rapportée à celle des puits calibrateurs (« témoins non exposés ») afin de déterminer la valeur de ratio normalisé « N », qui traduit l'expression du gène cible dans les puits exposés par rapport aux puits non exposés. La normalisation par rapport à un gène de référence va permettre dans une certaine mesure de s'affranchir des erreurs liées à la quantité initiale d'échantillon, à l'extraction, à la dégradation de l'ARN, aux erreurs de pipetage et de rendement de reverse transcription (détail du calcul en annexe 6c).

#### *Dosage de l'IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire*

Chaque fois qu'une augmentation des ARNm d'IL-8 était observée, la forme protéique de l'IL-8 a été recherchée dans les surnageants de culture cellulaire à l'aide d'un kit ELISA spécifique (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Rockford, USA). Ce kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon a été testé en duplicat. La limite de détection de l'IL-8 était de 2 pg/mL.

#### *Analyse statistique des résultats*

Les résultats de RT-qPCR et des dosages ELISA ont été comparés statistiquement par test ANOVA. Les différences observées ont été considérées comme significative pour  $p < 0.05$ .

### c) Résultats

Les cellules ont été incubées en présence d'une concentration de 50 µg/mL d'extraits protéiques soit d'ascospores, soit de conidies, soit de filaments d'*E. amstelodami* pendant 8h.

Nous avons observé une réponse inflammatoire suite à l'exposition à l'extrait protéique produit à partir des filaments d'*E. amstelodami* (Figure 16, p104 et tableau 9:  $N_{IL-8}=15.74$ ). Aucune différence significative de quantification des taux d'ARNm d'IL-8 n'a été observée lors de l'exposition aux extraits protéiques de conidies et d'ascospores d'*E. amstelodami* (Figure 16, p104 et tableau 9:  $N_{IL-8}=2.82$  pour l'extrait protéique d'ascospore et  $N_{IL-8}=2.3$  pour l'extrait protéique de conidies).

Les dosages de la forme protéique de l'IL-8 dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux différents extraits protéiques d'*E. amstelodami* ont également mis en évidence des concentrations élevées d'IL-8 après exposition aux extraits protéiques de filaments (Figure 17, p104 et tableau 9 : 5074 pg/mL).

Tableau 9 :Ensemble des résultats obtenus après exposition de la lignée A549 aux extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d'*E. amstelodami*.

Type d'exposition	ARNm IL-8		Forme protéique IL-8	
	N	Ecart-type	Concentration pg/mL	Ecart-type
<b>Extrait protéique (50 µg/mL) Pendant 8h</b>				
<b>Ascospores</b>	2.82	0.48	302	60
<b>Filaments</b>	15.74	2.89	5074	420
<b>Conidies</b>	2.3	0.27	512	90

Figure 16 : Quantification relative des ARNm de l'IL-8 lors de l'exposition aux extraits protéiques d'ascospores, de conidies et de filaments d'*E. amstelodami* pendant 8h. \* : augmentation significative de N<sub>IL-8</sub> (p<0.0001) lors de l'exposition aux extraits protéiques de filaments.

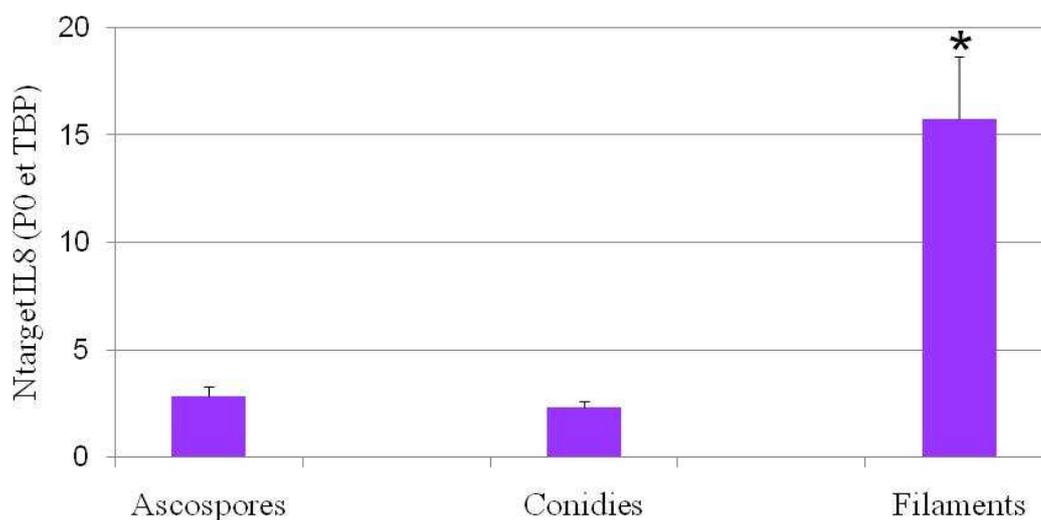
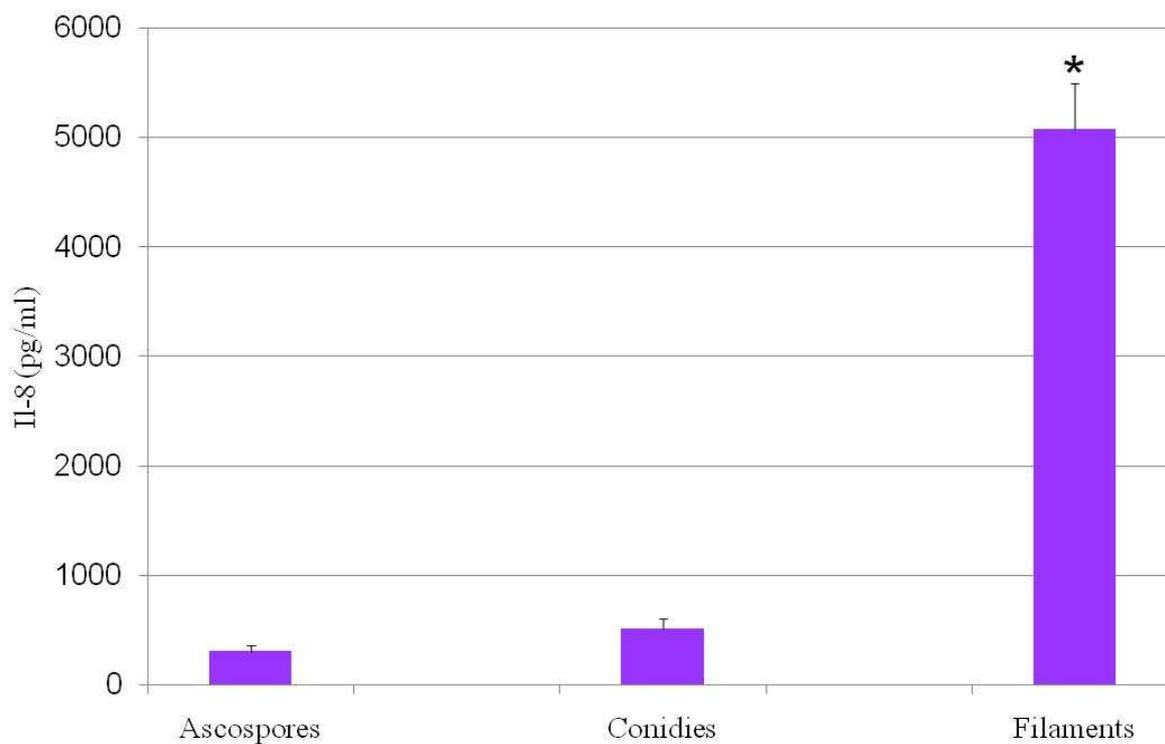


Figure 17 : Dosage de l'IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après exposition aux extraits protéiques de conidies, d'ascospores et de filaments d'*E. amstelodami*. \* : augmentation significative des concentrations d'IL-8 après exposition aux filaments (p<0.0001).



#### d) Discussion

Une augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-8 a été quantifiée par RT-qPCR temps réel après 8h d'exposition des cellules épithéliales pulmonaires A549 à l'extrait protéique de filaments d'*E. amstelodami*. Ceci a été confirmé par dosage ELISA de la forme protéique de l'IL-8 dans les surnageants de culture cellulaire correspondants.

Lors de la distribution des fourrages, les agriculteurs sont exposés, sous forme de poussières, à un aérosol de composition complexe : particules issues du sol, de végétaux, d'insectes, d'acariens, de pollens et de moisissures, ainsi que de leurs composants biologiques tels endotoxines, glucanes, allergènes et mycotoxines. Plusieurs études ont été réalisées dans le but de mieux comprendre le développement et la dispersion de ces particules, et en particulier, des moisissures, mais la nature exacte des formes fongiques principalement inhalées par les agriculteurs reste mal définie (Burge and Rogers 2000, McGinnis 2007). Si, de plus en plus d'études rapportent la présence de fragments mycéliens et leur importance en tant que source d'allergènes, en revanche, aucune donnée de la littérature n'est disponible sur la quantité d'ascospores dans l'air en environnement agricole. Des essais récents, au sein de notre laboratoire, de comptage de cléistothèces sur brins de foin fortement contaminés par *E. amstelodami*, ont permis d'estimer une quantité de 38% de cléistothèces présents (Roussel et al. 2009b).

Les extraits protéiques issus d'ascospores d'*E. amstelodami* n'induisent que peu, voire pas, de réaction inflammatoire *in vitro* alors qu'ils présentent le meilleur pouvoir discriminant au niveau diagnostique. Inversement, l'extrait protéique issu des filaments d'*E. amstelodami* induit une réaction inflammatoire très marquée *in vitro* alors qu'il ne permet pas de discriminer les patients exposés malades des patients exposés non malades en sérologie. Ces premiers résultats suggèrent donc que des fractions protéiques différentes d'*E. amstelodami* vont induire soit une réaction immédiate inflammatoire (extrait protéique de filaments) soit une réponse humorale en cas d'exposition chronique (extrait protéique d'ascospores).

Le potentiel allergénique des fragments mycéliens est généralement rapporté à la présence de beta-D-1-3 glucane (BG) (Bohn and BeMiller 1995). Or, dans notre étude, les extraits protéiques ont été obtenus par une méthode d'extraction utilisant une beta 1-3 glucanase. Il n'est cependant pas impossible que des quantités résiduelles de BG, qui était complexé aux protéines, soient présentes dans nos extraits. Pour vérifier cette hypothèse, des dosages de BG utilisant le kit Fungitell<sup>TM</sup> (Biogenic<sup>®</sup> Associates of Cape Cod, Liverpool, UK) sont programmés. Par ailleurs, dans le cas où l'absence de BG est vérifiée, nous avons prévu de séparer les différentes fractions protéiques de l'extrait de filaments en fonction de leur poids moléculaire à l'aide d'un système de chromatographie d'affinité (ultrafiltration : Amicon centrifuga filters, Millipore). Les interactions entre chacune des fractions ainsi recueillies et les cellules épithéliales seront étudiées par le dosage de l'IL-8 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire après 8h d'exposition à 50 µg/mL de chaque fraction. En fonction des résultats des tests de stimulation cellulaire, une analyse protéomique complète (« Shot-gun ») sur la (ou les) fraction(s) d'intérêt isolée(s) pourra être effectuée.

### *3 Essai préliminaire visant à évaluer l'impact de la présence d'éléments traces métalliques sur la réponse initiale des cellules épithéliales pulmonaires exposées aux grains de pollen de bouleau*

#### a) Contexte et objectif

L'augmentation des pollinoses dans les pays occidentaux est devenue un véritable problème de santé publique, en passant du 6<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> rang des pathologies durant ces vingt dernières années. L'impact de composés métalliques sur les grains de pollen reste peu appréhendé. Or, la constante augmentation des polluants atmosphériques et du nombre de pollinoses en milieu urbain incite à s'interroger sur d'éventuelles interactions entre pollution atmosphérique et pollinoses (Anderson et al. 1998). En effet, le pouvoir allergisant des pollens en ville pourrait être supérieur, du fait de la présence à leur surface d'éléments traces métalliques (ETM) liés à la pollution atmosphérique (Kalbande et al. 2008).

Dans ce cadre, l'équipe de Pallynologie de l'UMR « Chrono-Environnement » de l'Université de Franche-Comté (Pr H Richard, N Bernard, P Ruffaldi, F Bosh-Cano), depuis plusieurs années, évalue l'exposition pollinique allergisante dans des milieux atmosphériques différemment pollués. Des travaux récents de cette équipe ont permis d'établir que les pollens étaient capables de capter des ETM lorsqu'ils sont exposés *in situ* en conditions contrôlées mais que la quantité d'ETM captée dépendait de plusieurs facteurs (concentrations atmosphérique d'ETM, structure pollinique, durée d'exposition) (Bosh-Cano et al. 2008).

Les pollens de bouleau (*Betula sp*) sont majoritairement en cause dans les allergies saisonnières en Europe. Du fait de leurs tailles (proche de 15 à 20 µm), ces pollens sont bien distribués dans l'air et peuvent atteindre les parties basses des voies aériennes (Madeja et al. 2005). Les pollens collectés près de sites pollués présentent des concentrations moyennes d'ETM de 30mg/L (data non publiées issues du laboratoire de Pallynologie de l'UMR « Chrono-Environnement »).

L'objectif de ce travail collaboratif entre le laboratoire de Pallynologie et le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'UMR « Chrono-Environnement » était de documenter une possible synergie entre dépôts métalliques et pouvoir allergisant des pollens. Pour cet essai préliminaire, la réponse initiale des cellules épithéliales pulmonaires exposées à des grains de pollens de bouleau marqués ou non par du Plomb, a été étudiée. La technique de RT-qPCR temps réel a été utilisée afin de quantifier l'expression de gènes codant deux médiateurs reflétant une réponse inflammatoire (IL-8 et IL-6, voie Th1) et deux médiateurs reflétant une réponse allergique (IL-13 et IL-5, voie Th2).

## b) Matériels et Méthodes

L'ensemble des milieux de culture, réactifs, matériels et protocoles utilisés sont référencés en annexe (annexe 1).

### *Préparation des suspensions de pollen de bouleau avec ou sans ETM*

Les pollens de bouleau utilisés dans ce travail ont été collectés dans des zones non polluées, à Besançon, aux printemps 2007 et 2008. L'absence de présence d'ETM sur ces pollens a été vérifiée. Ces pollens non pollués constituent le matériel utilisé pour l'exposition des cellules aux grains de pollen de bouleau sans ETM (« Bouleau »).

Le marquage des grains de pollen de bouleau par des ETM a été réalisé par nébulisation, sur grains entiers, en présence d'une solution de chlorure de Plomb pendant une heure : une solution de chlorure de Plomb dosée à 30 mg/L a permis d'obtenir le « Bouleau-Plomb 30 », dose d'ETM retrouvée en moyenne sur les pollens en zone polluée (Bosh-Cano et al. 2008); une solution de chlorure de Plomb dosée à 60 mg/L a permis d'obtenir le « Bouleau-Plomb 60 », dose bien supérieure à celle retrouvée en moyenne dans les zones polluées. Le marquage par le Plomb des grains de pollen a été réalisé à Montbéliard par Floriane Bosh-Cano (doctorante de l'équipe de Pallynologie).

La dose de pollen à inoculer aux cellules a été choisie en tenant compte de nombreux facteurs tels que la quantité de cellules par puits à confluence ( $2 \cdot 10^6$ ) et leur taille ( $5 \mu\text{m}$ ), la surface de l'épithélium respiratoire chez un adulte ( $\approx 150 \text{ m}^2$ ), la taille des grains de pollen de bouleau ( $15\text{-}20 \mu\text{m}$ ), la quantité d'air inhalé par un adulte au repos (10 L d'air/min), la quantité de grains de pollen de bouleau pouvant générer une réaction allergique ( $100 \text{ grains/m}^3/\text{jour}$ ). Finalement, nous avons retenue une dose d'exposition de  $1000 \text{ grains/mL}$ , représentative de la quantité de grains de pollen de bouleau pouvant être inhalée un jour de pic pollinique par un adulte effectuant un effort modéré.

A partir d'équivalents poids-nombre de grains de pollen (Brown and Irving 1973), nous avons constitué des solutions mères de  $10^5 \text{ grains/mL}$ , dans du milieu de culture pour le « Bouleau », le « Bouleau-Plomb 30 », et le « Bouleau-Plomb 60 ». Ces solutions mères ont été diluées au  $100^{\text{ème}}$  juste avant exposition (annexe 2e).

### *Préparation des cellules épithéliales pulmonaires (annexe 3a) :*

La lignée cellulaire utilisée, A549, issue d'un carcinome pulmonaire alvéolaire, est constituée de pneumocytes de type II et a été obtenue auprès de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne). Les cultures cellulaires ont été réalisées en atmosphère humide à  $37^\circ\text{C}$  sous 5% de  $\text{CO}_2$  dans du milieu de culture Dulbecco modifié (DMEM, Invitrogen<sup>®</sup>, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Biowest<sup>®</sup>, Nuaille, France) et de  $25 \mu\text{g/mL}$  de gentamycine (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont étéensemencées à raison de  $2 \cdot 10^4 \text{ cellules/mL}$ , entretenues dans des flasques de  $25 \text{ cm}^2$

(Dutscher<sup>®</sup>, Brumath Cedex, France) et cultivées dans des plaques de 24 puits pour les expériences d'exposition (Dutscher<sup>®</sup>). Tous les deux jours, le milieu de culture était changé. Les cellules étaient à confluence en 5 jours. L'absence de contamination par des mycoplasmes a été vérifiée une fois par mois sur culot cellulaire et sur surnageant de culture, par PCR temps réel, au laboratoire d'Onco-Hématologie Moléculaire de l'EFS Bourgogne-Franche-Comté.

#### *Exposition aux suspensions de grains de pollen de bouleau avec et sans ETM*

Les expositions ont été réalisées à J5 de culture, lorsque les cellules étaient à confluence, dans des plaques de 24 puits (1mL/puits). Pour chaque exposition, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par du milieu de culture contenant l'agent à tester. Chaque condition d'exposition a été réalisée lors de trois expériences indépendantes sur deux puits de culture.

Les cellules ont été exposées pendant 2h et 6h à des inoculums de grains de pollens de bouleau non marqués « Bouleau », et marqués au Plomb « Bouleau Plomb 30 » et « Bouleau Plomb 60 », calibrés à 1000 grains/mL. Lors de chaque expérience d'exposition, au moins un puits non exposé (calibrateur), contenant du milieu de culture a été réalisé.

#### *Dosage des ARNm de cytokines*

- *Lyse cellulaire*

Après élimination du surnageant, chaque puits cellulaire a été lysé par 200 µL de tampon de lyse fourni dans le kit MagNa Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Meylan, France). Le fond de chaque puits était gratté afin de recueillir au mieux l'ensemble du lysat cellulaire, maintenu à 4°C jusqu'à l'extraction.

- *Extraction des ARNm*

L'extraction des ARNm a été faite sur automate MagNa pure Compact (Roche<sup>®</sup>), capable de traiter 8 échantillons simultanément. Les lysats cellulaires ont été placés dans l'automate ainsi que les tubes destinés à recevoir les extraits (volume d'élution 50 µL). Les cartouches contenant l'ensemble des réactifs (MagNa Pure RNA Isolation kit, Roche Diagnostics<sup>®</sup>) ont été placées dans l'automate ainsi que 20 µL de DNase par échantillon. Les extraits ont ensuite été dosés sur Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) afin de déterminer la concentration en ARNm et la pureté des extraits (R=260/280 nm, spectre). Les extraits ont été conservés à -80°C.

- *Transcription inverse (RT) (annexe 5).*

Les ADNc ont été obtenus par transcription inverse avec amorces aléatoires (random hexamer) permettant une amplification globale de tous les ARNm présents dans l'extrait. La réaction a été réalisée sur thermocycleur MasterCycler Personal, Eppendorf<sup>®</sup> dans un volume final de 20 µL : 4 µL (400 µg) ARNm ont été ajoutés à 2 µL de Dithiothreitol (DTT) 0.1M (Invitrogen<sup>®</sup>, Cergy Pontoise, France), 0.5 µL de Superscript II RnaseH-Reverse

transcriptase H-200 U/ $\mu$ L (Invitrogen<sup>®</sup>), 4  $\mu$ L First Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen<sup>®</sup>), 2  $\mu$ L dNTP mix 5 mM (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>, Uppsala, Sweden), 6  $\mu$ L random hexamers pd(N)<sub>6</sub> 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>), 0.5  $\mu$ L RNAsin<sup>®</sup> 40 U/ $\mu$ L (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA). Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C. Un témoin sans reverse transcriptase et un témoin sans ARNm ont été inclus dans chaque série.

- *Quantification relative par qPCR temps réel* (annexe 6a).

Les ADNc ont été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure avant amplification. La quantification des ARNm cibles a été réalisée par qPCR en temps réel, par quantification relative sur Applied 7500 Fast (Applied Biosciences<sup>®</sup>) dans un volume final de 20  $\mu$ L : 10  $\mu$ L Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosciences<sup>®</sup>), 50  $\mu$ M d'amorces sens et antisens, 8  $\mu$ L d'ADNc (dilué au 1/20<sup>ème</sup>) et de l'eau stérile. Les conditions d'amplification étaient : 10 minutes de dénaturation à 95°C, 45 cycles d'amplification (95°C pendant 15 secondes et 65°C pendant 1 minute). Les valeurs quantitatives étaient obtenues à partir du cycle seuil (Ct). Chaque échantillon a été testé en duplicat. Après amplification, les courbes de fusion ont été étudiées afin de valider la spécificité des produits de qPCR en temps réel. Les amorces utilisées proviennent des publications du Pr I. Bieche (Faculté de Paris V) (Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005) (annexe 6b). Deux gènes référents ont été utilisés pour la quantification relative : le gène P0 (RPLP0, 36B4, numéro d'accès GenBank NM\_001002), codant une phosphoprotéine ribosomale et TBP (numéro d'accès GenBank NM\_003194) qui code une protéine de liaison à l'ADN du complexe TFIID.

#### *Interprétation des résultats*

L'interprétation des résultats est réalisée par la technique du  $\Delta\Delta$ Ct permettant d'exprimer la production d'ARNm d'un gène cible par rapport à un gène de référence au sein de chaque puits cellulaire. Cette valeur est ensuite rapportée à celle des puits calibrateurs (« témoins non exposés ») afin de déterminer la valeur de ratio normalisé « N », qui traduit l'expression du gène cible dans les puits exposés par rapport aux puits non exposés. La normalisation par rapport à un gène de référence va permettre dans une certaine mesure de s'affranchir des erreurs liées à la quantité initiale d'échantillon, à l'extraction, à la dégradation de l'ARN, aux erreurs de pipetage et de rendement de reverse transcription (Détail du calcul en annexe 6c).

#### *Dosage de l'IL-5 par ELISA dans les surnageants de culture cellulaire*

Chaque fois qu'une augmentation des ARNm de l'IL-5 était observée, la forme protéique de l'IL-5 a été recherchée dans les surnageants de culture cellulaire à l'aide d'un kit ELISA spécifique (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Rockford, USA). Ce kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon a été testé en duplicat. La limite de détection de l'IL-5 était de 5 pg/mL.

### *Analyse statistique des résultats*

Les variations d'ARNm ont été comparées statistiquement par test ANOVA. Les différences observées ont été considérées comme significative pour  $p < 0.05$ .

#### c) Résultats

Les cellules ont été incubées en présence d'une concentration de 1000 grains/mL de bouleau en absence et en présence de Plomb (doses 30 et 60) pendant 2h et 6h.

Aucune augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-8, d'IL-6 et d'IL-13 n'a été observée lors de l'exposition aux grains de pollen de bouleau, qu'ils soient, ou non, marqués par du Plomb (Tableau 10, p111).

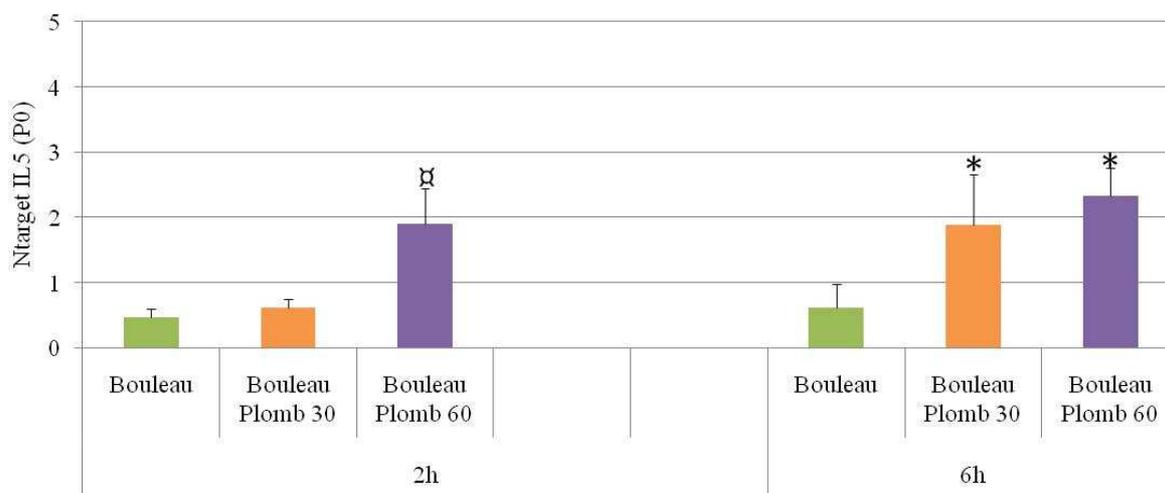
Concernant la quantification relative des ARNm de l'IL-5, des différences significatives ont été observées en réponse aux 3 types d'inoculum. Ainsi, après 2h d'exposition, une augmentation significative du taux d'ARNm d'IL-5 a été observée en réponse à l'exposition aux grains de pollen de bouleau marqué par la dose la plus élevée de Plomb (60) (Figure 18, p111:  $N_{IL-5}=1.9$ ). De la même façon, après 6h d'exposition, une augmentation significative du taux d'ARNm d'IL-5 a été observée en réponse à l'exposition aux grains de pollen de bouleau marqués par le Plomb (doses 30 et 60) (Figure 18, p111:  $N_{IL-5}=1.88$  pour la dose 30 et  $N_{IL-5}=2.33$  pour la dose 60).

La forme protéique de l'IL-5 n'a été retrouvée dans aucun surnageant de culture cellulaire, après exposition aux grains de pollen de bouleau marqués ou non marqués par le Plomb, par dosage ELISA.

Tableau 10 : Ensemble des résultats obtenus par RT-qPCR temps réel après exposition aux grains de pollen de bouleau, seuls et après marquage au Plomb, sur la lignée A549.

Type d'exposition	Temps	IL-8		IL-6		IL-13		IL-5	
		N	Ecart-type	N	Ecart-type	N	Ecart-type	N	Ecart-type
Bouleau (10 <sup>3</sup> grains/mL)	2h	0.60	0.2	0.31	0.16	0.31	0.16	0.61	0.36
	6h	1.21	0.18	0.11	0.01	1.27	0.32	0.47	0.13
Bouleau (10 <sup>3</sup> grains/mL) + Plomb (30)	2h	0.57	0.25	0.19	0.1	1.74	0.27	0.61	0.14
	6h	1.17	0.08	0.6	0.14	1.38	0.22	1.88	0.78
Bouleau (10 <sup>3</sup> grains/mL) + Plomb (60)	2h	0.47	0.09	0.30	0.15	0.31	0.14	1.90	0.754
	6h	1.4	0.26	1.09	0.18	1.06	0.22	2.33	0.42

Figure 18 : Quantification relative des ARNm de l'IL-5 lors de l'exposition aux grains de pollen de bouleau avec et sans Plomb sur la lignée A549.  $\alpha$  : augmentation significative de N à 2h après exposition aux grains de pollen de bouleau marqué par 60 mg/L de Plomb (p=0,001) ; \* : augmentation significative de N à 6h après exposition aux grains de pollen de bouleau marqués par 30 mg/L de Plomb (p=0,01) et 60 mg/L de Plomb (p=0,001).



#### d)Discussion

Dans cet essai préliminaire visant à évaluer l'influence de la présence de Plomb sur le pouvoir allergisant des grains de pollen de bouleau, nous avons observé une augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-5 par RT-qPCR temps réel. Cette augmentation était dose - et temps - dépendante. Cependant, la forme protéique d'IL-5 n'a pas été détectée dans les surnageants de culture cellulaire correspondants.

L'absence de réponse inflammatoire (absence d'induction des taux d'ARNm d'IL-8 et d'IL-6), même après exposition des cellules pendant 6h à des grains de pollens de bouleau marqués par des quantités élevées de Plomb (dose 60), ainsi que des ratios (N) de quantification relative d'ARNm globalement bas obtenus pour l'ensemble de ces tests de stimulation (N rarement au dessus de 2) suggèrent que la dose ou la nature de l'inoculum utilisées dans cet essai n'étaient pas optimales.

Pourtant, cette étude a été réalisée en essayant de respecter le plus possible les conditions d'expositions réelles aux grains de pollen. Ainsi, la quantité de grains de pollens mis en contact avec les cultures cellulaires a été déterminée en prenant en compte les principaux paramètres en jeu lors de l'inhalation de grains de pollen (surface pulmonaire, quantité d'air inhalé au repos/à l'effort, quantité de grains de pollen inhalés lors des pics polliniques). De la même façon, la dose de Plomb présente sur les grains de pollen a été choisie en fonction des concentrations moyennes d'ETM mesurées sur les pollens dans les zones polluées. La maîtrise des quantités de Plomb impactées sur les grains de pollen imposait une nébulisation sur grains de pollens entiers, ce qui est peut être à l'origine d'un moins bon contact entre les pollens et les cellules, puisque très souvent les études étudiant les interactions entre les cellules et les pollens utilisent des broyats de pollens (Taverna et al. 2008) ou des extraits protéiques (Milovanovic et al. 2009) comme inoculum.

L'augmentation significative des taux d'ARNm d'IL-5 observée par RT-qPCR n'a pas été confirmée par la détection de la forme protéique de l'IL-5 par dosage ELISA dans les surnageants de culture cellulaire. Le résultat est similaire à celui observé précédemment dans le cas de l'IL-13 après exposition des cellules A549 à *A. corymbifera*. Là encore, on peut suggérer un manque de sensibilité du kit ELISA (limite de détection 5 pg/mL) ou un manque de spécificité des amorces IL-5 utilisées. Il est également possible que les cellules A549 ne produisent pas les protéines correspondantes aux cytokines de la voie Th2 selon leurs conformations post-traductionnelles habituelles et que, de ce fait, ces protéines ne puissent se lier aux anticorps spécifiques utilisés dans le kit ELISA. En conclusion, cet essai préliminaire ne permet pas de conclure sur une potentielle synergie entre la présence de Plomb sur les grains de pollen de bouleau et le pouvoir allergisant des pollens.

Il serait bien sûr idéal de pouvoir faire ce type d'essais sur des cellules primaires issues de patients allergiques au pollen de bouleau. En effet, les cellules A549 sont des cellules en lignée, non sensibilisées aux pollens, par rapport aux patients allergiques. Par ailleurs, si ces essais devaient se poursuivre, nous aimerions améliorer le contact des grains de pollen avec les cellules, en utilisant du broyat ou de l'extrait de pollen marqué ou non par des ETM. Cependant, des mises au point techniques, concernant la maîtrise des concentrations d'ETM par nébulisation sur un substrat différent de grain de pollen entier sont nécessaires.



# **Conclusion et perspectives**



L'étude de la réponse initiale des cellules épithéliales pulmonaires, première barrière de défense de l'organisme, nous a permis de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu en réponse à l'inhalation de différentes fractions fongiques. Ainsi, le rôle de la germination des conidies d'*A. fumigatus* dans le développement de la réaction inflammatoire au cours de l'aspergillose a pu être établi. De plus, nous avons démontré que la moisissure *A. corymbifera* induisait une réponse inflammatoire au niveau de l'épithélium pulmonaire, ce qui renforce l'idée que cette moisissure, présente en grande quantité dans le foin et capable d'induire la production d'anticorps sériques spécifiques, est un agent étiologique important de la maladie du Poumon de Fermier, alors que pour cette maladie, seul *S. rectivirgula*, actinomycète thermophile, est retenu comme agent étiologique depuis des années.

Par ailleurs, l'ensemble de ces essais nous a permis de mieux appréhender l'importance de la nature des inoculums utilisés dans nos tests de stimulation. Ainsi, alors que pour nos premiers essais, nous avons utilisé des extraits totaux hydrosolubles de moisissures, nous avons poursuivi les expérimentations en utilisant des fractions protéiques purifiées afin de mieux cerner les fractions fongiques responsables des effets observés et de mieux standardiser les essais de stimulation.

Ces essais nous ont également démontré l'importance d'utiliser deux techniques pour étudier la réponse cellulaire (quantification des ARNm par RT-qPCR temps réel suivie du dosage de la forme protéique des médiateurs étudiés dans les surnageants de culture cellulaire). Si les cellules A549 permettent aisément de mettre en évidence une réaction de type inflammatoire, par la production d'IL-8, en revanche, elles semblent peu appropriées à l'étude de mécanismes allergiques, puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence la production des cytokines représentatives de la voie Th2 (IL-13, IL-5) sous une forme protéique capable de se lier aux anticorps spécifiques utilisés dans les kits ELISA.

Nos perspectives comprennent deux grands axes. D'une part, nous souhaitons continuer à préciser le rôle des différentes fractions fongiques. Les essais utilisant des fractions protéiques purifiées de différentes formes de développement d'*E. amstelodami* ont amorcé cette démarche qui devrait se poursuivre par l'utilisation d'extraits polysidiques fongiques. En effet, l'importance des composés polysidiques est de plus en plus rapportée dans la littérature scientifique, en particulier concernant le rôle du beta-D-1-3 glucane, présent dans la paroi de la plupart des espèces fongiques, dans l'initiation de réponses inflammatoires. Les mycotoxines fongiques, mises en cause dans l'*Organic Dust Toxic Syndrom*, qui survient en cas d'inhalation aiguë massive d'antigènes, pourraient également faire l'objet d'expérimentations sur modèle cellulaire in vitro, afin d'étudier leur rôle dans le déclenchement de la maladie du Poumon de Fermier. Par ailleurs, nous envisageons d'utiliser à l'avenir la technique Luminex® pour nos dosages dans les surnageants de culture cellulaire. En effet, ce système multi-analytique puissant nous permettra d'identifier et de quantifier 10-15 médiateurs (cytokines, chemokines) simultanément, avec une bonne sensibilité, par rapport aux kits ELISA classiques, ne permettant qu'un dosage individuel de cytokines.

Notre second axe de perspectives consistera à approfondir l'étude du rôle des moisissures dans l'initiation du recrutement lymphocytaire à l'origine de l'alvéolite lymphocytaire qui caractérise la maladie du Poumon de Fermier.

Ainsi, nous avons comme projet d'étudier les interactions entre cellules épithéliales pulmonaires et cellules dendritiques lors du contact avec les différentes fractions fongiques à l'aide d'un modèle *in vitro* de co-culture cellules épithéliales/cellules dendritiques. Plusieurs études rapportent l'intérêt des cellules dendritiques, qui sont spécialisées dans la reconnaissance, le traitement et la présentation des antigènes, et qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'immunité innée et adaptative (Banchereau and Steinman 1998, Lambrecht 2001, Steinman and Banchereau 2007, von Garnier and Nicod 2009). Elles sont concentrées au niveau des interfaces de l'organisme exposées à l'environnement et surveillent scrupuleusement l'entrée de tous les antigènes, induisant soit une tolérance vis-à-vis des substances inoffensives soit une réaction immunitaire de défense en cas d'antigène potentiellement dangereux. L'activation des cellules dendritiques s'accompagne de la libération de molécules de costimulation et de marqueurs de maturation, ce qui génère l'activation et le recrutement de cellules T naïves. La libération de cytokines et de chemokines qui s'ensuit ne sert pas seulement à amplifier la réponse immune innée mais détermine aussi le type de cellule T effectrices qui sera recruté. Les cellules dendritiques sont plus complexes à obtenir, en effet, il n'existe pas de lignée de cellules dendritiques et elles ne peuvent pas être conservées ni entretenues sur plusieurs passages. Elles sont donc obtenues après traitement par facteurs de croissance de monocytes sanguins prélevés chez des sujets sains (dans un deuxième temps, des monocytes prélevés chez des agriculteurs malades pourraient être utilisés).

Ainsi, avec pour objectif de préciser quelles fractions fongiques (protéiques, polyosidiques, mycotoxines) sont impliquées dans le recrutement lymphocytaire caractérisant la maladie du Poumon de Fermier, nous souhaitons effectuer des tests de stimulations sur cellules épithéliales respiratoires primaires (obtenues lors de biopsies nasales, en collaboration avec nos collègues ORL). Ces cellules épithéliales activées pourront être mises en contact avec des cellules dendritiques. La caractérisation des médiateurs sécrétés sera effectuée par la technique Luminex<sup>®</sup> et l'étude des marqueurs de maturation exprimés (CD40, CD86 etc...) sera faite par cytométrie de flux.

Ces travaux devraient permettre d'apporter des informations nouvelles sur les mécanismes physio-pathologiques des pneumopathies d'hypersensibilité, en précisant d'une part la nature des molécules « activatrices » en cause du côté fongique (protéine, polyoside, mycotoxine) et d'autre part, en améliorant la connaissance des médiateurs et des voies cellulaires mises en cause du côté de l'hôte.

# **Annexes**



### *Autre travail réalisé*

#### Etude prospective des marqueurs lymphocytaires chez des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier

Dans le cadre d'un projet soutenu par l'ANR (étude ANR n°05977), un protocole prospectif, initié en 2007, a permis l'inclusion, par les services de pneumologie du CHU de Besançon (Pr JC Dalphin), de patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier et de patients atteints de pneumopathies interstitielles diffuses. En collaboration avec la plateforme de biotechnologie de l'établissement Français du sang (EFS) de Besançon (M Deschamps, E Robinet), une analyse comparative *in vivo* de marqueurs lymphocytaires d'intérêt a été réalisée, par cytométrie de flux, dans le sérum et le liquide de lavage broncho-alvéolaire de ces patients. A ce jour, 13 patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier et 6 patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse ont été inclus dans cette étude. Les premiers résultats sont présentés dans les Tableaux 6-8. Ces premiers résultats suggèrent qu'en moyenne, des taux supérieurs de lymphocytes CD103<sup>+</sup>, sont retrouvés dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier. Par ailleurs, le marqueur Foxp3<sup>+</sup>, dont l'intérêt a peu été évalué jusqu'à présent dans le diagnostic différentiel des pneumopathies d'hypersensibilité par rapport aux pneumopathies interstitielles diffuses, semble être présent en plus grande quantité dans le sang et le liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être confrontés aux données cliniques et radiologiques avant de conclure.

Tableau 11 : Premiers résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires chez les patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse.

Sang					
Marqueurs	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup>
	%CD103 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	%CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>
<b>Patient 1</b>	1.41	68.99	31	2.22	NR
<b>Patient 2</b>	1.16	57.53	29.4	1.95	1.62
<b>Patient 3</b>	4.5	32	65.5	0.49	2.2
<b>Patient 4</b>	1.2	56.9	39.1	1.46	2.2
<b>Patient 5</b>	2.3	76.7	21.5	3.57	4.9
<b>Patient 6</b>	4.6	55.1	38.3	1.44	0

Lavage broncho-alvéolaire					
Marqueurs	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup>
	%CD103 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	%CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>
<b>Patient 1</b>	10.99	24.9	73	0.34	NR
<b>Patient 2</b>	33	57	16	3.55	0.26
<b>Patient 3</b>	14.7	30.4	43.9	0.69	NR
<b>Patient 4</b>	17.7	34.4	63.6	0.54	7.4
<b>Patient 5</b>	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Patient 6</b>	32	79	4.97	4.97	0.1

\*NR : Non réalisé (cellularité insuffisante du lavage broncho-alvéolaire pour le patient 5 et absence de réactif pour l'analyse du marqueur Foxp3 pour le patient 1).

Tableau 12 : Premiers résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires dans le sang des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier.

Sang					
Marqueurs	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup>
	%CD103 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	%CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>
<b>Patient 1</b>	0.56	90.99	7.8	11.6	NR
<b>Patient 2</b>	1.38	71.7	24.9	2.88	0.34
<b>Patient 3</b>	1.66	74.4	22	3.38	3.8
<b>Patient 4</b>	1.13	61.55	23.7	2.6	NR
<b>Patient 5</b>	23.1	48.8	34.1	1.43	1.48
<b>Patient 6</b>	2.67	63.5	35.6	1.78	1.22
<b>Patient 7</b>	2.41	73.5	25.4	2.9	1.06
<b>Patient 8</b>	2.4	62.6	29.9	2.1	2.2
<b>Patient 9</b>	2.4	62.2	27	2.3	5.7
<b>Patient 10</b>	5.8	70.1	17.1	4.1	1.8
<b>Patient 11</b>	1.1	81.2	17.1	4.75	4.8
<b>Patient 12</b>	1.1	78.8	19.2	4.1	3.6
<b>Patient 13</b>	0.8	82.5	16.6	4.97	2.4

\*NR : Non réalisé (absence de réactif pour l'analyse du marqueur Foxp3 pour le patient 1 et 4)

Tableau 13 : Premiers résultats des analyses par cytométrie de flux des marqueurs lymphocytaires dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires des patients atteints de la maladie du Poumon de Fermier.

Lavage broncho-alvéolaire					
Marqueurs	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup>
	%CD103 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	%CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>
<b>Patient 1</b>	35	39.9	57.2	0.7	NR
<b>Patient 2</b>	43.1	32.2	65.2	0.5	0.66
<b>Patient 3</b>	48.5	56.1	43	1.3	3.5
<b>Patient 4</b>	39.9	19.2	63.6	0.3	NR
<b>Patient 5</b>	53.9	19.2	63.6	0.3	2.99
<b>Patient 6</b>	52.5	45.5	51	0.89	4.11
<b>Patient 7</b>	47.3	53.9	44.3	1.22	0.66
<b>Patient 8</b>	54.9	65.3	31.7	2.06	4.6
<b>Patient 9</b>	50	40.2	51	0.79	1.2
<b>Patient 10</b>	44.2	70.3	19.7	3.6	3.4
<b>Patient 11</b>	57.3	94.2	4.9	19.22	3.1
<b>Patient 12</b>	35.8	67.1	29.6	2.27	5
<b>Patient 13</b>	10.8	40.9	58.8	0.7	7

\*NR : Non réalisé (absence de réactif pour l'analyse du marqueur Foxp3 pour le patient 1)

**Annexe 1-Milieus de cultures, réactifs, matériel**

	<b>Produit</b>	<b>Fabriquant</b>
<b>Culture cellulaire</b>	A549	DSMZ
	Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture (DMEM)	Invitrogen
	Sérum de vœu foetal	
	Trypsine EDTA 0.05%	
	Gentamicine 10 mg/mL	Sigma Aldrich
	Flasques 25 cm <sup>2</sup> Plaques de 24 puits	Falcon
	Dymethyl sulfoxyde (DMSO)	Prolabo
<b>Extraction automatisée des ARN</b>	MagNA pure RNA isolation kit	Roche Diagnostics
<b>Extraction manuelle des ARN</b>	RNAbLe Kit	Eurobio
<b>Reverse transcription</b>	5X First Strand Buffer	Invitrogen
	Superscript II Reverse Transcriptase	
	0.1M DTT	
	RNasin RNase inhibitor	Promega
	Pd (N)6 Random Hexamer sodium salt 0.5 µg/µL	GE Healthcare
	nucléotides	
2' desoxythymidine 5' triphosphate		
2' desoxycytosine 5' triphosphate		
2' desoxyguanosine 5' triphosphate		

<b>PCR temps réel</b>	Power SYBR Green PCR Master Mix 2X	Applied Biosystems
	Plaques 96 puits FAST qualité optique	
	Films adhésifs qualité optique	
	SYBR Green PCR 10X	Roche Diagnostics
	Capillaires 20 µL	
	Amorces P0/TBP/IL-8/TNFα/GM-CSF/IL-13	Ivan Bieche, Paris V(Bieche et al. 2005, Saadoun et al. 2005)
<b>Extraction des fractions protéiques</b>	Lyticase	MP Biomedicals
	Phosphate de sodium monobasique	Sigma Aldrich
	Sodium Hydrogen Phosphate dihydrate	
	Deoxycholate 0.1%	
	Acide trichloroacétique	
	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF)	
	Pepstatin	
	O Phenanthroline	
<b>Dosage des inoculums</b>	Bovin Serum Albumine (BSA)	
	Kit DC Protein Assay	Biorad
	Uvettes Eppendorf	Dustcher
<b>Dosage ELISA</b>	Kit IL-8, cytokine humaine	Thermo Scientific
	Kit IL-5, cytokine humaine	
	Kit IL-13, cytokine humaine	

## **Annexe 2a-Méthode de préparation des suspensions de spores fongiques**

1/ Repiquer des souches de référence d'*A. fumigatus* (IP2279-94) et de *P. chrysogenum* (IP 1652.86) sur milieu Malt agar (DIFAL, Seysses, France).

2/ A J<sub>7</sub> de culture, verser 5 mL de Tween 20 (Sigma France<sup>®</sup>) dans le tube de culture et vortexer quelques minutes.

3/Récupérer la suspension de spores dans un tube Falcon<sup>®</sup> de 50 mL et centrifuger à 2500 tours/minute pendant 5 minutes.

4/Éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot de spores dans 5 mL de milieu de culture pour cellules. Bien vortexer.

5/Prélever 10 µL de suspension et diluer au 100<sup>ème</sup> en ajoutant 990 µL de milieu de culture pour cellules. Compter en cellule de Malassez.

6/Diluer la suspension de conidies avec du milieu de culture afin de l'ajuster à 10<sup>7</sup> spores/mL.

## **Annexe 2b-Méthode de préparation des extraits totaux hydrosolubles**

1/ Repiquer des souches de référence de *S. rectivirgula* (DSMZ 43114) sur milieu R8(Amner et al. 1989) à 44°C, *A. corymbifera* (BBCM/IHEM 3809) et *E. amstelodami* (BBCM/IHEM 16286) sur milieu DG18 (Oxoid, Unipath, Basingstoke, England) à 30°C, et *W. sebi* (BBCM/IHEM 16284) sur milieu Sabouraud (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) à 20°C.

2/A J<sub>7</sub> de culture, récupérer par grattage l'ensemble des structures fongiques de façon à obtenir une suspension laiteuse (> 2 Mc Farland).

3/ Congéler à -20°C pendant une nuit.

4/ Lyophiliser (Appareil Labconco<sup>®</sup>, Kansas City, USA)

5/ Réhydrater dans 1 mL d'eau stérile. Bien vortexer.

6/Centrifuger 10 000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant constitue l'extrait total hydrosoluble.

## **Annexe 2c-Protocole de dosage des protéines par technique colorimétrique**

1/ Utiliser le kit DC Protein Assay (Biorad)

2/Réaliser une gamme de dilution de Bovin Serum Albumin (BSA) : 100 µg / mL, 250 µg / mL, 500 µg / mL , 750 µg / mL, 1000 µg / mL, 1500 µg / mL

3/Réaliser un mélange des solutions A et S (solution A') : 20 µL de S / mL de solution A, sachant que 500 µL de solution A' sont nécessaire pour chaque tube d'échantillon et de la gamme. Bien vortexer.

4/ Ajouter 4 mL de solution B par tube. Bien vortexer.

5/ Incuber 15 min à température ambiante.

6/ Lire au spectrophotomètre à 450 nm dans des cuves plastiques.

## **Annexe 2d-Méthode de préparation des extraits protéiques**

1/Préparer du tampon Tris HCl 0.1N, pH=8.5

- 5 mL de Tris 1M
- 1.47 mL HCL 1N
- Qsp 100 mL EDS

2/ Préparer du tampon phosphate NaCl pH=6

- 90 mL de phosphate monosodique
  - soit 4.53g phosphate de sodium monobasique qsp 500 mL EDS
- 10 mL de phosphate dissodique
  - soit 5.93g de sodium hydrogen phosphate dihydrate qsp 500 mL EDS
- 6.3g NaCl
- Qsp 700 mL EDS

2/ Repiquer de la souche de référence *E amstelodami* (BBCM/IHEM 16286) sur trois milieux distincts, chacun favorisant l'obtention d'une culture pure soit d'ascospores (forme sexuée), soit de conidies (forme asexuée), soit de filaments (forme végétative)(Roussel et al. 2009a) :

- DG 18 (Oxoid, Unipath, Basingstoke, England) : obtention d'une culture pure d'ascospores

-Malt Agar (DIFAL, Seysses, France): obtention d'une culture pure de conidies

-Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson, NJ, France) : obtention d'une culture pure de filaments

2/A J<sub>7</sub> de culture, récupérer les structures fongiques obtenues.

- Déposer 2 à 3 mL de tampon phosphate NaCl sur la surface de chaque boîte et racler légèrement avec une anse stérile.
- Réaspérer le liquide avec une pastete et transférer dans un tube Falcon (15 mL). Placer les tubes dans la glace au fur et à mesure.
- Centrifuger à 5500 rpm pendant 5 min à 4°C.

3/Lyse des structures fongiques

- Reprendre les culots dans 5 mL de Tris HCl (pH=7.5)
- Ajouter 20 µL de Lyticase, 50 µL de PMSF, 50 µL de phenanthroline et 1 µL de pepsatin
- Incuber les tubes, inclinés, sous agitation, pendant 1 h à température ambiante
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 3 min

- Récupérer le surnageant dans des tubes Falcon 15 mL
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 3 min
- Récupérer le surnageant dans des tubes Falcon 15 mL

#### 4/ précipitation des protéines

- Ajouter 100 µL de deoxycholate 0.1% / mL de surnageant et incuber 5 min à température ambiante
- Ajouter 70 µL d'acide trichloroacétique / mL et incuber 15 min dans la glace
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 10 min
- Eliminer le surnageant
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 min
- Eliminer le surnageant

## **Annexe 2e-Méthode de préparation des suspensions de grains de pollen**

1/ Les grains de pollen de bouleau non pollués (« Bouleau ») ont été collectés au moyen de pièges, disposés dans des zones non polluées, autour de Besançon, pendant les périodes de pics polliniques (printemps 2007 et 2008).

2/ Les grains de pollen de bouleau non pollués ont été marqués au Plomb par nébulisation pendant une heure en présence d'une solution de chlorure de Plomb, soit à 30mg/L (« Bouleau-Plomb 30 »), soit à 60 mg/L (« Bouleau-Plomb 60 »).

3/ Un mg de pollen correspond environ à 100 000 grains de pollen de Bouleau (Allergy, 1973). Trois mg de chaque type de pollen, soit « Bouleau », « Bouleau-Plomb 30 » et « Bouleau-Plomb 60 » ont été pesés et mis en suspension dans du milieu de culture, afin de constituer des solutions mères de grains de pollen à  $10^5$  grains/mL.

4/ Avant exposition, ces solutions mères ont été diluées au  $100^{\text{ème}}$ , afin que chaque puits cellulaire soit exposé à 1000 grains /mL, dose représentative de la quantité de grains de pollen de bouleau pouvant être inhalée en période de pic pollinique par un patient effectuant un effort modéré.

### Annexe 3a –Protocole de cultures cellulaires (Lignée A549)

<b>Composition des milieux de culture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture (DMEM) 500 mL</li> <li>- Sérum de veau foetal (SVF) 10%</li> <li>-Gentamicine 0.5%</li> </ul>
<b>Entretien, toutes les 48 heures</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-5 mL de milieu préchauffé à 30°C par flasque de 25 cm<sup>2</sup></li> <li>-1 mL de milieu préchauffé par puits</li> </ul>
<b>Repiquage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-5 mL de trypsine EDTA préchauffée par flasque de 25 cm<sup>2</sup> pendant 10 minutes à 37°C</li> <li>-Neutralisation par 5 mL de SVF préchauffé</li> <li>-Centrifugation 7 minutes à 1500 tours/minutes</li> <li>-Reprise du culot par 5 mL de milieu</li> </ul> <p>Comptage des cellules en cellule de Malassez, évaluation de la mortalité par coloration au bleu trypan 10%</p>
<b>Ensemencement des flasques</b>	2.10 <sup>4</sup> cellules/cm <sup>2</sup>
<b>Ensemencement des puits</b>	2.10 <sup>4</sup> cellules/cm <sup>2</sup>

## Annexe 3b–Protocole de la PCR mycoplasme

1/ 100 µL de surnageant de culture cellulaire sont prélevés et incubés à 95°C pendant 5 minutes, puis centrifugés 5 secondes.

2/ 2 µL de surnageant est ajouté au mix PCR.

3/ 5 µL de chaque produit de PCR chargé de 2 µL de bleu de bromophénol sont déposés sur gel de polyacrylamide standard à 8% en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire.

4/ Un témoin négatif et un témoin positif sont intégrés à chaque série de cellules à tester.

5/ La migration se fait dans une cuve Mini PROTEAN 3 cell\_Biorad® (30 minutes à 180 volts). Après migration, la révélation du gel est faite par incubation dans du BET 10% pendant 10 minutes.

Préparation du mix PCR	
Réactifs	Volumes par échantillon (µL)
Eau	12.3
Tampon Taq	2.5
MgCl <sub>2</sub>	3
Amorces	2.5
Contrôle interne	2.5
Taq Fast Start	0.2
Echantillon	2

Programme d'amplification		
Température (°C)	Temps	
94	5 minutes	
94	30 secondes	
55	30 secondes	35 cycles
72	30 secondes	
72	1 minute	
4	∞	

Gel de polyacrylamide 8%	
Réactifs	Volumes
Eau distillée	4 mL
Acrylamide	9.5 mL
TBE 10%	1.5 mL
APS	75 µL
TEMED	15 µL

## Annexe 4-Extraction manuelle des ARN

1/ Utiliser le kit RNable™ (Eurobio®, Courtaboeuf, France). Afin de préserver les ARN de l'action de RNAses, prendre des précautions: maintien des échantillons à +4°C pendant toute l'extraction, nettoyage de tout le matériel avec de la RNase away™ (Molecular Bioproducts Inc®, San Diego, USA), port de gants.

2/Après élimination du surnageant, lyser chaque puits cellulaire par 200 µL de RNable. Gratter le fond de chaque puits afin de recueillir au mieux l'ensemble du lysat cellulaire. Mettre immédiatement les échantillons dans la glace.

3/ Ajouter 20µL de chloroforme par tube; vortexer chaque tube 15 secondes. Laisser reposer 5 minutes dans la glace. Centrifugation 15 min, 4°C, 12000g

4/ Prélever la phase supérieure incolore (ARN totaux). Ajouter 80µL d'isopropanolol par tube.

5/ Incuber au moins une heure à 4°C. Centrifuger 5 min, 4°C, 12000g

6/Laver le culot avec de l'alcool à 75° : 200 µL par tube ; vortexer ; centrifuger 5 min, 4°C, 7500g ; refaire un deuxième lavage.

7/Sécher le culot (5min au moins par tube). Reprendre le culot dans 10µL d'eau ultra pure.

## Annexe 5-Protocole de reverse transcription

Préparation du mix de RT-PCR		
Réactifs	Concentrations finales	Volumes/échantillon (µL)
Tampon 5X	1X	4
DTT 0.1 µM	0.01 µM	2
dNTP 5 mM chacun	0.5 mM	2
Random hexamers 0.5 µg/µL	0.15 µg/µL	6
RNAsin 40 U/µL	20 U	0.5
Reverse transcriptase 200 U/µL	100 U	0.5
H2O qsp 16 µL		1
Echantillon		4

Programme de RT-PCR	
Température (°C)	Temps
25	10 min
42	30 min
99	5 min
4	∞

### Annexe 6a-Protocole de PCR quantitative en temps réel

Préparation du mix qPCR en temps réel (travail de recherche 1 sur LightCycler 2.0)		
Réactifs	Concentrations finales	Volumes par tube (µL)
Fast Start SYBR Green Buffer 10X	1X	2
MgCl <sub>2</sub>	3mM	1.6
Upper primer	0.2 µM	0.08
Lower primer	0.2 µM	0.08
H <sub>2</sub> O qsp 12 µL		
Volume d'ADNc des échantillons dilués au 1/20 <sup>ème</sup>		8
Préparation du mix qPCR en temps réel (travaux 2 et 3 sur Applied 7500 Fast)		
Réactifs	Concentration finale	Volume par tube (µL)
Power SYBR Green PCR Master Mix 2X	1X	10
Upper primer	0.2 µM	0.08
Lower primer	0.2 µM	0.08
H <sub>2</sub> O qsp 12 µL		
ADNc des échantillons dilués au 1/20 <sup>ème</sup>		8

### Programme de qPCR en temps réel

Température (°C)	Temps
95	8 min
95	15 sec
65	1 min (acquisition fluorescence)

### Annexe 6b- séquences des amorces

Cible	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti sens (5'-3')
P0	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
IL-8	CACCGGAAGGAACCATCTCACTGT	TCCTTGGCAAAACTGCACCTTCA
TNF $\alpha$	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTT	CCTCAGCTTGAGGGTTTGCTACA
GM CSF	GAGACACTGCTGCTGAGATGAATG	CAGGTCGGCTCCTGGAGGT
IL-13	ATCACCCAGAACCAGAAGGCTC	GATTCCAGGGCTGCACAGTACA
IL-5	GAACTCTGCTGATAGCCAATGAGAC	CTCCAGTGTGCCTATTCCCTGA

## Annexe 6c-détail du calcul du $\Delta\Delta Ct$ pour la quantification relative.

$$E_{\text{gène cible}}^{(\text{Ct gène cible non exposé}-\text{Ct gène cible exposé})}$$

$$N = \frac{\quad}{\quad}$$

$$E_{\text{gène de référence}}^{(\text{Ct gène de référence non exposé}-\text{Ct gène de référence exposé})}$$

N	Ratio normalisé
E	Rendement de qPCR (Théorique = 2)
Ct	Cycle Threshold
Cible	Gène étudié
Référence	Gènes de référence ( <i>Housekeeping gene</i> ) ici TBP et P0
Exposé	Puits exposés (conidies, extrait totaux hydrosolubles, extraits protéiques)
Non exposé	Puits calibrateurs (témoins)



# **Publications**



## *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549

Anne-Pauline Bellanger,<sup>1</sup> Laurence Millon,<sup>1</sup> Khaled Khoufache,<sup>2</sup> Danièle Rivollet,<sup>2</sup> Ivan Bièche,<sup>3</sup> Ingrid Laurendeau,<sup>3</sup> Michel Vidaud,<sup>3</sup> Françoise Botterel<sup>2</sup> and Stéphane Bretagne<sup>2</sup>

### Correspondence

Stéphane Bretagne  
bretagne@univ-paris12.fr

<sup>1</sup>UMR 6249 CNRS, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Jean Minjot, Besançon, France

<sup>2</sup>UMR BIPAR 956, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Henri Mondor and Université Paris-Est, Créteil, France

<sup>3</sup>UMR INSERM 745, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologique, Paris, France

Inhalation of conidia is the main cause of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) and the respiratory epithelium is the first line of defence. To explore the triggering factor for the inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*, the species mainly responsible for IPA, this study analysed the differential expression of three inflammatory genes in A549 cells after challenge with live and killed conidia. The influence of steroids, one of the main risk factors for developing IPA, was also investigated. Quantification of mRNAs of the inflammatory mediator genes encoding interleukin (IL)-8, tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and granulocyte–monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) was carried out using real-time PCR. Ingestion rates were studied for the conidia of *A. fumigatus* and *Penicillium chrysogenum* using a fluorescence brightener. Similar results were obtained for both species, with ingestion rates ranging from 35 to 40%. Exposure of A549 cells to live *A. fumigatus* conidia only induced a four- to fivefold increase in the mRNA levels of the three genes, starting 8 h after the initial contact. Both inactivation of live *A. fumigatus* conidia and treatment by dexamethasone ( $10^{-7}$  M) prevented the overexpression of TNF- $\alpha$ , IL-8 and GM-CSF. Fungal growth, rather than conidia ingestion, appears to be the main stimulus for the production of inflammatory mediators by epithelial cells, and this production is inhibited by steroid therapy. These results underline the role that the epithelium plays in the innate response against IPA.

Received 28 July 2008

Accepted 20 October 2008

## INTRODUCTION

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is an opportunistic infection whose incidence is increasing at the same rate as the number of severely immunocompromised patients (Lin *et al.*, 2001). Neutropenia and high-dose steroid treatments are the main risk factors for IPA, and these underline the importance of an appropriate inflammatory response if fungal invasion is to be avoided. Most authors stress the important roles that alveolar macrophages and neutrophils play in controlling infection (Romani, 2004; Walsh *et al.*, 2005). The release of innate immune-related molecules from professional phagocytic cells in the course of

*Aspergillus fumigatus* infection has been widely studied (Meier *et al.*, 2003; Pylkkanen *et al.*, 2004; Cortez *et al.*, 2006). However, the respiratory epithelium is the first tissue that inhaled conidia encounter, and it probably participates in the efficient coordinated response against IPA. In animal models of IPA, most inhaled conidia are trapped in the upper respiratory tract, and the respiratory epithelium coordinates with alveolar macrophages (Stephens-Romero *et al.*, 2005).

A few studies have investigated the production of inflammatory mediators by studying the human lung epithelial cell line A549 after stimulation with moulds or mould extracts (Borger *et al.*, 1999; Kauffman *et al.*, 2000; Huttunen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2006). These studies have focused on fungi as the source of allergens, and on species other than *A. fumigatus*, which are

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance;  $C_t$ , cycle threshold; GM-CSF, granulocyte–monocyte colony-stimulating factor; IL, interleukin; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; TNF, tumour necrosis factor.

often more allergenic (Kauffman *et al.*, 2000). To our knowledge, there are no reports on the response of A549 cells to germinating *A. fumigatus* or on comparisons with other mould species. Spores of other mould species usually outnumber *A. fumigatus* conidia in inhaled air, although *A. fumigatus* is the main aetiological agent of IPA. Therefore, differences observed between *A. fumigatus* conidia and the spores of other species after the challenge of respiratory epithelium could help explain why *A. fumigatus* is a frequently encountered aetiological agent of invasive infection.

The aim of our study was to investigate the early inflammatory signals in airway epithelial cells after exposure to *A. fumigatus* conidia using real-time quantitative PCR for reliable quantification of expression of selected inflammatory mediator genes (Stordeur *et al.*, 2002; Asselah *et al.*, 2005). We used in our study *Penicillium chrysogenum* as a control for conidia ingestion (Botterel *et al.*, 2008). *P. chrysogenum* is a mould that is highly predominant in the environment, with a conidial size (3–4 µm diameter) similar to that of *A. fumigatus*. Although *P. chrysogenum* can germinate at 37 °C (de Hoog *et al.*, 2000), this fungus is rarely responsible for invasive disease. We also aimed to explore the effect of steroids on the development of the inflammatory response of the A549 cell line after challenge with live *A. fumigatus* conidia.

## METHODS

**Fungal strains.** *A. fumigatus* strain IP 2279.94 and *P. chrysogenum* strain IP 1652.86 (both from the Pasteur Institute) were grown in 2% malt agar tubes (Bio-Rad) for 7 days at their optimal growth temperature: 37 and 27 °C for *A. fumigatus* and *P. chrysogenum*, respectively. The conidia were harvested with PBS/0.01% Tween 20 and 1 ml of conidia suspension ( $10^6$  ml<sup>-1</sup>) was used to seed the wells containing A549 cells. For some experiments, conidia were inactivated either chemically with 10% (v/v) formaldehyde or by heating at 100 °C in water for 1 h, and were resuspended in culture medium at  $10^6$  conidia ml<sup>-1</sup>.

**Cell lines.** The alveolar epithelial cell line A549 was purchased from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (DSMZ) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen), with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest) and 25 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich). The medium was changed every 2 days and cells were confluent after 5 days. Cell cultures were checked for the presence of *Mycoplasma* spp. every month using the Venor GeM Mycoplasma Detection PCR kit (BioValley). A549 cells were cultivated in 24-well microtitre plates (VWR). Confluent A549 cells (~5 × 10<sup>6</sup> cells per well) were seeded with conidial suspensions. Plates were centrifuged for 5 min at 1500 r.p.m. to optimize and standardize contact between the cells and conidia. The supernatants were removed and the conidia were counted. Wells were refilled with fresh, pre-warmed culture medium. Cell exposure was terminated at 2, 4, 8 and 24 h. These experiments were performed at least three times under all conditions.

**Quantification of conidia ingestion.** The internalized conidia were quantified using the fluorescence brightener Blankophor-P-fluessig [4,4'-bis[(4-anilino-6-substituted-1,3,5-triazine-2-yl) amino stilbene-2,2'-disulfonic acid], kindly provided by Bayer (Botterel *et al.*, 2008).

The brightener stained only the external conidia. Ten microlitres of the dye was diluted in 1 ml culture medium and 300 µl of this dilution was added to the wells and incubated for 10 min at 37 °C to stain non-internalized conidia. The wells were washed twice to collect any remaining unattached conidia and to remove the dye. The A549 cells were then lysed with 300 µl distilled water to allow counting of all conidia associated with or ingested by the cells. An Axioskop 40 microscope (Zeiss) with a filter combination including a barrier filter at 420 nm was used to classify the conidia. When UV light was stimulated below 400 nm, the brightener emitted a very intense bluish, yellowish or white light (Ruchel & Margraf, 1993). The blue conidia were classified as non-internalized and the non-fluorescent conidia as internalized.

**Dexamethasone experiments.** A549 cells were also challenged with *A. fumigatus* conidia in the presence of 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-7</sup> M dexamethasone (Sigma). Dexamethasone was dissolved in 90% ethanol, diluted in culture medium and added to the A549 cells just after centrifugation of the plates and removal of the supernatant. The growth of *A. fumigatus* in DMEM at 37 °C in the presence of 10<sup>-3</sup>–10<sup>-7</sup> M dexamethasone was also monitored for effects on fungal growth at 37 °C. Fungal germination was analysed at 4, 8 and 24 h.

**mRNA quantification.** RNA was extracted using an RNable kit (Eurobio). Determination of the concentration of nucleic acids was performed using a spectrophotometer (Nanodrop ND 1000) and the concentrations were adjusted to 250 ng µl<sup>-1</sup>. Reverse transcription was carried out in a final volume of 20 µl as follows: 1 µg (4 µl) RNA extract was added to 2 µl 0.1 M dithiothreitol (Invitrogen), 0.5 µl Superscript II reverse transcriptase (200 U µl<sup>-1</sup>; Invitrogen), 4 µl 5 × first-strand buffer [250 mM Tris/HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen], 2 µl 5 mM dNTP mix (Amersham Pharmacia), 6 µl pdN<sub>6</sub> random hexamers (0.5 µg µl<sup>-1</sup>; Amersham Pharmacia) and 0.5 µl RNasin (40 U µl<sup>-1</sup>; Promega). Sterile water was used to dilute the cDNAs (1:20) before storing at -80 °C until amplification. For each reaction, negative controls without RNA and without reverse transcriptase were carried out.

The primers used are listed in Table 1. Real-time PCR was carried out in a LightCycler 1.5 (Roche) in a 20 µl final volume containing 2 µl 10 × Fast Start SYBR Green Buffer (Fast Start SYBR Green kit; Roche Diagnostics), 3 mM MgCl<sub>2</sub> for granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF; *CSF2* gene) and interleukin (IL)-8 (*IL-8* gene) and 5 mM MgCl<sub>2</sub> for tumour necrosis factor (TNF)-α (*TNF* gene), 50 µM sense and antisense primers, 8 µl cDNA (diluted 1:20) and sterile water. The thermal cycling conditions were: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 s and 65 °C for 1 min. Quantitative values were obtained from the cycle threshold (C<sub>t</sub>) number. Samples from three independent experiments were analysed in duplicate. The melting curves of each PCR were checked. The presence of contaminating DNA was checked by amplifying an intron of the human albumin gene. Each sample was normalized on the basis of its content compared with two reference mRNAs that were not co-regulated (Bieche *et al.*, 2005). The first gene, P0, also known as 36B4 (GenBank accession no. NM\_001002), encodes acid ribosomal phosphoproteins. The second, the TBP gene (GenBank accession no. NM\_003194), encodes a component of the DNA-binding protein complex TFIID. The results, expressed as the *N*-fold difference in target gene expression relative to the P0 or TBP gene (termed *N*<sub>target</sub>), were determined by the formula  $N_{\text{target}} = 2^{\Delta C_t \text{ sample}}$ . The  $\Delta C_t$  sample was determined by subtracting the mean C<sub>t</sub> value of the target gene from the mean C<sub>t</sub> value of the TBP or the P0 gene. The *N*<sub>target</sub> values of the samples were subsequently normalized so that the median *N*<sub>target</sub> value of the non-fungus control samples was 1.

**Table 1.** Primers sequences used in the study

Gene target	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')
IL-8 (IL-8 gene)	CACCGGAAGGAACCATCTCACTGT	TCCTTGGCAAACTGCACCTTCA
TNF- $\alpha$ (TNF gene)	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTT	CCTCAGCTTGAGGGTTGCTACA
c-Fos ( <i>FOS</i> )	ACCACTCACCCGAGACTCCT	CCAGGTCCGTGCAGAAGTCCT
GM-CSF ( <i>CSF2</i> )	GAGACACTGCTGCTGAGATGAATG	CAGGTCGGCTCCTGGAGGT
P0	GGCGACCTGGAAGTCCAACT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
Albumin (intron)	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC

**Statistical analysis.** Data are presented as means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical analysis was performed using XLSTAT 2007. Differences were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . A one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to detect significant variations in mRNA levels for each target gene during exposure. A *t*-test was used to detect significant differential mRNA levels with or without dexamethasone.

## RESULTS AND DISCUSSION

Using quantitative PCR, we observed a significant increase in mRNA levels in A549 epithelial cells for all three selected inflammatory mediators (IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF) when they were exposed to live *A. fumigatus* conidia. This increase was observed at 8 h and continued up to 24 h. This overexpression of mRNA was not observed when the cells were exposed to inactivated *A. fumigatus* conidia, or to live or inactivated *P. chrysogenum* conidia. The presence of  $10^{-7}$  M dexamethasone prevented the increase in mRNA levels of IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF.

### Standardization of techniques

After centrifugation of cell cultures with conidial suspensions, approximately 10% did not adhere to the A549 cells and were removed. There was no statistical difference between the ingestion rates of conidia for *A. fumigatus* ( $35.3 \pm 3.3\%$ ) and *P. chrysogenum* ( $37.7 \pm 2.0\%$ ) at 4 h post-exposure.

After RNA extraction, we first checked for contaminating genomic DNA by amplifying an intron of the human albumin gene. The  $C_t$  values were always  $>37$  and were similar for all of the cDNAs, confirming the absence of DNA contamination. To normalize mRNA expression from different wells, a relative quantification of the target genes and of the endogenous reference P0 and TBP genes using  $\Delta\Delta C_t$  was performed. Because similar results were obtained for both reference genes, only the results standardized with the P0 gene are reported here.

### mRNA quantification

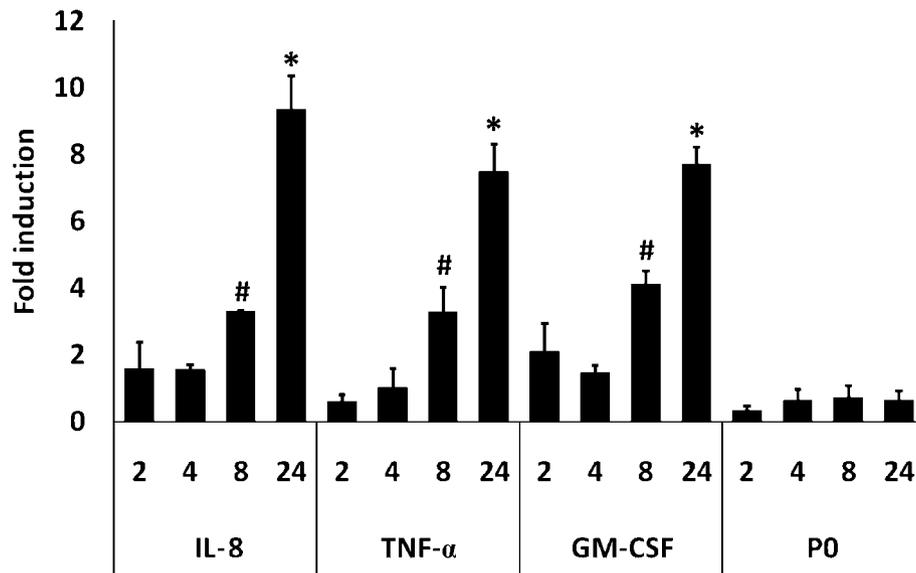
We focused our study on three mediators whose role has been well established in the inflammatory response. The absence of this response is one of the well-known risk factors for IPA, i.e. prolonged neutropenia and steroid therapy. IL-8 is a chemokine involved in both the recruitment of

neutrophils and the neutrophil phagocytosis of *A. fumigatus* conidia (Richardson & Patel, 1995), TNF- $\alpha$  is a cytokine that plays a role in chemokine production and neutrophil activity (Mehrad *et al.*, 1999; Phadke & Mehrad, 2005) and GM-CSF is a growth factor known to be crucial in the maturation process of granulocytes and macrophages (Walsh *et al.*, 2005). These three mediators are released in response to activation of the NF- $\kappa$ B transcriptional complex.

Exposure to live *A. fumigatus* conidia induced a progressive increase in IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF mRNA levels (Fig. 1). A significant overexpression of the mRNA of all three was observed as early as 8 h post-exposure ( $P \leq 0.005$ ,  $P \leq 0.002$  and  $P \leq 0.003$ , respectively). This increase was not observed when the cells were exposed to inactivated *A. fumigatus* conidia. No significant variation for any of the three inflammatory mediators was observed when the epithelial cells were exposed to live or inactivated *P. chrysogenum* conidia. Germinating *A. fumigatus* conidia were observed in A549 cells as early as 8 h post-exposure. In contrast, with live *P. chrysogenum* conidia and with the inactivated conidia of both species, no germination was observed during the entire 24 h of the experiment.

We hypothesized that ingestion of conidia by A549 cells could be the triggering factor for the inflammatory response. Overexpression of chemokines and of chemokine receptor genes (IL-8 gene, *CCL4*, *CXCL20* and *CXCL2*) has been described as early as 2 h in human monocyte models using cDNA microarray analysis (Cortez *et al.*, 2006). In our study, we were unable to detect any significant increase before 8 h. If conidia ingestion were the triggering event, an inflammatory response would have occurred for both fungal species because the rate of internalized conidia was similar for both species: around 30–40%, as reported previously (Wasylnka & Moore, 2002).

However, in our study, a sharp increase appeared at the same time as the hyphal growth of *A. fumigatus*, which started after 6–8 h of culture in liquid medium (Manavathu *et al.*, 1999). In addition, exposure to inactivated *A. fumigatus* conidia did not induce any significant modifications of the mRNA levels of the factors studied. Similar results for cytokine production using ELISA were obtained using non-viable fragments of mycelium and inactivated *A. fumigatus* conidia (Zhang *et al.*, 2005). Recently, infection with hyphae, but not with



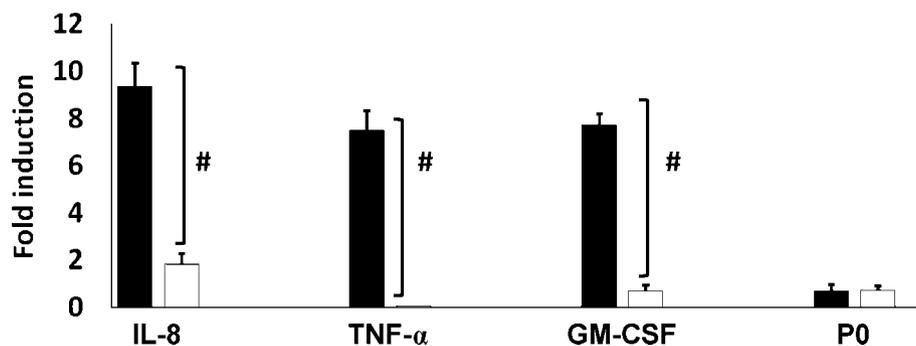
**Fig. 1.** Standardized mRNA expression of the genes encoding IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and P0 after exposure of A549 cells to live *A. fumigatus* conidia calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method, with P0 as the reference gene. Values were calculated from three independent experiments and gene expression was subsequently normalized against the median values of the uninfected controls. The data are presented as means  $\pm$  SEM: significant overexpression at 8 h (#) for IL-8 ( $P \leq 0.005$ ), TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0.002$ ) and GM-CSF ( $P < 0.003$ ), and at 24 h (\*) for the three factors ( $P \leq 0.0001$ ), and unchanged expression of the control gene (P0), were analysed by ANOVA.

conidia, was shown to stimulate endothelial cells to synthesize IL-8 and TNF- $\alpha$  *in vitro* using ELISA (Chiang *et al.*, 2008). We cannot rule out the fact that heating or chemical inactivation may have destroyed epitope structures and heat-labile molecules such as proteases, which are potentially involved in inflammatory signalling. However, our results are in agreement with a recent report on the role of germinating conidia in the innate immune system *in vitro* and in animal models (Hohl *et al.*, 2005). Conidial

swelling is accompanied by an enrichment of  $\beta$ -glucans on the membrane surface, which triggers inflammatory responses via Dectin-1 recognition (Hohl *et al.*, 2005).

#### mRNA quantification in the presence of dexamethasone

Exposure of A549 cells to live conidia of *A. fumigatus* in the presence of  $10^{-6}$  M (not shown) and  $10^{-7}$  M dexametha-



**Fig. 2.** Standardized mRNA expression of the genes encoding IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and P0 after exposure of A549 cells to live *A. fumigatus* conidia with (white columns) and without (black columns)  $10^{-7}$  M dexamethasone using the  $\Delta\Delta C_t$  method, with P0 as the reference gene. Values were calculated from three independent experiments and gene expression was subsequently normalized against the median values of the uninfected and non-steroid controls. The data are presented as means  $\pm$  SEM: absence of mRNA overexpression at 24 h ( $P \leq 0.0001$  for each) by *t*-test compared with wells exposed to live conidia of *A. fumigatus* without dexamethasone. The control gene (P0) remained unchanged.

sone resulted in the absence of overexpression at 8 h for IL-8 ( $P \leq 0.005$ ), TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0.002$ ) and GM-CSF ( $P < 0.003$ ) and at 24 h ( $P \leq 0.01$  for each) (Fig. 2). In addition, dexamethasone at concentrations of  $10^{-3}$ – $10^{-7}$  M did not modify the growth of *A. fumigatus* conidia (data not shown).

Given the significant role that germinating conidia play in IPA, the disappearance of overexpression when the conidia-exposed cells were treated with  $10^{-7}$  M dexamethasone supports the role of steroids as a risk factor for IPA, not only at the macrophage level, but also at the respiratory epithelium level (Nissen & Yamamoto, 2000). Although the role that steroids play in the NF- $\kappa$ B pathway of the cells is a probable explanation, we cannot completely rule out the fact that steroids could inhibit the synthesis of a specific fungal compound that could be responsible for the immune stimulation of A549 cells.

These initial results show that germinating *A. fumigatus* conidia induce overexpression of inflammatory mediators by epithelial cells in the first 24 h after exposure. Further studies are needed to define in more detail the chemokines, adhesion molecules and other possible pathways involved. However, these results suggest that the respiratory epithelium plays a role in initiating innate immunity to prevent the occurrence of IPA. Our results also confirm that steroids significantly modify the normal inflammatory response of airway cells exposed to *A. fumigatus*, and this could explain at least in part why steroids are a risk factor for IPA.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from L'Agence Nationale de la Recherche (no. 0014705), ADEME (no. 0575C0030) and AFSSET (no. ES-2005-012).

## REFERENCES

- Asselah, T., Bieche, I., Laurendeau, I., Paradis, V., Vidaud, D., Degott, C., Martinot, M., Bedossa, P., Valla, D. & other authors (2005). Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **129**, 2064–2075.
- Bieche, I., Asselah, T., Laurendeau, I., Vidaud, D., Degot, C., Paradis, V., Bedossa, P., Valla, D. C., Marcellin, P. & Vidaud, M. (2005). Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* **332**, 130–144.
- Borger, P., Koeter, G. H., Timmerman, J. A., Vellenga, E., Tomee, J. F. & Kauffman, H. F. (1999). Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms. *J Infect Dis* **180**, 1267–1274.
- Botterel, F., Gross, K., Ibrahim-Granet, O., Khoufache, K., Escabasse, V., Coste, A., Cordonnier, C., Escudier, E. & Bretagne, S. (2008). Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by primary nasal epithelial cells in vitro. *BMC Microbiol* **8**, 97.
- Chiang, L. Y., Sheppard, D. C., Gravelat, F. N., Patterson, T. F. & Filler, S. G. (2008). *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun* **76**, 3429–3438.
- Cortez, K. J., Lyman, C. A., Kottlil, S., Kim, H. S., Roilides, E., Yang, J., Fullmer, B., Lempicki, R. & Walsh, T. J. (2006). Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **74**, 2353–2365.
- de Hoog, G. S., Guarra, J., Gené, J. & Figueras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Reus, Spain: Universitat Rovira i Virgili.
- Hohl, T. M., van Epps, H. L., Rivera, A., Morgan, L. A., Chen, P. L., Feldmesser, M. & Pamer, E. G. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific  $\beta$ -glucan display. *PLoS Pathog* **1**, e30.
- Huttunen, K., Hyvarinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H. & Hirvonen, M. R. (2003). Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ Health Perspect* **111**, 85–92.
- Kauffman, H. F., Tomee, J. F., van de Riet, M. A., Timmerman, A. J. & Borger, P. (2000). Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 1185–1193.
- Lin, S. J., Schranz, J. & Teutsch, S. M. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**, 358–366.
- Manavathu, E. K., Cutright, J. & Chandrasekar, P. H. (1999). Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J Clin Microbiol* **37**, 858–861.
- Mehrad, B., Strieter, R. M. & Standiford, T. J. (1999). Role of TNF- $\alpha$  in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* **162**, 1633–1640.
- Meier, A., Kirschning, C. J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J. & Ebel, F. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* **5**, 561–570.
- Nissen, R. M. & Yamamoto, K. R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NF $\kappa$ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **14**, 2314–2329.
- Phadke, A. P. & Mehrad, B. (2005). Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol* **43** (Suppl. 1), S173–S176.
- Pylkkänen, L., Gullsten, H., Majuri, M. L., Andersson, U., Vanhala, E., Maatta, J., Meklin, T., Hirvonen, M. R., Alenius, H. & Savolainen, K. (2004). Exposure to *Aspergillus fumigatus* spores induces chemokine expression in mouse macrophages. *Toxicology* **200**, 255–263.
- Richardson, M. D. & Patel, M. (1995). Stimulation of neutrophil phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by interleukin-8 and *N*-formylmethionyl-leucylphenylalanine. *J Med Vet Mycol* **33**, 99–104.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**, 1–23.
- Ruchel, R. & Margraf, S. (1993). Rapid microscopical diagnosis of deep-seated mycoses following maceration of fresh specimens and staining with optical brighteners. *Mycoses* **36**, 239–242.
- Stephens-Romero, S. D., Mednick, A. J. & Feldmesser, M. (2005). The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun* **73**, 114–125.
- Stordeur, P., Poulin, L. F., Craciun, L., Zhou, L., Schandene, L., de Lavareille, A., Goriely, S. & Goldman, M. (2002). Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods* **259**, 55–64.

**Tai, H. Y., Tam, M. F., Chou, H., Peng, H. J., Su, S. N., Perng, D. W. & Shen, H. D. (2006).** Pen h 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* **61**, 382–388.

**Walsh, T. J., Roilides, E., Cortez, K., Kottlil, S., Bailey, J. & Lyman, C. A. (2005).** Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **43** (Suppl. 1), S165–S172.

**Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. (2002).** Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun* **70**, 3156–3163.

**Zhang, Z., Liu, R., Noordhoek, J. A. & Kauffman, H. F. (2005).** Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect* **51**, 375–382.

## New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease

ANNE-PAULINE BELLANGER\*, GABRIEL REBOUX\*, FRANÇOISE BOTTEREL†, CHARLINE CANDIDO\*, SANDRINE ROUSSEL\*, BENEDICTE ROGNON\*, JEAN-CHARLES DALPHIN‡, STEPHANE BRETAGNE† & LAURENCE MILLON\*

\*CNRS-University of Franche Comté/UMR 6249 Chrono-environnement, Parasitology-Mycology Department, University Hospital Jean Minjoz, Besançon, †UMR BIPAR 956, Parasitology-Mycology Department, University Hospital Henri Mondor and University of Paris Est, Créteil, and ‡Pneumology Department, University Hospital Jean Minjoz, Besançon, France

Farmer's lung disease (FLD) is a form of hypersensitivity pneumonitis resulting from recurrent exposure to moldy plant materials. We investigated and compared the initial response of respiratory epithelium after exposure to extracts of *Sacharopolyspora rectivirgula*, *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*), *Eurotium amstelodami* and *Wallemia sebi*. The two criteria for selection of these species were their high prevalence in the hay handled by FLD patients and the presence of high levels of specific precipitins to these molds in FLD patients' sera. Hydrosoluble extracts were prepared from spores and hyphae grown in culture under optimal conditions for each of the four species. Confluent A549 cells were inoculated with one of the four calibrated soluble extracts. Two mediators, one inflammatory (*Interleukin (IL)-8*) and one allergic (*IL-13*), were quantified using real-time PCR and ELISA assay, after four exposure periods (30 min, 2 h, 4 h and 8 h). *S. rectivirgula* and *L. corymbifera* extracts were the only ones which induced a marked upregulation of *IL-8*, as shown by both real-time PCR and ELISA assay 8 h after the initial contact. This study adds to the growing body of evidence that *L. corymbifera* should be recognized as an etiologic agent of FLD along with *S. rectivirgula*.

**Keywords** farmer's lung disease, *Lichtheimia corymbifera*, airway cells, IL-8

### Introduction

Farmer's lung disease (FLD) is a form of hypersensitivity pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis) resulting from recurrent exposure to moldy plant materials during the handling of hay, straw or grains [1]. In the acute form, influenza-like symptoms often predominate, presenting 2–9 h after exposure [2]. The immunologic and allergic mechanisms of FLD are complex and little is known about them. As mentioned by the NHLBI/ORD (National Heart, Lung, and Blood Institute and the Office of Rare Diseases) Confer-

ence [3], *in vitro* cellular models are of particular help in providing a better understanding of these systems.

It is well-known and generally accepted that *Sacharopolyspora rectivirgula*, a thermophilic actinomycete (synonyms: *Faenia rectivirgula*, *Micropolyspora faeni* and *Thermomonospora monospora*), is a causative agent of FLD [1,4]. Previous experimental studies analyzing the bronchoalveolar lavage (BAL) of mice exposed to *S. rectivirgula* have demonstrated that the initial response is marked by the presence of neutrophils which were detected in BAL in less than 24 h after exposure. In contrast, lymphocytes were detected approximately 72 h after exposure [5]. It has been suggested that molds, such as *Lichtheimia corymbifera* (= *Absidia corymbifera*) [6], *Eurotium amstelodami* and *Wallemia sebi*, are also causative agents of FLD because of their prevalence in the hay handled by FLD patients, and the presence of high levels of specific

Received 20 November 2009; Received in final revised form 5 February 2010; Accepted 18 February 2010

Correspondence: Laurence Millon, Department of Parasitology-Mycology, University Hospital, Besançon, France. Tel: +33 (0)3 81 66 80 68; Fax: +33 (0)3 81 66 89 14; E-mail: laurence.millon@univ-fcomte.fr

precipitins to these molds in FLD patients' sera [7,8]. However, no *in vitro* or *in vivo* experiments have yet provided proof of their involvement in FLD. All the *in vitro* studies investigating the immunologic mechanism of FLD have measured mediators, primarily alveolar macrophages after stimulation with *S. rectivirgula* [2]. Only one team studied the interaction of *S. rectivirgula* with respiratory epithelium, using A549 cell lines [9]. Respiratory epithelium is, however, the first tissue encountered by inhaled antigens, and this first interaction is most probably of singular importance in the development of FLD. To our knowledge, there are no reports on the initial response of A549 cells to potential etiologic agents of FLD other than *S. rectivirgula*.

The aim of our study was to investigate the early inflammatory signals in airway epithelial cells after exposure to soluble extracts of *S. rectivirgula*, *L. corymbifera*, *E. amstelodami* and *W. sebi*. We used real-time quantitative PCR (RT-qPCR) to quantify the expression of two mediator genes, i.e., *Interleukin 8 (IL-8)*, an inflammatory chemokine whose main role is to attract neutrophils [10], and *IL-13*, selected because it is a key effector in the allergic inflammation of airways [11].

## Materials and methods

### Bacterial and fungal strains

We used Lacey's strain of *S. rectivirgula* (DSMZ 43113) and three fungal strains isolated from the hay of FLD-patients in Franche-Comté, a region in Eastern France, i.e., *L. corymbifera* (BCCM/IHEM 3809), *E. amstelodami* (BCCM/IHEM 16286) and *W. sebi* (BCCM/IHEM 16284). All were cultured for 1 week under the following conditions, (1) at 44°C on R8 medium for *S. rectivirgula* [12], (2) at 20°C on Sabouraud dextrose agar (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) for *W. Sebi* and (3) at 30°C on DG18 (Oxoid, Unipath, Basingstoke, England) for *L. corymbifera* and *E. amstelodami* (on DG18, *E. amstelodami* produces only ascospores) [13]. Temperatures and media were chosen on the basis of the optimal growth conditions of each species.

For each species, four culture plates were gently brushed with a swab and the resulting structures were harvested in 2 ml of sterile water, resulting in milk-like suspensions (>7 Mc Farland). Each suspension was frozen at -20°C for one night. The following day, lyophilization was carried out in a Labconco Apparatus (Labconco, Kansas City, MO, USA) and the lyophilizate was resuspended in 1 ml of sterile water. After centrifugation for 2 min at 10,000 rpm, the supernatants (the hydrosoluble extracts) were harvested, and proteins were quantified by the Lowry technique using the DC protein Assay (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). For each of the four species, the extract

was calibrated using the protein contents in the extract (50 µg of proteins per ml of extract).

### Cell lines

The alveolar epithelial cell line A549 was purchased from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, Nuaillé, France) and 25 µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). The medium was changed every 2 days and cells were confluent in 5 days. Cell cultures were checked for the presence of *Mycoplasma* spp. every month using the Venor GeM Mycoplasma Detection PCR kit (Biovalley, Marne-La-Vallée, France). Cells were cultivated in 24-well microtitre plates (Dutsher, Brumath Cedex, France). Confluent cells (about 5 × 10<sup>6</sup> cells per well) were inoculated with each of the four calibrated soluble extracts at 1 ml (containing 50 µg) of extract added to each well. Each experiment included a control, in which epithelial cells were exposed to culture media only. Cell exposure was terminated at 30 min, 2, 4 and 8 h. These experiments were performed at least three times with careful replication of all conditions cited above.

### mRNA quantification

RNA was extracted using the RNA MagNa Pure Compact Isolation kit in the MagNa Compact (Roche Diagnostics, Meylan, France). Quantity and quality of RNA were checked using a spectrophotometer (Nanodrop ND 1000) before samples were stored at -80°C.

Reverse transcription was carried out in a final volume of 20 µl as follows; 4 µl (400 µg) RNA were added to 2 µl Dithiothreitol (DTT) 0.1M (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 0.5 µl Superscript II Rnase H- Reverse Transcriptase H- 200U/µl (Invitrogen), 4 µl First Strand Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen), 2µl dNTP mix 5mM (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), 6 µl random hexamers pd(N)6 0.5 µg/µl (Amersham Pharmacia), 0.5 µl RNAsin® 40U/µl (Promega, Madison, WI, USA). Sterile water was used to dilute the cDNA (1/20), which was then stored at -20°C until amplification. For each reaction, controls without RNA and without reverse transcriptase were employed.

The primers used are listed in Table 1. Real-time PCR was carried out in a LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Meylan, France) in a 20 µl final volume containing; 2µl Fast Start SYBR Green Buffer 10X (Fast Start SYBR Green Kit™, Roche Diagnostics), 3 mM of MgCl<sub>2</sub>, 50 µM sense and antisense primers, 8 µl cDNA (diluted 1/20) and sterile water. The thermal cycling conditions were denaturation at

**Table 1** Primer sequences used in the study.

	Sense primers	Antisense primers
<i>RPLP0</i> *	GGC GAC CTG GAA GTC CAA CT	CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC
<i>IL-8</i>	CAC CGG AAG GAA CCA TCT CAC TGT	TCC TTG GCA AAA CTG CAC CTT CA
<i>IL-13</i>	ATC ACC CAG AAC CAG AAG GCT C	GAT TCC AGG GCT GCA CAG TAC A

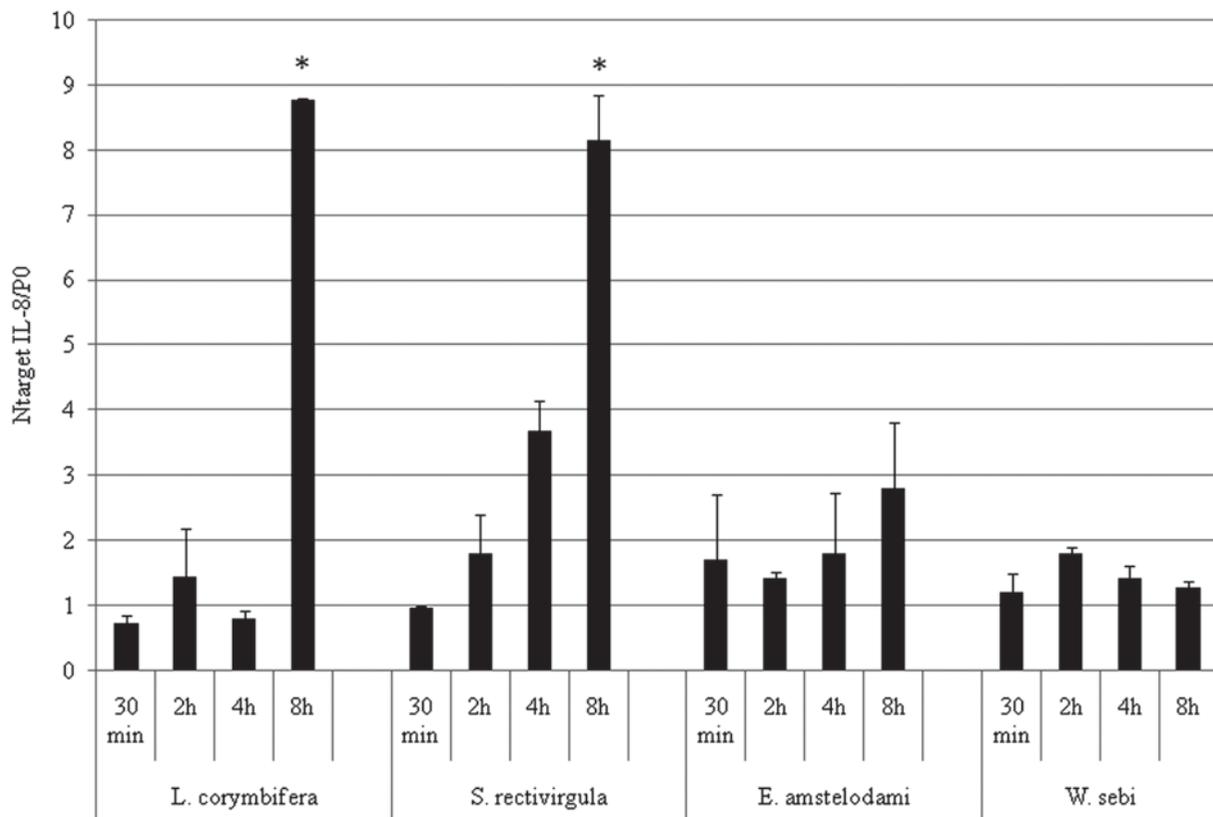
\*RPLP0 encodes the human acidic ribosomal phosphoprotein P0.

95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and 65°C for 1 min. Quantitative values were obtained from the cycle threshold ( $C_t$ ) number. Samples from three separate experiments were analyzed in duplicate. The melting curves of each PCR product were checked. Each sample was normalized on the basis of its content compared with a referent gene, P0. P0 is recognized as a housekeeping gene, also known as 36B4 (GenBank accession number NM\_001002), which encodes human acidic ribosomal phosphoprotein P0 [10,14,15]. The results, expressed as

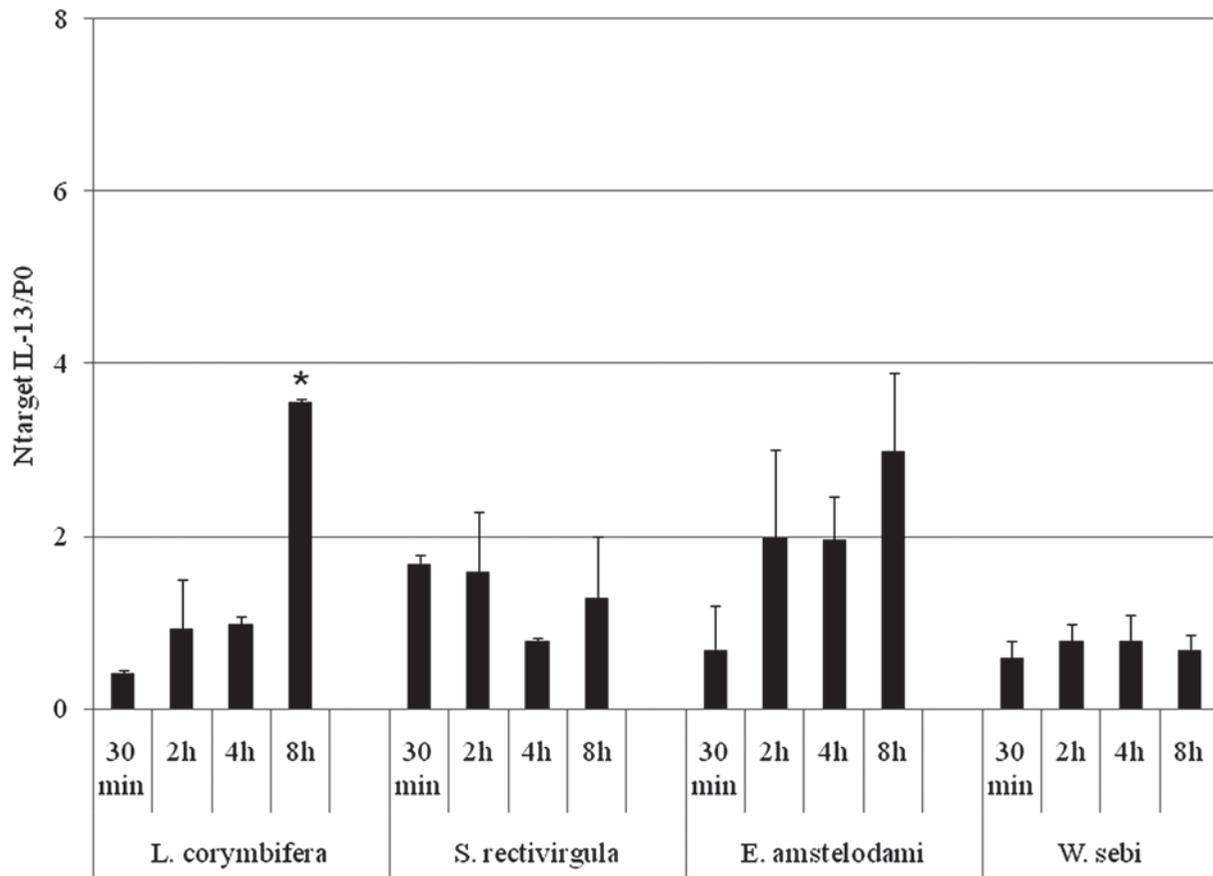
the N-fold difference in target gene expression relative to the P0 gene (termed  $N_{\text{target}}$ ), were obtained by the formula:  $N_{\text{target}} = 2^{\Delta C_t \text{ sample}}$ . The  $\Delta C_t$  sample was determined by subtracting the mean  $C_t$  value of the target gene from the mean  $C_t$  value of the P0 gene. The  $N_{\text{target}}$  values of the samples were subsequently normalized, so that the median  $N_{\text{target}}$  value of the control sample (epithelial cells exposed to culture media only) was 1 [14,15]. To present the results in graph form, the  $N_{\text{target}} = 2^{\Delta C_t \text{ sample}}$  was calculated for each experiment (3 replicates of each type of exposure). Each column represents a mean of the 3 replicates of  $N_{\text{target}}$  plus SEM with the control bar is  $y = 1$ .

#### *IL-8* dosage in cell supernatants

In order to determine if synthesized *IL-8* was released into cell supernatants exposed to *S. rectivirgula* and *L. corymbifera*, *IL-8* levels were evaluated by a specific ELISA kit (Thermo Scientific, Rockford, USA), following the manufacturer's instructions. Each sample was measured in duplicate. The detection limit of the assay was 2 pg/ml.



**Fig. 1** Standardized mRNA expression of the gene encoding *IL-8* after exposure of A549 cells to *Sacharopolyspora rectivirgula*, *Lichtheimia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* and *Wallemia sebi* soluble extracts (50  $\mu\text{g/ml}$ ) calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method, with *P0* as the reference gene. Values were calculated from three separate experiments and gene expression was subsequently normalized against the median values of the controls. The data are presented as means of the  $N_{\text{target}} \pm \text{SEM}$ ; a significant overexpression of mRNA of the gene encoding *IL-8* was observed during time: at 4 h (#) for *S. rectivirgula* ( $P = 0.005$ ) and at 8 h (\*) for *S. rectivirgula* and *L. corymbifera* ( $P = 0.0005$  for both species). The control bar is  $y = 1$ .



**Fig. 2** Standardized mRNA expression of the gene encoding *IL-13* after exposure of A549 cells to *Sacharopolyspora rectivirgula*, *Lichtheimia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* and *Wallemia sebi* soluble extracts (50 µg/ml) calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method, with *P0* as the reference gene. Values were calculated from three separate experiments and gene expression was subsequently normalized against the median values of the controls. The data are presented as means of the  $N_{\text{target}} \pm \text{SEM}$ ; a significant overexpression of mRNA of the gene encoding *IL-13* was observed during time: at 8 h (\*) after exposure to *L. corymbifera* ( $P = 0.0005$ ). The control bar is the  $y = 1$ .

### Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SEM from three separate experiments. Statistical analysis was performed using XLSTAT 2009. Differences were considered statistically significant for  $P < 0.05$ . Non-parametric tests (a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney test) were used to detect significant variations in the quantification of mRNA and protein levels.

## Results

### Relative mRNA quantifications

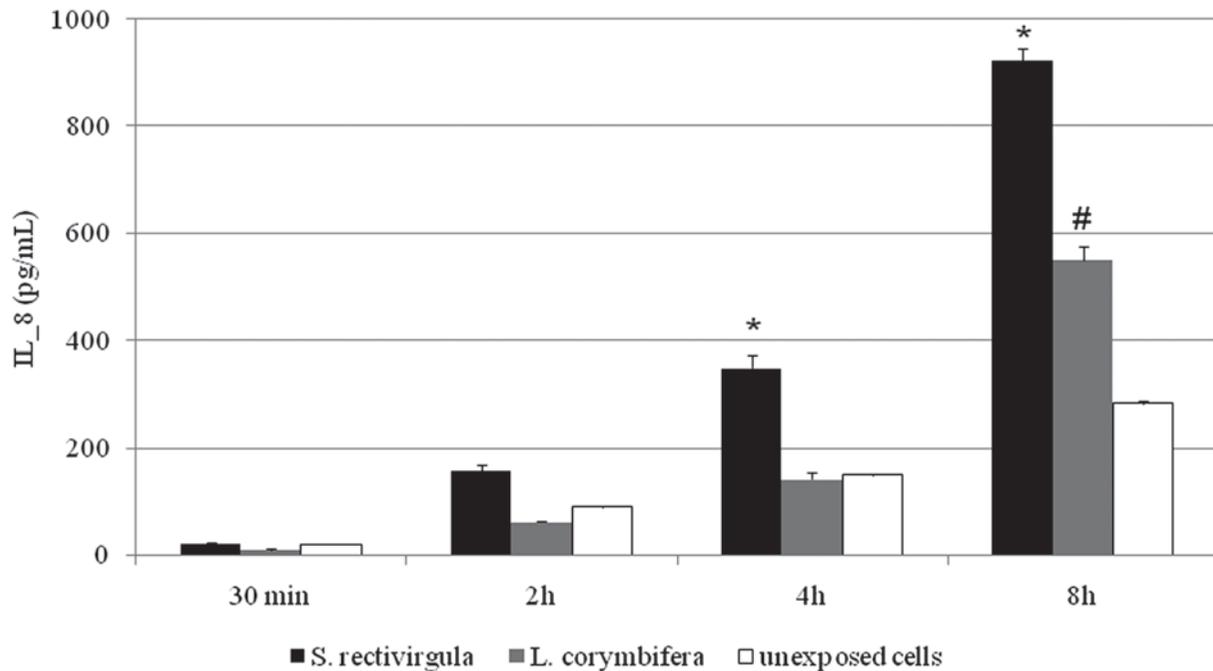
Exposure to *S. rectivirgula* and *L. corymbifera* soluble extracts induced significant upregulation of the *IL-8* gene with the intensity and time lapse before appearance of overexpression varying from one agent to another (Fig. 1). Specifically, exposure to *S. rectivirgula* was progressive

and clear, beginning at 4 h ( $N = 3.7$ ) and continuing to 8 h ( $N = 8.1$ ), (Mann-Whitney test,  $P = 0.005$  at 4 h and  $P = 0.005$  at 8 h). Exposure to *L. corymbifera* was late and abrupt, with  $N = 8.75$  at 8 h (Mann-Whitney test,  $P = 0.005$ ). No significant variations were observed with exposure to *E. amstelodami* and to *W. sebi* during the entire 8 h of the experiment.

Exposure to *L. corymbifera* induced significant upregulation of *IL-13*, (Fig. 2), i.e.,  $N = 3.56$  at 8 h (Mann-Whitney test,  $P = 0.005$ ). No significant variations were observed on exposure to *S. rectivirgula*, *E. amstelodami* or *W. sebi* during the entire 8 h of the experiment.

### Concentrations of synthesized mediators in cell supernatants

*IL-8* levels in cell supernatants confirmed the results obtained using RT-qPCR. Concentrations of *IL-8* in A549



**Fig. 3** Concentrations (pg/ml) of synthesized *IL-8* in A549 supernatants during time (30 min, 2 h, 4 h and 8 h) after exposure to *Sacharopolyspora rectivirgula*, *Lichtheimia corymbifera* and in unexposed cells. The data are presented as means  $\pm$  SEM; compared to *IL-8* levels in supernatants of unexposed cells, higher levels of *IL-8* were observed at 4 h and 8 h (\*) after exposure to *S. rectivirgula* ( $P = 0.0004$ ) and at 8 h (#) after exposure to *L. corymbifera* ( $P = 0.0004$ ).

supernatants began to rise 4 h after the initial contact with *S. rectivirgula* (350 pg/ml, Fig. 3). Eight hours after exposure, *IL-8* levels were 923 pg/ml and 551 pg/ml in response to *S. rectivirgula* and *L. corymbifera*, respectively (Fig. 3). These levels were significantly higher than those measured in unexposed cell supernatants (Mann-Whitney test,  $P = 0.0004$  at 4 h and 8 h for *S. rectivirgula* and at 8 h for *L. corymbifera*). In contrast, synthesized *IL-13* was not detected in any A549 cell supernatants.

## Discussion

Using RT-qPCR, we observed a significant increase in *IL-8* mRNA amounts in A549 epithelial cells at 8 h, when exposed to *S. rectivirgula* or *L. corymbifera*. This was not observed for the other two suspected etiologic FLD agents tested in this study.

Identification of putative etiologic FLD agents is generally performed using serologic and culture techniques. Previous studies have suggested that *L. corymbifera*, *E. amstelodami*, and, to a lesser degree, *W. sebi*, are important etiologic agents of FLD [7,16,17]. The causative role of *L. corymbifera* in FLD, based on serologic data, has been suggested in two studies, one carried out in Finland [18], the other in Eastern France [7]. However, for years,

*S. rectivirgula* has been the only pathogen used *in vivo* and *in vitro* to study the pathogenesis of FLD, probably because of its high prevalence in patients' hay in the 1960s and because it is easier to standardize bacterial inocula than those of fungi.

The overexpression of *IL-8* after exposure to *S. rectivirgula*, first described for A549 cells by Gudmundsson *et al.* [9], was confirmed in our study. *L. corymbifera* was the only one to generate *IL-8* upregulation levels similar to those of *S. rectivirgula*. This result strongly suggests that *L. corymbifera* plays an important role in the pathogenesis of FLD. However, there is not yet enough evidence to categorize *L. corymbifera* as a recognized cause of FLD [19]. In fact, the categorization as 'recognized cause of FLD' would only be justified if *L. corymbifera* induced hypersensitivity pneumonitis after chronic inhalation in a mouse model (as defined by Denis *et al.*) [20]. However, the importance of *L. corymbifera* in FLD was previously suggested by three other studies in which (i) high levels of specific precipitins of *L. corymbifera* were found in FLD patients' sera [7,18], and (ii) FLD relapses due to high amounts of *L. corymbifera* in FLD patient-handled hay were reported [8]. Thus the present *in vitro* experiment not only adds to already-existing support for the role of *L. corymbifera* in FLD, but also

demonstrates that it triggers an inflammatory reaction at the epithelial level.

Concomitantly, we do not think that the present study presents sufficient evidence to categorically exclude the etiologic role of *W. sebi* or *E. amstelodami* in FLD. Even though two studies using culture and serologic techniques support the involvement of *E. amstelodami* and *W. sebi* in FLD [7,16], these two species had only minor effects on the respiratory epithelium in our study. One hypothesis for this is that cross-reactions may have occurred between species when serological tests using fungal antigens were performed [21]. However, the nature of inocula (in our study these were hydrosoluble extracts which were calibrated using their protein contents) could influence the cellular response observed in *in vitro* models. Nor can we exclude the fact that other immunologic components (for example, polyside chains), not quantified by our calibration, may have interfered. The use of purified extracts (either proteins or polysides) and specific recombinant proteins could help to better define the interaction between mold and epithelial cells.

Exposure to *L. corymbifera* also induced a significant increase in the concentration of *IL-13* mRNA. However, the specific ELISA assay did not detect the protein *IL-13* in cell supernatants. This discrepancy could be due to a lack of sensitivity on the part of the ELISA kit or incomplete spatial conformation of the *IL-13* protein produced by A549 cells, resulting in absence of recognition by specific *IL-13* antibodies.

Environmental surveys and serologic data are essential to identify the putative etiologic agents of FLD and other types of hypersensitivity pneumonitis. Testing their ability to initiate an immune-allergic response *in vitro*, however, could help to identify the microbial species which are really involved in the development of the disease. The more we know about the intensity and the time lapse before the cytokine response induced by each of the suspected etiologic agents, the more precisely the real responsible microorganisms can be targeted by hay treatment techniques, such as hay-drying systems [22] or salting [23], addition of commercial chemicals [24], and inoculation of bacteria [25]. Prevention measures are indeed of prime importance, because there are no effective treatments for FLD. In our opinion, *L. corymbifera* should be recognized as an etiologic agent of FLD along with *S. rectivirgula*.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (No. 001470). We thank Isabelle Vieille for her excellent technical help, and Lois Rose for her editorial assistance.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- 1 Pepys J, Jenkins P, Festenstein G, et al. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of farmer's lung hay' antigen. *Lancet* 1963; **2**: 607–611.
- 2 Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 2009; **64**: 322–334.
- 3 Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**: 792–798.
- 4 Kotimaa M, Husman K, Terho E, Mustonen M. Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland. *Scand J Work Environ Health* 1984; **10**: 115–119.
- 5 Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, et al. Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure. *Eur Respir J* 1993; **6**: 1276–1281.
- 6 Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Gantier JC, et al. Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa*. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3862–3870.
- 7 Reboux G, Piarroux R, Mauny F, et al. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 1534–1539.
- 8 Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, et al. Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study. *Mycopathologia* 2005; **160**: 273–279.
- 9 Gudmundsson G, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells release interleukin-8 in response to a thermophilic bacteria that causes hypersensitivity pneumonitis. *Exp Lung Res* 1999; **25**: 217–228.
- 10 Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; **129**: 2064–2075.
- 11 Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, et al. IL-13/Ralpha2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2941–2951.
- 12 Amner W, Edwards C, McCarthy A. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *App Environ Microbiol* 1989; **55**: 2669–2674.
- 13 Roussel S, Reboux G, Rognon B, et al. Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in serological diagnosis of farmer's lung disease. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17**: 160–167.
- 14 Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 2005; **332**: 130–144.
- 15 Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, Rivollet D, et al. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 174–179.
- 16 Lappalainen S, Pasanen AL, Reiman M, Kalliokoski P. Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; **81**: 585–592.
- 17 Kotimaa MH, Oksanen L, Koskela P. Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand J Work Environ Health* 1991; **17**: 117–122.
- 18 Erkinjuntti-Pekkanen R, Reiman M, Kokkarinen JI, Tukiainen HO, Terho EO. IgG antibodies, chronic bronchitis, and pulmonary function

- values in farmer's lung patients and matched controls. *Allergy* 1999; **54**: 1181–1187.
- 19 Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN, *et al.* Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; **84**: 839–844.
- 20 Denis M, Cormier Y, Fournier M, Tardif J, Laviolette M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **5**: 477–483.
- 21 Kaukonen K, Savolainen J, Viander M, Terho EO. Characterization of *Aspergillus umbrosus* carbohydrate antigens by biotinylated lectins and IgG response to mannan/mannoprotein antigens in patients with farmer's lung. *Clin Exp Allergy* 1993; **23**: 21–27.
- 22 Dalphin JC, Pernet D, Reboux G, *et al.* Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France. *Thorax* 1991; **46**: 619–623.
- 23 Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Laplante JJ, Piarroux R. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann Agric Environ Med* 2005; **12**: 217–221.
- 24 Reboux G, Dalphin JC, Polio JC, *et al.* Influence of buffered propionic acid on the development of micro-organisms in hay. *Mycoses* 2002; **45**: 184–187.
- 25 Duchaine C, Meriaux A, Brochu G, Cormier Y. Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J* 1999; **60**: 89–95.

This paper was first published online on Early Online on 26 March 2010.



# Références bibliographiques



- Adler, K. B., P. W. Cheng, and K. C. Kim. 1990.** Characterization of guinea pig tracheal epithelial cells maintained in biphasic organotypic culture: cellular composition and biochemical analysis of released glycoconjugates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 145-54.
- Agostini, C., L. Trentin, M. Facco, and G. Semenzato. 2004.** New aspects of hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 10: 378-82.
- Alekseeva, L., D. Huet, F. Femenia, I. Mouyna, M. Abdelouahab, A. Cagna, D. Guerrier, V. Tichanne-Seltzer, A. Baeza-Squiban, R. Chermette, J. P. Latge, and N. Berkova. 2009.** Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol* 9: 33.
- Alonso, J. M. 2008.** [Immunity and pathophysiology of respiratory tract infections]. *Med Mal Infect* 38: 433-7.
- Amitani, R., G. Taylor, E. N. Elezis, C. Llewellyn-Jones, J. Mitchell, F. Kuze, P. J. Cole, and R. Wilson. 1995.** Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 63: 3266-71.
- Amner, W., C. Edwards, and A. McCarthy. 1989.** Improved medium for recovery and enumeration of the Farmer's Lung Organism, *Saccharomonospora viridis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2669-2674.
- Amstad, P., R. R. Reddel, A. Pfeifer, L. Malan-Shibley, G. E. Mark, 3rd, and C. C. Harris. 1988.** Neoplastic transformation of a human bronchial epithelial cell line by a recombinant retrovirus encoding viral Harvey ras. *Mol Carcinog* 1: 151-60.
- Anderson, H. R., A. Ponce de Leon, J. M. Bland, J. S. Bower, J. Emberlin, and D. P. Strachan. 1998.** Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92. *Thorax* 53: 842-8.
- Anderson, K., S. M. Morrison, S. Bourke, and G. Boyd. 1988.** Effect of cigarette smoking on the specific antibody response in pigeon fanciers. *Thorax* 43: 798-800.
- Ando, M., K. Hirayama, K. Soda, R. Okubo, S. Araki, and T. Sasazuki. 1989.** HLA-DQw3 in Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *Am Rev Respir Dis* 140: 948-50.
- Aquino-Galvez, A., A. Camarena, M. Montano, A. Juarez, A. C. Zamora, G. Gonzalez-Avila, M. Checa, G. Sandoval-Lopez, G. Vargas-Alarcon, J. Granados, A. Pardo, J. Zuniga, and M. Selman. 2008.** Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol* 84: 173-7.
- Arber, C., A. Bitmansour, S. Shashidhar, S. Wang, B. Tseng, and J. M. Brown. 2005.** Protection against lethal *Aspergillus fumigatus* infection in mice by allogeneic myeloid progenitors is not major histocompatibility complex restricted. *J Infect Dis* 192: 1666-71.
- Asselah, T., I. Bieche, I. Laurendeau, V. Paradis, D. Vidaud, C. Degott, M. Martinot, P. Bedossa, D. Valla, M. Vidaud, and P. Marcellin. 2005.** Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129: 2064-75.
- Avrameas, S., and T. Ternynck. 1971.** Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8: 1175-9.
- Baeza-Squiban, A., S. Romet, A. Moreau, and F. Marano. 1991.** Progress in outgrowth culture from rabbit tracheal explants: balance between proliferation and maintenance of differentiated state in epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A: 453-60.
- Baeza-Squiban, A., E. Boisvieux-Ulrich, C. Guilianelli, O. Houcine, G. Geraud, C. Guennou, and F. Marano. 1994.** Extracellular matrix-dependent differentiation of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A: 56-67.
- Balloy, V., and M. Chignard. 2009.** The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 11: 919-27.
- Balloy, V., J. M. Sallenave, Y. Wu, L. Touqui, J. P. Latge, M. Si-Tahar, and M. Chignard. 2008.** *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is

- controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J Biol Chem* 283: 30513-21.
- Balloy, V., M. Si-Tahar, O. Takeuchi, B. Philippe, M. A. Nahori, M. Tanguy, M. Huerre, S. Akira, J. P. Latge, and M. Chignard. 2005.** Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 73: 5420-5.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52.
- Bellanger, A., G. Reboux, F. Botterel, C. Candido, S. Roussel, B. Rognon, J. Dalphin, S. Bretagne, and L. Millon. 2009a.** Upregulation of IL-8 and IL-13 genes in A549 cells in response to *Absidia corymbifera*. *Arch Int All Immunol Submitted*.
- Bellanger, A. P., L. Millon, K. Khoufache, D. Rivollet, I. Bieche, I. Laurendeau, M. Vidaud, F. Botterel, and S. Bretagne. 2009b.** *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* 58: 174-9.
- Berkova, N., S. Lair-Fullerger, F. Femenia, D. Huet, M. C. Wagner, K. Gorna, F. Tournier, O. Ibrahim-Granet, J. Guillot, R. Chermette, P. Boireau, and J. P. Latge. 2006.** *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Int Immunol* 18: 139-50.
- Bieche, I., T. Asselah, I. Laurendeau, D. Vidaud, C. Degot, V. Paradis, P. Bedossa, D. C. Valla, P. Marcellin, and M. Vidaud. 2005.** Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 332: 130-44.
- BitMansour, A., and J. M. Brown. 2002.** Prophylactic administration of liposomal amphotericin B is superior to treatment in a murine model of invasive aspergillosis after hematopoietic cell transplantation. *J Infect Dis* 186: 134-7.
- Blanchet, M. R., E. Israel-Assayag, and Y. Cormier. 2004.** Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 903-9.
- Blease, K., B. Mehrad, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, T. J. Standiford, and C. M. Hogaboam. 2001.** Antifungal and airway remodeling roles for murine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 during pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol* 166: 1832-42.
- Bochud, P. Y., J. W. Chien, K. A. Marr, W. M. Leisenring, A. Upton, M. Janer, S. D. Rodrigues, S. Li, J. A. Hansen, L. P. Zhao, A. Aderem, and M. Boeckh. 2008.** Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 359: 1766-77.
- Bogaert, P., K. G. Tournoy, T. Naessens, and J. Grooten. 2009.** Where asthma and hypersensitivity pneumonitis meet and differ: noneosinophilic severe asthma. *Am J Pathol* 174: 3-13.
- Bohn, J., and J. BeMiller. 1995.** (1-3)-beta-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-4.
- Boland, S., E. Boisvieux-Ulrich, O. Houcine, A. Baeza-Squiban, M. Pouchelet, D. Schoevaert, and F. Marano. 1996.** TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. *J Cell Sci* 109 ( Pt 9): 2207-19.
- Borger, P., G. H. Koeter, J. A. Timmerman, E. Vellenga, J. F. Tomee, and H. F. Kauffman. 1999.** Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms. *J Infect Dis* 180: 1267-74.
- Bosh-Cano, F., P. Ruffaldi, M. Toussaint, P. Badot, H. Richard, and N. Bernard. 2008.** Interaction entre pollution chimique et pollution biologique: exposition de pollens allergisants à des éléments traces métalliques d'origine atmosphérique., JIQA, Lille.
- Botterel, F., C. Cordonnier, V. Barbier, L. Wingerstmann, M. Liance, A. Coste, E. Escudier, and S. Bretagne. 2002.** *Aspergillus fumigatus* causes in vitro electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells. *Histol Histopathol* 17: 1095-101.

- Botterel, F., K. Gross, O. Ibrahim-Granet, K. Khoufache, V. Escabasse, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier, and S. Bretagne. 2008.** Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by primary nasal epithelial cells in vitro. *BMC Microbiol* 8: 97.
- Bouchard, S., F. Morin, G. Bedard, J. Gauthier, J. Paradis, and Y. Cormier. 1995.** Farmer's lung and variables related to the decision to quit farming. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 997-1002.
- Bourgeois, C. A., C. Blanquart, N. Jeanne, A. Moreau, and F. Marano. 1993.** Growth and differentiation of rabbit tracheal outgrowths in primary cultures: influence of substrata. *Biol Cell* 79: 187-91.
- Boutonnat, J., X. Ronot, and D. Grunwald. 2003.** Cytométrie en flux, Techniques en culture de cellules animales. Inserm, Paris.
- Bowman, J. C., G. K. Abruzzo, J. W. Anderson, A. M. Flattery, C. J. Gill, V. B. Pikounis, D. M. Schmatz, P. A. Liberator, and C. M. Douglas. 2001.** Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3474-81.
- Boxberger, H. J., M. J. Sessler, B. Maetzel, and T. F. Meyer. 1993.** Highly polarized primary epithelial cells from human nasopharynx grown as spheroid-like vesicles. *Eur J Cell Biol* 62: 140-51.
- Bozza, S., R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco, and L. Romani. 2002a.** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 168: 1362-71.
- Bozza, S., R. Gaziano, G. B. Lipford, C. Montagnoli, A. Bacci, P. Di Francesco, V. P. Kurup, H. Wagner, and L. Romani. 2002b.** Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect* 4: 1281-90.
- Braedel, S., M. Radsak, H. Einsele, J. P. Latge, A. Michan, J. Loeffler, Z. Haddad, U. Grigoleit, H. Schild, and H. Hebart. 2004.** *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol* 125: 392-9.
- Bretagne, S., and J. M. Costa. 2005.** Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 361-8.
- Bretagne, S., and J. M. Costa. 2006.** Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clin Chim Acta* 363: 221-8.
- Brown, H. M., and K. R. Irving. 1973.** The size and weight of common allergenic pollens. An investigation of their number per microgram and size distribution. *Acta Allergol* 28: 132-7.
- Buczowski, J., P. Krawczyk, S. Chocholska, J. Tabarkiewicz, R. Kieszko, M. Michnar, J. Milanowski, and J. Rolinski. 2003.** Blood myeloid and lymphoid dendritic cells reflect Th1/Th2 balance in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 58: 137-41.
- Burge, H. A., and C. A. Rogers. 2000.** Outdoor allergens. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4: 653-9.
- Butler, N. S., M. M. Monick, T. O. Yarovinsky, L. S. Powers, and G. W. Hunninghake. 2002.** Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J Immunol* 169: 3700-9.
- Caillot, D., L. Mannone, B. Cuisenier, and J. F. Couaillier. 2001.** Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect* 7 Suppl 2: 54-61.
- Camarena, A., A. Juarez, M. Mejia, A. Estrada, G. Carrillo, R. Falfan, J. Zuniga, C. Navarro, J. Granados, and M. Selman. 2001.** Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1528-33.
- Campbell, J. A., M. J. Kryda, M. W. Treuhaft, J. J. Marx, Jr., and R. C. Roberts. 1983.** Cheese worker's hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 127: 495-6.

- Carpenter, K. J., and C. M. Hogaboam. 2005.** Immunosuppressive effects of CCL17 on pulmonary antifungal responses during pulmonary invasive aspergillosis. *Infect Immun* 73: 7198-207.
- Casadevall, A. 1995.** Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun* 63: 4211-8.
- Cenci, E., A. Mencacci, A. Bacci, F. Bistoni, V. P. Kurup, and L. Romani. 2000.** T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* 165: 381-8.
- Cenci, E., A. Mencacci, A. Casagrande, P. Mosci, F. Bistoni, and L. Romani. 2001.** Impaired antifungal effector activity but not inflammatory cell recruitment in interleukin-6-deficient mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 184: 610-7.
- Cenci, E., S. Perito, K. H. Enssle, P. Mosci, J. P. Latge, L. Romani, and F. Bistoni. 1997.** Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 65: 564-70.
- Cenci, E., A. Mencacci, C. Fe d'Ostiani, G. Del Sero, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci, and L. Romani. 1998.** Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 178: 1750-60.
- Cenci, E., A. Mencacci, G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, C. F. d'Ostiani, P. Mosci, M. Bachmann, F. Bistoni, M. Kopf, and L. Romani. 1999.** Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis* 180: 1957-68.
- Cenci, E., A. Mencacci, A. Spreca, C. Montagnoli, A. Bacci, K. Perruccio, A. Velardi, W. Magliani, S. Conti, L. Polonelli, and L. Romani. 2002.** Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect Immun* 70: 2375-82.
- Centeno-Lima, S., H. Silveira, C. Casimiro, P. Aguiar, and V. E. do Rosario. 2002.** Kinetics of cytokine expression in mice with invasive aspergillosis: lethal infection and protection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32: 167-73.
- Chandenier, J., S. Bernard, J. Montharu, E. Bailly, F. Fetissov, M. de Monte, G. Desoubeaux, P. Diot, and D. Richard-Lenoble. 2009.** The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 52: 239-45.
- Chaturvedi, A. K., A. Kavishwar, G. B. Shiva Keshava, and P. K. Shukla. 2005.** Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1063-8.
- Chiang, L. Y., D. E. Ezykowitz, Z. Q. Tian, L. Katz, and S. G. Filler. 2006.** Efficacy of ambruticin analogs in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3464-6.
- Chiang, L. Y., D. C. Sheppard, F. N. Gravelat, T. F. Patterson, and S. G. Filler. 2008.** *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun* 76: 3429-38.
- Chouchakova, N., J. Skokowa, U. Baumann, T. Tschernig, K. M. Philippens, B. Nieswandt, R. E. Schmidt, and J. E. Gessner. 2001.** Fc gamma RIII-mediated production of TNF-alpha induces immune complex alveolitis independently of CXC chemokine generation. *J Immunol* 166: 5193-200.
- Clark, A. B., S. H. Randell, P. Nettesheim, T. E. Gray, B. Bagnell, and L. E. Ostrowski. 1995.** Regulation of ciliated cell differentiation in cultures of rat tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 329-38.
- Clemons, K. V., and D. A. Stevens. 2005.** The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S101-10.
- Clemons, K. V., G. Grunig, R. A. Sobel, L. F. Mirels, D. M. Rennick, and D. A. Stevens. 2000.** Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis. *Clin Exp Immunol* 122: 186-91.
- Coggins, R., M. Lorber, and L. Geiselhart. 2002.** Luminex labscreen mixed as a qualitative antibody-screening assay. *Hum Immunol* 63: (10 suppl):S104.

- Cordeiro, C. R., J. C. Jones, T. Alfaro, and A. J. Ferreira. 2007.** Bronchoalveolar lavage in occupational lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* 28: 504-13.
- Cormier, Y., and M. Desmeules. 1994.** Treatment of hypersensitivity pneumonitis (HP): comparison between contact avoidance and corticosteroids. *Can Respir J* 1: 223-228.
- Cormier, Y., and E. Israel-Assayag. 2004.** Chronic inflammation induced by organic dust and related metabolic cardiovascular disease risk factors. *Scand J Work Environ Health* 30: 438-44.
- Cormier, Y., J. Belanger, and P. Durand. 1985.** Factors influencing the development of serum precipitins to farmer's lung antigen in Quebec dairy farmers. *Thorax* 40: 138-42.
- Cormier, Y., L. Letourneau, and G. Racine. 2004.** Significance of precipitins and asymptomatic lymphocytic alveolitis: a 20-yr follow-up. *Eur Respir J* 23: 523-5.
- Cormier, Y., G. M. Tremblay, M. Fournier, and E. Israel-Assayag. 1994.** Long-term viral enhancement of lung response to *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 490-4.
- Cormier, Y., E. Israel-Assayag, M. Desmeules, and O. Lesur. 1996.** Effect of contact avoidance or treatment with oral prednisolone on bronchoalveolar lavage surfactant protein A levels in subjects with farmer's lung. *Thorax* 51: 1210-5.
- Cormier, Y., J. Belanger, A. Tardif, P. Leblanc, and M. Laviolette. 1986.** Relationships between radiographic change, pulmonary function, and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in farmer's lung disease. *Thorax* 41: 28-33.
- Cormier, Y., J. Belanger, J. Beaudoin, M. Laviolette, R. Beaudoin, and J. Hebert. 1984.** Abnormal bronchoalveolar lavage in asymptomatic dairy farmers. Study of lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 130: 1046-9.
- Cornely, O. A., J. Maertens, D. J. Winston, J. Perfect, A. J. Ullmann, T. J. Walsh, D. Helfgott, J. Holowiecki, D. Stockelberg, Y. T. Goh, M. Petrini, C. Hardalo, R. Suresh, and D. Angulo-Gonzalez. 2007.** Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 356: 348-59.
- Cortez, K. J., C. A. Lyman, S. Kottlilil, H. S. Kim, E. Roilides, J. Yang, B. Fullmer, R. Lempicki, and T. J. Walsh. 2006.** Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 74: 2353-65.
- Cowen, L. E., and S. Lindquist. 2005.** Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309: 2185-9.
- Cozens, A. L., M. J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe, and D. C. Gruenert. 1994.** CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 38-47.
- Cromwell, O., Q. Hamid, C. J. Corrigan, J. Barkans, Q. Meng, P. D. Collins, and A. B. Kay. 1992.** Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 77: 330-7.
- Dabur, R., S. K. Diwedi, V. Yadav, V. Mishra, R. Singh, H. Singh, and G. L. Sharma. 2005.** Efficacy of 2-(3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1h-pyrrole-2-yl)-1-methylethyl pentanoate in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4365-7.
- Dakhama, A., E. Israel-Assayag, and Y. Cormier. 1998.** Role of interleukin-2 in the development and persistence of lymphocytic alveolitis in farmer's lung. *Eur Respir J* 11: 1281-6.
- Dakhama, A., R. G. Hegele, G. Laflamme, E. Israel-Assayag, and Y. Cormier. 1999.** Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1316-22.
- Dalphin. 2003.** *Alvéolite allergique extrinsèque, Traité d'allergologie.* Flammarion, Paris.
- Dalphin, J. C., J. Maitre, and J. C. Paireon. 2009.** [Occupational respiratory diseases: the end of a series... and a story with no end]. *Rev Mal Respir* 26: 821-3.

- Dalphin, J. C., D. Pernet, G. Reboux, J. Martinez, A. Dubiez, T. Barale, and A. Depierre. 1991.** Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France. *Thorax* 46: 619-23.
- Dalphin, J. C., J. C. Polio, D. Pernet, M. F. Maheu, B. Toson, A. Dubiez, E. Monnet, J. J. Laplante, and A. Depierre. 1994.** Influence of barn drying of fodder on respiratory symptoms and function in dairy farmers of the Doubs region of France. *Thorax* 49: 50-3.
- Dalphin, J. C., D. Debieuvre, D. Pernet, M. F. Maheu, J. C. Polio, B. Toson, A. Dubiez, E. Monnet, J. J. Laplante, and A. Depierre. 1993.** Prevalence and risk factors for chronic bronchitis and farmer's lung in French dairy farmers. *Br J Ind Med* 50: 941-4.
- de Hoog GS, Guarra J, Gené J, and F. MJ. 2000.** Atlas of clinical fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Reus, Spain: Universitat Rovira i Virgili, Utrecht.
- de Jager, W., H. te Velthuis, B. J. Prakken, W. Kuis, and G. T. Rijkers. 2003.** Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 133-9.
- de Jong, P. M., M. A. van Sterkenburg, S. C. Hesselting, J. A. Kempenaar, A. A. Mulder, A. M. Mommaas, J. H. Dijkman, and M. Ponc. 1994.** Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 271-7.
- De Pauw, B., T. J. Walsh, J. P. Donnelly, D. A. Stevens, J. E. Edwards, T. Calandra, P. G. Pappas, J. Maertens, O. Lortholary, C. A. Kauffman, D. W. Denning, T. F. Patterson, G. Maschmeyer, J. Bille, W. E. Dismukes, R. Herbrecht, W. W. Hope, C. C. Kibbler, B. J. Kullberg, K. A. Marr, P. Munoz, F. C. Odds, J. R. Perfect, A. Restrepo, M. Ruhnke, B. H. Segal, J. D. Sobel, T. C. Sorrell, C. Viscoli, J. R. Wingard, T. Zaoutis, and J. E. Bennett. 2008.** Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46: 1813-21.
- de Repentigny, L., S. Petitbois, M. Boushira, E. Michaliszyn, S. Senechal, N. Gendron, and S. Montplaisir. 1993.** Acquired immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infect Immun* 61: 3791-802.
- Denis, M. 1992.** Interleukin-6 in mouse hypersensitivity pneumonitis: changes in lung free cells following depletion of endogenous IL-6 or direct administration of IL-6. *J Leukoc Biol* 52: 197-201.
- Denis, M., and E. Ghadirian. 1992.** Transforming growth factor-beta is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 156-60.
- Denis, M., Y. Cormier, and M. Laviolette. 1992.** Murine hypersensitivity pneumonitis: a study of cellular infiltrates and cytokine production and its modulation by cyclosporin A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 68-74.
- Denis, M., M. Bedard, M. Laviolette, and Y. Cormier. 1993.** A study of monokine release and natural killer activity in the bronchoalveolar lavage of subjects with farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 147: 934-9.
- Denis, M., Y. Cormier, M. Fournier, J. Tardif, and M. Laviolette. 1991.** Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 477-83.
- Denning, D. W., K. Riniotis, R. Dobrashian, and H. Sambatakou. 2003.** Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis* 37 Suppl 3: S265-80.
- Denning, D. W., S. A. Radford, K. L. Oakley, L. Hall, E. M. Johnson, and D. W. Warnock. 1997.** Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 40: 401-14.

- Dennis, C. G., W. R. Greco, Y. Brun, R. Youn, H. K. Slocum, R. J. Bernacki, R. Lewis, N. Wiederhold, S. M. Holland, R. Petraitiene, T. J. Walsh, and B. H. Segal. 2006.** Effect of amphotericin B and micafungin combination on survival, histopathology, and fungal burden in experimental aspergillosis in the p47phox<sup>-/-</sup> mouse model of chronic granulomatous disease. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 422-7.
- Devalia, J. L., R. J. Sapsford, C. W. Wells, P. Richman, and R. J. Davies. 1990.** Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respir Med* 84: 303-12.
- Dubourdeau, M., R. Athman, V. Balloy, M. Huerre, M. Chignard, D. J. Philpott, J. P. Latge, and O. Ibrahim-Granet. 2006.** *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol* 177: 3994-4001.
- Duchaine, C., A. Meriaux, G. Brochu, and Y. Cormier. 1999.** Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J* 60: 89-95.
- Duong, M., N. Ouellet, M. Simard, Y. Bergeron, M. Olivier, and M. G. Bergeron. 1998.** Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 178: 1472-82.
- Einsele, H., and J. Loeffler. 2008.** Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 4: 37-45.
- Erkinjuntti-Pekkanen, R., M. Reiman, J. I. Kokkarinen, H. O. Tukiainen, and E. O. Terho. 1999.** IgG antibodies, chronic bronchitis, and pulmonary function values in farmer's lung patients and matched controls. *Allergy* 54: 1181-7.
- Farebrother, M. J., M. C. Kelson, and R. F. Heller. 1985.** Death certification of farmer's lung and chronic airway diseases in different countries of the EEC. *Br J Dis Chest* 79: 352-60.
- Fedorova, N. D., N. Khaldi, V. S. Joardar, R. Maiti, P. Amedeo, M. J. Anderson, J. Crabtree, J. C. Silva, J. H. Badger, A. Albarraq, S. Angiuoli, H. Bussey, P. Bowyer, P. J. Cotty, P. S. Dyer, A. Egan, K. Galens, C. M. Fraser-Liggett, B. J. Haas, J. M. Inman, R. Kent, S. Lemieux, I. Malavazi, J. Orvis, T. Roemer, C. M. Ronning, J. P. Sundaram, G. Sutton, G. Turner, J. C. Venter, O. R. White, B. R. Whitty, P. Youngman, K. H. Wolfe, G. H. Goldman, J. R. Wortman, B. Jiang, D. W. Denning, and W. C. Nierman. 2008.** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 4: e1000046.
- Fenoglio, C. M., G. Reboux, B. Sudre, M. Mercier, S. Roussel, J. F. Cordier, R. Piarroux, and J. C. Dalphin. 2007.** Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 29: 706-12.
- Filler, S. G., M. R. Yeaman, and D. C. Sheppard. 2005.** Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 3: S208-12.
- Fink, J. N. 2000.** Immunologic orchestration of hypersensitivity pneumonitis. *J Lab Clin Med* 136: 5-6.
- Fink, J. N., H. G. Ortega, H. Y. Reynolds, Y. F. Cormier, L. L. Fan, T. J. Franks, K. Kreiss, S. Kunkel, D. Lynch, S. Quirce, C. Rose, R. P. Schleimer, M. R. Schuyler, M. Selman, D. Trout, and Y. Yoshizawa. 2005.** Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 792-8.
- Flatherty, D. K., T. Iha, R. Chmelik, H. Dickie, and C. E. Reed. 1975.** HL-A-8 in farmer's lung. *Lancet* 2: 507.
- Ganz, T. 2002.** Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 109: 693-7.
- Garcia-Vidal, C., A. Upton, K. A. Kirby, and K. A. Marr. 2008.** Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis* 47: 1041-50.
- Garlanda, C., E. Hirsch, S. Bozza, A. Salustri, M. De Acetis, R. Nota, A. Maccagno, F. Riva, B. Bottazzi, G. Peri, A. Doni, L. Vago, M. Botto, R. De Santis, P. Carminati, G. Siracusa, F. Altruda, A.**

- Vecchi, L. Romani, and A. Mantovani. 2002.** Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420: 182-6.
- Gavalda, J., O. Len, R. San Juan, J. M. Aguado, J. Fortun, C. Lumbreras, A. Moreno, P. Munoz, M. Blanes, A. Ramos, G. Rufi, M. Gurgui, J. Torre-Cisneros, M. Montejo, M. Cuenca-Estrella, J. L. Rodriguez-Tudela, and A. Pahissa. 2005.** Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis* 41: 52-9.
- Gaziano, R., S. Bozza, S. Bellocchio, K. Perruccio, C. Montagnoli, L. Pitzurra, G. Salvatori, R. De Santis, P. Carminati, A. Mantovani, and L. Romani. 2004.** Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4414-21.
- Gersuk, G. M., D. M. Underhill, L. Zhu, and K. A. Marr. 2006.** Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol* 176: 3717-24.
- Girard, M., Y. Lacasse, and Y. Cormier. 2009.** Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 64: 322-34.
- Godard, P., J. Clot, O. Jonquet, J. Bousquet, and F. B. Michel. 1981.** Lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavages of patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 80: 447-52.
- Golec, M. 2007.** Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med* 14: 1-4.
- Golec, M., C. Skorska, M. Lemieszek, and J. Dutkiewicz. 2009.** A novel inhalation challenge set to study animal model of allergic alveolitis. *Ann Agric Environ Med* 16: 173-5.
- Gordon, T., C. Nadziejko, K. Galdanes, D. Lewis, and K. Donnelly. 2006.** *Mycobacterium immunogenum* causes hypersensitivity pneumonitis-like pathology in mice. *Inhal Toxicol* 18: 449-56.
- Green, B. J., J. K. Sercombe, and E. R. Tovey. 2005.** Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. *J Allergy Clin Immunol* 115: 1043-8.
- Green, B. J., E. R. Tovey, J. K. Sercombe, F. M. Blachere, D. H. Beezhold, and D. Schmechel. 2006.** Airborne fungal fragments and allergenicity. *Med Mycol* 44 Suppl 1: S245-55.
- Gruenert, D. C., W. E. Finkbeiner, and J. H. Widdicombe. 1995.** Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 268: L347-60.
- Gudmundsson, G., and G. W. Hunninghake. 1999.** Respiratory epithelial cells release interleukin-8 in response to a thermophilic bacteria that causes hypersensitivity pneumonitis. *Exp Lung Res* 25: 217-28.
- Gudmundsson, G., M. M. Monick, and G. W. Hunninghake. 1998a.** IL-12 modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 161: 991-9.
- Gudmundsson, G., A. Bosch, B. L. Davidson, D. J. Berg, and G. W. Hunninghake. 1998b.** Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 812-8.
- Gupta, M. K., V. Subramanian, and J. S. Yadav. 2009.** Immunoproteomic identification of secretory and subcellular protein antigens and functional evaluation of the secretome fraction of *Mycobacterium immunogenum*, a newly recognized species of the *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group. *J Proteome Res* 8: 2319-30.
- Halstensen, A. S., K. C. Nordby, I. M. Wouters, and W. Eduard. 2007.** Determinants of microbial exposure in grain farming. *Ann Occup Hyg* 51: 581-92.
- Hapke, E. J., R. M. Seal, G. O. Thomas, M. Hayes, and J. C. Meek. 1968.** Farmer's lung. A clinical, radiographic, functional, and serological correlation of acute and chronic stages. *Thorax* 23: 451-68.
- Harris, N. L., and F. Ronchese. 1999.** The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 77: 304-11.

- Hedenstierna, G., R. Alexandersson, L. Belin, K. Wimander, and G. Rosen. 1986.** Lung function and rhizopus antibodies in wood trimmers. A cross-sectional and longitudinal study. *Int Arch Occup Environ Health* 58: 167-77.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlamm, P. F. Troke, and B. de Pauw. 2002.** Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 347: 408-15.
- Hodgson, M. J., D. K. Parkinson, and M. Karpf. 1989.** Chest X-rays in hypersensitivity pneumonitis: a metaanalysis of secular trend. *Am J Ind Med* 16: 45-53.
- Hoeben, B. J., D. S. Burgess, J. T. McConville, L. K. Najvar, R. L. Talbert, J. I. Peters, N. P. Wiederhold, B. L. Frei, J. R. Graybill, R. Bocanegra, K. A. Overhoff, P. Sinswat, K. P. Johnston, and R. O. Williams, 3rd. 2006.** In vivo efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1552-4.
- Hohl, T. M., M. Feldmesser, D. S. Perlin, and E. G. Pamer. 2008.** Caspofungin modulates inflammatory responses to *Aspergillus fumigatus* through stage-specific effects on fungal beta-glucan exposure. *J Infect Dis* 198: 176-85.
- Hohl, T. M., H. L. Van Epps, A. Rivera, L. A. Morgan, P. L. Chen, M. Feldmesser, and E. G. Pamer. 2005.** *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog* 1: e30.
- Hummel, M., C. Baust, M. Kretschmar, T. Nichterlein, D. Schleiermacher, B. Spiess, H. Skladny, H. Morz, R. Hehlmann, and D. Buchheidt. 2004.** Detection of *Aspergillus* DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis. *J Med Microbiol* 53: 803-6.
- Huttunen, K., A. Hyvarinen, A. Nevalainen, H. Komulainen, and M. R. Hirvonen. 2003.** Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ Health Perspect* 111: 85-92.
- Hwang, S. J., S. Kim, W. S. Park, and D. H. Chung. 2006.** IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *J Immunol* 177: 5258-68.
- Irifune, K., A. Yokoyama, N. Kohno, K. Sakai, and K. Hiwada. 2003.** T-helper 1 cells induce alveolitis but do not lead to pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J* 21: 11-8.
- Ismail, T., C. McSharry, and G. Boyd. 2006.** Extrinsic allergic alveolitis. *Respirology* 11: 262-8.
- Israel-Assayag, E., A. Dakhama, S. Lavigne, M. Laviolette, and Y. Cormier. 1999.** Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1830-4.
- Ito, J. I., and J. M. Lyons. 2002.** Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 186: 869-71.
- Jelinek, D. F., R. C. Tschumper, G. A. Stolovitzky, S. J. Iturria, Y. Tu, J. Lepre, N. Shah, and N. E. Kay. 2003.** Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res* 1: 346-61.
- Jiao, L., X. Han, S. Wang, Y. Fan, M. Yang, H. Qiu, and X. Yang. 2009.** Imprinted DC mediate the immune-educating effect of early-life microbial exposure. *Eur J Immunol* 39: 469-80.
- Johnson, E. M., K. L. Oakley, S. A. Radford, C. B. Moore, P. Warn, D. W. Warnock, and D. W. Denning. 2000.** Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J Antimicrob Chemother* 45: 85-93.
- Jorissen, M., and A. Bessems. 1995.** Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol* 115: 66-70.

- Jorissen, M., B. Van der Schueren, H. Van den Berghe, and J. J. Cassiman. 1991.** Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J* 4: 210-7.
- Joshi, A. D., D. J. Fong, S. R. Oak, G. Trujillo, K. R. Flaherty, F. J. Martinez, and C. M. Hogaboam. 2009.** Interleukin-17-mediated immunopathogenesis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 705-16.
- Kaartinen, L., P. Nettesheim, K. B. Adler, and S. H. Randell. 1993.** Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A: 481-92.
- Kalbande, D. M., S. N. Dhadse, P. R. Chaudhari, and S. R. Wate. 2008.** Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environ Monit Assess* 138: 233-8.
- Kalil, J., A. Fellous, and M. Fellous. .**
- Kaltreider, H. B., J. L. Caldwell, and E. Adam. 1977.** The fate and consequence of an organic particulate antigen instilled into bronchoalveolar spaces of normal canine lungs. *Am Rev Respir Dis* 116: 267-80.
- Kastelein, R. A., C. A. Hunter, and D. J. Cua. 2007.** Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25: 221-42.
- Kauffman, H. F., J. F. Tomee, M. A. van de Riet, A. J. Timmerman, and P. Borger. 2000.** Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1185-93.
- Kaukonen, K., J. Savolainen, M. Viander, and E. O. Terho. 1993.** Characterization of *Aspergillus umbrosus* carbohydrate antigens by biotinylated lectins and IgG response to mannan/mannoprotein antigens in patients with farmer's lung. *Clin Exp Allergy* 23: 21-7.
- Kaur, S., V. K. Gupta, S. Thiel, P. U. Sarma, and T. Madan. 2007.** Protective role of mannan-binding lectin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Exp Immunol* 148: 382-9.
- Kawai, T., M. Tamura, and M. Murao. 1984.** Summer-type hypersensitivity pneumonitis. A unique disease in Japan. *Chest* 85: 311-7.
- Ke, Y., R. R. Reddel, B. I. Gerwin, M. Miyashita, M. McMenamin, J. F. Lechner, and C. C. Harris. 1988.** Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 38: 60-6.
- Khoufache, K., O. Puel, N. Loiseau, M. Delaforge, D. Rivollet, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier, F. Botterel, and S. Bretagne. 2007.** Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiol* 7: 5.
- Kogan, T. V., J. Jadoun, L. Mittelman, K. Hirschberg, and N. Osherov. 2004.** Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J Infect Dis* 189: 1965-73.
- Kontoyiannis, D. P., M. S. Lionakis, R. E. Lewis, G. Chamilos, M. Healy, C. Perego, A. Safdar, H. Kantarjian, R. Champlin, T. J. Walsh, and Raad, II. 2005.** Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *J Infect Dis* 191: 1350-60.
- Kotimaa, M., K. Husman, E. Terho, and M. Mustonen. 1984.** Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland. *Scand J Work Environ Health* 10: 115-119.
- Kotimaa, M. H., L. Oksanen, and P. Koskela. 1991.** Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand J Work Environ Health* 17: 117-22.
- Kulemann, V., M. Bauer, W. Graninger, and C. Joukhadar. 2005.** Safety and potential of drug interactions of caspofungin and voriconazole in multimorbid patients. *Pharmacology* 75: 165-78.
- Kurup, V. P., M. C. Zacharisen, and J. N. Fink. 2006.** Hypersensitivity pneumonitis. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 48: 115-28.

- Lacasse, Y., M. Selman, U. Costabel, J. C. Dalphin, M. Ando, F. Morell, R. Erkinjuntti-Pekkanen, N. Muller, T. V. Colby, M. Schuyler, and Y. Cormier. 2003.** Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 952-8.
- Lacasse Y, Israel AE, Laviolette M, and C. Y. 2004.** Clinical and immunopathological aspects of hypersensitivity pneumonitis. *Rev Mal Respir* 21: 769-781.
- Laflamme, C., E. Israel-Assayag, and Y. Cormier. 2003.** Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 21: 225-31.
- Lalancette, M., G. Carrier, M. Laviolette, S. Ferland, J. Rodrigue, R. Begin, A. Cantin, and Y. Cormier. 1993.** Farmer's lung. Long-term outcome and lack of predictive value of bronchoalveolar lavage fibrosing factors. *Am Rev Respir Dis* 148: 216-21.
- Lamblin, G., J. P. Aubert, J. M. Perini, A. Klein, N. Porchet, P. Degand, and P. Roussel. 1992.** Human respiratory mucins. *Eur Respir J* 5: 247-56.
- Lambrecht, B. N. 2001.** Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 51-9.
- Laoukili, J., and F. Marano. 2003.** Culture de cellules épithéliales respiratoires, Techniques en culture de cellules animales. Inserm, Paris.
- Laoukili, J., E. Perret, S. Middendorp, O. Houcine, C. Guennou, F. Marano, M. Bornens, and F. Tournier. 2000.** Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 113 ( Pt 8): 1355-64.
- Lappalainen, S., A. L. Pasanen, M. Reiman, and P. Kalliokoski. 1998.** Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81: 585-92.
- Laviolette, M., Y. Cormier, A. Loiseau, P. Soler, P. Leblanc, and A. J. Hance. 1991.** Bronchoalveolar mast cells in normal farmers and subjects with farmer's lung. Diagnostic, prognostic, and physiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 144: 855-60.
- Lee, I., J. H. Oh, E. Keats Shwab, T. R. Dagenais, D. Andes, and N. P. Keller. 2009.** HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol*.
- Leenders, A. C., S. de Marie, M. T. ten Kate, I. A. Bakker-Woudenberg, and H. A. Verbrugh. 1996.** Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 38: 215-25.
- LeVan, T. D., S. Von Essen, D. J. Romberger, G. P. Lambert, F. D. Martinez, M. M. Vasquez, and J. A. Merchant. 2005.** Polymorphisms in the CD14 gene associated with pulmonary function in farmers. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 773-9.
- Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo. 2005.** Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105: 1162-9.
- Lewis, R. E., and N. P. Wiederhold. 2005.** Murine model of invasive aspergillosis. *Methods Mol Med* 118: 129-42.
- Lewis, R. E., N. D. Albert, and D. P. Kontoyiannis. 2008a.** Comparison of the dose-dependent activity and paradoxical effect of caspofungin and micafungin in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 61: 1140-4.
- Lewis, R. E., N. D. Albert, and D. P. Kontoyiannis. 2008b.** Efficacy of single-dose liposomal amphotericin B or micafungin prophylaxis in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4178-80.
- Lewis, R. E., R. A. Prince, J. Chi, and D. P. Kontoyiannis. 2002.** Itraconazole preexposure attenuates the efficacy of subsequent amphotericin B therapy in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3208-14.

- Lewis, R. E., G. Chamilos, R. A. Prince, and D. P. Kontoyiannis. 2007a.** Pretreatment with empty liposomes attenuates the immunopathology of invasive pulmonary aspergillosis in corticosteroid-immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1078-81.
- Lewis, R. E., G. Liao, J. Hou, G. Chamilos, R. A. Prince, and D. P. Kontoyiannis. 2007b.** Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1253-8.
- Lewis, R. E., N. P. Wiederhold, J. Chi, X. Y. Han, K. V. Komanduri, D. P. Kontoyiannis, and R. A. Prince. 2005.** Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun* 73: 635-7.
- Li, D. W., and B. Kendrick. 1995.** A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int J Biometeorol* 39: 74-80.
- Lin, J. Y., M. L. Chen, and B. F. Lin. 2006a.** *Ganoderma tsugae* in vivo modulates Th1/Th2 and macrophage responses in an allergic murine model. *Food Chem Toxicol* 44: 2025-32.
- Lin, J. Y., M. L. Chen, B. L. Chiang, and B. F. Lin. 2006b.** *Ganoderma tsugae* supplementation alleviates bronchoalveolar inflammation in an airway sensitization and challenge mouse model. *Int Immunopharmacol* 6: 241-51.
- Lin, S., J. Schranz, and S. Teutsch. 2001.** Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 32: 358-366.
- Lukacs, N. W., T. J. Standiford, S. W. Chensue, R. G. Kunkel, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1996.** C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 60: 573-8.
- Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, E. M. Hussain, K. B. Reid, and P. U. Sarma. 2001.** Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 69: 2728-31.
- Madeja, J., E. Wypasek, B. Plytycz, K. Sarapata, and K. Harmata. 2005.** Quantification of airborne birch (*Betula* sp.) pollen grains and allergens in Krakow. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53: 169-74.
- Madsen, M., Y. Leberthal, Q. Cheng, B. L. Smith, and M. K. Hostetter. 2000.** A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis* 181: 1330-6.
- Male, D., J. Brostoff, D. Roth, and I. Roitt. 2007.** *Immunologie*. Elsevier Masson, Paris.
- Malmberg, P., A. Rask-Andersen, and L. Rosenhall. 1993.** Exposure to microorganisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers. *Chest* 103: 1202-9.
- Malmberg, P., A. Rask-Andersen, S. Hoglund, B. Kolmodin-Hedman, and J. Read Guernsey. 1988.** Incidence of organic dust toxic syndrome and allergic alveolitis in Swedish farmers. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87: 47-54.
- Manavathu, E., J. Cutright, and P. Chandrasekar. 1999.** Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J Clin Microbiol* 37: 858-61.
- Marty, F. M., C. M. Lowry, C. S. Cutler, B. J. Campbell, K. Fiumara, L. R. Baden, and J. H. Antin. 2006.** Voriconazole and sirolimus coadministration after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 552-9.
- Matsuno, Y., Y. Ishii, K. Yoh, Y. Morishima, N. Haraguchi, N. Kikuchi, T. Iizuka, T. Kiwamoto, S. Homma, A. Nomura, T. Sakamoto, M. Ohtsuka, N. Hizawa, and S. Takahashi. 2007.** Overexpression of GATA-3 protects against the development of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1015-25.
- Mattila, P. E., A. E. Metz, R. R. Rapaka, L. D. Bauer, and C. Steele. 2008.** Dectin-1 Fc targeting of *aspergillus fumigatus* beta-glucans augments innate defense against invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1171-2.

- Mauny, F., J. C. Polio, E. Monnet, D. Pernet, J. J. Laplante, A. Depierre, and J. C. Dalphin. 1997.** Longitudinal study of respiratory health in dairy farmers: influence of artificial barn fodder drying. *Eur Respir J* 10: 2522-8.
- McCormack, F. X., and J. A. Whitsett. 2002.** The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 109: 707-12.
- McCrea, K. A., J. E. Ensor, K. Nall, E. R. Bleecker, and J. D. Hasday. 1994.** Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 696-703.
- McGinnis, M. 2007.** Indoor mould development and dispersal. *Med Mycol* 45: 1-9.
- Meersseman, W., K. Lagrou, J. Maertens, A. Wilmer, G. Hermans, S. Vanderschueren, I. Spriet, E. Verbeken, and E. Van Wijngaerden. 2008.** Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 27-34.
- Mehrad, B., and T. J. Standiford. 1999.** Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol Res* 20: 15-27.
- Mehrad, B., R. M. Strieter, and T. J. Standiford. 1999a.** Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* 162: 1633-40.
- Mehrad, B., T. A. Moore, and T. J. Standiford. 2000.** Macrophage inflammatory protein-1 alpha is a critical mediator of host defense against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic hosts. *J Immunol* 165: 962-8.
- Mehrad, B., R. M. Strieter, T. A. Moore, W. C. Tsai, S. A. Lira, and T. J. Standiford. 1999b.** CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* 163: 6086-94.
- Meier, A., C. J. Kirschning, T. Nikolaus, H. Wagner, J. Heesemann, and F. Ebel. 2003.** Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* 5: 561-70.
- Million, K., J. Larcher, J. Laoukili, D. Bourguignon, F. Marano, and F. Tournier. 1999.** Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23): 4357-66.
- Milovanovic, M., G. Heine, T. Zuberbier, and M. Worm. 2009.** Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy* 39: 671-8.
- Miyajima, M., M. Suga, K. Nakagawa, K. Ito, and M. Ando. 1999.** Effects of erythromycin on experimental extrinsic allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 29: 253-61.
- Moalic, V., B. Mercier, and C. Ferec. 2004.** Technologir Luminex™ : principe, applications et perspectives. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée* 19: 181-187.
- Moller, P. C., L. R. Partridge, R. A. Cox, V. Pellegrini, and D. G. Ritchie. 1989.** The development of ciliated and mucus cells from basal cells in hamster tracheal epithelial cell cultures. *Tissue Cell* 21: 195-8.
- Monkare, S., and T. Haahtela. 1987.** Farmer's lung--a 5-year follow-up of eighty-six patients. *Clin Allergy* 17: 143-51.
- Monkare, S., M. Ikonen, and T. Haahtela. 1985.** Radiologic findings in farmer's lung. Prognosis and correlation to lung function. *Chest* 87: 460-6.
- Moore, B. B., T. A. Moore, and G. B. Toews. 2001.** Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences. *Eur Respir J* 18: 846-56.
- Morgan, J., K. A. Wannemuehler, K. A. Marr, S. Hadley, D. P. Kontoyiannis, T. J. Walsh, S. K. Fridkin, P. G. Pappas, and D. W. Warnock. 2005.** Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S49-58.
- Morgenstern, D. E., M. A. Gifford, L. L. Li, C. M. Doerschuk, and M. C. Dinauer. 1997.** Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in

- both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 185: 207-18.
- Morrison, B. E., S. J. Park, J. M. Mooney, and B. Mehrad. 2003.** Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest* 112: 1862-70.
- Mouton, J. W., D. T. Te Dorsthorst, J. F. Meis, and P. E. Verweij. 2009.** Dose-response relationships of three amphotericin B formulations in a non-neutropenic murine model of invasive aspergillosis. *Med Mycol*: 1-7.
- Mroz, R. M., M. Korniluk, A. Stasiak-Barmuta, and E. Chyczewska. 2008.** Upregulation of Th1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage fluid of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 6: 499-505.
- Nagasaki, Y., Y. Eriguchi, Y. Uchida, N. Miyake, Y. Maehara, M. Kadowaki, M. Harada, K. Akashi, and N. Shimono. 2009.** Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised mouse model. *J Antimicrob Chemother* 64: 379-82.
- Nance, S., R. Cross, A. K. Yi, and E. A. Fitzpatrick. 2005.** IFN-gamma production by innate immune cells is sufficient for development of hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Immunol* 35: 1928-38.
- Nance, S. C., A. K. Yi, F. C. Re, and E. A. Fitzpatrick. 2008.** MyD88 is necessary for neutrophil recruitment in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukoc Biol* 83: 1207-17.
- Netea, M. G., J. W. Van der Meer, and B. J. Kullberg. 2004.** Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol* 12: 484-8.
- Netea, M. G., A. Warris, J. W. Van der Meer, M. J. Fenton, T. J. Verver-Janssen, L. E. Jacobs, T. Andresen, P. E. Verweij, and B. J. Kullberg. 2003.** *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 188: 320-6.
- Neth, O., D. L. Jack, A. W. Dodds, H. Holzel, N. J. Klein, and M. W. Turner. 2000.** Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 68: 688-93.
- Nissen, R. M., and K. R. Yamamoto. 2000.** The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14: 2314-29.
- O'Garra, A., and P. Vieira. 2004.** Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10: 801-5.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer. 2009.** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457: 471-4.
- Ojanen, T. 1992.** Class specific antibodies in serodiagnosis of farmer's lung. *Br J Ind Med* 49: 332-6.
- Olson, J. A., J. P. Adler-Moore, J. Schwartz, G. M. Jensen, and R. T. Proffitt. 2006.** Comparative efficacies, toxicities, and tissue concentrations of amphotericin B lipid formulations in a murine pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2122-31.
- Pagano, L., M. Caira, M. Picardi, A. Candoni, L. Melillo, L. Fianchi, M. Offidani, and A. Nosari. 2007.** Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality--SEIFEM-C Report. *Clin Infect Dis* 44: 1524-5.
- Pan, L. H., K. Yamauchi, T. Sawai, T. Nakadate, Y. Kojima, N. Takahashi, K. Adachi, A. Kameyama, and H. Inoue. 2000.** Inhibition of binding of E- and P-selectin to sialyl-Lewis X molecule suppresses the inflammatory response in hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1689-97.
- Pardo, A., K. M. Smith, J. Abrams, R. Coffman, M. Bustos, T. K. McClanahan, J. Grein, E. E. Murphy, A. Zlotnik, and M. Selman. 2001.** CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukoc Biol* 70: 610-6.

- Park, S. J., M. A. Hughes, M. Burdick, R. M. Strieter, and B. Mehrad. 2009.** Early NK cell-derived IFN- $\gamma$  is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol* 182: 4306-12.
- Pascual, A., T. Calandra, S. Bolay, T. Buclin, J. Bille, and O. Marchetti. 2008.** Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 46: 201-11.
- Pepys, J. 1969.** Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dusts. *Monogr Allergy* 4: 1-147.
- Pepys, J. 1994.** Farmer's lung. A needle in a haystack and pandora's box. *ACI News* 6: 63-72.
- Pepys, J., P. Jenkins, G. Festenstein, P. Gregory, M. Lacey, and F. Skinner. 1963.** Farmer's lung: Thermophilic actinomycetes as a source of farmer's lung hay'antigen. *Lancet* 2: 607-611.
- Pepys J, and J. PA. 1965.** Precipitins test in farmer's lung. *Thorax* 20: 21-35.
- Pfeifer, A. M., R. T. Jones, P. E. Bowden, D. Mann, E. Spillare, A. J. Klein-Szanto, B. F. Trump, and C. C. Harris. 1991.** Human bronchial epithelial cells transformed by the c-raf-1 and c-myc protooncogenes induce multidifferentiated carcinomas in nude mice: a model for lung carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 3793-801.
- Phadke, A. P., and B. Mehrad. 2005.** Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S173-6.
- Phadke, A. P., G. Akangire, S. J. Park, S. A. Lira, and B. Mehrad. 2007.** The role of CC chemokine receptor 6 in host defense in a model of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1165-72.
- Philippe, B., O. Ibrahim-Granet, M. C. Prevost, M. A. Gougerot-Pocidallo, M. Sanchez Perez, A. Van der Meeren, and J. P. Latge. 2003.** Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* 71: 3034-42.
- Poirier, P. 2008.** Interactions entre CFTR, mycotoxines et sucres fongiques sur des modèles de culture in vitro d'épithélium respiratoire, DES de Biologie Médicale. Faculté de Pharmacie, Paris 11, Chatenay-Malabry.
- Polonelli, L., A. Casadevall, Y. Han, F. Bernardis, T. N. Kirkland, R. C. Matthews, D. Adriani, M. Boccanera, J. P. Burnie, A. Cassone, S. Conti, J. E. Cutler, R. Frazzi, C. Gregory, S. Hodgetts, C. Illidge, W. Magliani, G. Rigg, and G. Santoni. 2000.** The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol* 38 Suppl 1: 281-92.
- Popper, H. H., S. Pailer, G. Wurzing, H. Feldner, C. Hesse, and E. Eber. 2002.** Expression of adhesion molecules in allergic lung diseases. *Virchows Arch* 440: 172-80.
- Prasse, A., D. V. Pechkovsky, G. B. Toews, W. Jungraithmayr, F. Kollert, T. Goldmann, E. Vollmer, J. Muller-Quernheim, and G. Zissel. 2006.** A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 781-92.
- Pylkkanen, L., H. Gullsten, M. L. Majuri, U. Andersson, E. Vanhala, J. Maatta, T. Meklin, M. R. Hirvonen, H. Alenius, and K. Savolainen. 2004.** Exposure to *Aspergillus fumigatus* spores induces chemokine expression in mouse macrophages. *Toxicology* 200: 255-63.
- Radon, K., B. Danuser, M. Iversen, E. Monso, C. Weber, J. Hartung, K. Donham, U. Palmgren, and D. Nowak. 2002.** Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric Environ Med* 9: 41-8.
- Ramaprakash, H., T. Ito, T. J. Standiford, S. L. Kunkel, and C. M. Hogaboam. 2009.** Toll-like receptor 9 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. *Infect Immun* 77: 108-19.
- Ramaswamy, S., K. N. Ross, E. S. Lander, and T. R. Golub. 2003.** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54.

- Ramirez-Ortiz, Z. G., C. A. Specht, J. P. Wang, C. K. Lee, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli, and S. M. Levitz. 2008.** Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect Immun* 76: 2123-9.
- Ramirez-Venegas, A., R. Sansores, and R. Chapela. 1995.** Inhaled beclomethasone versus oral prednisolone. A clinical trial in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: A605.
- Rask-Andersen, A. 1989.** Allergic alveolitis in Swedish farmers. *Ups J Med Sci* 94: 271-85.
- Ratjen, F., U. Costabel, M. Griese, and K. Paul. 2003.** Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 21: 144-8.
- Ray, B., D. Ebner, and I. Balazs. 2002.** Identifying HLA alloantibodies using Luminex microspheres. *Hum Immunol* 63: (10 Suppl):S85.
- Reboux, G., R. Piarroux, S. Roussel, L. Millon, K. Bardonnnet, and J. C. Dalphin. 2007.** Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J Med Microbiol* 56: 1317-21.
- Reboux, G., R. Piarroux, F. Mauny, A. Madroszyk, L. Millon, K. Bardonnnet, and J. C. Dalphin. 2001.** Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1534-9.
- Reboux, G., M. Reiman, S. Roussel, K. Taattola, L. Millon, J. C. Dalphin, and R. Piarroux. 2006.** Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med* 13: 267-73.
- Reboux, G., J. C. Dalphin, J. C. Polio, L. Millon, J. Baverel, J. Martinez, L. Girard, and R. Piarroux. 2002.** Influence of buffered propionic acid on the development of micro-organisms in hay. *Mycoses* 45: 184-7.
- Reddel, R. R., Y. Ke, B. I. Gerwin, M. G. McMenamin, J. F. Lechner, R. T. Su, D. E. Brash, J. B. Park, J. S. Rhim, and C. C. Harris. 1988.** Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 48: 1904-9.
- Reddel, R. R., I. C. Hsu, M. J. Mass, B. Hukku, B. I. Gerwin, S. E. Salghetti, A. N. Somers, A. J. Galati, W. T. Gunning, 3rd, C. C. Harris, and et al. 1991.** A human bronchial epithelial cell strain with unusual in vitro growth potential which undergoes neoplastic transformation after SV40 T antigen gene transfection. *Int J Cancer* 48: 764-73.
- Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal. 2002.** Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* 416: 291-7.
- Renegar, K. B., P. A. Small, Jr., L. G. Boykins, and P. F. Wright. 2004.** Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol* 173: 1978-86.
- Reynolds, S. P., J. H. Edwards, K. P. Jones, and B. H. Davies. 1991.** Immunoglobulin and antibody levels in bronchoalveolar lavage fluid from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. *Clin Exp Immunol* 86: 278-85.
- Richardson, M., and M. Patel. 1995.** Stimulation of neutrophil phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by interleukin-8 and N-formylmethionyl-leucylphenylalanine. *J Med Vet Mycol* 33: 99-104.
- Richerson, H. B., I. L. Bernstein, J. N. Fink, G. W. Hunninghake, H. S. Novey, C. E. Reed, J. E. Salvaggio, M. R. Schuyler, H. J. Schwartz, and D. J. Stechschulte. 1989.** Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 84: 839-44.
- Rittner, C., J. Sennekamp, and F. Vogel. 1975.** Letter: HLA-B8 in pigeon-fancier's lung. *Lancet* 2: 1303.

- Rivera, A., H. L. Van Epps, T. M. Hohl, G. Rizzuto, and E. G. Pamer. 2005.** Distinct CD4+T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 73: 7170-9.
- Rivera, A., N. Collins, M. T. Stephan, L. Lipuma, I. Leiner, and E. G. Pamer. 2009.** Aberrant tissue localization of fungus-specific CD4+ T cells in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 183: 631-41.
- Rivera, A., G. Ro, H. L. Van Epps, T. Simpson, I. Leiner, D. B. Sant'Angelo, and E. G. Pamer. 2006.** Innate immune activation and CD4+ T cell priming during respiratory fungal infection. *Immunity* 25: 665-75.
- Robertson, L. 1997.** Monitoring viable fungal and bacterial bioaerosol concentrations to identify acceptable levels for common indoor environments. *Indoor Built Environ* 6: 295-300.
- Robinson, B. W., A. H. Rose, P. J. Thompson, and A. Hey. 1987.** Comparison of bronchoalveolar lavage helper/suppressor T-cell ratios in sarcoidosis versus other interstitial lung diseases. *Aust N Z J Med* 17: 9-15.
- Romani, L. 2004.** Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 4: 1-23.
- Romani, L., F. Fallarino, A. De Luca, C. Montagnoli, C. D'Angelo, T. Zelante, C. Vacca, F. Bistoni, M. C. Fioretti, U. Grohmann, B. H. Segal, and P. Puccetti. 2008.** Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 451: 211-5.
- Rosenman, K. D. 2009.** Asthma, hypersensitivity pneumonitis and other respiratory diseases caused by metalworking fluids. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 97-102.
- Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, J. J. Laplante, and R. Piarroux. 2005a.** Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann Agric Environ Med* 12: 217-21.
- Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, K. Bardonnnet, L. Millon, and R. Piarroux. 2004.** Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup Environ Med* 61: e3.
- Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, D. Pernet, J. J. Laplante, L. Millon, and R. Piarroux. 2005b.** Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study. *Mycopathologia* 160: 273-9.
- Roussel, S., G. Reboux, B. Rognon, M. Monod, F. Grenouillet, J. Dalphin, and L. Millon. 2009a.** Optimisation of farmer's lung disease serological diagnosis using purified ascospore antigen of *Eurotium amstelodami*. *Clin Vaccin Immunol Under review*.
- Roussel, S., G. Reboux, B. Rognon, M. Monod, F. Grenouillet, M. Quadroni, J. M. Fellrath, J. D. Aubert, J. C. Dalphin, and L. Millon. 2009b.** Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in farmer's lung disease serological diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*.
- Saadoun, D., I. Bieche, T. Maisonobe, T. Asselah, I. Laurendeau, J. C. Piette, M. Vidaud, and P. Cacoub. 2005.** Involvement of chemokines and type 1 cytokines in the pathogenesis of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis neuropathy. *Arthritis Rheum* 52: 2917-25.
- Saikai, T., H. Tanaka, M. Fuji, H. Sugawara, I. Takeya, K. Tsunematsu, and S. Abe. 2002.** Hypersensitivity pneumonitis induced by the spore of *Pleurotus Eryngii* (Eringi). *Intern Med* 41: 571-3.
- Salvaggio, J. E. 1994.** Inhaled particles and respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 94: 304-9.
- Sambatakou, H., B. Dupont, H. Lode, and D. W. Denning. 2006.** Voriconazole treatment for subacute invasive and chronic pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 119: 527 e17-24.
- Schaffner, A., H. Douglas, and A. Braude. 1982.** Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest* 69: 617-31.
- Schaffner, A., H. Douglas, A. I. Braude, and C. E. Davis. 1983.** Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun* 42: 1109-15.

- Schelenz, S., D. A. Smith, and G. J. Bancroft. 1999.** Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med Mycol* 37: 183-94.
- Schmidt, D., U. Hubsch, H. Wurzer, W. Heppt, and M. Aufderheide. 1996.** Development of an in vitro human nasal epithelial (HNE) cell model. *Toxicol Lett* 88: 75-9.
- Schmitt, H. J., E. M. Bernard, M. Hauser, and D. Armstrong. 1988.** Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1676-9.
- Scholander, J., J. Graziani, K. Schillinger, A. Zachary, and M. Leffell. 2002.** Luminex technology for test of HLA-specific antibodies. *Hum Immunol* 63: (10 suppl):S15.
- Schuyler, M., and Y. Cormier. 1997.** The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 111: 534-6.
- Schuyler, M., K. Gott, and A. Cherne. 2002.** Is IL12 necessary in experimental hypersensitivity pneumonitis? *Int J Exp Pathol* 83: 87-98.
- Schuyler, M., K. Gott, and A. Cherne. 2003.** Experimental hypersensitivity pneumonitis: role of MCP-1. *J Lab Clin Med* 142: 187-95.
- Schuyler, M., K. Gott, and V. French. 2004.** The role of MIP-1alpha in experimental hypersensitivity pneumonitis. *Lung* 182: 135-49.
- Segal, B. H. 2009.** Aspergillosis. *N Engl J Med* 360: 1870-84.
- Segal, B. H., and M. C. Sneller. 1997.** Infectious complications of immunosuppressive therapy in patients with rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 23: 219-37.
- Segal, B. H., and T. J. Walsh. 2006.** Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 707-17.
- Segal, B. H., E. S. DeCarlo, K. J. Kwon-Chung, H. L. Malech, J. I. Gallin, and S. M. Holland. 1998.** *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 77: 345-54.
- Segal, B. H., J. Kwon-Chung, T. J. Walsh, B. S. Klein, M. Battiwalla, N. G. Almyroudis, S. M. Holland, and L. Romani. 2006.** Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 42: 507-15.
- Seidler, M. J., S. Salvenmoser, and F. M. Muller. 2008.** *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4130-6.
- Selman, M., and M. H. Vargas. 1998.** Airway involvement in hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 4: 9-15.
- Selman, M., L. Teran, A. Mendoza, A. Camarena, E. Martinez-Cordero, M. Lezama, and H. M. Rubio. 1987.** Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population. *Clin Immunol Immunopathol* 44: 63-70.
- Selman, M., A. Pardo, L. Barrera, A. Estrada, S. R. Watson, K. Wilson, N. Aziz, N. Kaminski, and A. Zlotnik. 2006.** Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 188-98.
- Semenzato, G., L. Bjermer, U. Costabel, P. L. Haslam, and D. Olivieri. 1990.** Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 3: 945-6, 961-9.
- Serrano-Gomez, D., A. Dominguez-Soto, J. Ancochea, J. A. Jimenez-Heffernan, J. A. Leal, and A. L. Corbi. 2004.** Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 173: 5635-43.
- Shalit, I., D. Halperin, D. Haite, A. Levitov, J. Romano, N. Osherov, and I. Fabian. 2006.** Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1beta and TNF-alpha secretion and NFkappaB and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 57: 230-5.

- Shen, B. Q., W. E. Finkbeiner, J. J. Wine, R. J. Mrsny, and J. H. Widdicombe. 1994.** Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion. *Am J Physiol* 266: L493-501.
- Sheppard, D. C., G. Rieg, L. Y. Chiang, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr., and A. S. Ibrahim. 2004.** Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1908-11.
- Shijubo, N., K. Imai, K. Shigehara, M. Hirasawa, M. Tsujisaki, Y. Hinoda, and S. Abe. 1995.** Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids of extrinsic allergic alveolitis. *Clin Exp Immunol* 102: 91-7.
- Shvedova, A. A., E. Kisin, A. Murray, T. Goldsmith, J. S. Reynolds, V. Castranova, D. G. Frazer, and C. Kommineni. 2002.** Metal working fluids: sub-chronic effects on pulmonary functions in B6C3F1 mice given vitamin E deficient and sufficient diets. *Toxicology* 177: 285-97.
- Sibille, Y., and F. X. Marchandise. 1993.** Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J* 6: 1529-43.
- Simonian, P. L., C. L. Roark, F. Wehrmann, A. M. Lanham, W. K. Born, R. L. O'Brien, and A. P. Fontenot. 2009a.** IL-17A-expressing T cells are essential for bacterial clearance in a murine model of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 182: 6540-9.
- Simonian, P. L., C. L. Roark, F. Wehrmann, A. K. Lanham, F. Diaz del Valle, W. K. Born, R. L. O'Brien, and A. P. Fontenot. 2009b.** Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J Immunol* 182: 657-65.
- Singh, M., T. Madan, P. Waters, S. Sonar, S. K. Singh, M. F. Kamran, A. L. Bernal, P. U. Sarma, V. K. Singh, E. C. Crouch, and U. Kishore. 2009.** Therapeutic effects of recombinant forms of full-length and truncated human surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mol Immunol* 46: 2363-9.
- Singh, N., T. L. Pruett, S. Houston, P. Munoz, T. V. Cacciarelli, M. M. Wagener, and S. Husain. 2006.** Invasive aspergillosis in the recipients of liver retransplantation. *Liver Transpl* 12: 1205-9.
- Sionov, E., S. Mendlovic, and E. Segal. 2005.** Experimental systemic murine aspergillosis: treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. *J Antimicrob Chemother* 56: 594-7.
- Smith, J., N. Safdar, V. Knasinski, W. Simmons, S. M. Bhavnani, P. G. Ambrose, and D. Andes. 2006a.** Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1570-2.
- Smith, T. J., J. Khatcheressian, G. H. Lyman, H. Ozer, J. O. Armitage, L. Balducci, C. L. Bennett, S. B. Cantor, J. Crawford, S. J. Cross, G. Demetri, C. E. Desch, P. A. Pizzo, C. A. Schiffer, L. Schwartzberg, M. R. Somerfield, G. Somlo, J. C. Wade, J. L. Wade, R. J. Winn, A. J. Wozniak, and A. C. Wolff. 2006b.** 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 24: 3187-205.
- Sorenson, W. G., D. G. Frazer, B. B. Jarvis, J. Simpson, and V. A. Robinson. 1987.** Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 53: 1370-5.
- Steele, C., R. R. Rapaka, A. Metz, S. M. Pop, D. L. Williams, S. Gordon, J. K. Kolls, and G. D. Brown. 2005.** The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 1: e42.
- Steinbach, W. J., J. L. Reedy, R. A. Cramer, Jr., J. R. Perfect, and J. Heitman. 2007.** Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol* 5: 418-30.
- Steinbach, W. J., D. K. Benjamin, Jr., S. A. Trasi, J. L. Miller, W. A. Schell, A. K. Zaas, W. M. Foster, and J. R. Perfect. 2004.** Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 42: 417-25.
- Steinman, R. M., and J. Banchereau. 2007.** Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419-26.
- Stephens-Romero, S. D., A. J. Mednick, and M. Feldmesser. 2005.** The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun* 73: 114-25.

- Stevens, D. A., R. B. Moss, V. P. Kurup, A. P. Knutsen, P. Greenberger, M. A. Judson, D. W. Denning, R. Cramer, A. S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish, and G. Mastella. 2003.** Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 37 Suppl 3: S225-64.
- Stordeur, P., L. F. Poulin, L. Craciun, L. Zhou, L. Schandene, A. de Lavareille, S. Goriely, and M. Goldman. 2002.** Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods* 259: 55-64.
- Studer, S. M., and N. Kaminski. 2007.** Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 4: 85-91.
- Suga, M., H. Yamasaki, K. Nakagawa, H. Kohrogi, and M. Ando. 1997.** Mechanisms accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 14: 131-8.
- Sullivan, K. M., C. A. Dykewicz, D. L. Longworth, M. Boeckh, L. R. Baden, R. H. Rubin, and K. A. Sepkowitz. 2001.** Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, and American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 392-421.
- Tai, H., M. Tam, H. Chou, H. Peng, S. Su, D. Perng, and H. Shen. 2006.** Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* 61: 382-388.
- Takizawa, H., K. Ohta, K. Hirai, Y. Misaki, T. Horiuchi, N. Kobayashi, J. Shiga, and T. Miyamoto. 1989.** Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. A study with mast-cell-deficient mice. *J Immunol* 143: 1982-8.
- Tang, C. M., J. Cohen, T. Krausz, S. Van Noorden, and D. W. Holden. 1993.** The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 61: 1650-6.
- Tansho, S., S. Abe, H. Ishibashi, S. Torii, H. Otani, Y. Ono, and H. Yamaguchi. 2006.** Efficacy of intravenous itraconazole against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *J Infect Chemother* 12: 355-62.
- Tao, B. G., Y. E. Shen, G. X. Chen, A. L. Wu, Z. R. Hong, J. W. Yuan, B. C. Chen, and X. Q. Gu. 1988.** An epidemiological study on farmer's lung among hay grinders in Dafeng County. *Biomed Environ Sci* 1: 13-8.
- Taverna, S., A. Flugy, P. Colomba, M. Barraza, G. De Leo, and R. Alessandro. 2008.** Effects of *Parietaria judaica* pollen extract on human microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 644-9.
- te Dorsthorst, D. T., P. E. Verweij, J. F. Meis, and J. W. Mouton. 2005.** Efficacy and pharmacodynamics of flucytosine monotherapy in a nonneutropenic murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4220-6.
- Terho, E. 1986.** Diagnosis criteria for farmer's lung disease. *Am J Ind Med* 10: 329.
- Terho, E. O., O. P. Heinonen, and S. Lammi. 1983.** Incidence of farmer's lung leading to hospitalization and its relation to meteorological observations in Finland. *Acta Med Scand* 213: 295-8.
- Terho, E. O., O. P. Heinonen, S. Lammi, and V. Laukkanen. 1987.** Incidence of clinically confirmed farmer's lung in Finland and its relation to meteorological factors. *Eur J Respir Dis Suppl* 152: 47-56.
- Thorne, P. S., A. Adamcukova-Dodd, K. M. Kelly, E. O'Neill M, and C. Duchaine. 2006.** Metalworking fluid with mycobacteria and endotoxin induces hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 759-68.

- Tomee, J. F., A. T. Wierenga, P. S. Hiemstra, and H. K. Kauffman. 1997.** Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 176: 300-3.
- Tremblay, G., S. Thibault, and Y. Cormier. 1991.** Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by alveolar macrophages in experimental allergic alveolitis. *Microbiol Immunol* 35: 147-55.
- Trentin, L., N. Migone, R. Zambello, P. F. di Celle, F. Aina, C. Feruglio, P. Bulian, M. Masciarelli, C. Agostini, A. Cipriani, and et al. 1990.** Mechanisms accounting for lymphocytic alveolitis in hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 145: 2147-54.
- Ullmann, A. J., J. H. Lipton, D. H. Vesole, P. Chandrasekar, A. Langston, S. R. Tarantolo, H. Greinix, W. Morais de Azevedo, V. Reddy, N. Boparai, L. Pedicone, H. Patino, and S. Durrant. 2007.** Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 356: 335-47.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Vandewoude, K. H., S. I. Blot, P. Depuydt, D. Benoit, W. Temmerman, F. Colardyn, and D. Vogelaers. 2006.** Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care* 10: R31.
- Vasconcelos, J. F., M. M. Teixeira, J. M. Barbosa-Filho, A. S. Lucio, J. R. Almeida, L. P. de Queiroz, R. Ribeiro-Dos-Santos, and M. B. Soares. 2008.** The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol* 8: 1216-21.
- von Bernuth, H., C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C. L. Ku, M. Chrabieh, I. B. Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Arostegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yague, J. Anton, M. Pascal, H. H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B. Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Marodi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel, and J. L. Casanova. 2008.** Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321: 691-6.
- von Garnier, C., and L. P. Nicod. 2009.** Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss Med Wkly* 139: 186-92.
- Walsh, T. J., E. Roilides, K. Cortez, S. Kottlil, J. Bailey, and C. A. Lyman. 2005.** Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 43: S165-172.
- Walsh, T. J., E. J. Anaissie, D. W. Denning, R. Herbrecht, D. P. Kontoyiannis, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J. A. van Burik, J. R. Wingard, and T. F. Patterson. 2008.** Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46: 327-60.
- Wang, J. E., A. Warris, E. A. Ellingsen, P. F. Jorgensen, T. H. Flo, T. Espevik, R. Solberg, P. E. Verweij, and A. O. Aasen. 2001.** Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 69: 2402-6.
- Wasylnka, J. A., and M. M. Moore. 2002.** Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun* 70: 3156-63.
- Werner, J. L., A. E. Metz, D. Horn, T. R. Schoeb, M. M. Hewitt, L. M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G. D. Brown, and C. Steele. 2009.** Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* 182: 4938-46.
- Wiederhold, N. P., D. P. Kontoyiannis, J. Chi, R. A. Prince, V. H. Tam, and R. E. Lewis. 2004.** Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 190: 1464-71.

- Wiederhold, N. P., L. K. Najvar, A. C. Vallor, W. R. Kirkpatrick, R. Bocanegra, D. Molina, M. Olivo, J. R. Graybill, and T. F. Patterson. 2008.** Assessment of serum (1->3)-beta-D-glucan concentration as a measure of disease burden in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1176-8.
- Wilson, M. S., E. Enekave, M. M. Mentink-Kane, M. G. Hodges, J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, R. W. Thompson, M. Kamanaka, R. A. Flavell, A. Keane-Myers, A. W. Cheever, and T. A. Wynn. 2007.** IL-13 $\alpha$ 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117: 2941-51.
- Wu, R., E. Nolan, and C. Turner. 1985.** Expression of tracheal differentiated functions in serum-free hormone-supplemented medium. *J Cell Physiol* 125: 167-81.
- Xing, Z., M. Jordana, H. Kirpalani, K. E. Driscoll, T. J. Schall, and J. Gauldie. 1994.** Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 148-53.
- Yamaguchi, E., A. Itoh, K. Furuya, H. Miyamoto, S. Abe, and Y. Kawakami. 1993.** Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 103: 479-83.
- Yang, J., Q. Lu, W. Liu, Z. Wan, X. Wang, and R. Li. 2009.** Cyclophosphamide reduces dectin-1 expression in the lungs of naive and *Aspergillus fumigatus*-infected mice. *Med Mycol*: 1-7.
- Yang, Z., S. M. Jaeckisch, and C. G. Mitchell. 2000.** Enhanced binding of *Aspergillus fumigatus* spores to A549 epithelial cells and extracellular matrix proteins by a component from the spore surface and inhibition by rat lung lavage fluid. *Thorax* 55: 579-84.
- Yoakum, G. H., J. F. Lechner, E. W. Gabrielson, B. E. Korba, L. Malan-Shibley, J. C. Willey, M. G. Valerio, A. M. Shamsuddin, B. F. Trump, and C. C. Harris. 1985.** Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* 227: 1174-9.
- Zaas, A. K., G. Liao, J. W. Chien, C. Weinberg, D. Shore, S. S. Giles, K. A. Marr, J. Usuka, L. H. Burch, L. Perera, J. R. Perfect, G. Peltz, and D. A. Schwartz. 2008.** Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS Genet* 4: e1000101.
- Zarembek, K. A., J. A. Sugui, Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung, and J. I. Gallin. 2007.** Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol* 178: 6367-73.
- Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein, M. Kopf, and L. Romani. 2007.** IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 37: 2695-706.
- Zhang, Z., R. Liu, J. A. Noordhoek, and H. F. Kauffman. 2005.** Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect* 51: 375-82.

**« Etude des interactions initiales entre moisissures et cellules épithéliales respiratoires dans les pathologies fongiques infectieuses (aspergillose invasive) et immuno-allergique (pneumopathie d'hypersensibilité). »**

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquitaires présents dans l'environnement qui peuvent être responsable de pathologies fongiques caractérisées par des manifestations cliniques variées. Les mécanismes de défense immunitaire contre les agents fongiques sont nombreux, allant de mécanismes protecteurs, mis en jeu immédiatement (immunité innée) à des mécanismes adaptatifs sophistiqués qui sont induits spécifiquement pendant l'infection (immunité adaptative cellulaire).

Ce travail comporte une partie bibliographique sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu en cas d'infection (exemple de l'aspergillose invasive) et en cas de réaction d'hypersensibilité (exemple de la maladie du Poumon de Fermier) et sur les outils (modèles cellulaires et techniques analytiques) permettant d'étudier ces mécanismes physiopathologiques. Dans les travaux de recherche, nous nous sommes intéressés au rôle de l'épithélium respiratoire, première ligne de défense de l'hôte lors de l'inhalation d'agents fongiques, dans deux situations, l'une aboutissant à un mécanisme infectieux, l'aspergillose invasive, et l'autre à une réponse d'hypersensibilité retardée avec dépôts d'immuns complexes, la maladie du Poumon de Fermier.

L'étude de la réponse initiale des cellules épithéliales pulmonaires, première barrière de défense de l'organisme, nous a permis de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu en réponse à l'inhalation de différents allergènes. Ainsi, le rôle de la germination des conidies dans le développement de la réaction inflammatoire au cours de l'aspergillose a pu être établi et de nouveaux arguments en faveur du rôle pathogène des moisissures dans le Poumon de Fermier ont été acquis, en particulier pour *A. corymbifera*, alors que pour cette maladie, seul *S. rectivirgula*, actinomycète thermophile, est retenu comme agent étiologique depuis des années. Par ailleurs, le travail effectué avec les fractions protéiques purifiées d'*E. amstelodami* a mis en évidence un rôle prépondérant des protéines de la forme filament dans la réponse inflammatoire initiale.

Afin d'approfondir les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et d'étudier le rôle des moisissures dans le recrutement lymphocytaire, nous avons comme projet d'utiliser à présent les cellules dendritiques. Ces cellules sont obtenues après traitement par facteurs de croissance de monocytes sanguins prélevés chez des sujets sains (voire même dans un deuxième temps chez des agriculteurs malades). Plusieurs études rapportent l'intérêt des cellules dendritiques, qui sont spécialisées dans la reconnaissance, le traitement et la présentation des antigènes, et qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'immunité innée et adaptative. De ce fait, les travaux futurs utilisant ce type cellulaire devraient être riches en informations et permettre de compléter les données obtenues concernant la première étape initiale épithéliale.