

Université de Franche-Comté
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques
Ecole Doctorale « Environnement, Santé »

Année 2013

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 octobre 2013

Par

Coralie BARRERA

**Optimisation du diagnostic sérologique des pneumopathies
d'hypersensibilité par le développement d'antigènes recombinants
spécifiques de micro-organismes de l'environnement.**

Directeur de thèse : Pr Laurence MILLON

Co-Direction : Dr Rognon Bénédicte, Dr Roussel Sandrine

UMR6249 CNRS/UFC Chrono-environnement

Jury

Dr Laurence DELHAES
Pr Raymond ROBERT
Pr Michel MONOD
Pr Philippe BONNIAUD
Pr Jean-Charles DALPHIN
Pr Laurence MILLON

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

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

Mes premiers remerciements s'adressent, d'abord, à ma directrice de thèse, le Professeur Laurence Millon, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu aboutir. Je lui suis reconnaissante de m'avoir offert cette opportunité d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Je voudrais la remercier pour son encadrement, pour ses conseils scientifiques avisés et ses nombreux encouragements. Je félicite aussi sa diplomatie et son humanité, son soutien et sa confiance qu'elle m'a témoignée durant toutes ces années me permettant de réaliser mes travaux en toute autonomie.

Je remercie avec une profonde gratitude le Docteur Gabriel Reboux pour ses conseils scientifiques toujours pertinents et pour son aide précieuse dans la rédaction des articles. Merci de m'avoir fait confiance en me permettant de réaliser certains « travaux parallèles ».

Je tiens à exprimer une profonde reconnaissance au Docteur Bénédicte Rognon pour m'avoir formé à (presque) toutes les techniques que je maîtrise désormais. Merci encore pour tous tes conseils précieux au quotidien dans les différents méandres de la biologie moléculaire... pour ta disponibilité et ton amitié. Je te remercie aussi pour avoir pris du temps pour relire ce travail.

Merci au Docteur Sandrine Roussel avec qui ce travail a débuté en master 2, merci pour tes conseils et ton aide. Merci au reste de l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, le Docteur Frédérique Grenouillet pour ses remarques pertinentes en réunion, et merci au Docteur Anne-Pauline Bellanger pour tous les services rendus, au Docteur Emeline Didier-Scherer et à toutes les techniciennes pour leur accueil et leur sympathie. Je désire effectuer un remerciement tout particulier à Marie-Pierre Faivre qui a réalisé un certain nombre d'ELISA pour moi et ceci toujours dans la meilleure humeur, à Isabelle Vieil pour son aide en microbio et à Karine Humbert pour son doigté exceptionnel pour les électrosynérèses.

Je remercie également le Professeur Jean-Charles Dalphin et le Docteur Bruno Degano pour leur accueil dans leur service lors des recrutements de patients, ainsi que tous mes interlocuteurs, médecins, ARC et infirmiers des autres centres et tous les patients que j'ai croisés, qui, malgré leur santé étaient toujours très avenants et obligeants.

Je remercie également le Professeur Michel Monod, du Laboratoire de Dermatologie du CHU de Lausanne, pour m'avoir permis de réaliser un stage au sein de son équipe et ainsi me perfectionner dans le développement des antigènes recombinants. Je voudrais également le remercier pour tous ses conseils scientifiques et ses nombreuses corrections et relectures d'articles et enfin d'avoir accepté d'être le président de ce jury de thèse.

C'est avec grand plaisir que je remercie le Professeur Raymond Robert et le Docteur Laurence Delhaes, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner ce travail et le Professeur Philippe Bonniaud pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Ma gratitude s'adresse aussi à ceux qui tour à tour ont été mes camarades, mes collègues et amis de bureau. Merci à Barbara pour son intérêt, son soutien et son amitié sans faille depuis notre première année de fac. Merci à Mallory pour m'avoir formé sur l'ELISA. Merci à Steffi pour son aide sur les statistiques et parfois la microbio, et bien d'autres choses encore... Merci à Audrey, ma « coloc' » de bureau, pour son soutien, ses encouragements, sa générosité et son amitié. Merci à Alexandre pour les petites « pauses couloirs » qui s'imposaient parfois. Merci à Jenny et à Benoît pour leur aide dans la relecture de cette thèse. Merci aux étudiants de Bactériologie Sophie, Cédric, Charlotte, Aurélie et tous les stagiaires (Pauline, Adeline,...) pour leur soutien, leurs conseils et surtout leur bonne humeur ! Merci à tous pour nos conversations, débats sans tabou et fou rire à la pause du midi. Encore merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie également les dirigeants de l'UMR chrono-environnement d'avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à la réussite de cette thèse, je pense notamment au service informatique rapide et compétent car de nos jours un mauvais équipement informatique serait une entrave considérable au bon déroulement de la thèse. Je remercie le comité scientifique de la ville de Besançon d'avoir retenu mon projet pour me permettre de réaliser cette thèse. Et merci aux dames de l'AFFDU pour m'avoir récompensé mais aussi de leur intérêt pour ce travail et de leur gentillesse.

A mon Poune, ma Moune, Amande, Angel, Didi, Raph, Mimi, Lulu, Léona et mon Mianou et tous les tatas, tontons, cousines, cousins et Mamie pour leur intérêt qu'ils ont porté à cette thèse tout au long de ces quatre années et de leur soutien et pour contribuer à faire de ma vie ce qu'elle est, vous formez une famille exceptionnelle ! Je remercie mes parents pour m'avoir permis de réaliser ces études et m'avoir donné le goût de la curiosité. Je remercie mon cher et tendre qui me supporte depuis plus de 11 ans maintenant et sans qui je ne serais jamais arrivée jusque-là, c'est grâce à ces grandes journées passées ensemble à réviser à la BU que j'ai pu aboutir à cette thèse, merci de m'avoir soutenu même malgré toi, et de m'avoir aidé à développer mon esprit critique !

A Romain, Maxim, Anne-Charlotte et Anne-Laure mes amis de toujours pour leur soutien et pour leur amitié. Et à tous les autres, Caroline, Amandine, Jennifer, Solenne...

A tous ceux qui ont choisi des études longues, ce mémoire de thèse montre qu'on peut arriver jusqu'au bout ! A ceux qui restent encore dans le circuit, courage on sera bientôt tous diplômés !

Merci à mon petit compagnon à quatre pattes qui était toujours à mes côtés pendant les longues journées de rédaction, c'est un soutien moral sans équivalent.

Je terminerai par une citation de Miguel Zamacoïs, pour toutes les personnes rencontrées lors de mes neuf années d'études et qui ont plaisantées sur mon accent :

*« Avoir l'accent enfin, c'est, chaque fois qu'on cause,
Parler de son pays en parlant d'autre chose !... »*

Liste des publications

- **Barrera C.**, Reboux G., Warfolomeow I., Rognon B., Millon L., Roussel S. External validation of recombinant antigens for serodiagnosis of Machine Operator's lung. *American Journal of Industrial Medicine*, accepté.
- **Barrera C.**, Millon L., Rognon B., Quadroni M., Roussel S., Dalphin J.C., Court-Fortune I., Caillaud D., Jouneau S., Fellrath J.M., Zaugg C., Monod M., Reboux G. Immunoreactive proteins of *Saccharopolyspora rectivirgula* for Farmer's Lung serodiagnosis. Soumis à *International Journal of Medical Microbiology*.
- Reboux G., **Barrera C.**, Millon L. Fiche technique: Immunodiagnostic des pneumopathies d'hypersensibilité, Soumis à *Revue des Maladies Respiratoires*
- Roussel S, Rognon B, **Barrera C.**, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, Thaon I, Dalphin J-C, Tillie-Leblond I, Quadroni M, Monod M, Millon L. Immuno-reactive proteins from *mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. *International Journal of Medical Microbiology* 2011;301:150-156.
- Millon L, Roussel S, Rognon B, Quadroni M, Salamin K, Reboux G, **Barrera C.**, Fellrath JM, Aubert JD, Dalphin JC, Monod M. *Aspergillus* species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012. 130(3):803-805.
- Millon L., Reboux G., **Barrera C.**, Rognon B., Roussel S., Monod M. Immunoproteomics for serological diagnosis of hypersensitivity pneumonitis caused by environmental microorganisms. *Current protein and peptides science*, Accepté.
- Paris C., Herin F., Reboux G., Penven E., **Barrera C.**, Poussel C., Guidat C., Thaon I. Working with argan cake: a new etiology of hypersensitivity pneumonitis. Soumis à *Chest*
- Rognon B., **Barrera C.**, Millon L., Quadroni M., Roussel S., Reboux G., Monod M. IgG specific to *Lichtheimia corymbifera* recombinant antigens for farmer's lung diagnosis. En préparation

Communications orales et affichées

- **Barrera C.**, Millon L., Reboux G., Rognon B., Roussel S., Quadroni M., Dalphin JC, Monod M. New enzyme linked immunosorbent assay using recombinant antigens from *Saccharopolyspora rectivirgula* for Farmer's Lung Disease serodiagnosis. Poster, European Respiratory Society, Vienna, Austria, September 2012.
- **Barrera C.**, Rognon B., Monod M., Reboux G., Roussel S., and Millon L. Diagnostic de la maladie du Poumon de Fermier : utilisation d'antigènes recombinants issus de micro-organismes de l'environnement. Poster, Workshop : Interactions des micro-organismes avec leurs environnements : circulation, adaptation. Dijon 6-7 juin 2012.
- **Barrera C.**, Rognon B., Monod M., Reboux G., Roussel S., Quadroni M., Potts A., Dalphin J.C., Millon L. Analyse protéomique des extraits antigéniques de *Saccharopolyspora rectivirgula* : intérêt pour le diagnostic de la maladie du poumon de fermier. Communication orale, Congrès de la société française de mycologie médicale, Angers 19-20 Mai 2010.
- **Barrera C.**, Rognon B., Monod M., Reboux G., Roussel S., Quadroni M., Potts A., Dalphin J.C., Millon L. Analyse protéomique des extraits antigéniques de *Saccharopolyspora rectivirgula* : intérêt pour le diagnostic de la maladie du poumon de fermier. Communication orale, Forum des jeunes chercheurs, Besançon Mai 2010.
- **Barrera C.**, Rognon B., Monod M., Reboux G., Roussel S., Quadroni M., Potts A., Dalphin J.C., Millon L. Analyse protéomique des extraits antigéniques de *Saccharopolyspora rectivirgula* : intérêt pour le diagnostic de la maladie du poumon de fermier. Communication orale, Société de biologie de Besançon. Décembre 2010.

Liste des figures et des tableaux

Figures

- Figure 1 : Coupe de tomodynamométrie thoracique chez un porteur de PHS. Aspect typique d'opacités en verre dépoli (Source : (Deschênes et al.) (2012)) 26
- Figure 2 : Exemple d'une bande d'électrosynérèse sur acétate de cellulose..... 29
- Figure 3 : Schéma de la dynamique et de l'évolution possible des PHS, inspiré de (Bourke et al., 2001)..... 35
- Figure 4 : Fluide de coupe projeté sur une pièce métallique en cours d'usinage. (Source : J.B. Murat©)..... 36
- Figure 5 : Observation de *M. immunogenum* en microscopie optique coloration de Gram, objectif x 100 (Source : J.B. Murat©)..... 41
- Figure 6 : Colonies de *M. immunogenum* sur milieu gélosé Mueller-Hinton, incubation à 30°C pendant 12 jours (Source : J.B. Murat©) 41
- Figure 7 : Distribution du foin aux vaches en stabulation, tâche soulevant beaucoup de poussière et à risque pour le PDF (Source : M. Vacheyrou©)..... 48
- Figure 8 : Principaux micro-organismes impliqués dans le PDF en Franche-Comté. A : *Lichtheimia corymbifera* (L.c.) sur milieu DG18 à 30°C. B : *Aspergillus* du groupe *glaucus* et *Wallemia sebi* (W.s.) sur milieu malt-sel à 20°C. C : *Saccharopolyspora rectivirgula* (S.r.), *Saccharomonopsora viridis* (S.v.) et *Thermoactinomyces vulgaris* (T.v.) sur milieu R8 à 52°C. 52
- Figure 9 : Schéma récapitulatif des grandes étapes de l'approche immunoprotéomique dans le but de l'optimisation du diagnostic des PHS 68
- Figure 10 : Exemple de spectre de masse obtenu avec une analyse par la technologie LC-MS/MS. 69
- Figure 11 : Schéma récapitulatif des étapes menant à la production d'antigènes recombinants. Les étapes de Mini et Midi préparation d'ADN sont des étapes d'extraction du plasmide 71
- Figure 12 : Représentation schématique et simplifiée du plasmide pET11a-H6. 76
- Figure 13 : Schéma du principe du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)..... 95
- Figure 14 : Exemple d'une courbe ROC 96
- Figure 15 : Western blot avec les antigènes purifiés de *S. rectivirgula*: 28 sérums de cas de PDF (en haut) et 29 sérums de témoins exposés asymptomatiques (en bas) ont été

incubés avec des bandelettes de nitrocellulose. Chaque lot de membrane de nitrocellulose est testé avec un sérum de malade (PBHS1) et un sérum de témoin (TEA2).....	126
Figure 16 : Schéma du principe du test DELFIA® (Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunsorbent Assay).....	180
Figure 17: Corrélation entre le nombre d'arcs obtenu en électrosynérèse pour les antigènes de <i>S. rectivirgula</i> et le score obtenu pour la combinaison des trois antigènes recombinants SR1FA, SR17 et SR22.	183
Figure 18 : Index moyens en IgG spécifiques et résultats de l'analyse statistique en courbe ROC pour les cinq espèces testées : <i>S. rectivirgula</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>E. amstelodami</i> , <i>L. corymbifera</i> et <i>W. sebi</i>	184
Figure 19 : Index moyens en IgA spécifiques et résultats de l'analyse statistique en courbe ROC pour les quatre espèces testées : <i>S. rectivirgula</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>E. amstelodami</i> , <i>L. corymbifera</i>	185
<u>Tableaux</u>	
Tableau 1 : Liste des publications ayant identifiées et caractérisées les antigènes de <i>S. rectivirgula</i>	59
Tableau 2 : Référence de seuils de contamination.	78
Tableau 3 : Amorces permettant d'amplifier les gènes d'intérêts de <i>S. rectivirgula</i>	87
Tableau 4 : Amorces permettant d'amplifier les gènes d'intérêt de <i>M. immunogenum</i>	88
Tableau 5 : Résultats obtenus pour les deux techniques : électrosynérèse sur acétate de cellulose et ELISA	112
Tableau 6 : Répartition des fermes étudiées en fonction du type d'agriculture et du type de ferme.....	121
Tableau 7 : Pourcentage de fermes et d'échantillons présentant les espèces impliquées dans l'étiologie du PDF, et pourcentage de fermes dont au moins un des échantillons de fourrages dépasse le seuil de référence.	122
Tableau 8 : Nombre moyen de colonies pour les espèces retrouvées dans l'ensemble des prélèvements de chaque centre en UFC/g de fourrage.....	123
Tableau 9 : Résultats de l'analyse statistique des ELISA des 17 antigènes recombinants de <i>S. rectivirgula</i>	127
Tableau 10 : Résultats des analyses statistiques des tests ELISA de la 2 ^{ème} étude d'évaluation des antigènes recombinants G6Pi et GLPV avec 43 sérums de PDF et 44 sérums de témoins exposés.....	173
Tableau 11 : Résultats d'électrosynérèse	183

Liste des abréviations

- ABPA : Aspergillose Broncho Pulmonaire Allergique
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AUC : Aire sous la courbe (Area Under the Curve)
- BALISA : Biotin-Avidin Linked ImmunoSorbent Assay
- BCIP : 5-bromo-1-chloro-3-indoyl phosphate
- BET : Bromure d'ethidium
- BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
- BSA: Bovine Serum Albumine
- DD : Double Diffusion
- DELFIA®: Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immuno Assay
- DHD : Dihydrolipoyl déshydrogénase
- DLco : Capacité de diffusion du monoxyde de carbone
- dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates
- DO: Densité optique
- EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
- ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- ES : Electrosynérèse sur acétate de cellulose
- G6Pi : Glucose-6-phosphate isomerase
- GLPV : Glu/Leu/Phe/Val déshydrogénase
- HPLC: High-performance liquid chromatography
- IFA : ImmunoFluorescent Assay
- IgG / IgA / IgE / IgM : Immunoglobuline G / Immunoglobuline A /E/M
- IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- LB: milieu Luria Bertoni
- LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
- NADfd : NAD-dependent formate déshydrogénase
- NBT: Nitroblue tetrazolium chloride
- ORF : Open Reading Frame
- PBS: Phosphate buffered saline
- PCR: Réaction de polymérase en chaîne / *Polymerase chain reaction*
- PDF : Poumon de Fermier
- PDM : Poumon de Mécanicien
- PHS : Pneumopathies d'hypersensibilité
- ROC : *Reicever Operating Characteristics*
- SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
- TBS : Tris buffered Saline
- TEA : Témoins exposés asymptomatiques
- TTB : TBS-Tween-BSA
- UFC : Unité Formant Colonie
- UV : Ultra violet

Table des matières

I. INTRODUCTION	13
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. Définition et généralités sur les PHS	21
1.1. Agents étiologiques.....	21
1.2. Symptômes.....	22
1.3. Physiopathologie.....	23
1.4. Diagnostic.....	25
1.5. Le diagnostic sérologique.....	27
1.5.1. Les tests d'immuno-précipitations.....	28
1.5.2. Les tests immuno-enzymatiques.....	30
1.6. Diagnostic différentiel.....	32
1.7. Le traitement.....	33
1.8. Séquelles et évolution de la maladie.....	34
2. La maladie du poumon de mécanicien	36
2.1. Historique et épidémiologie de la maladie du poumon de mécanicien.....	36
2.2. Les fluides de coupe.....	37
2.3. Les micro-organismes liés aux fluides de coupe.....	38
2.3.1. Les mycobactéries et <i>Mycobacterium immunogenum</i>	40
2.4. Diagnostic et sérologie.....	41
2.5. Moyens de prévention.....	43
3. La maladie du Poumon de Fermier (PDF)	45
3.1. Historique de la maladie du Poumon de Fermier.....	45
3.2. Epidémiologie.....	45
3.2.1. Prévalence.....	45
3.2.2. Population.....	47
3.2.3. Influence du climat et des pratiques agricoles.....	47
3.2.4. Influence de facteurs génétiques.....	49
3.2.5. Autres facteurs influençant la survenue du PDF.....	50
3.2.6. Facteur protecteur.....	50
3.3. Les micro-organismes en cause.....	50
3.3.1. Les étiologies.....	50
3.3.2. <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	53
III. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	61
IV. DEVELOPPEMENT D'ANTIGENES RECOMBINANTS ET MISE AU POINT DE TESTS ELISA STANDARDISES POUR LE DIAGNOSTIC DU PDM ET PDF	65
1. Stratégie	67
1.1. Approche immunoprotéomique.....	69
1.2. Production des antigènes recombinants.....	70
1.3. Développement et évaluation de tests diagnostiques : Recherche d'IgG spécifiques des antigènes recombinants.....	71
2. Patients, matériel et méthodes	72
2.1. Patients.....	72
2.1.1. Préparation et conservation des sérums.....	72
2.1.2. Etudes sur la maladie du poumon de mécanicien.....	72

2.1.3.	Etudes sur la maladie du poumon de fermier	73
2.2.	Matériel	74
2.2.1.	Les milieux de culture	74
2.2.2.	Souches des micro-organismes impliquées dans les PHS	75
2.2.3.	Souches des bactéries pour le clonage.....	75
2.2.4.	Plasmide natif pET-11aH6	76
2.3.	Prélèvements et analyses environnementales.....	77
2.3.1.	Prélèvements des échantillons agricoles	77
2.3.2.	Traitement des échantillons agricoles	77
2.3.3.	Identifications des moisissures.....	77
2.3.4.	Interprétation des résultats.....	78
2.4.	Analyses génomiques.....	79
2.4.1.	Extraction de l'ADN des souches.....	79
2.4.2.	Base de données ADN de <i>M. immunogenum</i>	79
2.4.3.	Base de données ADN de <i>S. rectivirgula</i>	79
2.5.	Analyses protéomiques	81
2.5.1.	Extraction des protéines	81
2.5.2.	Electrophorèse : SDS-PAGE 1D.....	82
2.5.3.	Western Blotting 1 D.....	82
2.5.4.	Electrophorèse : SDS-PAGE 2D.....	83
2.5.5.	Western Blotting 2D.....	84
2.5.6.	Spectrométrie de masse LC-MS/MS.....	85
2.5.7.	Analyses des séquences protéiques	85
2.6.	Production d'antigènes recombinants	86
2.6.1.	Amplification de séquences nucléotidiques par PCR.....	86
2.6.2.	Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	88
2.6.3.	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	89
2.6.4.	Ligature	90
2.6.5.	Transformations bactériennes.....	90
2.6.6.	Isolation du plasmide	92
2.6.7.	Induction à l'IPTG et purification par chromatographie d'affinité sur colonnes de Nickel	93
2.7.	Dosage des IgG spécifiques des antigènes recombinants par ELISA pour le diagnostic des PHS	94
2.7.1.	Antigènes utilisés	94
2.7.2.	Mode opératoire de l'ELISA	94
2.8.	Traitement des résultats et analyse statistique.....	96
2.8.1.	Evaluation de l'efficacité de l'ELISA par analyse en courbe ROC.....	96
2.8.2.	Traitements des résultats bruts	97
3.	Résultats	99
3.1.	Développement de tests sérologiques pour le diagnostic de la maladie du poumon de mécanicien..	99
3.1.1.	Protéines immuno-réactives issues de <i>M. immunogenum</i> utiles au sérodiagnostic de la maladie du poumon de mécanicien	99
3.1.2.	Validation des antigènes recombinants pour le diagnostic de la maladie du poumon de mécanicien	111
3.2.	Développement de tests sérologiques pour le diagnostic de la maladie du poumon de fermier	121
3.2.1.	Analyses microbiologiques des fourrages	121
3.2.2.	Identification des protéines immuno-réactives spécifiques de <i>S. rectivirgula</i> pour le développement d'antigènes recombinants et mise au point d'un test ELISA standardisé.....	124
3.2.3.	Contribution à l'identification des protéines immuno-réactives spécifiques d' <i>Aspergillus</i> pour le développement d'antigènes recombinants et mise au point d'un test ELISA standardisé.....	161
3.2.4.	Evaluation des antigènes recombinants d' <i>Aspergillus fumigatus</i> avec les sérums de la population complète des PDF	173

V. EVALUATION D'AUTRES TESTS SEROLOGIQUES CONTRIBUANT A L'AMELIORATION DU DIAGNOSTIC DU PDF.. 175

1. Patients, matériel et méthodes	177
1.1. Patients	177
1.2. Matériel	177
1.3. Méthodes	177
1.3.1. Recherche de précipitines	177
1.3.2. ELISA IgG et IgA avec des antigènes purifiés et somatiques	178
1.3.3. Calcul de la charge immunitaire	181
1.3.4. Etape d'adaptation technique pour des ELISA de routine	181
1.4. Tests statistiques et traitement des données	182
2. Résultats	183
2.1. Recherche de précipitines	183
2.2. Recherche des IgG spécifiques d'extraits antigéniques purifiés	184
2.3. Recherche des IgA spécifiques d'extraits antigéniques purifiés	184
2.4. Recherche des IgG ₄ spécifiques de <i>S. rectivirgula</i> par test DELFIA®	185
2.5. Charge immunitaire	185
2.6. Adaptation technique pour des ELISA de routine	186

VI. DISCUSSION ET CONCLUSION

1. Analyse environnementale et prévalence des précipitines	189
1.1. L'environnement agricole	189
1.2. L'environnement industriel	192
1.3. Conclusion :	193
2. Caractéristiques des antigènes identifiés	194
2.1. Comparaison aux études antérieures sur <i>S. rectivirgula</i>	194
2.1.1. Antigènes sécrétés vs antigènes totaux purifiés	194
2.1.2. Poids/pH	194
2.1.3. Fonctions enzymatiques	195
2.2. Implication dans d'autres pathologies / facteur de virulence	196
2.2.1. Les hydrolases	196
2.2.2. Les oxydoréductases	197
2.2.3. Les isomérases	199
2.2.4. Les protéines de transport	199
2.2.5. Les lyases	199
2.2.6. Les transférases	200
2.3. Conclusion et perspectives :	200
3. Le diagnostic sérologique utilisant les antigènes recombinants	201
3.1. Conclusion et perspectives	204
4. Autres tests sérologiques contribuant à l'amélioration du diagnostic du PDF	206
4.1. Conclusion et perspectives :	206
5. Conclusion générale	208

VII. BIBLIOGRAPHIE

VIII. ANNEXES

1. Fiche de renseignements pour les prélèvements agricoles	231
2. Etapes préliminaires pour la mise au point de du test ELISA	235
2.1. Choix du type de plaque	235
2.2. Choix des anti- IgG humain	235

I. Introduction

Les pneumopathies d'hypersensibilité ou alvéolites allergiques extrinsèques sont dues à l'inhalation répétée de particules organiques principalement d'origine fongique et bactérienne. Cette maladie est souvent une maladie professionnelle. L'un des critères diagnostiques est réalisé par la recherche d'anticorps sériques précipitants (précipitines), par les méthodes classiques que sont la double diffusion et l'électrosynérèse sur acétate de cellulose. Ces techniques sont performantes en diagnostic de routine, mais leur réalisation n'est pas standardisée, entre autre du fait de l'utilisation d'extraits antigéniques totaux produits dans chaque laboratoire de façon artisanale. L'utilisation d'antigènes recombinants produits de manière standardisée pour la mise au point de technique ELISA, sensible et rapide, dont la lecture automatisée est indépendante de l'opérateur, devrait permettre la standardisation du diagnostic sérologique des PHS.

L'objectif de cette thèse est d'améliorer et de standardiser le diagnostic sérologique des pneumopathies d'hypersensibilité industrielles et agricoles, par la caractérisation des protéines antigéniques des agents étiologiques, puis par la synthèse des antigènes recombinants correspondants, et l'utilisation de ces antigènes standardisés dans un test ELISA. Cette amélioration est importante pour un dépistage fiable et plus rapide de la maladie, afin de mettre en place une meilleure prise en charge des patients.

Ce travail de thèse porte principalement sur deux pneumopathies d'hypersensibilité : la maladie du poumon de fermier (PDF) et la maladie du poumon de mécanicien (PDM).

Le PDF atteint les agriculteurs en contact avec des fourrages moisissus. Historiquement, la première espèce mise en cause a été l'actinomyète *Saccharopolyspora rectivirgula*, mais d'autres espèces fongiques et bactériennes sont impliquées de manière plus ou moins importante selon les pays, les conditions climatiques et les pratiques agricoles.

Le PDM atteint les ouvriers de l'industrie métallurgique manipulant des pièces métalliques immergées dans un fluide de coupe (ou huile de coupe) contaminé par différents micro-organismes mais principalement par une mycobactérie non tuberculeuse, *Mycobacterium immunogenum*.

Durant les 5 dernières années, trois types d'agents étiologiques des PHS ont été étudiés dans le laboratoire de Mycologie de l'UMR ChronoEnvironnement: une mycobactérie : *Mycobacterium immunogenum* ; un actinomyète, *Saccharopolyspora rectivirgula* ; et deux moisissures : une du genre *Aspergillus* (*Eurotium amstelodami*), et une mucorale (*Lichtheimia*

(*ex Absidia*) *corymbifera*). Le travail de thèse présenté dans ce mémoire, initié en master 2, a porté essentiellement sur la caractérisation des antigènes de *M. immunogenum*, l'agent étiologique du PDM et de l'actinomycète *S. rectivirgula*, l'agent étiologique reconnu du PDF. Il a abouti au développement de 5 antigènes recombinants spécifiques de *M. immunogenum* et 17 antigènes recombinants spécifiques de *S. rectivirgula*. Le travail de thèse inclut également l'évaluation des performances diagnostiques des tests ELISA utilisant ces antigènes recombinants, dans le cadre de protocoles de recherche clinique incluant des patients atteints de PDF et de PDM et des témoins exposés. Les travaux menés sur ces deux bactéries ont également directement contribué au développement d'antigènes recombinants spécifiques des moisissures impliquées dans les PHS, étudiées également dans le laboratoire durant la période de la thèse (*E. amstelodami*, *L. corymbifera*).

Au total des antigènes recombinants spécifiques de ces 4 micro-organismes ont été produits, puis évalués dans le cadre de protocole de recherche clinique :

- *Mycobacterium immunogenum* : 6 antigènes recombinants ont été produits et évalués avec les sérums de 14 patients atteints de PDM et 12 sujets contrôles exposés asymptomatiques (Roussel, Rognon, Barrera et al., 2011), puis une validation externe a été réalisée à l'aide de 10 sérums de patients provenant de trois entreprises allemandes (Barrera, Am J Ind Med en révision)
- *Saccharopolyspora rectivirgula* : 17 antigènes recombinants ont été produits et testés sur un panel de 42 patients PDF, et 43 sujets contrôles exposés asymptomatiques (Barrera et al., soumis Respiratory Research).
- *Aspergillus fumigatus* : 5 antigènes recombinants ont été produits et testés dans une première série comprenant 18 patients PDF, 32 sujets contrôles exposés asymptomatiques, puis dans une deuxième série comprenant le panel complet de 42 patients PDF, et 43 sujets contrôles exposés (Millon et al., 2012).
- *Lichtheimia corymbifera* : les travaux sont en cours, avec l'identification de 60 protéines immunoréactives, et la production au laboratoire de 6 antigènes recombinants actuellement testés avec le panel complet de 42 patients PDF, et 43 sujets contrôles exposés (Rognon, Barrera et al., en préparation).

Dans ce mémoire, après une synthèse bibliographique sur les PHS en général et sur le poumon de mécanicien, puis une description bibliographique plus approfondie du poumon de fermier, la méthodologie et les résultats des expérimentations ayant conduit au développement d'antigènes recombinants et de tests ELISA avec *M. immunogenum* et *S. rectivirgula* seront présentés de façon détaillée. Les expérimentations concernant les antigènes recombinants et tests ELISA d'*Aspergillus* seront présentées plus brièvement. Quelques autres essais contribuant à l'amélioration du diagnostic du PDF, réalisés également au cours de la thèse, sont présentés brièvement à la fin de ce document.

II. Synthèse bibliographique

1. Définition et généralités sur les PHS

Les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) ou alvéolites allergiques extrinsèques sont des syndromes complexes résultants d'une réponse immune exagérée suite à l'inhalation d'un antigène auquel le sujet a préalablement été sensibilisé. Les complexes immuns formés par la combinaison antigènes-anticorps se déposent dans les tissus alvéolaires et ont pour conséquences une inflammation et des lésions tissulaires (Kirchner, 2002). La maladie est caractérisée par l'accumulation de lymphocytes au niveau alvéolaire, la formation de granulome et la fibrose (Selman et al., 2010). Les PHS peuvent être très invalidantes et évoluer vers une insuffisance respiratoire chronique. Il n'existe pas de traitement efficace et la seule option thérapeutique demeure l'éviction antigénique ou la réduction du niveau d'exposition.

Les PHS ne surviennent que chez une petite proportion de personnes exposées, ce qui suggère la mise en jeu d'interactions complexes entre des cofacteurs environnementaux et génétiques (Fink et al., 2005). Les PHS sont des maladies de type allergique dans lesquelles le rôle des facteurs d'exposition est majeur. Ces facteurs de risques environnementaux incluent la concentration en antigène, la durée de l'exposition, la fréquence de l'exposition, la taille des particules, les caractéristiques des particules (capacité à induire la réponse immunitaire), l'utilisation de masques de protection, la variabilité des tâches et la prédisposition génétique. Ces facteurs peuvent influencer la durée de la maladie, sa sévérité, sa prévalence.

1.1. Agents étiologiques

Les antigènes responsables de la survenue des PHS sont des particules d'origine très diverses : micro-organismes, protéines animales, composés chimiques et médicaments. Il semble que les substances antigéniques répondent à certains critères généraux communs : ils doivent être « respirables » donc ne pas dépasser une taille d'environ 3 à 5 microns (de cette manière ils peuvent atteindre les alvéoles), être résistants à l'épuration mucociliaire, être capable de fixer le complément et d'agir comme adjuvant pour induire la réponse immunologique par la production d'IgG (Bourke et al., 2001; Dalphin, 2001). Sur cette base une multitude d'antigènes de nature différente peuvent être impliqués dans les PHS, non seulement des micro-organismes mais aussi des protéines animales, des substances chimiques

ou bien encore des endotoxines (comme c'est le cas dans l'industrie du coton) (Omland, 2002).

Les antigènes les plus souvent en cause sont les protéines aviaires (dont la mucine, une glycoprotéine responsable du Poumon d'éleveurs d'oiseaux, la plus fréquente des PHS (American Thoracic Society, 1998) et les bactéries, notamment les actinomycètes (*Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris* pour le PDF) et les mycobactéries (*Mycobacterium immunogenum* pour le PDM, *M. avium* pour le Poumon du jacuzzi). Les champignons sont aussi fréquemment impliqués, en particulier les mucorales (*L. corumbifera*) et le genre *Aspergillus* (*Aspergillus* du groupe *glaucus* (notamment le stade sexué *Eurotium amstelodami*), *A. fumigatus*, *A. umbrosus*...) dans la maladie du poumon de fermier. Ainsi les alvéolites extrinsèques sont parfois classées dans les aspergilloses d'origine allergique. Cependant un grand nombre d'autres genres de champignons et bactéries peuvent être responsables des mêmes symptômes, dans des situations professionnelles très variées : *Penicillium* pour la maladie des fromagers, *Rhizopus* pour la maladie des scieurs de bois, etc...(Roussel et al., 2006). Un grand nombre de PHS sont des maladies professionnelles (Dalphin, 2003; Roussel et al., 2005a; Roussel et al., 2011). La maladie du poumon de fermier, liée à l'inhalation des micro-organismes présents dans les fourrages, est la 2^{ème} PHS par ordre de fréquence après la maladie du poumon d'éleveurs d'oiseaux (American Thoracic Society, 1998). Mais avec l'évolution du mode de vie et l'augmentation du temps libre, des cas liés à des activités de loisirs commencent à apparaître (aquariophilie, joueur de saxophone, fabrication de mouches pour la pêche, utilisation de jacuzzis ou saunas) (Dalphin, 2003; Dalphin et al., 2009a; Metzger et al., 2010).

En outre, il existe de très nombreuses PHS en fonction de la nature de l'antigène en cause et de nouveaux agents étiologiques sont continuellement découverts (Agache and Rogozea, 2013; Marvisi et al., 2012).

1.2.Symptômes

La présentation clinique des PHS est classiquement classée en 3 formes : aiguë, subaiguë et chronique (Girard et al., 2009b; Richerson et al., 1989).

La **forme aiguë** est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, frissons, myalgies, céphalée, nausée, apparaissant 2 à 9 h après l'exposition. Les symptômes

respiratoires (toux, dyspnée) sont fréquents, mais pas constants. La présence de râles crépitants est constante et leur absence élimine le diagnostic. Les symptômes s'amendent habituellement en quelques jours, mais si l'exposition perdure, les épisodes de récurrence sans phénomène de tolérance ont tendance à s'aggraver avec une altération de l'état général.

La **forme subaiguë** apparaît progressivement en quelques semaines. La dyspnée, la toux et l'altération de l'état général sont au premier plan. La relation avec l'exposition est moins flagrante que dans la forme aiguë, mais les signes s'aggravent souvent au contact antigénique. Les râles crépitants sont constants. L'évolution peut se faire en quelques semaines vers un tableau d'insuffisance respiratoire grave, nécessitant une hospitalisation en urgence.

La **forme chronique** aboutit de façon sournoise, en plusieurs années, à une insuffisance respiratoire chronique, avec toux et dyspnée. La fatigue et la perte de poids sont les symptômes prédominants.

Cette classification en trois formes est ancienne et basée essentiellement sur le mode d'installation du tableau, elle ne reflète pas vraiment des catégories de patients avec des présentations cliniques différentes. Une classification en deux présentations clinico-radiologiques distinctes a été proposée plus récemment (Lacasse et al., 2009):

- **la PHS de type 1** est caractérisée par la récurrence des symptômes généraux (malaise, frisson) apparaissant quelques heures après l'inhalation de l'antigène, et où la radiographie thoracique peut être normale ;
- **la PHS de type 2** fait suite à une exposition prolongée, et on observe plus fréquemment des anomalies gazométriques et fonctionnelles (hypoxémie, trouble ventilatoire restrictif et/ou obstructif) et une fibrose sur les images tomographiques à haute résolution.

1.3. Physiopathologie

Les PHS mettent en jeu des mécanismes immunoallergiques, et l'évènement initial dans la physiopathologie du PDF est la sensibilisation à un antigène inhalé. Après cette première étape de sensibilisation, les expositions suivantes à cet antigène généreront les signes et les symptômes de la maladie, par la mise en jeu de réactions immunitaires cellulaires et humorales :

- Le mécanisme menant aux réactions d'hypersensibilité de type III est initié par l'inhalation répétée d'antigènes menant 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. Ces complexes immuns sont à l'origine de réactions inflammatoires et de la fibrose, par activation du complément, et mise en jeu de cellules effectrices (Male et al., 2007).
- Le mécanisme menant aux réactions d'hypersensibilité de type IV et à la formation de granulomes est dû à la production chronique d'IFN γ (produit par les cellules T activées) et de TNF α (produit par les macrophages et les cellules T activées) du fait de la persistance de l'antigène (Male et al., 2007). La présence de ces cytokines Th1 à taux élevé active les macrophages qui se différencient en cellules épithéloïdes, et fusionnent pour former des cellules géantes.

Après reconnaissance d'un antigène donné, les cellules inflammatoires s'accumulent dans les poumons des patients (Lacasse Y et al., 2004). Le contact avec l'agent étiologique produit initialement un recrutement de polynucléaires neutrophiles au niveau alvéolaire (Ismail et al., 2006). La libération par ces polynucléaires neutrophiles d'IFN γ (impliqué dans la formation du granulome), d'élastase (impliqué dans l'altération de l'élasticité des fibres et développement de l'emphysème), et de radicaux libres oxydants (qui altèrent les tissus et font le lit de la fibrose) est à l'origine des lésions retrouvées dans les formes chroniques de la maladie (Girard et al., 2009b). Puis dans les 24 à 48 heures qui suivent l'exposition antigénique, les lymphocytes apparaissent à un taux élevé qui persiste plusieurs années (Ismail et al., 2006). La lymphocytose alvéolaire est une caractéristique majeure du PDF.

Les macrophages jouent également un rôle important dans la physiopathologie du PDF. Ils sont activés par la fraction C5 du complément à la suite de la fixation des antigènes sur les IgG spécifiques et relarguent alors de multiples médiateurs pro-inflammatoires dont l'IL-8, RANTES, CCL-18, MCP-1 et MIP-1 α , ce qui entretient et amplifie le recrutement et l'activation d'autres macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans les 4 à 6 heures (Fink, 2000; Girard et al., 2009b). Ils produisent aussi des taux élevés de TGF- β , qui en plus d'être une cytokine inflammatoire, induit fortement la synthèse de collagène et la fibrose (Denis and Ghadirian, 1992).

D'autres cellules sont impliquées dans la physiopathologie du PDF comme les cellules NK (Natural Killer, influencent le développement de la réponse immune) et les cellules dendritiques (participent à l'activation des lymphocytes) (Hwang et al., 2006).

1.4. Diagnostic

Le diagnostic des PHS est difficile du fait de la grande variété des manifestations cliniques et de l'absence de test ou de biomarqueur spécifique. Le diagnostic repose donc sur une combinaison de critères clinique, radiologique, fonctionnel, cytologique, histologique et biologique. Un diagnostic reposant sur cinq critères majeurs dont les quatre premiers sont obligatoires, est proposé par Dalphin et ses collaborateurs (Dalphin et al., 2009a):

- Symptômes respiratoires compatibles, et râles crépitants à l'auscultation
- Preuve d'une exposition antigénique: retenue, soit par l'interrogatoire, soit par la présence de précipitines, soit éventuellement par des prélèvements environnementaux.
- Alvéolite lymphocytaire au lavage broncho-alvéolaire.
- Diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DL_{CO}) ou hypoxie (ou désaturation) d'effort.
- Imagerie compatible (radiographie pulmonaire standard ou tomodensitométrie haute résolution).

Le diagnostic est certain devant l'existence des cinq critères ; en l'absence du critère n°5 (imagerie compatible), il est justifié d'obtenir confirmation par un test de provocation positif et/ou des prélèvements histologiques (biopsie). De plus, les opacités observées en imagerie peuvent être différentes selon les formes chronique, aiguë ou subaiguë de la maladie. Dans le cas d'une forme chronique, la fibrose est représentée par des opacités linéaires et irrégulières, une perte de volume lobulaire, un alvéolage (honeycombing) et une bronchiectasie de traction. Pour les autres formes un aspect en verre dépoli peut être observé.



Figure 1 : Coupe de tomodensitométrie thoracique chez un porteur de PHS. Aspect typique d'opacités en verre dépoli (Source : (Deschênes et al.) (2012))

En 2003, Lacasse tend à simplifier le diagnostic par l'utilisation d'un questionnaire d'exposition et propose six critères simples permettant de suspecter une PHS de forme aiguë, subaiguë ou chronique avec une bonne valeur prédictive, et permettant dans un grand nombre de cas d'éviter des explorations invasives (Lacasse et al., 2003):

- l'exposition à un antigène connu pour être pathogène (questionnaire, et/ou investigations environnementales),
- la positivité de la sérologie sanguine vis-à-vis de cet antigène (techniques d'immunoprécipitations : électrosynérèse sur acétate de cellulose, double diffusion),
- la récurrence des symptômes (fièvre, frissons, douleurs diffuses, toux, dyspnée...),
- la survenue des symptômes 4-8 h après l'exposition,
- la présence de râles crépitants à l'auscultation,
- une perte de poids.

À partir de ces critères et de leur poids respectif, un score de probabilité diagnostique peut être calculé et utilisé dans les études épidémiologiques. Le diagnostic de la maladie a une probabilité de 81% lorsque le patient observe 3 des 6 critères cités ci-dessus : des épisodes récurrents de symptômes respiratoires, des râles crépitants et des anticorps spécifiques.

Ces six critères suffisent et une biopsie, n'est pas nécessaire, Lacasse (2003) suggère également que pour les patients ayant des signes cliniques typiques, le lavage broncho-alvéolaire n'est pas indispensable ; ainsi grâce à cette règle les examens invasifs pourraient dans certains cas être évités. L'identification d'une source antigénique est cruciale dans le diagnostic clinique d'une PHS. Le tabagisme doit également être pris en compte, même si le fait de ne pas être fumeur n'est pas un critère de prédiction (Lacasse et al., 2003). En effet, la sensibilité de certains examens médicaux est diminuée chez les patients fumeurs (absence de râles crépitants, spirométrie et scanner non compatible) et le niveau d'anticorps spécifique est significativement plus faible chez un fumeur (Dangman et al., 2004; Fenoglio et al., 2007).

Les prélèvements biopsiques sont peu réalisés en raison du caractère invasif du prélèvement et les aspects histopathologiques ne sont pas spécifiques d'une PHS (granulomatose interstitielle diffuse, pseudo-tuberculoïde, sans nécrose caséuse, associée à un épaississement des cloisons inter-alvéolaires et des tissus bronchiolaires, parfois observation d'infiltration lymphoplasmocytaire, de lésions de vascularite ou de fibrose) (Cormier and Laviolette, 1996; Toubas et al., 1995).

Les tests de provocation sont des tests consistant à faire respirer au patient, des allergènes suspects de provoquer une PHS, puis à mesurer les modifications des débits et volumes respiratoires ou apparition de la fièvre et autres symptômes (Toubas et al., 1995). Ils ne sont plus recommandés pour le diagnostic du PDF, et une rechute lors d'une réexposition à l'agent suspecté dans l'environnement naturel du patient est suffisamment évocatrice d'une PHS et pour beaucoup préférable aux tests de provocation.

1.5.Le diagnostic sérologique

La présence de précipitines sériques et/ou d'anticorps circulants est l'un des critères diagnostiques des PHS. Elle occupe également une place importante dans les études épidémiologiques, en particulier dans la recherche des étiologies (Pepys et al., 1963). Le niveau de précipitines serait même corrélé au niveau d'exposition en moisissures dans l'environnement de travail du patient (Dalphin et al., 1994; Vohlonen et al., 1987). Mais seulement la moitié des agriculteurs ayant des précipitines sont atteints du PDF, la difficulté réside donc dans la différenciation des agriculteurs malades ayant des précipitines et ceux non malades et ayant également des précipitines (Marx et al., 1978). Les techniques sérologiques les plus couramment employées sont la double diffusion en gel d'agarose (test

d'Ouchterlony), l'électrosynérèse sur acétate de cellulose, l'immunoélectrophorèse et la recherche d'immunoglobulines G (IgG) par la technique ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Kurup and Fink, 1977). Plus rarement, des techniques apparentées à l'ELISA (IFA (*Immunofluorescent assay*), BALISA (*Biotin-Avidin-linked immunosorbent assay*)) et le Western blotting sont également utilisés (Aznar et al., 1988; Brummund et al., 1988; Gump et al., 1979; Reboux et al., 2007).

Pour le diagnostic du PDF, la comparaison de quatre techniques immunologiques : le Western blot, la double diffusion, l'électrosynérèse et l'ELISA (recherche d'IgG et d'IgA), a montré que l'électrosynérèse était la technique la mieux adaptée à condition toutefois d'utiliser un panel d'antigènes spécifiques à la région (Fenoglio et al., 2007; Reboux et al., 2007). Cependant, aucune corrélation entre le nombre d'arcs de précipitines obtenus et les critères cliniques comme le pourcentage de lymphocytes au lavage bronchoalvéolaire n'a pu être démontré véritablement (Hébert et al., 1985; Reboux et al., 2001). Même si Larsson et al. ont prouvé une corrélation, elle n'est valable que pour certaines espèces (*Paecilomyces*, *A. fumigatus*, *Penicillium*) (Larsson et al., 1988).

Une autre approche, plus anecdotique, de test sérologique a été évoquée par la mesure du taux d'une enzyme « *Angiotensin-converting* » dans le sérum des patients, dont le taux est anormalement bas, permettant d'établir un diagnostic différentiel entre un PDF et une sarcoïdose (Tewksbury et al., 1981).

1.5.1. Les tests d'immuno-précipitations

Les tests d'immuno-précipitation regroupent la double diffusion en gel d'agarose (DD) et l'électrosynérèse sur acétate de cellulose (ES) recherchant les anticorps sériques précipitants appelés précipitines (arcs de précipitines). Les précipitines sont composées majoritairement d'IgG (Rottoli et al., 1995). Il existe d'autres techniques comme l'ELIEDA (*Enzyme-linked immunoelectrodifussion assay*) ou l'immunoélectrophorèse mais elles sont beaucoup moins répandues dans le diagnostic du PDF.

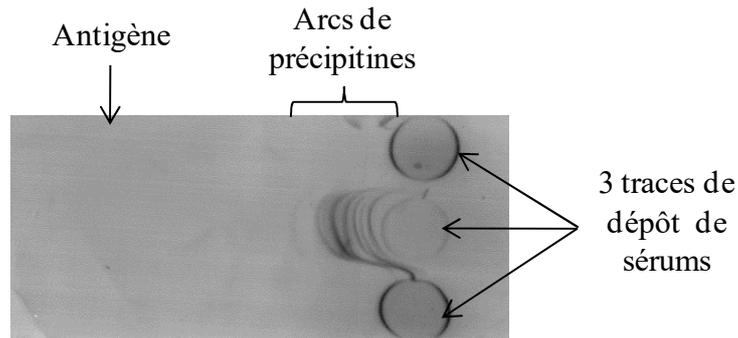


Figure 2 : Exemple d'une bande d'électrosynérèse sur acétate de cellulose.

La DD présente l'avantage d'être simple à utiliser et peu coûteuse. Cependant la durée totale de l'examen est de 5 jours et le nombre d'arcs que l'on peut espérer obtenir est limité (souvent de 1 à 3 arcs), ainsi il est difficile de déterminer un seuil (Reboux et al., 2001; Reboux et al., 2007). L'ES est une variante de la DD, avec une migration active des antigènes et des anticorps dans un champ électrique. Elle est moins répandue dans le diagnostic des PHS (Gari et al., 1982). La comparaison des résultats obtenus avec la DD et l'ES montre que ces deux techniques de révélation des précipitines sont corrélées (Reboux et al., 2001). L'électrosynérèse permet cependant d'obtenir en 4 h un nombre plus important d'arcs (jusqu'à 8 arcs ou plus) que la double diffusion (Reboux et al., 2007). Quant à l'immunoélectrophorèse, elle est très peu utilisée en routine dans le diagnostic du PDF, mais plus courante pour la maladie des poumons d'éleveurs d'oiseaux. La durée totale des opérations est de 5 jours et la technique est très consommatrice de sérum (150 μ l par antigène).

La valeur diagnostique des précipitines est discutée. La sensibilité des tests varie selon les études de 18 à 91%, probablement du fait de la pertinence du panel antigénique utilisé (Husman et al., 1987; Reboux et al., 2007). C'est cependant le nombre de faux positifs qui soulève le plus de critiques et qui a amené certains auteurs à considérer les précipitines comme de simples témoins d'une exposition et non comme des marqueurs de la maladie (Cormier et al., 2004; Gariépy et al., 1989; Katila and Mäntyjärvi, 1987; Khan et al., 1995). C'est pour cette raison que ces techniques sont aussi souvent utilisées pour la recherche des étiologies. Les différences de résultats observées selon les études sont dues à divers facteurs qui relèvent d'une part de la diversité des techniques (température, milieu et temps d'incubation, méthode d'extraction,...) (Melinn and McLaughlin, 1992) et des antigènes utilisés (Katila and Mäntyjärvi, 1987; Reboux et al., 2007); et d'autre part, d'une

méconnaissance de la nature et de la signification précise des précipitines dans les PHS (Aznar et al., 1988). Le nombre de précipitines observées peut varier au cours du temps (Cormier and Bélanger, 1989; Rautalahti et al., 1990). De plus, des réactions non-spécifiques peuvent se produire due à la présence de protéines C-réactives, créant de fausses interprétations, et dans certaines situations une bande blanche peut apparaître autour du puits de sérum rendant la lecture des arcs difficile (Konishi et al., 1985). Afin d'améliorer les tests, le panel antigénique utilisé doit être adapté en fonction des espèces réellement présentes dans la région du patient (Katila and Mäntyjärvi, 1987; Reboux et al., 2007).

1.5.2. Les tests immuno-enzymatiques

De manière simple, les tests immuno-enzymatiques regroupent différentes techniques permettant la détection/quantification d'un antigène ou d'un anticorps par un anticorps secondaire. La technique ELISA, Western blot, BALISA, IFA, DIA (*Dot-immunobinding assay*) en font partie.

Dans les PHS, les tests immuno-enzymatiques ont été testés avec diverses classes et sous-classes d'immunoglobulines, en particulier des IgG, mais aussi IgG₂, IgA, IgM, et IgE (Aznar et al., 1988; Mundt et al., 1996; Mäntyjärvi and Kurup, 1988; Ojanen, 1992). Les classes des IgG et des IgA sont les plus représentatives du PDF, toutefois les IgG sont en réelle abondance dans les sérums des patients (Aznar et al., 1988; Konishi et al., 1985; Patterson et al., 1976; Roberts et al., 1973). Les IgM et les IgE ne permettent pas de discriminer les patients des témoins exposés asymptomatiques (Ojanen, 1992; Rottoli et al., 1995). Pour les patients finlandais, l'optimisation du diagnostic est obtenue par la recherche des IgG spécifiques à *T. vulgaris* et à la recherche d'IgA spécifiques pour l'espèce *A. fumigatus* (Ojanen, 1992). De manière surprenante, des travaux récents sur des patients ayant la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux montrent que le niveau d'IgG₁ et d'IgG₂ est plus élevé chez les personnes exposées asymptomatiques (cependant l'avidité de ces anticorps serait plus importante chez les patients) (Nademi et al., 2013). Les IgG₁ ont aussi été mis en évidence comme marqueur de l'exposition au milieu agricole et les IgG₃ comme étant relié à la maladie du PDF (Stokes et al., 1981).

La technique ELISA est très répandue, elle permet une lecture automatisée, donc indépendante du manipulateur, elle est rapide, reproductible et considérée comme plus sensible que les techniques d'immunoprécipitations (Ando et al., 1991; Bamdad, 1980; De Champs et al., 1997; Hébert et al., 1985; Khan et al., 1995; Konishi et al., 1985; Mäntyjärvi et

al., 1980; Marx and Gray, 1982; Melinn and McLaughlin, 1989; Ojanen et al., 1982) mais moins spécifique (Reboux et al., 2007). Et même si elle nécessite de faire la réaction en duplicat ou en triplicat, elle ne consomme pas beaucoup de sérums (5 μ l maximum pour un antigène) ce qui est un avantage sur les techniques d'immuno-précipitations (Hébert et al., 1985).

La concordance entre les densités optiques (DO) obtenues en ELISA avec des extraits antigéniques totaux et des arcs de précipitines obtenus par les techniques d'immuno-précipitation est discutée, certains auteurs ne mettent pas en évidence de corrélation (De Champs et al., 1997; Khan et al., 1995), tandis que d'autres le peuvent (Bamdad, 1980; Hébert et al., 1985; Ojanen et al., 1982; Ylönen et al., 1989).

L'ELISA semble adapté pour le diagnostic des PDF car le taux d'anticorps dirigés contre les différents agents étiologiques est toujours plus élevé pour les patients que pour les sujets sains exposés ou ayant une autre pathologie (Bamdad, 1980; Brummund et al., 1988; De Champs et al., 1997; Konishi et al., 1985; Mantyjärvi et al., 1980; Ojanen et al., 1980). De plus, la mesure du taux d'anticorps par l'ELISA semble permettre une meilleure corrélation avec les symptômes cliniques que la double diffusion (Bamdad, 1980). La quantité d'IgG dans les cas typiques de PDF semble même être corrélé à la sévérité des symptômes (Aberer et al., 2001).

Cependant, même si beaucoup d'auteurs montrent une différence significative entre les valeurs obtenues en ELISA entre le groupe des PDF et le groupe des exposés asymptomatiques, un seuil permettant de discriminer les deux groupes est difficile à établir, et il faut parfois trouver un compromis pour avoir un couple de valeurs de sensibilité/spécificité optimal (De Champs et al., 1997; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Konishi et al., 1985; Reboux et al., 2007). La définition d'un seuil est rendu difficile par la présence d'IgG chez des personnes exposées asymptomatiques, et par l'existence de variations considérables du taux des IgG au cours d'une même saison et au fil des années (Rautalahti et al., 1990; Reboux et al., 2007). La sensibilité de l'ELISA dépend également des espèces testées et de la préparation de l'extrait (Ojanen et al., 1980; Reboux et al., 2007; Roussel et al., 2010). Il peut exister une différence de sensibilisation des patients pour une même espèce en fonction de l'extrait protéique utilisé : extraits à partir d'hyphes, de conidies ou de cléistothèces du champignon (Kaukonen et al., 1996; Roussel et al., 2010) ou selon différentes souches d'une même espèce (Ylönen et al., 1989). La simplification des extraits protéiques par l'utilisation d'antigènes recombinants ou de peptides synthétiques permet l'amélioration de la sensibilité

et/ou de la spécificité des tests ELISA pour d'autres maladies (Johnson et al., 1992; List et al., 2010; Tsogtbaatar et al., 2008). Certains auteurs montrent néanmoins que la simplification de l'extrait entraîne parfois une perte de sensibilité et qu'un mélange d'extrait total et de protéines recombinantes améliore le test tout en apportant une standardisation relative (Busse et al., 2008). Pour d'autres, il est préférable d'utiliser un résultat cumulé de plusieurs protéines plutôt qu'un mélange (List et al., 2010).

Le Western blot ne permet pas d'établir le diagnostic du PDF, même si certaines bandes paraissent spécifiques de la maladie (Aznar et al., 1988; Reboux et al., 2007). Les autres techniques évoquées restent anecdotiques et peu utilisées pour des techniques de routine diagnostic.

Pour l'optimisation du sérodiagnostic, il apparaît que différents facteurs sont à prendre en compte : un panel d'antigènes adapté aux agents étiologiques potentiels (activité professionnelle ou domestique, région géographique, ...), la technique utilisée (ELISA, ES, DD, etc), le type d'antigène (selon les techniques d'extraction et de production des antigènes), le type d'immunoglobuline ciblée (IgG, sous-classes d'IgG, IgA, ...) (Ojanen, 1992; Ojanen et al., 1982; Reboux et al., 2007; Roussel et al., 2010).

1.6. Diagnostic différentiel

En milieu agricole, devant un syndrome pseudo-grippal récidivant, il convient d'évoquer le diagnostic différentiel du PDF avec l'"Organic Dust Toxic Syndrome", qui associe des signes respiratoires aigus à une fièvre débutant quelques heures après une inhalation massive et inhabituelle de particules organiques (moisissures). Plusieurs éléments distinguent ce syndrome du PDF: un déclenchement des symptômes dès la première exposition (pas de sensibilisation antérieure), un phénomène de tolérance avec une prédominance des symptômes en début d'exposition puis une diminution progressive, l'auscultation et une imagerie normales, un lavage bronchoalvéolaire avec une alvéolite à polynucléaires neutrophiles, et, en général, une absence de précipitines sériques (Thaon et al., 2006). Les principaux diagnostics évoquant un syndrome interstitiel accompagné d'une lymphocytose alvéolaire sont les pneumopathies d'origine virale, la sarcoïdose, la tuberculose miliaire et les lymphangites carcinomateuses (Toubas et al., 1995). Dans le cas d'un PDM, il est souvent évoqué une pneumonie impliquant la prescription d'un traitement antibiotique (Gupta and Rosenman, 2006). La pneumopathie interstitielle diffuse idiopathique peut également être

évoquée devant les symptômes d'une PHS de type chronique, mais peut être différenciée entre autres par la présence de cellules géantes et de granulome à la biopsie (Takemura et al., 2012). Dans ces différents cas, ce n'est que lorsque le syndrome ne répond pas au traitement antibiotique ou que le malade récidive lors de la ré-exposition que le diagnostic d'une PHS peut être évoqué (Toubas et al., 1995). L'enquête environnementale est alors indispensable pour définir la source antigénique (Cormier and Laviolette, 1996).

1.7. Le traitement

La corticothérapie est considérée comme le traitement symptomatique de référence, mais si elle permet une amélioration rapide des valeurs fonctionnelles respiratoires à court terme, elle ne modifie pas le pronostic à plus long terme (Cormier and Desmeules, 1994; Dalphin, 2003; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1997; Monkare and Haahtela, 1987). Les corticoïdes par voie générale sont indiqués dans les formes récentes sévères et hypoxémiantes, à une posologie initiale de 40 à 60 mg par jour. Il a également été suggéré que les corticoïdes en nébulisation pouvaient avoir une certaine efficacité (Ramirez-Venegas et al., 1995). Cependant la 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 DL_{CO}).

Les recherches sur des modèles murins se portent actuellement sur des immuno-régulateurs permettant de moduler la réponse immunitaire et ainsi limiter le granulome et réduire les séquelles pulmonaires (Agache and Rogozea, 2013).

Ainsi, il n'existe pas de traitement réellement efficace et la seule option thérapeutique demeure l'éviction antigénique ou la réduction du niveau d'exposition, d'où l'importance des enquêtes environnementales et du diagnostic sérologique pour identifier les agents étiologiques. Lorsque que le diagnostic est confirmé, les malades peuvent poursuivre leur activité en réaménageant les conditions de travail et/ou en portant un masque de protection respiratoire adapté (Bouchard et al., 1995a; Dalphin et al., 2009b). En pratique, dans le cas d'une PHS agricole, les agriculteurs sont généralement opposés à une reconversion professionnelle et font le choix de poursuivre leur activité. Il a été montré que la modernisation des techniques (mécanisation de tâches, séchage artificiel du foin, etc) permettait une réduction de l'aérocontamination en actinomycètes thermophiles et donc une réduction des symptômes respiratoires (Dalphin, 2003).

1.8.Séquelles et évolution de la maladie

Un épisode de PHS peut évoluer et laisser des séquelles. Pour la maladie du poumon de fermier, il apparaît qu'entre 30 et 65% des patients ayant eu une forme aiguë ou subaiguë restent symptomatiques, même si une amélioration des fonctions pulmonaires est constatée et que les patients retrouvent un résultat de scanner normal (les opacités en verre dépoli sont très rarement ré-observées) (Cormier and Bélanger, 1985; Dalphin, 2001; Malinen et al., 2003). Des épisodes récurrents s'observent chez 40% des patients et peuvent survenir en moyenne 8 ans après le diagnostic (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1997). Les séquelles sont sur le plan clinique une obstruction des voies respiratoires et une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone, se manifestant généralement par de la toux, une dyspnée à l'effort, une expectoration chronique et éventuellement une insuffisance respiratoire (Cormier and Laviolette, 1996; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1997). Pour ces patients, si l'exposition aux antigènes en cause continue, la maladie peut évoluer vers une forme chronique, ou vers une fibrose même si le contact avec les antigènes a cessé (Malinen et al., 2003). Chez les patients ayant eu une forme chronique de PDF ou si les épisodes de PDF sont récurrents, la maladie peut évoluer vers un emphysème, ou moins fréquemment vers une fibrose (Dalphin, 2001; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1997; Lalancette et al., 1993; Malinen et al., 2003). Toutefois le PDF conduit très rarement au décès du patient, seuls quelques cas sont reportés généralement à cause d'une évolution vers une fibrose (Gari et al., 1985; Kokkarinen et al., 1994). Aux Etats-Unis, il a été estimé que seulement 8% des cas de PHS toutes confondues conduisent au décès du patient parmi lesquels 40% concerne le PDF (Bang et al., 2006).

Selon les études entre 22 et 57% des patients atteints de PDF quittent le milieu agricole (Bouchard et al., 1995b; Cormier and Bélanger, 1985; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1997; Katila and Mäntyjärvi, 1987). Les patients continuant leur activité ne montrent pas une symptomatologie plus sévère à long terme que ceux ayant cessé (Cormier and Bélanger, 1985) et la décision d'abandonner le métier d'agriculteur semble résider dans la peur de la maladie et l'opinion de l'entourage et du médecin de famille (Bouchard et al., 1995b).

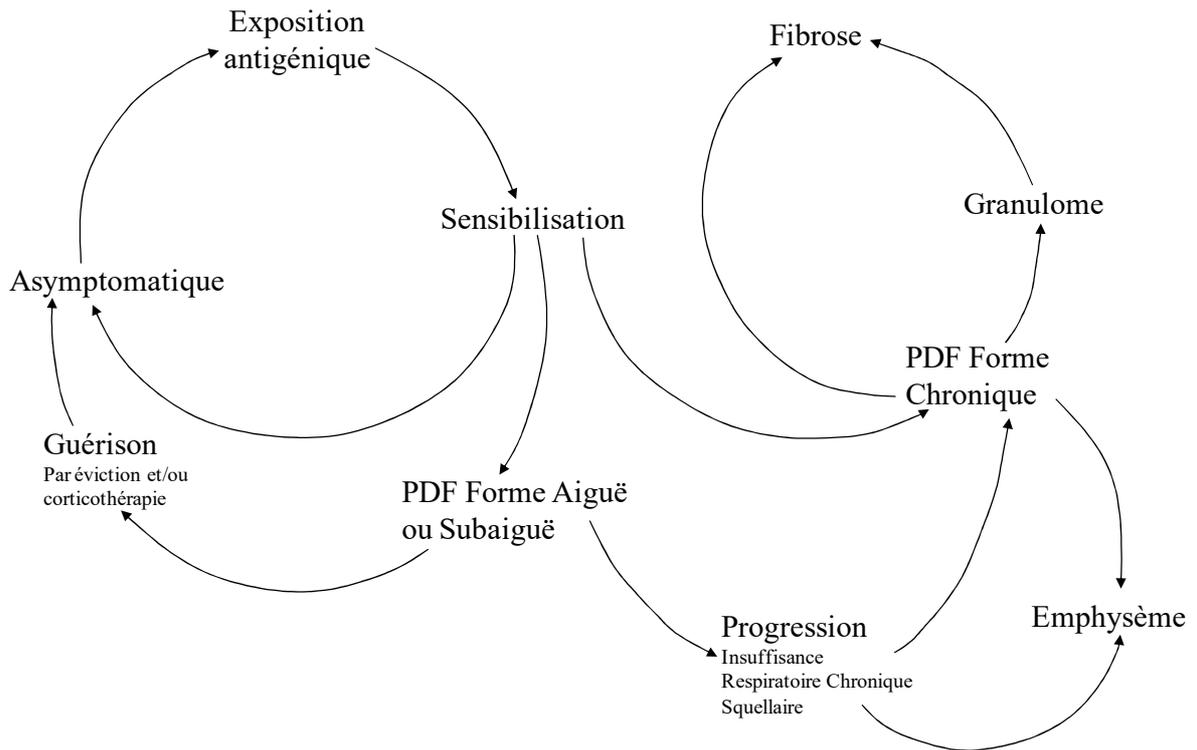


Figure 3 : Schéma de la dynamique et de l'évolution possible des PHS, inspiré de (Bourke et al., 2001).

2. La maladie du poumon de mécanicien

2.1. Historique et épidémiologie de la maladie du poumon de mécanicien

La maladie du poumon de mécanicien (PDM) est une PHS décrite pour la première fois aux Etats-Unis dans les années 1990 (Bernstein et al., 1995; Kreiss and Cox-Ganser, 1997; Muilenberg et al., 1993; Shelton et al., 1999; Zacharisen et al., 1998). Depuis les années 2000 seulement quelques nouveaux cas américains (n=7) (Gupta and Rosenman, 2006) et européens (12 britanniques, 1 espagnole et 13 français) ont été recensés (Dawkins et al., 2006; Sastre et al., 2012; Tillie-Leblond et al., 2011). Elle est liée à l'utilisation de fluides ou huiles de coupe largement employés dans les industries métallurgiques notamment le secteur automobile (Dawkins et al., 2006; Gupta and Rosenman, 2006). Les fluides servent pour le refroidissement et l'usinage des pièces métalliques et pour la lubrification des rouages des machines (Beckett et al., 2005; Falkinham, 2003). L'utilisation de ces fluides entraîne la formation d'un aérosol contenant des micro-organismes, qui peut être inhalé par les professionnels travaillant dans ces secteurs.



Figure 4 : Fluide de coupe projeté sur une pièce métallique en cours d'usinage. (Source : J.B. Murat©).

Quatre-vingt-dix-huit cas de PDM ont été décrit entre 1991 et 1997 dans seulement huit usines du secteur automobile et de sous-traitance (Kreiss and Cox-Ganser, 1997). Les cas de PDM semblent apparaître comme une épidémie due à l'exposition aux fluides de coupe d'une même machine / ou d'une même ligne de production ou encore d'un même bâtiment (Dawkins et al., 2006; Kreiss and Cox-Ganser, 1997). Plus d'un million de travailleurs américains sont exposés aux fluides de coupe (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). En France, l'exposition aux fluides concerne plus de 200 000 personnes selon l'Institut

National de Recherche et de Sécurité (INRS) (Lafontaine, 2002) et des cas groupés de PDM ont été décrits par Tillie-Leblond et ses collaborateurs (Tillie-Leblond et al., 2011). Il semblerait que le nombre de PDM soit sous-estimé à cause d'un diagnostic de pneumonie atypique établi par erreur, en raison de la présentation clinique et radiologique semblable. (Gupta and Rosenman, 2006). De plus, même si le diagnostic de PDM est correctement établi, le médecin ne rapporte pas toujours le cas aux autorités médicales de surveillance (Gupta and Rosenman, 2006). Enfin, il semble que des facteurs génétiques puissent influencer la survenue du PDM comme c'est le cas sur des modèles murins (Gordon et al., 2006).

Le contact avec les fluides de coupe peut également entraîner d'autres pathologies respiratoires comme de l'asthme professionnel, de la bronchite, de la pneumonie et également des irritations cutanées (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Kirchner, 2002; Kreiss and Cox-Ganser, 1997; McDonald et al., 2006). L'effet cancérigène des fluides de coupe est également connu depuis longtemps (cancer de la vessie, de la prostate, des sinus, des poumons, du foie, de l'œsophage, de la peau) (Park, 2012) et récemment il a été montré que le contact répété avec les fluides de coupes peut aussi favoriser le développement de cancer des testicules (Behrens et al., 2012). Ainsi, l'exposition aux fluides de coupe est un problème global qui fait l'objet de recommandations et d'une surveillance accrue (Park, 2012; Passman and Rossmore, 2002).

2.2. Les fluides de coupe

Les fluides de coupe sont utilisés dans les industries métallurgiques pour différentes étapes d'usinage du métal : meulage, perçage, fraisage, etc... Les fluides permettent le refroidissement des pièces, la lubrification pour éviter la corrosion des pièces et évitent les projections métalliques. En fonction du type d'utilisation, des huiles minérales ou des fluides synthétiques seront préférentiellement utilisés, il en existe quatre types : huile entière, huile soluble ou émulsion, semi-synthétique, synthétique. Il est communément admis que le risque de développer des symptômes respiratoires est plus élevé chez les personnes exposées aux fluides solubles et/ou synthétiques que celles exposées à des huiles minérales puisque le risque de contamination microbienne est plus élevé (Bukowski, 2003). Le type de fluide le plus couramment rencontré est l'émulsion ou le fluide semi-synthétique contenant entre 2 et 9% d'huile minérale et de l'eau (Gupta and Rosenman, 2006). Ils contiennent des hydrocarbures (divers dérivés du pétrole), des substances organiques (des acides gras, des

esters, des alcools), et des éléments tels que de l'azote et du phosphore. Des additifs sont ajoutés comme des biocides et des fongicides pour limiter la contamination microbienne et des antirouilles (Selvaraju et al., 2005). Les fluides sont conservés dans des cuves pouvant contenir jusqu'à 190 000 L et les réservoirs sont vidés et nettoyés après plusieurs mois d'utilisation (Gupta and Rosenman, 2006) mais parfois seulement partiellement vidés ce qui favorise le développement de la flore microbienne (Cyprowski et al., 2007).

Des contrôles de la qualité microbienne peuvent être mis en place une fois par semaine (contrôle de l'activité biologique globale, concentration en moisissures, bactéries, contrôle de la concentration en huile et du pH). La méthode traditionnelle de culture sur milieu gélosé ne suffit pas à détecter l'ensemble de la contamination, il est estimé que seulement 1% des bactéries des fluides sont cultivables (Saha and Donofrio, 2012). Des tests de détection des mycobactéries et autres micro-organismes se sont développés ces dernières années afin d'effectuer le contrôle de la contamination, basés principalement sur des méthodes d'amplification de l'ADN (Kapoor and Yadav, 2009; Khan and Yadav, 2004; Rhodes et al., 2008; Rhodes et al., 2011; Saha et al., 2010; Veillette et al., 2008). Une autre méthode appelée « *Fluorescent in situ hybridization* » a également été adaptée pour l'utilisation sur les fluides de coupe permettant de mettre en évidence des espèces ciblées (Saha et al., 2012; Selvaraju et al., 2008a). Des tests généralistes permettant d'évaluer la quantité totale de biofilm ou de micro-organismes dans les fluides ont également été mis au point (Canter, 2009; Trafny et al., 2013).

2.3. Les micro-organismes liés aux fluides de coupe

Les fluides de coupe composés d'hydrocarbures et d'acides gras favorisent la croissance d'une flore microbienne par l'apport d'une source de carbone. Les fluides de coupe contiennent, en moyenne 10^5 CFU/ml de bactéries (allant d'une centaine de CFU/ml à 10^7 CFU/ml) (Cyprowski et al., 2007; Dilger et al., 2005). Le genre *Pseudomonas* représente entre 50% et 100% des bactéries présentes, l'autre part peut être représentée par des bactéries du genre *Bacillus* et *Micrococcus* mais un large spectre de bactéries est présent avec entre autres des espèces pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella sp.*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Bakalova et al., 2007; Cyprowski et al., 2007; Dilger et al., 2005; Elsmore, 1989; Lucchesi et al., 2012). Une étude polonaise montre toutefois que l'espèce dominante est *Shewanella*

putrefaciens (Cyprowski et al., 2007). Il s'avère également que le type de matériaux usinés et donc le type d'industrie joue un rôle dans la contamination des fluides de coupe. Les industries du secteur automobile seraient contaminées par des bactéries Gram-positives, et les industries métallurgiques hors automobile seraient contaminées plus particulièrement par des bactéries Gram-négatives (Murat et al., 2012). Quelques moisissures peuvent également être présentes dans les fluides parmi lesquelles les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Cepalosporium*, *Acremonium* (Cyprowski et al., 2007; Murat et al., 2012; Saha and Donofrio, 2012).

Les fluides de coupe associés à des cas de PDM révèlent une flore bactérienne inhabituelle contenant des bactéries Gram-positives et des bactéries acido-alcool-résistantes (principalement des mycobactéries) et quelques espèces fongiques (Kreiss and Cox-Ganser, 1997; Murat et al., 2012). Par exemple, dans une usine de pièces automobile de l'Ohio, *M. immunogenum* a été détecté à un niveau de plus de 10^6 UFC / ml de fluides et certains postes de travail présentaient un niveau d'aérosols supérieur aux recommandations américaines (0.1-0.9 mg de particules / m³ d'air) (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Outre les espèces de micro-organismes, une quantité importante d'endotoxine, liée à la présence de bactéries Gram-négatives, est retrouvée dans les fluides (Cyprowski et al., 2007; M. Lewis et al., 2001). Il apparaît que l'eau permettant de dissoudre les fluides synthétiques, semi-synthétiques ou solubles pourrait être à l'origine de la contamination (Cyprowski et al., 2007; Kreiss and Cox-Ganser, 1997). De plus, une pratique parfois observée qui permet de diminuer les coûts mais favorise la persistance de la contamination microbienne, est de vider en partie seulement le fluide usager, et de compléter le volume de la cuve par du fluide neuf sans aucune étape de nettoyage de la cuve (Cyprowski et al., 2007).

Pseudomonas fluorescens a tout d'abord été incriminé dans la survenue de la PHS, du fait de sa présence dans les fluides et de sa réactivité vis-à-vis des sérums de malades (présence de précipitines en double diffusion) (Bernstein et al., 1995).

Puis, l'espèce *Mycobacterium chelonae* et plus généralement les mycobactéries non tuberculeuses ont été incriminées dans le PDM (Kreiss and Cox-Ganser, 1997; M. Lewis et al., 2001; Shelton et al., 1999). Mais sans doute s'agissait-il déjà de la nouvelle espèce *Mycobacterium immunogenum*, dont l'existence a été évoquée pour la première fois par Wilson en 2001 (Wilson et al., 2001) et qui est désormais considéré comme l'agent étiologique majeur du PDM (Beckett et al., 2005; Khan et al., 2005; Moore et al., 2000;

Tillie-Leblond et al., 2011; Wallace et al., 2002). Des expérimentations sur des modèles murins ont permis ensuite d'apporter la preuve de l'implication de *M. immunogenum* (Gordon et al., 2006; Thorne et al., 2006). Et il apparaît que cette espèce est présente dans la quasi totalité des usines où des cas de PHS ont été détectés, et absente dans les industries sans PHS (Murat et al., 2012; Thorne et al., 2006).

2.3.1. Les mycobactéries et *Mycobacterium immunogenum*

Cette nouvelle espèce, récemment introduite dans le groupe de *M. abscessus*-*M. chelonae*, est très résistante aux biocides, et est donc difficile à éliminer des huiles (Wallace et al., 2002). De manière générale, les mycobactéries du complexe *M. chelonae*-*M. abscessus* sont des bactéries à croissance rapide, les composants de leur paroi cellulaire sont connus pour avoir une activité d'adjuvants stimulant la réponse immunitaire ; elles sont également résistantes au chlore (et peuvent être trouvées dans les piscines et jacuzzis, notamment *M. avium* responsable d'une autre PHS) et aux agents désinfectants comme l'alkaline glutaraldéhyde et le formaldéhyde. *M. immunogenum* est particulièrement résistant *in vitro* à la cefoxitine, cefmetazole, ciprofloxacine, doxycycline, imipenem, sulfaméthoxazole, et à la tobramycine (Selvaraju et al., 2008b; Wilson et al., 2001). Elles sont retrouvées dans les systèmes d'eau potable et elles ont la capacité de créer un biofilm, ce qui leur confère une grande capacité de résistance aux biocides (Falkinham, 2003, 2009; Selvaraju et al., 2005; Trafny et al., 2013). Après traitement des fluides de coupes par des biocides, la croissance des mycobactéries est facilitée par l'absence de compétition (Falkinham, 2003). Elles peuvent également coloniser les systèmes d'eau distillée et eaux chaudes des hôpitaux car elles sont relativement résistantes aux hautes températures, et sont donc une source de maladies nosocomiales (Falkinham, 2003; Fraser et al., 1992; Maloney et al., 1994). Elles sont aussi connues pour provoquer des infections cutanées, des infections oculaires (kératite) et des infections opportunistes chez des patients immunodéprimés (Falkinham, 2003; Gupta et al., 2009; Sampaio et al., 2006). La présence de contamination par les mycobactéries accroît le risque de développer un PDM (Shelton et al., 1999).

De manière surprenante, il apparaît qu'un seul génotype de *M. immunogenum* soit présent dans les fluides de coupe provenant d'usines de différents états (USA). Cependant, la possibilité d'une contamination croisée reste invérifiable et peu probable (Wallace et al., 2002) et ces résultats sont contredits par Khan en 2005 démontrant l'existence de trois génotypes différents de *M. immunogenum* (Khan et al., 2005). Ces différents génotypes ont

des susceptibilités différentes aux biocides et selon le type de fluide utilisé (Selvaraju et al., 2008b, 2011). Un test rapide a été développé afin d'évaluer cette sensibilité et répondre plus efficacement à une demande de traitement (fluide de coupe, système d'eau contaminé dans les hôpitaux) (Kapoor and Yadav, 2010).

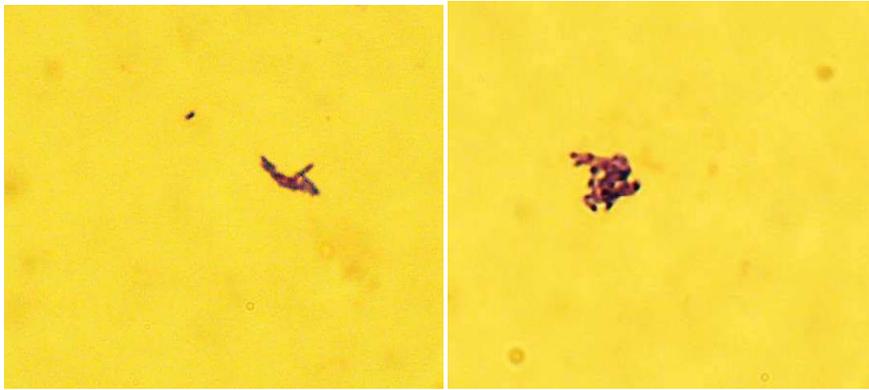


Figure 5 : Observation de *M. immunogenum* en microscopie optique coloration de Gram, objectif x 100 (Source : J.B. Murat©)

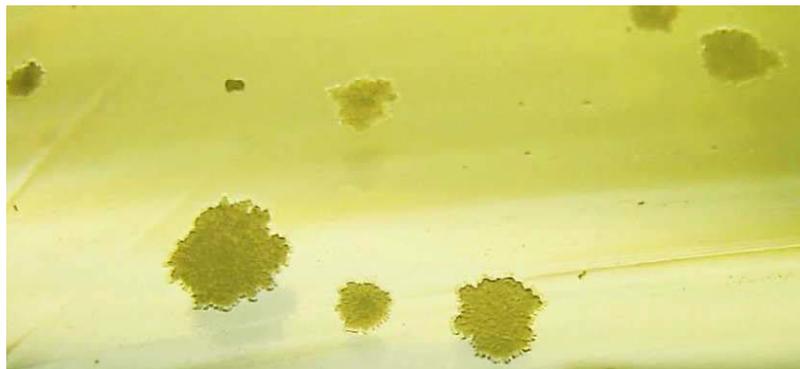


Figure 6 : Colonies de *M. immunogenum* sur milieu gélosé Mueller-Hinton, incubation à 30°C pendant 12 jours (Source : J.B. Murat©)

2.4. Diagnostic et sérologie

En 2002, Dangman a tenté de créer un indice permettant le diagnostic du PDM basé sur des examens non-invasifs (Dangman et al., 2002). Cet indice permet le diagnostic des PDM en se basant sur la présence de symptômes compatibles avec une PHS liée à l'environnement de travail, un rapport élevé de la concentration en oxygène artériel et alvéolaire (A-a gradient), une DLco faible, une vitesse de sédimentation élevée, et des râles crépitant à l'auscultation. Toutefois, Dangman n'exclut pas l'utilité du scanner et de la spirométrie, et il soulève que le manque de connaissances sur les micro-organismes en cause peut être un frein à l'élaboration

de cet indice. De plus, le tabagisme des patients doit être pris en compte dans le diagnostic car il peut affecter certains résultats d'examen, même si les PHS sont plus fréquentes chez les non-fumeurs (Dangman et al., 2004).

Aucun test commercial n'est disponible à ce jour pour établir le diagnostic sérologique de la maladie du poumon de mécanicien (ou établir la preuve de l'exposition aux micro-organismes liés aux fluides de coupe). Cette absence de test s'explique par la relative nouveauté de cette maladie, et du désaccord que l'on observe dans certaines études sur la principale étiologie. Actuellement, lors de l'établissement d'un nouveau cas de PDM, une sérologie « à la carte » est réalisée.

Bernstein montre par double diffusion que les 6 cas de PDM qu'il décrit sont sensibilisés à *Pseudomonas fluorescens* (Bernstein et al., 1995) et Zacharisen montre que les 7 patients PDM rapportés dans son étude ont des arcs de précipitines contre *Acinetobacter lwoffii* (Zacharisen et al., 1998). Les premiers tests ELISA réalisés avec des extraits protéiques de *M. immunogenum* et *P. pseudoalcaligenes* montrent un taux d'IgG spécifiques de ces deux espèces important chez un patient PDM et son binôme de travail, par rapport à d'autres sujets témoins de l'entreprise (Shelton et al., 1999). Lewis montre par un test ELISA que 35% de personnes exposées ont des anticorps dirigés contre *M. chelonae* (Lewis et al., 2001). Le cas rapporté par Beckett ne montrait pas de réaction immunologique vis-à-vis du panel d'antigènes testés, mais il ne s'agissait pas d'antigènes issus des souches isolées du fluide, mais d'un panel standard de 9 substances comprenant des bactéries, des moisissures, et du sérum de pigeon (Beckett et al., 2005). Les 12 cas britanniques décrits par Dawkins ne sont pas sensibilisés aux mycobactéries (par ailleurs absentes des fluides), mais sont sensibilisés aux espèces dominantes *Acinetobacter* et *Ochrobactrum* (Dawkins et al., 2006). Les cas décrits par Gupta (2006) et le cas espagnol décrit par Sastre (2012) n'incluent pas de tests sérologiques (Gupta and Rosenman, 2006; Sastre et al., 2012).

Pour les cas groupés français, trois espèces fréquemment rencontrées dans les fluides ont été testées par la technique d'électrosynérèse sur acétate de cellulose et par ELISA. *M. immunogenum* apparaît comme l'agent étiologique principal, avec un nombre d'arcs de précipitines important (positivité de tous les patients, jusqu'à 12 arcs) tandis que pour les deux autres espèces testées *Fusarium solani* et *Bacillus simplex*, le nombre d'arcs ne dépasse pas 4 et on observe une positivité seulement chez 3/13 et 8/13 patients respectivement (Tillie-Leblond et al., 2011). Pour les cas de PHS où la présence de *M. immunogenum* est avérée

dans les fluides de coupe, les tests sérologiques semblent performants puisque l'électrosynérèse permet d'obtenir une spécificité de 92% et le test ELISA, une spécificité de 100% (avec une sensibilité de 90%) (Tillie-Leblond et al., 2011).

Peu de choses sont connues sur les protéines immuno-réactives impliquées dans le dépistage de la maladie. Au début des années 2000, trois protéines immuno-réactives de 29, 35 et 53 kDa, contenues dans les fluides de coupe et spécifiques d'un extrait protéique de *M. chelonae*, ont été mises en évidence par Western blotting avec des sérums de personnes exposées (Lewis et al., 2001). Les protéines sécrétées dans les fluides pourraient également jouer un rôle dans la réponse immunitaire (Falkinham, 2003). Les facteurs de virulence de *M. immunogenum* sont toutefois mieux connus grâce à une étude identifiant 33 protéines antigéniques par spectrométrie de masse (préalablement révélées en Western blotting bidimensionnel par des anticorps produits par un lapin artificiellement sensibilisé à *M. immunogenum*). Vingt-cinq nouvelles protéines ont été décrites comme potentiellement responsables de la survenue de la PHS *in vitro*. Les 8 autres protéines étant déjà connues comme facteur de virulence chez d'autres mycobactéries, comme par exemple, la superoxide dismutase. Les protéines identifiées ont des fonctions diverses impliquées dans différentes voies du métabolisme, du transport, etc...mais 11 protéines sur les 33 restent de fonction inconnue. Ces protéines antigéniques proviennent des fractions cytoplasmiques, pariétales, sécrétées et de la membrane plasmique. (Gupta et al., 2009).

2.5.Moyens de prévention

Outre l'impact sur la santé, la contamination microbiologique des fluides altère leurs qualités industrielles et plusieurs méthodes de traitement des fluides sont proposées par Passman dès 1992 :

- des méthodes non-chimiques : la pasteurisation, l'irradiation par les rayons ultraviolets, la sonication, la filtration
- des méthodes chimiques : utilisation de fluides synthétiques et de différents biocides. Il existe trois grandes familles de biocides : les formaldéhydes, les alcanolamines et les non-formaldéhydes.

Les techniques de traitement non chimique implique un investissement dans du matériel coûteux et ainsi l'utilisation de biocides est plus largement optée. Le risque lié à l'exposition

aux biocides n'est pas différent d'une exposition à un produit chimique quelconque, et l'utilisation de ces produits pourrait entraîner d'autres pathologies que celles liées aux micro-organismes (Passman, 1992). Cependant, le danger principal de l'utilisation des biocides est l'apparition de résistances chez des bactéries pathogènes (Dilger et al., 2005). Le risque est également de faciliter le développement d'espèces résistantes comme les mycobactéries, car elles sont alors débarrassées de toute concurrence. Les mécanismes inhérents à l'efficacité des biocides dans les fluides sont complexes et les choix de traitements peuvent s'avérer inefficaces si le type de biocide choisi n'est pas compatible avec le type de fluide. De plus, les modèles de laboratoire réalisés avec *M. immunogenum* en co-culture avec *Pseudomonas fluorescens* révèlent une diminution dans l'efficacité des traitements : un effet potentiel de communauté permettrait l'apparition de mécanismes de protection conférant une résistance au biocide jusqu'à quatre fois plus importante (Selvaraju et al., 2011).

Pour la prévention, les industriels optent aussi pour des aménagements de postes tels qu'une amélioration de la ventilation pour les postes les plus à risque, l'installation d'un système d'air conditionné dans la salle des machines, la création d'une enceinte autour de la machine et aussi parfois des solutions de protection respiratoire individuelle (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Kreiss and Cox-Ganser, 1997).

Un autre moyen préventif contre la contamination des fluides par des espèces pathogènes a été évoqué par Dilger et ses collaborateurs. Il s'agit d'inoculer aux fluides des bactéries non pathogènes (une combinaison entre des espèces de *Pseudomonas* et de *Micrococcus*) créant un biotope capable d'éliminer ou de limiter la croissance des bactéries pathogènes (*M. immunogenum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, ...) (Dilger et al., 2005).

3. La maladie du Poumon de Fermier (PDF)

3.1. Historique de la maladie du Poumon de Fermier

En 1555, un suédois, du nom d'Olaus Magnus, décrit un syndrome respiratoire atteignant les fermiers. En 1873, Blackley publie ses observations et attribue à un champignon microscopique des symptômes proches de la grippe (Salvaggio, 1997). Les premières véritables études cliniques de la maladie remontent à 1932 quand Campbell l'a associé à l'exposition de la poussière de foin moisi, des descriptions de cas ont suivi jusque dans les années 1950 sans identifier réellement le micro-organisme en cause (Sweeney, 1952). Une étude de 1953 a tenté de déterminer l'agent étiologique de la maladie en stimulant la réponse immunitaire par injection sous-cutanée de solutions contenant différentes espèces de moisissures ou des extraits de foin, mais les souches utilisées n'avaient pas montré de résultats positifs (Fuller, 1953). Il faudra attendre les années 1960, pour mettre en évidence par des techniques d'immuno-précipitation, la présence de précipitines dans les sérums de patients dirigées contre un extrait de foin moisi (Pepys et al., 1963) et démontrer la présence et le rôle d'un actinomycète thermophile, *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Syn. Micropolyspora faeni*, *Faenia rectivirgula*) comme source antigénique majeure (Gregory et al., 1964; Pepys et al., 1963). Molina, en 1971 révèle pour la première fois la fréquence de la maladie en France et fait reconnaître le PDF comme maladie professionnelle. Katila en 1978 émet des doutes à l'égard du rôle prépondérant de *S. rectivirgula* et propose d'adjoindre d'autres étiologies d'origine fongique comme responsable de la maladie en Finlande (Katila and Mäntyjärvi, 1987). Depuis, des publications tendent à démontrer que les agents étiologiques varient en fonction de l'évolution des techniques agricoles et des pays ou régions (Reboux et al., 2001). La description des agents étiologiques sera évoquée dans un autre chapitre de cette thèse (Cf 3.3 Les micro-organismes en cause, p50).

3.2. Epidémiologie

3.2.1. Prévalence

Il est difficile d'établir la prévalence et l'incidence des PHS car elles varient considérablement en fonction de la définition de la maladie, des méthodes de diagnostic utilisées, de l'intensité

de l'exposition, des conditions environnementales et des facteurs de risques génétiques de l'hôte. Bien qu'un nombre élevé de personnes soit exposé aux antigènes en cause, la prévalence des PHS est faible. Cela peut s'expliquer par des cofacteurs génétiques et environnementaux, mais aussi par une sous-estimation du nombre des PHS (Fink et al., 2005; Grant et al., 1972).

Toutefois, la maladie du Poumon de Fermier sévit essentiellement dans les régions d'élevage au climat froid et humide. Elle est liée à la distribution hivernale de fourrages ou de végétaux moisissés. On la décrit aussi bien en Europe qu'au Canada, dans certaines régions des Etats-Unis, en Chine, en Inde et au Japon. Les différences entre pays sont dues à des climats et des pratiques agricoles différentes.

En Europe. L'incidence annuelle serait de 0,04 % de la population agricole en Finlande (Terho et al., 1987) et de 0,02 à 0,03% en Suède (Bourke et al., 2001). En France, dans le département du Doubs, elle est de 2 à 4 % (Depierre et al., 1988) et s'élèverait à environ 6% (35/551) chez les agriculteurs ayant des symptômes respiratoires (Dalphin et al., 1994). Dans la région Midi-Pyrénées, la prévalence des PHS agricoles est de 6% (PDF et maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux confondus) (Seguela et al., 1978). En Italie, elle serait comprise entre 1,5 % et 3 % dans la région de Reggio Emilia (lieu de production du parmesan) (Ferri et al., 2003). En Ecosse dans les années 1970, la prévalence était estimée entre 2,3 % et 8,6 % selon les régions (Grant et al., 1972). En république Tchèque, 69 % des PHS sont des PDF (50 sur 72 PHS recensées sur une période de 13 ans), mais la prévalence n'a pu être calculée en raison du manque d'informations sur le nombre d'agriculteurs dans le pays (Fenclová et al., 2009). Des cas ont été également déclarés en Pologne, mais aucune étude épidémiologique n'a été rapportée (Milanowski et al., 1998). La prévalence peut rester étonnamment stable sur une longue période comme en Irlande où en absence de modifications des conditions de travail, aucun recul de la maladie n'a été enregistré de 1983 à 1996 (McGrath et al., 1999) mais sur la période de 1997 à 2002 un déclin de la maladie est observé, probablement en raison des changements de pratiques (Arya et al. 2009).

En Asie. Au Japon, la prévalence a été établie entre 1 et 2 % dans la région d'Hokkaido (Homma et al., 1986). En Chine, dans la région du Dafeng elle atteint 11,4 % (Shen et al., 1991; Tao et al., 1988).

Aux Etats Unis. Dans le Wisconsin, la prévalence dans la population exposée est située entre 0,42 % (Gruchow et al., 1981) et 3,9 % (Madsen et al., 1976). Dans le Vermont, sur 258

agriculteurs surveillés, 11 ont une suspicion de PDF soit environ 4 % des agriculteurs (Gump et al., 1979). En Caroline du Nord, la prévalence serait de 2,2% (Hoppin et al., 2007).

3.2.2. Population

La maladie concerne de façon universelle la tranche d'âge 40-60 ans (Dalphin et al., 1993; Terho et al., 1987). Les femmes et les hommes sont touchés de façon différente selon les régions en fonction de leur rôle professionnel. En Finlande, le PDF touche préférentiellement les femmes (2/3 des cas de PDF sont des femmes), car traditionnellement ce sont les femmes qui s'occupent du bétail (Katila and Mäntyjärvi, 1987; Terho et al., 1987). Au Japon, les femmes et les hommes contribuent de façon équivalente aux travaux agricoles et sont, par conséquent, touchés dans une même proportion par le PDF (Homma et al., 1986). De façon similaire, dans le Wisconsin, en Franche-Comté et en République Tchèque, les hommes qui sont plus au contact avec la distribution de fourrages, sont plus fréquemment atteints par la maladie que les femmes (Depierre et al., 1988; Fenclová et al., 2009; Kurup et al., 1987).

3.2.3. Influence du climat et des pratiques agricoles

L'incidence de la maladie est liée aux différences géographiques et climatiques. Plus particulièrement, elle est due au niveau de pluviométrie pendant la saison estivale ou de l'altitude (Dalphin et al., 1993; Grant et al., 1972; McGrath et al., 1999; Terho et al., 1987) ainsi qu'aux différences de pratiques agricoles (Fenclová et al., 2009; Grant et al., 1972).

Certains facteurs sont déterminants dès la récolte. Aussi, les conditions météorologiques défavorables et la présence de terre due à la prolifération des campagnols favoriseront la prolifération ultérieure dans les fourrages de micro-organismes responsables de la maladie.

La production de fourrages pour le bétail serait plus à risque pour le développement de la maladie, comparé à la production d'ensilage ou à la production céréalière (Grant et al., 1972). D'autre part, cette différence peut être biaisée par un facteur économique : une exploitation laitière et une exploitation céréalière se différencient de manière générale par la taille de l'exploitation, la situation économique et les moyens ; c'est-à-dire qu'une ferme de production céréalière est plus avantagée économiquement et est donc mieux équipée (entre autre la mise en place de séchage artificiel du foin) (Grant et al., 1972). Dans un même pays, des variations du nombre de cas entre différentes années peuvent être observées et elles seraient liées à la qualité des fourrages (Rautalahti et al., 1990). En effet, des études finlandaise et suédoise suggèrent que la concentration en micro-organismes est fortement liée à un risque accru de

développer le PDF (Kotimaa et al., 1984; Malmberg et al., 1993). Et la plupart des nouveaux cas sont constatés en fin d'hiver après plusieurs mois de distribution de fourrages au bétail en stabulation, lorsque les concentrations en micro-organismes thermophiles s'accroissent (Roussel et al., 2004; Terho et al., 1987).



Figure 7 : Distribution du foin aux vaches en stabulation, tâche soulevant beaucoup de poussière et à risque pour le PDF (Source : M. Vacheyrou©)

Le cumul du nombre d'années passées dans une ferme semble paradoxalement moins important pour le risque de développer un PDF que la durée d'exposition journalière (Cormier et al., 1985; Katila and Mäntyjärvi, 1987; Roberts, 1974). Les bâtiments d'élevage de bovins ne sont pas plus contaminés que les bâtiments d'élevage de porcs et de volaille et la fraction de poussière respirable y est moins importante (Omland, 2002).

Le mode de conditionnement des fourrages est aussi important. Une moisissure impliquée dans la maladie en France et en Finlande, *Lichtheimia corymbifera* (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Reboux et al., 2001) est plus fréquemment observée dans le foin stocké en balles rondes que dans le foin stocké en vrac et dans les balles carrées de moyenne densité. De même en Italie, le conditionnement en balle ronde accentue la présence de *S. rectivirgula* par rapport au conditionnement en petite balle rectangulaire ; et ce phénomène est amplifié par le climat de montagne (Ferri et al., 2003; Ranalli et al., 1999). Une étude dans le Doubs a montré que le séchage en grange a un effet protecteur sur la santé respiratoire des producteurs laitiers, du fait d'une moindre contamination en micro-organismes dans les fourrages séchés (Roussel et al., 2005b).

L'évolution permanente des techniques agricoles influence la flore microbiologique des foins et des produits agricoles, ainsi que les modalités d'exposition des agriculteurs (Dalphin, 2001; Reboux et al., 2006a). Les principaux changements dans l'agriculture au cours des dernières décennies sont les suivantes :

- l'utilisation de méthodes pour éliminer l'humidité : stockage de foins séchés, séchage des graines avec de l'air réchauffé, traitements chimiques à des pH plus bas ou préservateurs biologiques ;
- la modernisation des fermes : nouveaux hangars plus vastes pour le bétail, automatisation des pratiques de distribution de la nourriture ;
- le stockage de l'ensilage en balles rondes emballées (enrubanné) ;
- l'utilisation de masques de protection respiratoire (standard Afnor 2). Le port du masque chez les sujets malades prévient des récurrences.

3.2.4. Influence de facteurs génétiques

Certaines études ont suggéré un lien entre certains types de HLA (*Human Leucocyte Antigen*) et les PHS, avec une augmentation de l'occurrence du type HLA B8 chez les PDF et les cas de poumon d'éleveur d'oiseaux d'origine Caucasienne et du type HLA DR7 chez des mexicains atteints de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux (Bourke et al., 2001). Par ailleurs, des facteurs génétiques impliquant un variant du gène TAP1 (*Transporter Associated with antigen Processing*) serait associé à un risque supérieur de développer un PDF (Aquino-Galvez et al., 2008). La présence de l'allèle TNFA2 associé à la surproduction de TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) et l'allèle HLA-DRB1*0802 du complexe majeur d'histocompatibilité seraient des facteurs de prédisposition génétique pour le développement d'un PDF ou de la maladie du poumon d'éleveurs d'oiseaux (Camarena et al., 2001; Schaaf et al., 2001). Le gène MyD88 semble également important dans le développement de la maladie mais encore aucune étude de prévalence n'a été effectuée chez les patients (Nance et al., 2008). Des prédispositions génétiques associées à des conditions environnementales particulières conduiraient donc à la survenue de la maladie, mais toutes les études ne sont pas en accord. Ainsi les différentes études réalisées sur le sujet reflètent la diversité et la complexité des facteurs génétiques potentiellement impliqués : différents gènes peuvent être impliqués selon la population étudiée et/ou plusieurs gènes peuvent intervenir dans la survenue de la maladie. Ainsi une étude sur un modèle murin suggère que les facteurs multigénétiques influencent la susceptibilité de certaines souches de souris dans le

développement d'une inflammation pulmonaire granulomateuse (Bourke et al., 2001). Ce phénomène a également été observé pour la maladie du poumon de mécanicien (Gordon et al., 2006).

3.2.5. Autres facteurs influençant la survenue du PDF

Certains auteurs évoquent des circonstances étiologiques particulières favorisant le développement du PDF comme des infections virales (Cormier and Israël-Assayag, 2000) ou la présence concomitante d'endotoxines (Rylander, 2006) ou encore une forte exposition aux pesticides (Hoppin et al., 2007).

Dans le développement du PDF, le rôle favorisant des infections virales a été suggéré par la mise en évidence d'un effet synergique entre *S. rectivirgula* et le virus *parainfluenza1* sur la réponse inflammatoire pulmonaire dans un modèle murin (Cormier et al., 1993). D'autre part, Dalphin *et al.* (1993) a montré que la prévalence du PDF pour les agriculteurs atteints de bronchite chronique était de 8,9% alors que celle des agriculteurs sans autres symptômes respiratoires était de 0,7% (Dalphin et al., 1993). Un cas de PDF a été également associé à une bullectomie (Koschel et al., 2012).

3.2.6. Facteur protecteur

Le tabagisme est considéré comme un facteur protecteur en limitant la réaction exagérée de l'hôte vis-à-vis des antigènes (Dalphin et al., 1993; Morgan et al., 1975). En effet, Dalphin et al. (1993) a montré que la prévalence du PDF dans la population d'agriculteurs fumeurs était de 0,4% alors que pour les non fumeurs ou ex-fumeurs, elle était de 1,6 à 2,2%. Les mécanismes protecteurs du tabac sont mal connus, mais des études ont montré que la consommation de cigarettes altérait la cascade de réaction cytokiniques et réduisait l'état d'activation des macrophages (Girard et al., 2009a; Roussel et al., 2006).

3.3. Les micro-organismes en cause

3.3.1. Les étiologies

L'identification des agents étiologiques du PDF est importante pour l'optimisation de la prise en charge du patient, à la fois pour le diagnostic, le traitement et la prévention de la maladie. Cette identification est basée essentiellement sur l'analyse microbiologique des fourrages des

patients, des tests sérologiques, et plus récemment, sur des tests de provocation sur des modèles murins ou cellulaires.

➤ *Les micro-organismes*

Les premières études sur la contamination en micro-organismes montrent que la présence d'actinomycètes thermophiles, *S. rectivirgula* et *T. vulgaris*, est dominante dans les foins liés à des cas de PDF et sont également les principaux agents étiologiques (Gregory et al., 1964; Nicolet and Bannerman, 1975; Pepys and Jenkins, 1965; Pepys et al., 1963; Roberts et al., 1976a).

Gregory & Lacey (1963) montrent que dans les foins moisissus et/ou liés au PDF, certaines espèces sont plus fréquentes que dans du foin de bonne qualité : *Absidia ramosa*, *Lichtheimia* (ex-*Absidia*) *corymbifera*, *Aspergillus fumigatus*, *Wallemia sebi* (syn. *Hemispora stellata*), *Mucor pusillus*, *Scopulariopsis brevicaulis* et *Stachybotrys* sp (Gregory and Lacey, 1963). Puis d'autres agents étiologiques ont été identifiés comme *Wallemia sebi*, *Aspergillus umbrosus*, *Fusarium* sp., *Eurotium amstelodami*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhodotorula glutinis* (Bellanger et al., 2010; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Kotimaa et al., 1984; Lappalainen et al., 1998; Ojanen, 1992; Reboux et al., 2001). Ou encore la bactérie *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*) est considérée responsable du PDF en Allemagne et en Pologne (Lemieszek et al., 2011; Milanowski et al., 1998; Sennekamp et al., 2012).

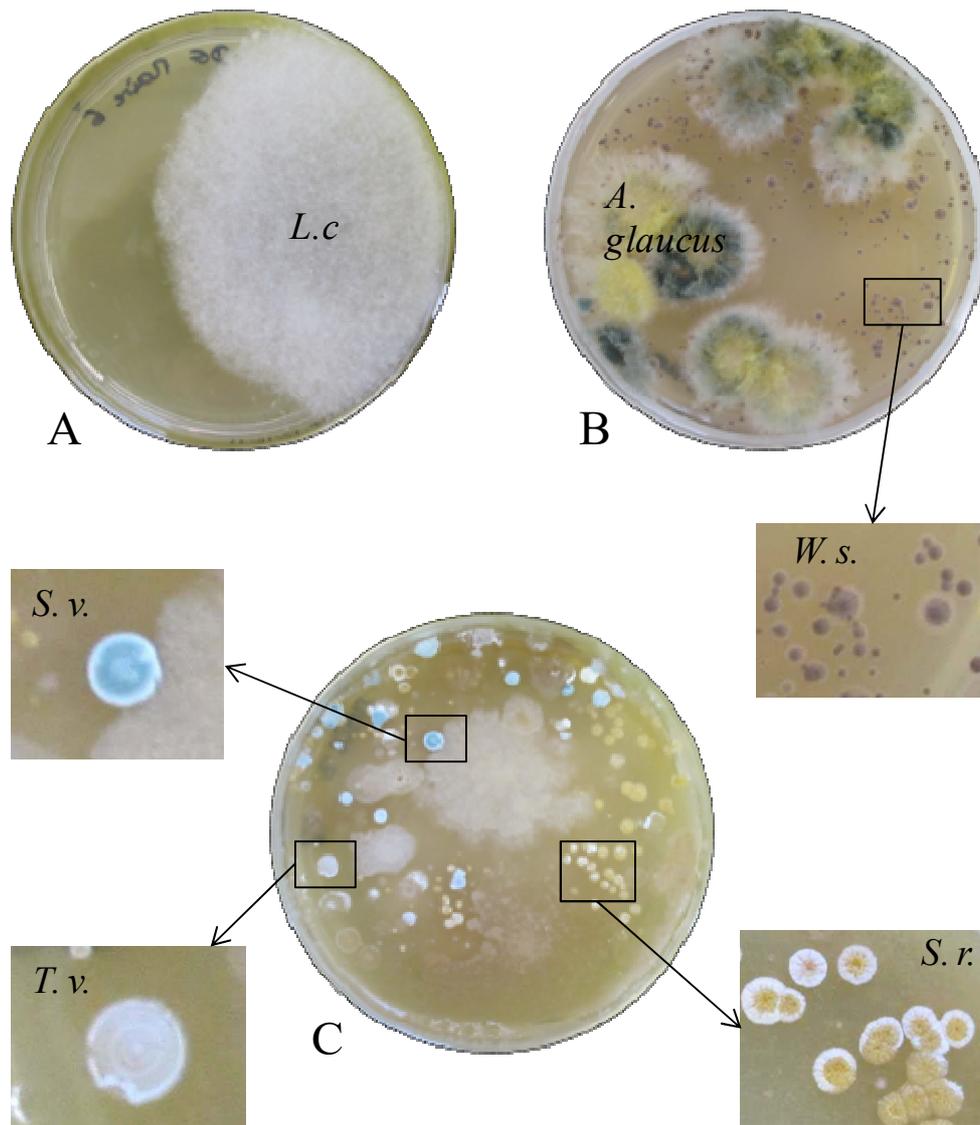


Figure 8 : Principaux micro-organismes impliqués dans le PDF en Franche-Comté. A : *Lichtheimia corymbifera* (L.c.) sur milieu DG18 à 30°C. B : *Aspergillus* du groupe *glaucus* et *Wallemia sebi* (W.s.) sur milieu malt-sel à 20°C. C : *Saccharopolyspora rectivirgula* (S.r.), *Saccharomonopsora viridis* (S.v.) et *Thermoactinomyces vulgaris* (T.v.) sur milieu R8 à 52°C.

➤ *Caractéristiques de la source de contamination : les fourrages*

Dans le cas de la maladie du Poumon de Fermier, les sources de contamination sont les fourrages mal séchés où se développe une flore microbienne particulière dite de stockage, différente de la flore du champ initialement présente sur les espèces végétales. Lors du stockage des foin, la fermentation va induire un changement de la flore microbiologique qui dépend de l'hygrométrie pendant la récolte, du pH et de la température atteinte lors de la fermentation (Gregory & Lacey, 1963 ; Pepys, 1963). Quand le matériel est très humide, la température peut atteindre 60-65°C et la microflore mésophile est remplacée par une flore

thermotolérante puis par une flore thermophile (Roussel, 2006). Le foin contaminé « à risque » est aussi caractérisé par un pH neutre alors que le « bon » foin est plutôt acide (Gregory et al., 1964; Gregory and Lacey, 1963). Si la disponibilité en eau est basse, la flore microbienne reste stable.

Il est communément admis que les fermes des agriculteurs atteints de PDF sont plus contaminées (au moins au moment du premier épisode de la maladie) par rapport aux fermes des agriculteurs non malades (Kotimaa et al., 1984; Malmberg et al., 1993). Toutefois, Reboux (2001) a montré que le nombre total de spores de moisissures ou d'actinomycètes dans les fermes de l'Est de la France n'était pas significativement différent entre les deux groupes d'agriculteurs (Reboux et al., 2001). Par contre, les concentrations par espèces sont différentes d'un groupe à l'autre, par exemple la concentration de l'espèce *L. corymbifera* est significativement plus forte dans les fermes où il y a un cas de PDF (2 720 UFC / m³ d'air dans l'étable) que dans les fermes contrôles (1 460 UFC / m³ d'air) (Reboux et al., 2001). Dans les fourrages, les espèces les plus fréquemment rencontrées et les plus abondantes sont dans l'ordre décroissant : *W. sebi*, *E. amstelodami*, *L. corymbifera*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*. L'implication de ces espèces dans la maladie du PDF est confirmée par les tests sérologiques : le nombre d'arcs de précipitines obtenus en électrosynérèse est significativement plus grand chez les malades que chez les témoins pour *L. corymbifera*, *E. amstelodami* et *W. sebi* (Reboux et al., 2001). Ces espèces en cause dans la survenue de la maladie sont plus fréquemment retrouvées dans les balles rondes de haute densité, dans les fermes dont l'altitude est au-delà de 700m et lorsque les conditions météorologiques étaient mauvaises durant la période de récolte. D'autre part, les actinomycètes sont plus retrouvés dans les foins en fin d'hiver qu'au début de la mauvaise saison (Gbaguidi-Haore et al., 2009). De plus, il apparaît que la flore fongique favorise la croissance des actinomycètes (Reboux et al., 2001).

Dans le milieu agricole, les graines et la poussière de graines peuvent être une autre source antigénique (Halstensen et al., 2007).

3.3.2. *Saccharopolyspora rectivirgula*

Saccharopolyspora rectivirgula est l'agent étiologique principal, reconnu sur des arguments épidémiologiques, sérologiques et physiopathologiques obtenus dans différents pays (Grande Bretagne, Canada, Etats-Unis) (Gregory et al., 1964; Gruchow et al., 1981; Kurup et al., 1976; Nicolet and Bannerman, 1975; Pepys and Jenkins, 1965; Pepys et al., 1963; Roberts et al., 1976a). Ses antigènes sont largement utilisés pour induire une PHS dans les modèles murins

pour les investigations sur les voies impliquées dans les réponses inflammatoires (Blanchet et al., 2011; Jimenez-Alvarez et al., 2010; Park et al., 2010; Schuyler et al., 2000, 2003).

➤ *Taxonomie*

S. rectivirgula est une bactérie de la famille des *Micromonosporaceae* et de l'ordre des *Actinomycetales*. La taxonomie des actinomycètes thermophiles est parfois ambiguë et *S. rectivirgula* a changé de nom au cours des années dont les synonymes sont *Micropolyspora faeni*, *Faenia rectivirgula* ou encore il a été incorrectement identifié comme *Thermopolyspora polyspora* dans certaines publications (Gregory et al., 1964). Pour faciliter l'identification des espèces du genre *Saccharopolyspora*, Gamian et al (1996), a montré que l'analyse des lipides pouvait être un outil efficace, non seulement pour l'identification du genre mais aussi pour l'identification de l'espèce (Gamian et al., 1996). Dans le genre *Saccharopolyspora*, il y a de nombreuses espèces dont des espèces parfois récemment reclassées. De manière générale, les espèces de ce genre sont retrouvées dans des substrats liés aux végétaux en stockage (foin, paille) ou en décomposition (compost, ensilage, usine de traitement des eaux usées) (Prazmo et al., 2003), ou bien encore aux végétaux utilisés dans l'industrie (Gamboa et al., 2005). Ces micro-organismes produisent des métabolites bioactifs variés. Par exemple, *S. erythraea* produit l'érythromycine (Gamian et al., 1996). Le génome de cette espèce est entièrement séquencé et comprend 8,2 Mpb avec 7 198 séquences codantes pour des protéines (Oliynyk et al., 2007).

➤ *Morphologie*

La largeur des hyphes varient de 230 à 275 nm. L'épaisseur de sa paroi varie entre 9 et 14 nm. Les spores globuleux ou conidies mesurent 700 à 900 nm de diamètre et leur surface extérieure est légèrement polygonal et lisse. La paroi des spores est plus épaisse que celle des hyphes et mesure entre 30 et 70 nm (Reijula, 1993). Les spores peuvent être parfois regroupées en petites chaînes de deux à trois spores (Gangwar et al., 1989). *S. rectivirgula* a une croissance modérément rapide (Kurup and Fink, 1975).

➤ *S. rectivirgula, principale étiologie ?*

Les actinomycètes sont connus pour être présents en grande quantité dans les flores microbiologiques. *S. rectivirgula* a été retrouvé dans les fourrages, le compost, les excréments d'animaux d'élevage (vache, volaille, pigeon), dans divers substrats fermentescibles (maïs ensilé, bagasse), dans les graines de céréales, dans la poussière de logements, dans les

chauffages ou les humidificateurs d'air conditionnée (Gamboa et al., 2005; Gangwar et al., 1989; Gregory and Lacey, 1963; Prazmo et al., 2003; Unaogu et al., 1994). Les foins sont particulièrement colonisés par cette espèce avec une colonisation moyenne atteignant 110 000 UFC / g de fourrage au Nigeria (Unaogu et al., 1994). En France, dans le département du Doubs, la concentration en actinomycètes thermophiles moyennes dans l'air des étables, où un cas de PDF a été déclaré, étaient de 19 310 CFU / m³ d'air et 43 400 UFC / g dans les fourrages contre 4 650 UFC / m³ d'air et 3 420 UFC / g dans les fermes d'agriculteurs non malades. Ces résultats ne sont pourtant pas statistiquement différents, et *S. rectivirgula* ne représente qu'une faible part de la concentration totale en actinomycètes thermophiles. Ainsi *S. rectivirgula* ne semble pas être un agent étiologique majeur dans cette région (Reboux et al., 2001). Dans les fermes finlandaises où il y a un cas de PDF, la concentration moyenne en spores de *S. rectivirgula* est de 50 000 spores par m³ d'air, contre 600 000 spores par m³ d'air de *Thermoactinomyces vulgaris* (Kotimaa et al., 1984). Malgré une exposition relativement faible à *S. rectivirgula* en comparaison à *T. vulgaris*, la contamination par *S. rectivirgula* est significativement plus élevée dans les fermes où il y a un cas de PDF que les fermes témoins. En Inde, *S. rectivirgula* est retrouvé dans 44% des foins analysés avec une densité moyenne de 3 200 UFC / g de fourrage, mais l'espèce la plus abondante est *T. vulgaris* comme en Finlande (Gangwar et al., 1989; Terho and Lacey, 1979).

L'étude de Gruchow (1981) a montré que dans une population de 1 400 agriculteurs du Wisconsin (USA), 6 % ont des précipitines contre *S. rectivirgula* (Gruchow et al., 1981). Les agriculteurs ayant des précipitines sont sensibilisés dans 86 % des cas à *S. rectivirgula* (Roberts et al., 1976a). L'utilisation des antigènes de *S. rectivirgula* permettraient même de discriminer les patients de sujets exposés asymptomatiques par la technique BALISA (Brummund et al., 1988). En Chine et en Finlande, les agriculteurs ont une réponse immunitaire faible vis-à-vis de *S. rectivirgula* au profit de *T. vulgaris* (Ojanen, 1992). En 1999, la même équipe Finlandaise montre un résultat étonnamment contradictoire avec l'étude de 1992 (Ojanen) : le dosage des IgG spécifiques contre *S. rectivirgula* montre une différence significative entre les patients PDF et les témoins exposés (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999). En France, la prévalence des précipitines contre *S. rectivirgula* était seulement de 27% en 1994 (Dalphin et al., 1994) mais il a été montré que la détection de précipitines contre *S. rectivirgula* en association avec deux autres espèces contribue au diagnostic du PDF (Fenoglio et al., 2007).

➤ *Caractérisation des antigènes de S. rectivirgula*

La caractérisation des antigènes de *S. rectivirgula* spécifiques du PDF est essentielle pour améliorer le sérodiagnostic. Des chercheurs ont tenté d'identifier ces protéines immuno-réactives depuis les années 1960 jusque dans les années 1990, mais aucun d'entre eux n'a réellement identifié la séquence d'acides aminés des protéines d'intérêt.

Dans les années 1970, Treuhaft et ses collaborateurs montrent par *crossed-immunoélectrophorèse* que 3 antigènes permettent d'effectuer le diagnostic avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 100% (Treuhaft et al., 1979).

Fletcher *et al.* (1970) montre que l'utilisation des antigènes sécrétés de *S. rectivirgula* permet d'obtenir une bonne discrimination entre les patients et les sujets exposés (présence de précipitines dans 75% des cas de PDF et 20% seulement sujets exposés) (Fletcher et al., 1970). Parmi tous les arcs de précipitines observés, il en identifie certains comme plus spécifiques de la maladie et les assimilent parfois à la fraction antigénique « C » décrite par Pepys dans les premières études sur le PDF (Pepys and Jenkins, 1965). Ainsi, les antigènes extracellulaires de *S. rectivirgula* semblent améliorer le diagnostic du PDF par rapport à un extrait mycélien (Fletcher et al., 1970; Ojanen et al., 1980).

En accord avec ce concept, une équipe suisse a montré que parmi une multitude de protéines et autres constituants cellulaires, seule une minorité de substances sont immunogènes et semblent être des enzymes extracellulaires (Nicolet et al., 1977; Nicolet and Bannerman, 1975). Ces enzymes immuno-réactives ont été identifiées comme des « chymotrypsine-like » mais les auteurs n'ont pas pu caractériser davantage ces protéines qui seraient directement impliquées dans la maladie (Nicolet et al., 1977; Nicolet and Bannerman, 1975). Une de ces enzymes appelée enzyme 1 pourrait également jouer un rôle dans le développement de la maladie avec l'induction de la production d'anticorps ayant pour conséquence le dépôt d'immuns complexes et/ou des dommages directes sur les tissus (Schällibaum et al., 1977).

A l'inverse, Roberts et ses collaborateurs montrent que l'utilisation d'un extrait antigénique de *S. rectivirgula* préparé à l'aide d'acide trichloroacétique (antigènes solubles) permet de discriminer les patients des témoins avec 68% de patients correctement classés contre seulement 22 % de faux-positifs chez les témoins (Roberts et al., 1976b).

L'utilisation de la technique d'immunoélectrophorèse simple ou à deux dimensions a permis également de mettre en évidence des antigènes spécifiques de la maladie dans de nombreuses

études, mais l'état des connaissances de cette période n'a pas permis de caractériser la nature de ces antigènes (Kurup and Fink, 1977; Pepys and Jenkins, 1965; Treuhaf et al., 1979).

Globalement, les antigènes de *S. rectivirgula* ont un pH situé entre 3,5 et 6 mais les protéines immuno-réactives ont plutôt un pH situé en dessous de 5 (Kurup et al., 1981; Mundt et al., 1996) mis à part les deux clusters mis en évidence par Kurup en 1987 (Tableau 1) (Kurup, 1987). Les extraits antigéniques ont une activité enzymatique importante (Nicolet and Bannerman, 1975). Et il est connu depuis longtemps que cette activité est principalement protéasique (Roberts et al., 1977).

Six protéines semblent être particulièrement impliquées dans la réponse immunitaire des patients et spécifiques de la maladie, tout d'abord une glycoprotéine de 51 kDa (Kurup et al., 1981), une protéine non identifiée de 29 kDa (Kurup et al., 1981), une protéine de 16 kDa ayant un point isoélectrique de pH 3.8 (Kurup et al., 1984), une protéine de 66 kDa avec un pH de 6-6,5 et pouvant avoir une activité enzymatique d'acide phosphatase et de beta-glucosidase (Ramasamy et al., 1987), et enfin deux protéines de 28 kDa et de 49 kDa (Aznar et al., 1988). L'étude de l'activité enzymatique d'extraits protéiques de *S. rectivirgula* montre la présence d'activités alcaline phosphatase, estérase, leucine amino peptidase, et β -galactosidase (Kurup et al., 1987). Les extraits antigéniques semblent également contenir des chaînes glucidiques fortement immunogènes qui permettraient de discriminer les patients des témoins exposés plus efficacement qu'avec le corps de la protéine, et cette fraction serait même plus réactive avec la sous-classe des IgG₂ (Mundt et al., 1996). Une électrophorèse bidimensionnelle a permis de montrer que seulement une quinzaine de protéines est détectée par les anticorps IgG₂ parmi lesquelles deux protéines remarquables ont été dévoilées, une protéine de 12 kDa (pI de 3,7) et une seconde de 30 kDa (pI 4,2) (Mundt et al., 1996).

Des Western blot à deux dimensions ont été réalisés et deux groupes de spots semblent être spécifiques des patients, les témoins exposés asymptomatiques ne montrant qu'une réactivité occasionnelle à ces groupes de spots (Kurup, 1987).

L'étude des composés chimiques de *S. rectivirgula* a montré l'existence d'un glycolipide majeur, permettant outre l'identification de l'espèce, un test sérologique permettant d'identifier des patients atteints de PDF (Gamian et al., 1996).

Ces différentes études citées montrent une grande diversité de résultats, la réactivité des sérums vis-à-vis des antigènes de *S. rectivirgula* dépend des conditions de croissance du

micro-organisme, de la fraction extraite (milieu de culture ou mycélium), de la méthode d'extraction, de la concentration de l'extrait, du test utilisé, de la variabilité individuelle de chaque sérum et de la variabilité entre différentes nationalités (Kurup et al., 1987).

Tableau 1 : Liste des publications ayant identifiées et caractérisées les antigènes de *S. rectivirgula*.

Auteurs (année)	Nombre sérums / sujets étudiés	Techniques utilisées pour la caractérisation des Ag	Classe d'anticorps	Nature des Ag testés	Technique d'extraction/purification	Nombre d'Ag détectés	Ag remarquables pour le diagnostic du PDF	Caractéristiques / Fonctions	Taille pH
Pepys & Jenkins (1965)	327 agriculteurs	DD, IEP	Précip.	Ag extraC	Précipitation acide + dialyse	3 Ag (fraction A, B et C)	Fraction "C"	NR	NR
Laberge & Stahmann (1966)*	-	IEP	Précip.	Ag mycéliens et Ag extraC	Sonication + précipitation acide	3 fractions antigéniques	Ag mycéliens solubles	Glycopeptide de la paroi, Ag polysaccharides (galactose, arabinose, glucosamine)	NR
Fletcher (1970)	40 cas de PDF, 54 exposés avec autres pathologies pulmonaires	DD	Précip.	Ag extraC	Dialyse	29 Ag (arcs)	« Chymotrypsine like »	« Chymotrypsine like »	NR
Edwards (1972)	pool de sérums de PDF	IEP et chromatographie pour séparer les différents Ag	Précip.	Ag extraC	Double dialyse	5 Ag majeurs	1 glycopeptide et 4 protéines	NR	Ag majeurs = 44; 77; 85; 101; 172 kDa; Ag mineurs = 75; 39; 45; 77; 90; 51; 105; 265 kDa
Nicolet and Bannerman (1975)	Sérum d'un lapin immunisé	DD	Précip.	Ag extraC	Dialyse	-	Enzymes extracellulaires « Chymotrypsine like »	Ag à activité chymotripsique	NR
Nicolet et al. (1977)	12 Sérums de lapins immunisés, 2 sérums de lapin témoin et 21 sérums de bétail et 62 sérums d'agriculteur dont 8 PDF	IEP	Précip.	Ag totaux	Dialyse	6 Ag : Enzymes 1, 2, 3, 4, 5 et 6	Enzymes extracellulaires « Chymotrypsine like », enzymes 1, 3 (et 5)	« Chymotrypsine like », hydolases, esterase (Enzyme 1)	500 kDa (Enzyme 1)
Kurup (1977)	4 Sérums de lapins immunisés et pool de 5 sérums de PDF	DD, 2D IEP	Précip.	2 Ag extraC produits par 2	SMSL et double dialyse	24 Ag (arcs)	Ag produits par technique SMSL	-	Tous les constituants sont inférieurs à 500 Da
Treuhart (1979)	15 PDF, 16 témoins exposés	Crossed IEP	Précip.	Ag extraC	Double dialyse	36 Ag (arcs)	10 arcs spécifiques de la maladie dont 3 intéressants pour le diagnostic	-	-
Ojanen (1980)*	PDF, patients ayant une bronchite, témoins	ELISA	-	Ag extraC et Ag mycéliens	-	-	Ag extracellulaires	-	-
Kurup (1981)	pool de lapins immunisés, 18 PDF et témoins exposés	DD, SDS-PAGE, Crossed IEP	Précip.	Ag extraC	SMSL	27 Ag	Ag extracellulaires (filtrat de culture), 1 glycoprotéine et 1 protéine	1 Glycoprotéine	pH 3,5-5,5; 51 kDa (glycoprotéine); 29 kDa (protéine)
Kurup (1984)*	15 PDF et 20 témoins exposés	ELISA	IgG	Ag extraC	-	1 antigène purifié	Ag extracellulaires (filtrat de culture)	Acides aminés majeurs = glycine, acide glutamique, acide aspartique, alanine	16 kDa pH 3,8
Kurup (1987a)*	PDF et témoins exposés	2D-PAGE, western blot	IgG	Ag bruts	-	29 Ag (spots)	2 clusters d'Ag majeurs	-	Cluster 1 = pH 5,37-5,67 et 25-45kDa; Cluster 2 = pH 6,38-6,64 et 55-60kDa

Ag: Antigènes; extraC : extracellulaire ; Précip. : précipitines ; DD: Double diffusion; IEP: Immunoélectrophorèse; ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*; BALISA : *Biotin-avidin-linked immunosorbent assay*; ELIEDA : *Enzyme linked immunoelectrodifussion assay* ; PDF : cas de Poumon de fermier ; NR : Non recherché ; * publication non accessible (informations basées sur le résumé)

Tableau 1 (suite): Liste des publications ayant identifiées et caractérisées les antigènes de *S. reactivigula*.

Auteurs (année)	Nombre sérums / sujets étudiés	Techniques utilisées pour la caractérisation des Ag	Classe d'anticorps	Nature des Ag testés	Technique d'extraction/purification	Nombre d'Ag détectés	Ag remarquables pour le diagnostic du PDF	Caractéristiques / Fonctions	Taille pH
Ramasamy (1987)*	PDF	ELISA	IgG	Ag extraC purifiés	chromatographie d'immuno-affinité	–	1 protéine (66 kDa)	Activités acide phosphatase et β -glucosidase	66 kDa, pH 6,0-6,5
Aznar (1988)	10 PDF, 10 témoins exposés	SDS-PAGE, western blot, ELIEDA	IgG, IgM, IgA et IgE	Ag bruts	Dialyse	en ELIEDA jusqu'à 16 arcs IgG; 16 arcs en IgA; 17 arcs en IgE; 19 arcs en IgM. 14 bandes visibles en SDS-PAGE et 20 bandes en western blot	2 protéines en western blot (28 et 49 kDa)	–	Protéines entre 15 et 66 kDa, 2 Ag remarquables à 28 kDa et 49 kDa
Iranitalab (1989)	25 PDF, 14 exposés avec autres pathologies pulmonaires, 31 suspicion de PDF, 14 témoins exposés, 13 témoins non exposés	SDS-PAGE, western blot.	IgG, IgA, IgM	4 Extraits commerciaux	Dialyse et lyophilisation	Extrait A immuno-réactif : protéines de 11 à 70kDa; Ag majeurs du PDF 11, 12, 25, 35 et 60kDa	SDS-PAGE: Extrait A = de 10 à 70kDa; Extrait B = 1 bande à 60kDa; Extrait C = 2 bandes à 21,5 kDa et 1 bande de 80-85kDa, Extrait D= bandes entre 10 et 90kDa	–	IgG = 11 kDa et 25 kDa, 60kDa, 12kDa; 35kDa; 15kDa; 24kDa; 30kDa; 52,5kDa; 55kDa; 62,5kDa; IgM = 11, 25 et 60kDa; IgA = 11kDa, 25kDa et 60kDa
Melinn (1992)	1380 sujets suspectés de PDF, 30 retenus pour le western blot	Western blot	IgG, IgA, IgM	Ag extraC	Double dialyse	2 bandes en SDS-PAGE de 25 et 58kDa; jusqu'à 17 bandes détectées en wb	IgG= 6 bandes + région 50-80kDa, IgA= 13 bandes, IgM= 8 bandes	–	IgG = région 50-80kDa, 12, 36, 20, 26, 38, 46kDa; IgA= 54 -70kDa
Kumar (1993)	7 PDF + 8 exposés + souris immunisée	Western blot, ELISA, <i>crossed</i> IEP et <i>Rocket</i> électrophorèse	IgG	Ag extraC	Double dialyse + chromatographie d'affinité	9 bandes en <i>crossed</i> IEP et <i>rocket</i> électrophorèse, 1 bande en western blot	Ag à 60kDa	–	28, 35, 60, 65, 68, > 100 kDa
Mundt (1996)	35 PDF, 15 témoins exposés et 20 témoins non exposés	Western blot, Dot blot	IgG ₂	Ag extraC	Triple dialyse	12 et 15 protéines antigéniques spécifiques de la maladie (protéines démunies de structure carbohydratee). Dont 2 isoformes probables Sac r 1 (12 kDa, pI 3,7) et Sac r 2 (30 kDa, pI 4,2)	Structures carbohydrates = antigéniques	Présence de mannose, glucose et galactose dans l'extrait protéique purifié.	pH 3,5 - 5 ; 10 - 100 kDa
Gamian (1996)	–	–	–	Lipides	–	Présence d'un glycolipide majeur chez le genre <i>Saccharopolyspora</i>	–	–	–

Ag: Antigènes; extraC : extracellulaire ; Précip. : précipitines ; DD: Double diffusion; IEP: Immunoelectrophorèse; ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*; BALISA : *Biotin-avidin-linked immunosorbent assay*; ELIEDA : *Enzyme linked immunoelectrodiffusion assay* ; PDF : cas de Poumon de fermier ; NR : Non recherché ; * publication non accessible (informations basées sur le résumé)

III. Problématique et objectifs

La positivité de la sérologie est l'un des critères majeurs pour le diagnostic des PHS selon Lacasse (2003) même si parfois celle-ci est considérée comme simple marqueur de l'exposition. La complexité des extraits antigéniques, la diversité des techniques de diagnostic sérologique et des techniques de production des antigènes bruts rendent difficile la mise au point de ces techniques. Actuellement, les antigènes totaux sont fabriqués de façon artisanale dans chaque laboratoire et leur composition varie d'un lot à l'autre même lorsque les conditions de culture sont harmonisées. Les laboratoires utilisent donc des antigènes très différents et même au sein d'un laboratoire donné, les résultats des techniques d'immuno-précipitation peuvent varier en fonction des lots de fabrication des antigènes. La démarche d'accréditation, obligatoire pour tous les laboratoires d'analyses médicales, pousse au remplacement des techniques classiques par des tests de réalisation plus standardisée tels que les tests immuno-enzymatiques (l'ELISA entre autre) avec l'utilisation d'antigènes recombinants.

Les protéines immuno-réactives d'intérêt diagnostique doivent être identifiées pour le développement des antigènes recombinants. Dans le cadre du PDF, des antigènes de *S. rectivirgula* ont déjà été caractérisés dans des études anciennes (années 1960 à 1990) mais aucun n'a jamais été identifié. Dans le cadre du PDM, les antigènes de *M. immunogenum* ont déjà fait l'objet d'une caractérisation précise par spectrométrie de masse (Gupta, 2009), permettant de définir 33 protéines antigéniques. Cependant ces protéines ont été révélées par western blotting par un sérum de lapin sensibilisé artificiellement à *M. immunogenum*, et les protéines immuno-réactives de patients sensibilisés dans des conditions réelles pourront apporter des informations supplémentaires sur les antigènes de l'espèce étudiée. De plus, du fait de la relative nouveauté de la maladie du poumon de mécanicien (premiers cas diagnostiqués dans les années 1990), aucun test de diagnostic sérologique n'est disponible dans le commerce.

L'objectif principal de cette thèse est d'améliorer et de standardiser le diagnostic sérologique des pneumopathies d'hypersensibilité industrielles et agricoles par le développement de test ELISA utilisant des antigènes recombinants spécifiques des principaux agents étiologiques. Trois espèces ont été étudiées *M. immunogenum* pour le diagnostic du PDM, *Aspergillus sp. (Eurotium amstelodami)* et *S. rectivirgula* pour le diagnostic du PDF dans le but de produire des kits diagnostiques utilisant une combinaison d'antigènes recombinants représentatifs des micro-organismes environnementaux impliqués dans chacune de ces pathologies.

IV. Développement d'antigènes recombinants et mise au point de tests ELISA standardisés pour le diagnostic du PDM et PDF

1.Stratégie

Les grandes étapes de l'approche adoptée pour le développement d'antigènes recombinants et la mise au point de test ELISA standardisé pour le diagnostic des PHS sont schématisées dans la Figure 9 ci-dessous.

La première étape consiste en l'identification des micro-organismes présents dans l'environnement des patients. Des prélèvements environnementaux ont été réalisés chez les patients inclus dans les protocoles cliniques (prélèvement de fourrage pour les patients PDF, prélèvements de fluide de coupe pour les patients PDM), afin d'isoler les agents étiologiques impliqués.

L'étape suivante comprend l'identification des protéines d'intérêt diagnostique par une approche immunoprotéomique, et la production de ces protéines sous forme recombinante (antigènes recombinants) en utilisant le système d'expression dans *E. coli*.

La dernière étape consiste en la validation, dans le cadre d'études cliniques, des techniques ELISA permettant la détection des IgG spécifiques des antigènes recombinants produits.

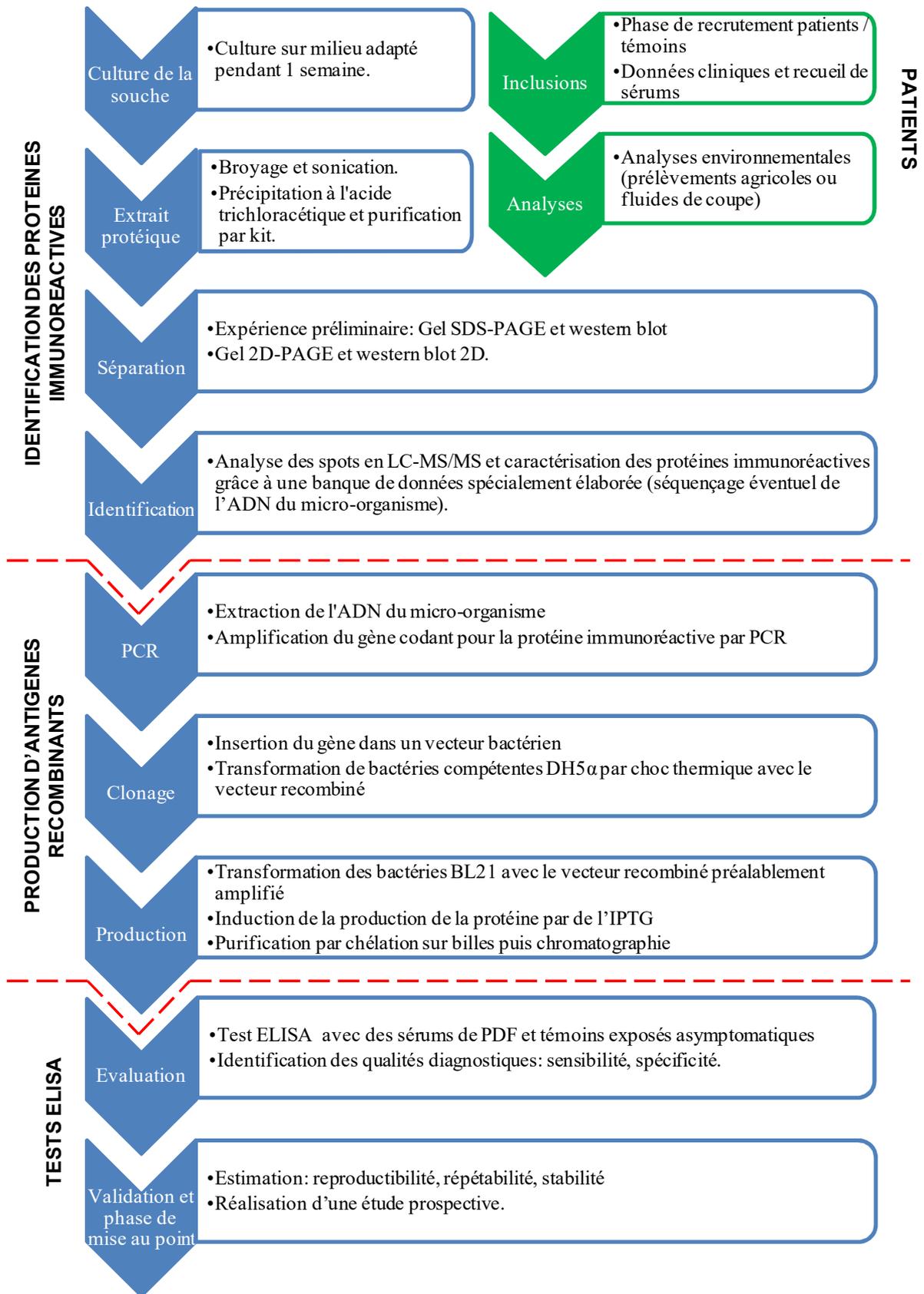


Figure 9 : Schéma récapitulatif des grandes étapes de l'approche immunoprotéomique dans le but de l'optimisation du diagnostic des PHS

1.1.Approche immunoprotéomique

L'approche immunoprotéomique utilisée dans ce travail de thèse, consiste à la séparation des protéines d'une espèce donnée par une électrophorèse bidimensionnelle, suivi de l'identification des protéines immuno-réactives par Western blot. Les premières étapes comprennent l'extraction et la purification des protéines du micro-organisme préalablement cultivé dans des conditions adéquates durant une semaine.

Les membranes de Western blot réalisées avec des sérums de patients ont été comparées avec celles réalisées avec des sérums de témoins exposés asymptomatiques. Les spots spécifiques de la maladie, révélés uniquement par les sérums de patients, ont été découpés sur le gel coloré au bleu de Coomassie puis analysés par spectrométrie de masse. Cette étape a été réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'université de Lausanne (Suisse) dirigée par le Dr Quadroni M., et est décrite brièvement ci-dessous.

La technologie utilisée pour ce travail est la LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry). Le principe de cette méthode est de digérer la ou les protéines contenues dans le spot par la trypsine afin d'obtenir des peptides. Les peptides sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse suivant leur hydrophobicité. Dans un second temps, les peptides sont ionisés puis leur masse est mesurée, ce qui permet d'accéder à leur composition en acides aminés (Figure 10).

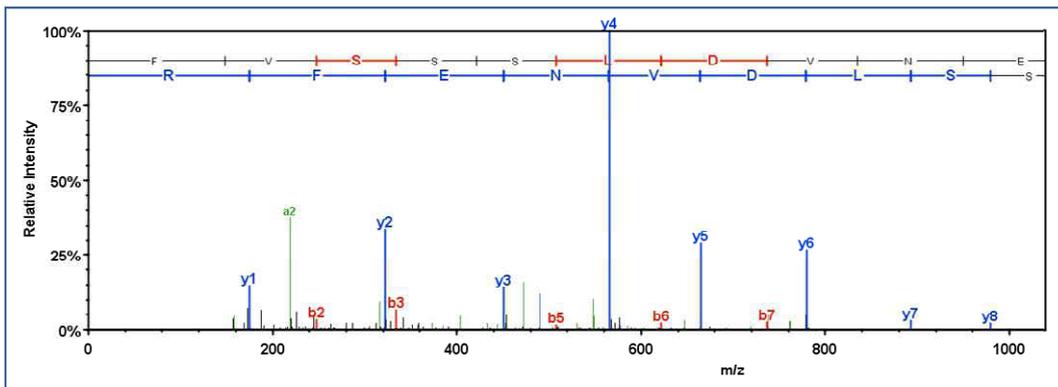


Figure 10 : Exemple de spectre de masse obtenu avec une analyse par la technologie LC-MS/MS.

Les séquences peptidiques sont alignées avec des séquences de protéines connues d'une base de données spécialement créée, il peut s'agir d'informations déjà disponibles sur les sites internet de données protéiques (ncbi, uniprot) ou d'une base de données nouvelles (le

séquençage du génome de l'espèce étudiée peut s'avérer indispensable si aucune autre espèce proche n'est déjà séquencée).

Dans ce travail, et pour *M. immunogenum* et *Aspergillus* nous avons utilisé des données disponibles (données génomiques et protéomiques sur les banques de données en ligne Uniprot et Genbank). Dans le cas de *S. rectivirgula*, le séquençage préalable du génome ainsi que l'annotation des contigs ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Mycologie du CHU de Lausanne.

1.2. Production des antigènes recombinants

Le développement d'antigènes recombinants nécessite l'utilisation de techniques de clonage de l'ADN dans des bactéries. Les bactéries transformées sont capables de produire en grande quantité la protéine d'intérêt, identifiée préalablement par la spectrométrie de masse.

Le gène d'intérêt est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis inséré dans un vecteur d'expression bactérien (pET11a-H6), qui est ensuite intégré dans une bactérie. Ce vecteur présente un gène de résistance aux antibiotiques, ainsi les colonies bactériennes survivant sur un milieu de culture en présence de l'antibiotique sont considérées comme positives (car porteuses du plasmide recombinant). Après la transformation bactérienne e.g. *Escherichia coli* DH5 α , la multiplication des bactéries permet l'obtention à l'identique d'un grand nombre de copies de l'insert dans le vecteur. Le vecteur est ensuite isolé (Mini et Midi préparation d'ADN plasmidique) et à nouveau intégré dans une autre souche de bactéries *E. coli* BL21, spécifiquement utilisée pour produire la protéine recombinante en grande quantité (Figure 11).

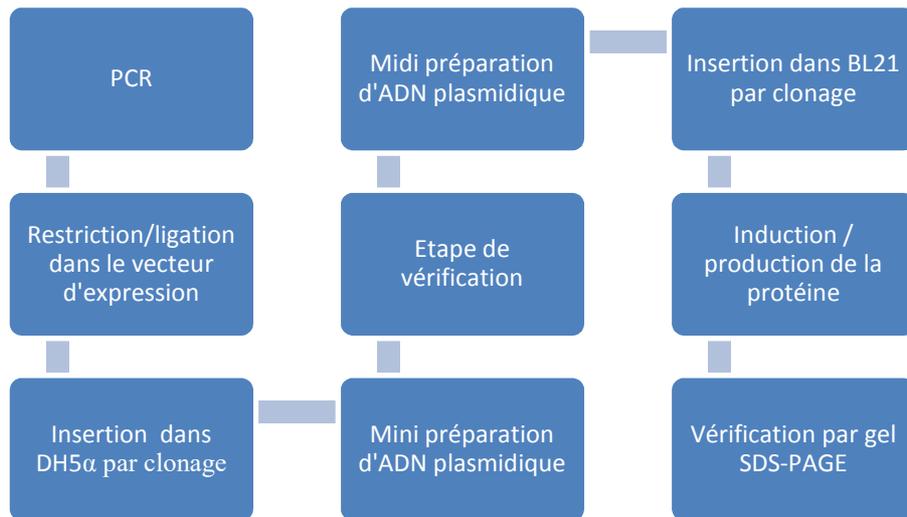


Figure 11 : Schéma récapitulatif des étapes menant à la production d'antigènes recombinants. Les étapes de Mini et Midi préparation d'ADN sont des étapes d'extraction du plasmide

1.3. Développement et évaluation de tests diagnostiques : Recherche d'IgG spécifiques des antigènes recombinants

La recherche d'anticorps IgG spécifiques des antigènes recombinants est réalisée par la technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) indirect. La formation des complexes antigène-anticorps est détecté par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé dans notre cas à la peroxydase dont le substrat est dégradé en un produit chromogène. La lecture de l'absorbance permet de quantifier le taux d'IgG spécifiques. La performance diagnostique du test est évaluée par une analyse statistique en courbe ROC (Receiver-Operating Characteristics), qui permet d'obtenir plusieurs paramètres caractérisant l'efficacité de l'antigène dans le test diagnostic : la sensibilité, la spécificité, l'aire sous la courbe et le pourcentage de valeurs correctement classées.

2. Patients, matériel et méthodes

2.1. Patients

2.1.1. Préparation et conservation des sérums

Tous les patients et témoins recrutés ont donné leur consentement écrit après avoir été informés sur les risques et la finalité de l'étude, puis un tube de sang (7ml minimum) a été prélevé sur chaque participant. Le sérum a été conservé dans des cryotubes à -80°C avant leur utilisation pour les analyses immunologiques.

2.1.2. Etudes sur la maladie du poumon de mécanicien

➤ *Patients français*

Le recrutement des patients atteints de PDM (n=15) a été réalisé par le service de pneumologie du centre hospitalo-universitaire de Lille (Tillie-Leblond et al., 2011) selon les critères de diagnostics admis (Bourke et al., 2001; Lacasse et al., 2003). Des témoins exposés asymptomatiques (n=12) ont également été recrutés dans la même entreprise. Des témoins non exposés provenant de zone urbaine et sans symptômes respiratoires ont aussi été inclus dans cette étude. Les deux groupes de témoins étaient similaires au groupe des malades par l'âge et le sexe.

➤ *Patients allemands*

Une seconde vague d'inclusion de 10 cas suspects de PDM a été réalisée par le service de santé et sécurité au travail de l'association des professionnels du bois et des métaux (BGHM) à Mayence (Rhénanie-Palatinat, Allemagne). Un tube de sérum de chaque patient a été envoyé au service de Mycologie-Parasitologie du CHU de Besançon pour des analyses diagnostiques complémentaires. Les sérums ont été conservés à -80°C.

➤ *Autres patients*

Quinze sérums de patients atteints de tuberculose à *Mycobacterium tuberculosis* et 15 sérums de patients infectés par d'autres mycobactéries (*M. abscessus* et *M. avium*) ont été testés afin de mettre en évidence d'éventuelles réactions immunologiques croisées.

2.1.3. Etudes sur la maladie du poumon de fermier

➤ *Patients de l'étude ANR « PHS-ICAD »*

Une étude antérieure à ce travail, le projet ANR « PHS ICAD » conduit entre 2006 et 2009 a permis de recruter des 26 patients de Franche-Comté et de Suisse atteints de la maladie du poumon de fermier sur la base des critères diagnostiques admis (Lacasse et al., 2003). Des témoins exposés asymptomatiques (TEA) ont également été recrutés via une campagne de dépistage conduite par la Mutualité Sociale Agricole (MSA) de Franche-Comté. Patients et témoins n'étaient pas appariés.

➤ *Patients de l'étude PHRC « SOPHIA »*

Le recrutement des patients a été effectué par 9 centres hospitalo-universitaires (CHU) impliqués dans le Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) « SOPHIA », conduit de 2009 à 2012 (Sérologie Optimisée des Pneumopathies d'Hypersensibilité Industrielles et Agricoles) impliquant les centres français de Besançon, Clermont-Ferrand, Lille, Lyon, Rennes, Rouen, Saint-Étienne, et suisses de Lausanne et Neuchâtel. Les patients ont été appariés avec des TEA, selon l'âge (\pm cinq ans), les habitudes tabagiques, la localisation géographique et le type d'exploitation agricole (taille, type d'élevage). Les TEA ont été recherchés sur des critères professionnels par les malades eux-mêmes puis recrutés par le service de pneumologie.

Au cours des trois ans de l'étude SOPHIA (au 01/07/2013), 26 patients atteints de PDF et 21 témoins ont été recrutés :

- 13 patients et 9 témoins par le CHU de Besançon
- 5 patients et 5 témoins par le CHU de Clermont-Ferrand
- 2 patients et 1 témoin par le CHU de Saint-Etienne
- 3 patients et 3 témoins par le CHU de Neuchâtel
- 3 patients et 3 témoins par le CHU de Rennes

➤ *Autres sérums*

D'autres sérums provenant de la sérothèque du laboratoire ont été utilisés dans certains essais de test ELISA. Des pools de sérums ont été constitués pour les essais et passés sur l'ensemble des plaques pour évaluer la répétabilité et permettre la standardisation :

- Pool négatif : Trois sérums de patients anonymes préalablement testés et ne réagissant pas aux différents extraits protéiques des espèces étudiées.
- Pool positif : Deux sérums de l'étude PHS ICAD (codifiés PBHS8 et PNHS4), ces sérums avaient un taux d'IgG spécifiques particulièrement haut pour l'ensemble des espèces étudiées.
- Pool de référence : Deux sérums de patients anonymes sensibilisés aux différents antigènes responsables du PDF (hors études SOPHIA et PHS-ICAD).
- Témoins urbains : 28 sérums de personnes anonymes provenant d'une zone urbaine (non exposés au milieu agricole ni à des antigènes aviaires).

2.2. Matériel

2.2.1. Les milieux de culture

Les milieux de culture ont été utilisés pour le maintien des souches de référence, pour les analyses microbiologiques des prélèvements agricoles, ou pour la culture des souches d'*E. coli* pour les différentes étapes du clonage.

- *Milieux pour les analyses microbiologiques des prélèvements agricoles et maintien des souches de référence issus du milieu agricole*

Le milieu Dichloran-Glycérol (DG18, Oxoid, Unipath®, Basingstoke, Grande-Bretagne) supplémenté par 0,5% de chloramphénicol (Merk®, Darmstadt, Allemagne) favorise le développement de moisissures mésophiles et des levures (comme *Lichtheimia corymbifera* et *Eurotium amstelodami*). La température d'incubation est de 30°C.

Le milieu Malt sel (Oxoid, Unipath®, Basingstoke, Grande-Bretagne) (NaCl 10 %) favorise le développement de *Wallemia sebi* et permet de mettre en évidence des espèces fongiques osmophiles dans les produits agricoles. La température d'incubation est de 20°C.

Le milieu Actinomycètes (Bacto, Difco Laboratories®, Détroit, Etats-Unis) favorise le développement d'actinomycètes mésophiles. La température d'incubation est de 30°C.

Le milieu R8 (Amner et al., 1989) favorise le développement d'actinomycètes thermophiles (comme *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris*, ou les *Streptomyces* thermophiles). La température d'incubation est de 52°C.

Le milieu « eau gélosée » (Pastagar B, Sanofi Diagnostics Pasteur®, Marnes-la-coquette, France) favorise le développement des hyphomycètes. Il a été utilisé uniquement pour le repiquage des souches non identifiables (filaments stériles) dans les analyses microbiologiques des prélèvements agricoles. La température d'incubation est de 30°C.

Milieu Coeur-Cerveille (BHI : Brain Heart Infusion ; BD) a été utilisé à 52°C et sous-agitation, pour la culture en milieu liquide de *S. rectivirgula*.

➤ *Milieux de culture pour M. immunogenum*

Le milieu MH (Muller-Hinton) gélosé ou liquide a été utilisé à 30°C pour maintenir la souche de *M. immunogenum*.

➤ *Milieux de culture pour bactéries E. coli*

Le milieu de culture principalement utilisé dans cette étude pour les bactéries compétentes *E. coli* est le milieu LB (Luria Bertani) en milieu gélosé (10 g/L de tryptone, 5 g/L de d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl, 0,3% NaOH, 15 g/L d'agar) ou liquide (10 g/L de tryptone, 5 g/L de d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl, 0,3% NaOH). Les solutions ont été autoclavées puis selon le besoin de sélection des bactéries transformées, le milieu LB gélosé a été coulé dans des boîtes de Pétri en présence d'ampicilline (50 µg/ml) (Sigma-aldrich®).

Le milieu YT2X (20g/L tryptone, 5g/L extrait de levure, 0,1M NaCl, 2mM MgSO₄) est un milieu spécialement utilisé pour la culture de bactéries dans le protocole de fabrication de cellules compétentes par la méthode de Hanahan.

2.2.2. Souches des micro-organismes impliquées dans les PHS

La souche de *M. immunogenum* utilisée pour cette étude est issue des prélèvements de fluides de coupe réalisés dans une usine française du Nord de la France dans laquelle la majorité des cas ont été diagnostiqués (Tillie-Leblond et al., 2011). Cette souche est référencée sous le numéro DSMZ 45496.

La souche de *S. rectivirgula* DSMZ 43113, isolée de foin moisi lié à un cas de PDF a servi pour l'analyse protéomique et génomique. La souche est maintenue sur milieu R8 à 44°C.

2.2.3. Souches des bactéries pour le clonage

Deux souches de bactéries compétentes *E. coli* sont utilisées dans cette étude. La souche *E. coli* DH5 α a été utilisée pour l'étape de clonage des plasmides recombinants qui permet l'obtention à l'identique d'un grand nombre de copies des produits de ligature insert-vecteur. La souche *E. coli* BL21 a été utilisée pour la production de la protéine recombinante en présence d'un inducteur l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

2.2.4. Plasmide natif pET-11aH6

Le plasmide pET-11aH6 (Figure 12) est un plasmide dérivé du pET-11a (commercialisé), comportant un gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur *LacI* permettant l'induction de la production de la protéine recombinante par l'IPTG et une répétition de codons permettant l'ajout d'une queue de 6 histidines (6 His-Tag) à l'extrémité N-terminale des antigènes recombinants produits. Il contient des sites de restriction uniques pour les enzymes *NcoI*, *BamHI*, *RcaI* e *BglII*, utilisées pour permettre l'insertion des produits PCR. La taille du plasmide est d'environ 5 500 pb.

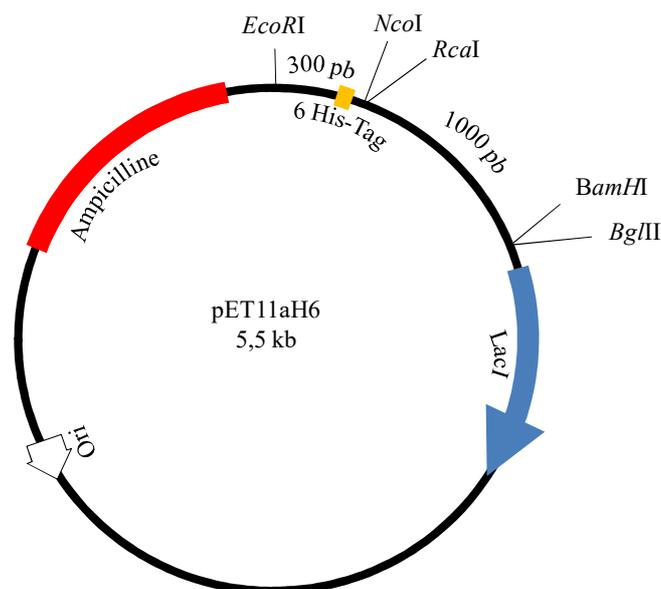


Figure 12 : Représentation schématique et simplifiée du plasmide pET11a-H6.

2.3. Prélèvements et analyses environnementales

Dans le cadre de la thèse, seules des analyses de l'environnement agricoles ont été réalisées (les études microbiologiques sur des fluides de coupe ont été réalisées précédemment à ce mémoire de thèse).

2.3.1. Prélèvements des échantillons agricoles

Des prélèvements environnementaux ont été effectués par les participants eux-mêmes de l'étude SOPHIA. Le kit de prélèvements pour fourrages était constitué de dix pots stériles, une fiche de renseignements (Cf annexe, page 229) et un conditionnement de gel hydro-alcoolique. Les participants devaient récolter au maximum 10 échantillons différents de foin, de paille ou d'aliments pour le bétail (granulés/graines/farine) et indiquer un maximum de renseignements sur l'échantillon (type de produit, conditionnement, provenance, date et conditions météorologiques de récolte, lieu de stockage) (Gbaguidi-Haore et al., 2009). Les échantillons ont été adressés par colis postal au CHU de Besançon. Chaque échantillon a été congelé au minimum une nuit à -20 °C pour détruire les acariens présents.

2.3.2. Traitement des échantillons agricoles

Cinq grammes de fourrage ou 15 g de granulés (ou autres aliments pour le bétail) ont été placés dans un sac type StomacherTM (AES®, Combourg, France) sous hotte à flux laminaire. Les échantillons ont été battus durant 6 min avec 80ml d'une solution saline (NaCl 0,9 % ; Tween80 0,1 %). Cent microlitres du liquide de rinçage de l'échantillon ont été utilisés purs pour les milieux Actinomycètes et R8 ou dilués au 1/10^e pour les milieux DG18 et Malt sel, en étalement par la technique du râteau puis incubées à la température appropriée. Le liquide de rinçage non utilisé a été conservé dans un cryotube à -20 °C pour d'éventuelles analyses supplémentaires.

2.3.3. Identifications des moisissures

Les colonies ont été identifiées et comptabilisées après 3 et 7 jours de culture. Les résultats sont exprimés en Unité Formant Colonies par gramme de fourrage (UFC/g) selon la formule suivante :

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC observées} \times \frac{\text{Volume de la solution de rinçage}}{\text{Volumeensemencé}} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Poids de fourrages rincés (en g)}}$$

Les moisissures ont été identifiées selon les procédures habituelles d'identification en mycologie (Reboux et al., 2006b), basées sur l'observation macroscopique et microscopique des colonies fongiques. En cas d'absence de fructification, les colonies ont été repiquées sur milieu « eau gélosée » et reconnues comme « filaments non identifiés » lorsque cette sub-culture n'a pas permis l'identification. Les principales moisissures responsables du PDF ont été recherchées et, pour les autres, l'identification a été faite jusqu'au genre seulement (*Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*). Les levures ont été dénombrées mais n'ont pas été identifiées (seules les levures de couleur rouge ont été classées dans le genre *Rhodotorula*). Les actinomycètes ont été identifiés sur la base d'observations macroscopiques uniquement et par comparaison avec des souches de références : la souche DSMZ43113 pour *S. rectivirgula*, IHEM 14576 pour *Thermoactinomyces vulgaris* et une souche de collection environnementale du CHU de Besançon (n°199) pour *Saccharomonospora viridis*.

2.3.4. Interprétation des résultats

Les résultats en UFC/g ont été comparés à une base de données de référence locale. Cette référence détermine les seuils de contamination au-dessus desquels l'échantillon peut être considéré comme anormalement contaminé pour les espèces impliquées dans l'apparition du PDF : *L. corymbifera*, *Eurotium spp.*, *Wallemia sebi*, *Streptomyces* mésophiles et thermophiles, *Saccharomonospora spp.*, *S. rectivirgula* et *T. vulgaris* (Cf Tableau 2). Les seuils de référence indiqués ont été établis à partir de lots de foin et de paille encore conditionnés au moment du prélèvement, de 42 exploitations représentatives du département du Doubs (France) dont aucun des agriculteurs ne présentaient de troubles respiratoires (ni Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ni PDF) (Roussel et al., 2005b).

Tableau 2 : Référence de seuils de contamination.

Espèces	Référence en UFC/g
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	2 000
<i>Eurotium spp.</i>	50 000
<i>Wallemia sebi</i>	180 000
<i>Streptomyces</i> mésophiles	14 600
<i>Streptomyces</i> thermophiles	4 400
<i>Saccharomonospora spp.</i>	640
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	740
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	500

2.4. Analyses génomiques

2.4.1. Extraction de l'ADN des souches

Cinq millilitres de bouillon cœur-cerveille ont étéensemencés à partir d'une pré-culture de *S. rectivirgula* sur milieu gélosé R8 ou de *M. immunogenum* sur le milieu gélosé MH et incubés sous agitation pendant 20 h à 52 °C. Les cellules ont été recueillies par une centrifugation de 5 min à 4 000 g et lavées deux fois avec 5 ml de PBS (*Phosphate buffered Saline*, Sigma-aldrich®). Le culot a été resuspendu dans 200 µl de PBS supplémenté avec 20 µl de SDS 10 % et les parois des cellules ont été digérées par 100 µg de lysozyme (Roche Diagnostics®, Mannheim, Allemagne) pendant 30 min à 37 °C. L'échantillon a ensuite été traité avec 100 µg de RNase pendant 15 min à 37 °C afin d'éliminer l'ARN présent. L'ADN contenu dans le lysat cellulaire a finalement été purifié à l'aide du coffret: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics®, Mannheim, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur.

2.4.2. Base de données ADN de *M. immunogenum*

Pour l'analyse des séquences codantes des protéines immuno-réactives de *M. immunogenum*, la base de données utilisée est celle de l'espèce la plus proche *M. abscessus* qui est disponible sur Genbank sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), puisque son génome est entièrement séquencé (Wilson et al., 2001).

2.4.3. Base de données ADN de *S. rectivirgula*

➤ Séquençage du génome de *S. rectivirgula* par 454 FLX

Aucune base de données de l'espèce *S. rectivirgula* ou d'espèce proche n'est disponible dans les banques disponibles. Nous avons donc constitué une base de données pour les besoins de notre étude. L'extrait d'ADN de *S. rectivirgula* a été séquencé par la société Microsynth (Balgach, Suisse) en utilisant la technologie 454 FLX (454 Roche GS FLX, Roche®). Les fragments d'ADN obtenus ont été assemblés en 77 contigs grâce à l'utilisation du logiciel DeNovo Assembler 2.0.01.14.

➤ Préparation d'une base de données pour spectrométrie de masse

Les 77 contigs ont nécessité une annotation afin de convertir cette base de données de séquences d'ADN en une base de données protéiques compatible avec l'analyse en

spectrométrie de masse. Cette étape d'analyse bioinformatique a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Mycologie (Dr Zaugg et Pr M Monod), service de Dermatologie du CHU de Lausanne (Suisse).

Les contigs de *S. rectivirgula* ont été alignés par tblastn avec un cut-off de 0,5, avec le génome de *S. erythraea*, l'espèce séquencée la plus proche du point de vue génétique et disponible sur la banque de données GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), afin d'annoter de manière prédictive les séquences nucléotidiques de *S. rectivirgula*. L'alignement a permis de prédire 7197 ORF (Open Reading Frame) ou protéines probables servant de base de données protéiques finale pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Pour l'amplification par PCR des gènes codant pour les protéines à développer en antigènes recombinants, la prédiction des 7197 ORF n'est pas suffisamment précise et une seconde analyse bioinformatique a été menée spécialement pour dessiner les amorces. Le logiciel en ligne softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=Programs & subgroup=gfindb>) a permis de déterminer l'emplacement exact du gène sur le contig (parfois différente de quelques bases nucléotidiques par rapport à la prédiction avec *S. erythraea*) et sa traduction en séquence d'acides aminés. La carte de restriction de chaque gène a été déterminée par le logiciel en ligne mise à disposition par New England Biolabs Inc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Les sites de coupures par les enzymes de restriction *NcoI*, *BamHI*, *RcaI*, *BglIII* et *EcoRI* sont particulièrement recherchés afin de déterminer les sites à utiliser pour l'insertion du gène dans le vecteur d'expression (Cf chapitre III 2.6 Production d'antigènes recombinants p. 86)

2.5. Analyses protéomiques

2.5.1. Extraction des protéines

La paroi cellulaire du micro-organisme (*M. immunogenum* et *S. rectivirgula*) a été détruite par lyse mécanique puis les protéines ont été précipitées à l'acide trichloracétique avant d'être purifiées à l'aide d'un kit. Les antigènes purifiés sont utilisés pour les techniques de SDS-PAGE, Western blot et ELISA.

➤ *Mode opératoire*

L'actinomycète *S. rectivirgula* a été cultivé sur un milieu R8 à 44°C et la mycobactérie *M. immunogenum*, sur milieu MH à 30°C pendant une semaine.

Les colonies bactériennes obtenues après 7 jours de culture ont été décollées de la gélose à l'aide d'un scalpel et suspendues dans le tampon A (phosphate de sodium 10 mM, NaCl 0,9 %) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (phenylmethanesulfonyl fluoride 1mM, phenanthroline 1mM et pepstatine 1µM). Les colonies bactériennes ont été broyées pendant 1 min à l'Ultra-Turrax® (Ultra-Turrax® T25, basic, IKA Labortechnik, Staufen, Allemagne) à pleine puissance, puis les cellules éclatées aux ultrasons pendant 5 cycles alternant 1 min d'ultrasons et 1 min de repos. Après 3 min de centrifugation du broyat à 10 000 rpm à 4°C, le surnageant a été recueilli et soumis à une deuxième centrifugation avant une filtration sur une membrane de 45 µm (Merk Millipore, Darmstadt, Allemagne). Après l'ajout de déoxycholate 0,1% à raison de 100 µl pour 1 ml de surnageant, la solution a été incubée pendant 5 min à température ambiante. Les protéines ont été précipitées pendant 15 min dans la glace en présence d'acide trichloracétique (à 6,1N, Sigma-Aldrich®) à raison de 70 µl par ml de surnageant puis centrifugées 7 min à 10 000 rpm. Le culot protéique obtenu par précipitation acide a été purifié à l'aide du coffret SDS-PAGE clean-up (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) selon les instructions du fournisseur. L'échantillon a été resuspendu dans une quantité adéquate d'eau distillée. Cette étape a permis d'éliminer les résidus non protéiques et permettre de réaliser des SDS-PAGE plus nets.

➤ *Dosage des protéines par la méthode Lowry*

La concentration des protéines totales a été évaluée selon la méthode de Lowry par l'utilisation d'un coffret *DC Protein assay* (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) selon les recommandations du fournisseur. Une gamme étalon de 6 points de dilution allant de

0,1mg/ml à 1,5mg/ml de BSA a été réalisée afin de convertir les mesures d'absorbance des échantillons réalisées à 750 nm en concentration.

2.5.2. Electrophorèse : SDS-PAGE 1D

Principe : Les protéines sont séparées sous conditions dénaturantes (due à la présence de SDS et de β -mercaptoéthanol dans le tampon de charge et d'une dénaturation par chauffage) selon leur poids moléculaire à travers une matrice constituée d'acrylamide et de bis-acrylamide à l'aide d'un champ électrique.

Mode opératoire : Un volume de tampon de charge (SDS-PAGE sample Buffer, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) supplémenté avec 5 % (v/v) de β -mercaptoéthanol équivalent au volume d'échantillon protéique correspondant à une quantité de 200 μ g de protéines a été ajouté. Les protéines de l'extrait ont d'abord été dénaturées à 95°C pendant 3 min puis déposées sur un gel de polyacrylamide comportant deux phases : le gel de concentration des protéines (acrylamide/bisacrylamide 5% ; Tris-HCl pH6,8 0,12 M ; SDS 0,2% ; Persulfate d'ammonium 0,05% ; TEMED 0,1%) et le gel de séparation des protéines (acrylamide/bisacrylamide 10% ; Tris-HCl pH8,8 0,375 M ; SDS 0,1%, Persulfate d'ammonium 0,05%, TEMED 0,1%). Un marqueur de poids moléculaire a également été déposé (Precision Plus Protein Standards, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). La migration a été effectuée dans du tampon d'électrophorèse pH8,3 (Tris 24 mM ; Glycine 20 mM ; SDS 3,5 mM) à 100 volts (V) pendant 30 min à travers le gel de concentration puis pendant 2 h à 150 V à travers le gel de séparation. Pour visualiser les protéines séparées, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (méthanol 40% ; acide acétique 10% ; bleu de Coomassie 0,2%). Alternativement, les protéines du gel (non coloré) peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose afin de réaliser un Western blotting.

2.5.3. Western Blotting 1 D

Principe : Les protéines du gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis cette membrane est incubée avec les sérums des sujets étudiés pour permettre la fixation des anticorps spécifiques de ces protéines. Les complexes antigènes-anticorps sont révélés par un anticorps secondaire anti- IgG humain couplé à une enzyme qui métabolise un substrat incolore en un produit coloré (ici la phosphatase alcaline).

Mode opératoire : Les protéines séparées à l'aide du gel SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (9 x 7 cm, Protan, Whatman, GE, Velizy-Villacoublay,

France) sous l'action d'un champ électrique (2h à 80V) dans un tampon de transfert pH8,3 (Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1%, Méthanol 20%). La membrane a été colorée au rouge Ponceau R4 afin de vérifier la qualité du transfert puis rincée à l'eau distillée avant d'être séchée et découpées en bandelettes de 3 mm de large. Toutes les étapes du Western blotting ont ensuite été réalisées sur une table d'agitation. Chaque bandelette a été réhydratée avec une solution de lavage (TBS-Tween 0,05 %), puis les sites non occupés par des protéines sur la membrane ont été saturés durant 1 h avec une solution TTB (TBS ; Tween 0,05% ; BSA 3%). Chaque bandelette a ensuite été mise en incubation 1 h avec un sérum dilué au 1/500e dans 1 ml de solution TTB. Après 4 lavages de 5 min avec la solution de lavage, les bandelettes ont été incubées 1 h avec un anticorps secondaires (anti-IgG humain couplé à la phosphatase alcaline, Sigma-Aldrich®) dilué au 1/4000^e dans la solution TTB. Après 4 lavages supplémentaires, les bandelettes ont été incubées à l'obscurité durant 5 min dans la solution de révélation (Tris 100 mM ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 5 mM ; Triton X100 (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) 0,025% ; nitrobluetetrazolium 0,15 mM ; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 0,15 mM (Roche®)). La réaction de révélation a été stoppée par lavages des bandelettes à l'eau distillée.

2.5.4. Electrophorèse : SDS-PAGE 2D

Principe : Les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique à travers un gradient de pH puis selon leur poids moléculaire comme dans l'électrophorèse 1D. Plusieurs tailles de gels sont utilisées. Les petits gels de 7 cm sont utilisés pour réaliser les essais préliminaires. Les grands gels de 11 ou 18 cm sont utilisés pour obtenir une résolution plus fine du gel coloré au bleu de Coomassie, ou du résultat du Western blot, afin de découper plus facilement les spots pour l'analyse en spectrométrie de masse.

➤ *Mode opératoire pour les gels de 7 cm*

Vingt-cinq microgrammes de protéines ont été resuspendus dans 125µl de tampon de charge (tampon de lyse 2x DIGA, 2% IPG) puis déposés sur le strip (7cm immobiline DryStrip pH3-11NL ; GE) préalablement réhydraté une nuit (solution DeStreak, 0.5% IPG ; GE). La migration a été effectuée pendant 15h selon plusieurs étapes : une étape de 3h à 150V suivie d'une étape de 3h à 300 V, puis une étape durant laquelle le voltage a été augmenté progressivement jusqu'à 1000V durant 5h puis jusqu'à 3000 V pendant 2h et une étape finale à 3000V constant durant 2h. Le strip a ensuite été équilibré 15 min dans une solution d'équilibration (Tris HCl pH6.8 50mM, Urée 6M, glycérol 30%, SDS 2%) supplémenté avec

120 mg de dithiothreitol, puis 15 min avec la solution d'équilibration supplémentée avec 300 mg d'iodoacétamide. Le strip a ensuite été rapidement incubé dans le tampon de migration pour SDS-PAGE avant d'être scellé avec de l'agarose au sommet d'un gel d'acrylamide 12% pour la seconde dimension. La migration a été réalisée en 3 étapes : une première étape de 30 min à 25V suivie d'une étape de 30 min à 80V et une dernière étape durant laquelle le voltage a été augmenté jusqu'à atteindre 120V. Finalement, les protéines séparées sur le gel ont été soit colorées au bleu de Coomassie, soit transférées sur une membrane pour le Western blotting.

➤ *Mode opératoire pour les gels moyens de 11 cm et grands gels de 18 cm*

Pour un gel de plus grande dimension la procédure est sensiblement la même, seuls les quantités de protéines déposées et les voltages des migrations changent. Cent microgrammes de protéines (pour un gel coloré au bleu de Coomassie) ou 50µg (pour un gel destiné au transfert des protéines sur une membrane) ont été déposés sur le strip de 11 cm (11cm Immobiline DryStrip pH 3-11NL, GE) ou 18cm (18cm Immobiline DryStrip pH 3-11NL, GE) avec 200 à 300µl de tampon de charge. La migration s'effectue en plusieurs étapes : une étape de 3h à 150 V suivie d'une étape de 3h à 300 V, puis d'une étape de 6 h durant laquelle le voltage est progressivement augmenté jusqu'à 1000 V, puis une étape de 3 h durant laquelle le voltage est augmenté jusqu'à 8000 V et enfin une dernière étape de 3h durant laquelle le voltage est constant à 8000 V. Le strip a été équilibré comme pour les petits gels avant d'être scellé au gel d'acrylamide 12%. La migration dans la deuxième dimension a été effectuée durant 45 min à 10 mA puis durant 1 h à 16 mA, et enfin une étape durant laquelle l'ampérage a été augmenté jusqu'à atteindre 50 mA.

2.5.5. Western Blotting 2D

Principe : Le principe est le même que pour le Western blotting 1D. Le transfert sur membrane de nitrocellulose est précédé d'une séparation des protéines selon leur point isoélectrique à travers un gradient de pH puis selon leur poids moléculaire permettant une meilleure résolution.

Mode opératoire : Le transfert des protéines à partir des petits ou grands gels de 1 ou 18cm ont été réalisés de la même manière qu'un Western blot 1D (voir paragraphe III 2.5.3). Après le transfert, la membrane a été colorée au rouge Ponceau afin de visualiser les protéines. Des repères ont été réalisés avec une aiguille au niveau des spots les plus intenses. Après la

révélation avec les sérums, ces marques ont permis d'aligner les différents blots entre eux ou avec le gel coloré au bleu de Coomassie. Le Western blotting 2D a également été réalisé de la même façon que pour le Western blotting 1D mais avec des volumes plus importants. Pour les petits gels, les incubations avec les sérums et l'anticorps secondaires ont été réalisées dans un volume de 20 ml, les lavages dans un volume de 30 ml et la révélation dans 25 ml. Pour le grand gel, toutes les étapes ont été réalisées dans 50 ml sauf l'étape de révélation qui a été effectuée dans un volume total de 100 ml.

2.5.6. Spectrométrie de masse LC-MS/MS

Les spots sélectionnés pour l'analyse par spectrométrie de masse ont été découpés dans le grand gel (18cm ou 11cm) coloré au bleu de Coomassie et transférés dans une plaque 96 puits (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Les spots ont été digérés par de la trypsine (Promega, Charbonnières, France) puis les peptides obtenus ont été séparés par HPLC sur colonne Pepmap C18 (Dionex, ThermoScientific, Roskilde, Danemark). L'analyse a été réalisée avec le spectromètre de masse 4000 QTRAP quadrupole-linear trap (ABI SCIEX) et les données ont été analysées avec le logiciel Mascot (Matrix Science, version 2.2.0) par alignement avec la base de données protéique créée pour cette étude (voir III 2.4.3). Le logiciel Scaffold (Proteome software Inc., version Scaffold 01_06_03) a également été utilisé pour valider les résultats de la spectrométrie de masse.

2.5.7. Analyses des séquences protéiques

Chaque séquence d'acides aminés déterminée par la spectrométrie de masse a fait l'objet de diverses analyses de prédiction.

➤ *Prédiction de la localisation cellulaire*

La prédiction de la localisation cellulaire a été possible par la recherche d'un peptide signal dans la séquence protéique sur les sites SIG-PRED¹ et pSORTb² (Subcellular Localization Prediction Tool, version 3.0.2).

¹ http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html

²: <http://www.psort.org/psortb/>

➤ *Prédiction du point isoélectrique et de la masse moléculaire*

La prédiction du point isoélectrique et de la masse moléculaire ont été réalisées sur le portail de bioinformatique ExPASy³.

³ http://web.expasy.org/compute_pi/

2.6. Production d'antigènes recombinants

2.6.1. Amplification de séquences nucléotidiques par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été utilisée ici pour amplifier les gènes codant pour les protéines d'intérêt (protéines immuno-réactives sélectionnées pour être produites en antigènes recombinants).

Les amorces ont été dessinées de manière à amplifier l'ORF de chaque gène d'intérêt, et à insérer en début de séquence (5') un site de restriction correspondant au site de *NcoI* ou *RcaI* et un site de restriction correspondant au site de *BamHI* ou *BglIII* en fin de séquence (3'). Le couple d'enzyme *NcoI-BamHI* ou *RcaI-BglIII* a été préférentiellement choisi selon la carte de restriction de chaque gène (voir Tableau 3, Tableau 4). Une base a été ajoutée pour respecter le cadre de lecture dans l'amorce sens, après la coupure par l'enzyme de restriction.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl. Le mélange réactionnel est composé de 60 µg d'ADN purifié, 0,5 µM d'amorces sens et 0,5 µM d'amorces anti-sens et 25µl de ReadyMixTM Taq PCR (Sigma-Aldrich®) contenant à la fois les dNTPs et la Taq polymérase ou ADN polymérase, du MgCl₂ et le tampon de l'enzyme. L'amplification a été réalisée selon les programmes de PCR suivants :

Programme 1 :

- Etape de dénaturation initiale : 3 min à 94°C
 - Etape de dénaturation : 1 min à 94°C
 - Etape d'hybridation : 30s à 55°C
 - Etape d'élongation : 2 min à 72°C
 - Etape d'élongation finale : 10min à 72°C
- } 30 répétitions

Programme 2 :

- Etape de dénaturation initiale : 3 min à 94°C
 - Etape de dénaturation : 1 min à 94°C
 - Etape d'hybridation : 30s à 65°C
 - Etape d'élongation : 2,5 min à 72°C
 - Etape d'élongation finale : 10min à 72°C
- } 30 répétitions

Tableau 3 : Amorces permettant d'amplifier les gènes d'intérêts de *S. rectivirgula*.

Amorces	Séquence nucléotidique de l'amorce	Nom du gène	Numéro d'accèsion EMBL	Taille du fragment amplifié (pb)	Enzymes de restriction utilisées
SR1-f	5'-GTTCCATGGGAGAGACGGCTCAGCAACGGCG-3'	<i>gsr1</i>	HE793687	808	<i>Nco I</i>
SR1-a	5'-GGGAGATCTTCAGCTGCGGGCGGACAGCTCCG-3'				<i>Bgl II</i>
SR1-b	5'-TGCCCATGGACGCAAGTGGCTCCAGCGCCGC-3'				<i>Nco I</i>
SR1-r	5'-GTTGGATCCTCAGCGGGAGAGCACCCGGTA-3'				<i>BamH I</i>
SR2-f	5'-GTTCCATGGGACGACTGGACCGGAATCCACGGGC-3'	<i>gsr2</i>	HE793688	1164	<i>Nco I</i>
SR2-r	5'-GTTGGATCCTCAGGGGGCCTGCACCAATCCGGC-3'				<i>BamH I</i>
SR4-f	5'-GTTCCATGGGGGTCTGCTGGCTGCTGCGTTG-3'	<i>gsr4</i>	HE793690	1761	<i>Nco I</i>
SR4-r	5'-GTTGGATCCTCAGTCCATCCCCGGGTGACGATC-3'				<i>BamH I</i>
SR5-f	5'-CGTTCATGACGTGGAGTTCCCGCGGGACCAG-3'	<i>gsr5</i>	HE793691	1368	<i>Rca I</i>
SR5-r	5'-GTTAGATCTTCACTTGCCGGTGATCCGCTTGTA-3'				<i>Bgl II</i>
SR6-f	5'-CGTTCATGAGACCTGCCGGTACCGCTGCGGC-3'	<i>gsr6</i>	HE793692	1986	<i>Rca I</i>
SR6-r	5'-GTTAGATCTTCACTCGCGCCGATCTCGCC-3'				<i>Bgl II</i>
SR7-f	5'-GTTCCATGGGAGCATCCGCGAGCAGGCGCAGAAG-3'	<i>gsr7</i>	HE793693	1311	<i>Nco I</i>
SR7-r	5'-GTTGGATCCTCAGAAGTGCAGCAGCTCCGTGGA-3'				<i>BamH I</i>
SR9-f	5'-GTTCCATGGGGGTACCAGTGGAATCACTCGCCGG-3'	<i>gsr9</i>	HE793695	2262	<i>Nco I</i>
SR9-r	5'-GTTGGATCCCTATCGGATGCTCAACGTGCTCCT-3'				<i>BamH I</i>
SR10-f	5'-CGTTCATGACGGGATCACCGAAGTACCGGTTCC-3'	<i>gsr10</i>	HE793696	1629	<i>Rca I</i>
SR10-r	5'-GTTAGATCTTCAAGCCATGTGCGGATAGGTGTG-3'				<i>Bgl II</i>
SR12-f	5'-GTTCCATGGGCCTGTCGAGGAGTGCGAAGTGACC-3'	<i>gsr12</i>	HE793698	1392	<i>Nco I</i>
SR12-r	5'-GTTGGATCCTCATCCGTGCACGTGCAGCGGCTT-3'				<i>BamH I</i>
SR13-f	5'-GTTCCATGGGGCCGTCCGGATTCCAGGCATCGAC-3'	<i>gsr13</i>	HE793699	792	<i>Nco I</i>
SR13-r	5'-GTTGGATCCTCAAGCCGGGATCTTCAAGCACCTG-3'				<i>BamH I</i>
SR16-a	5'-GTTTCATGAGTCCGAATGTTCTCGTTGCCCCGAA-3'	<i>gsr16</i>	HE793702	1220	<i>Rca I</i>
SR16-b	5'-GTTAGATCTTACCGGCTCGCGGCCGCGCGGG-3'				<i>Bgl II</i>
SR17-f	5'-GTTTCATGAGGCGAACAAGATCGCGATGCGAAG-3'	<i>gsr17</i>	HE793703	2121	<i>Rca I</i>
SR17-r	5'-GTTAGATCTTACCGGGCACCGATTCCGTCCT-3'				<i>Bgl II</i>
SR20-f	5'-GTTCCATGGGAGTGAGGTTCTGGTCCCTCGTTGAT-3'	<i>gsr20</i>	HE793706	960	<i>Nco I</i>
SR20-r	5'-GTTGGATCCTCAGCCCTTGCCTTGTTGATCTC-3'				<i>BamH I</i>
SR22-f	5'-GTTCCATGGGGCAGCTGAAATCTTCTACGAGTCG-3'	<i>gsr22</i>	HE793708	999	<i>Nco I</i>
SR22-r	5'-GTTGGATCCTCACTTCTGGGTCCACGACATCAA-3'				<i>BamH I</i>
SR25-f	5'-GTTCCATGGGGCTGGAGTGCAGGAGATGACCATC-3'	<i>gsr25</i>	HE793711	666	<i>Nco I</i>
SR25-r	5'-GTTGGATCCCTACACGTGCGTGATGCGCAACCC-3'				<i>BamH I</i>
SR28-a	5'-GTTTCATGAGTCCGAATGTTCTCGTTGCCCCGAA-3'	<i>gsr28</i>	HE793714	1170	<i>Rca I</i>
SR28-b	5'-GTTAGATCTTACCGGCTCGCGGCCGCGCGGG-3'				<i>Bgl II</i>

Tableau 4 : Amorces permettant d'amplifier les gènes d'intérêt de *M. immunogenum*

Nom de la protéine	Amorces	Séquence nucléotidique de l'amorce	N° accession Uniprot	Taille (pb)	Enzymes
Acyl-CoA déshydrogénase	P1	5'-GTTCCATGGGACCAACACGTTACCCCGCGC-3'	B1MEV6	1414	<i>Nco</i> I
	P2	5'-GTTGGATCCCTACAGGACAACGACGCCTTC-3'			<i>Bam</i> H I
Acyl-CoA déshydrogénase FadE	P3	5'-GTTTCATGAGGCCGATACGCATGTCGTCACC-3'	B1MGI9	1635	<i>Rca</i> I
	P4	5'-GTTAGATCTTCAGTCGCCCGACTTGACGGT-3'			<i>Bgl</i> II
Cytosol aminopeptidase	P5	5'-GTTTCATGAGAGCGCATAACGGCACCTTCG-3'	B1MNX9	1509	<i>Rca</i> I
	P6	5'-GTTAGATCTTCACCCGTTGGCGGCGATGTC-3'			<i>Bgl</i> II
Dihydrolipoyl déshydrogénase	P7	5'-GTTCCATGGGACTGCACACTATGACGTCGTC-3'	B1MIH9	1398	<i>Nco</i> I
	P8	5'-GTTGGATCCTCAGAAGTTGATCATGTGCCCC-3'			<i>Bam</i> H I
Serine hydroxymethyltransferase	P9	5'-GTTTCATGAGACGACTTCAGCCTCCAGCGAT-3'	B1MKN2	1458	<i>Rca</i> I
	P10	5'-GTTAGATCTCTACAAAGTGAGGCCCGGGTAC-3'			<i>Bgl</i> II
Superoxide dismutase	P11	5'-GTTCCATGGGGCTGAGTACACACTGCCCGAT-3'	B1MEF4	624	<i>Nco</i> I
	P12	5'-GTTGGATCCTCAGCCGAAGATCAGGCCCGA-3'			<i>Bam</i> H I

2.6.2. Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Pour confirmer l'amplification correcte du gène d'intérêt, les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Les produits de PCR ou les vecteurs bactériens ont été séparés selon leur taille en paire de base (pb) sur un gel contenant entre 0,8% et 1% d'agarose (Promega, Charbonnières, France) en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Ladder, 1 kb, Euromedex, Souffelweyersheim, France) durant environ 30 min à 120 V dans du tampon TAE (40mM Tris-acétate, 1mM EDTA, pH8). L'ADN a ensuite été révélé sous lumière UV après marquage au bromure d'éthidium (BET).

Dans les but d'isoler un fragment nucléotidique (produit d'amplification PCR ou vecteur bactérien linéarisé), des électrophorèses sur gel d'agarose *low melting point* 0,8% (Sigma-aldrich®) ont été réalisées à 80 V durant environ 40 min puis les produits de PCR ont été marqués au BET. Le gel d'agarose a ensuite été placé sur un dispositif à lampe UV afin de découper les fragments d'ADN à isoler.

2.6.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les produits de PCR ont été purifiés sur colonne pour éliminer les dNTP et les amorces introduits en excès dans le milieu réactionnel, à l'aide du coffret *High Pure PCR Product Purification* (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur, et élués dans un volume de 50 µl de tampon d'éluion du kit.

Dans un volume réactionnel de 20 µl, 10 à 14 µl de produit PCR purifiés ont été digérés par 20 U de chaque enzyme de restriction définie pour chaque gène dans les

Tableau 3 et Tableau 4 (soit le couple *NcoI/BamHI* soit *RcaI/BglII*, Roche Diagnostics) dans leur tampon respectif à la concentration 1X. En parallèle, dans un volume réactionnel de 20 µl, 1 µg de plasmide pET-11aH6 a été digéré par 20 U d'enzymes *NcoI* et *BamHI* dans leur tampon respectif. Les différents milieux réactionnels ont été mis en incubation au bain-marie à 37°C entre 1h et 3h. Pour permettre l'incorporation des inserts, le plasmide a ensuite été déphosphorylé en présence de 1 U de phosphatase alcaline (SAP, Shrimp alcaline phosphatase, Sigma-Aldrich) ajoutée 30 min avant la fin de l'incubation à 37°C. Les enzymes de restriction utilisées dans cette étude ont généré des bouts collants complémentaires. Ainsi un produit de PCR digéré par le couple d'enzymes *RcaI/BglII* a été ligué de la même façon qu'un produit de PCR digéré par le couple *NcoI/BamHI* avec un plasmide digéré avec le couple *NcoI/BamHI*.

Les produits de la digestion ont été purifiés par migration sur gel *low melting point* contenant 0,8 % d'agarose (§III 2.6.2). La bande ainsi obtenue après migration et correspondant au gène digéré a été découpée ainsi que la bande correspondant au plasmide délesté d'une fraction d'environ 1000 pb. Les fragments d'agarose ont ensuite été placés dans le même tube, puis l'agarose a été fondue à 65°C pendant 10 min pour libérer l'ADN, puis maintenue à l'état liquide dans un bain-marie à 42°C avant d'ajouter de la β-agarase et son tampon (1 U de β-agarase pour 100 mg d'agarose, New England BioLabs, MA) permettant la dégradation de l'agarose. La digestion de l'agarose par la β-agarase se déroule pendant 1 à 2h à 42°C. L'ADN contenu dans le tube a ensuite été purifié par une précipitation à l'éthanol absolu en présence de 0,3M d'acétate de sodium. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm le culot a été lavé avec 100 µl d'éthanol 70% puis resuspendu dans 5 µl d'eau ultrapure.

Digestions de vérifications : Des digestions par les enzymes de restriction ont été réalisées afin de vérifier, après les étapes de ligature et de transformation, si la taille de l'insert était celle attendue. Pour des inserts introduits par le couple d'enzymes *NcoI/BamHI*, la digestion de vérification a été réalisée dans un volume réactionnel final de 10 µl avec 2 U de chaque enzyme, 0,5 µl de chaque tampon et 2 µl de produits d'une mini préparation d'ADN plasmidique (§III 2.6.6). Pour des inserts introduits avec le couple d'enzymes *RcaI/BgIII*, la vérification a été réalisée par digestion du plasmide l'enzyme *BgIII* et une enzyme reconnaissant un site unique au sein du plasmide, ici *EcoRI* a été utilisé, si la séquence nucléotidique de l'insert ne comporte pas de site interne reconnu par cette enzyme. De cette manière, il a été obtenu un fragment de 5200 pb et un fragment de la taille attendue de l'insert additionné de 300 pb.

2.6.4. Ligature

L'étape de ligature permet l'incorporation de l'insert dans le plasmide. Dans un volume réactionnel final de 10 µl, 4 µl de produits de la digestion enzymatique contenant le plasmide et l'insert ont été incubés en présence de 3 U de T4 DNA ligase pour permettre la ligature (LigaFast™ Rapid DNA Ligation system ; Promega) se déroulant en 15 min à température ambiante.

2.6.5. Transformations bactériennes

➤ Préparation des cellules compétentes

○ *E. coli* DH5α :

Deux millilitres de milieu LB liquide sans antibiotique, contenant les bactéries, ont d'abord étéensemencés à l'aide d'une pointe stérile et incubés une nuit à 37 °C sous agitation. Deux-cent millilitres de milieu LB ont ensuite été inoculés avec quelques gouttes de la pré-culture et incubés sous agitation à 37 °C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,6. Les bactéries ont été réparties dans des tubes de 50 ml et centrifugées à 4000 g pendant 4 min. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 20 ml d'une solution à 4°C de $CaCl_2$ à 50 mM puis incubés 20 min dans la glace avant d'être de nouveau centrifugés. Les culots ont ensuite été resuspendus dans 1 ml de la solution de $CaCl_2$ et incubés sur la glace pendant quelques heures (2 à 3 h). Pour permettre une bonne conservation, 200 µl de glycérol à 80% ont été ajoutés aux cellules. Les bactéries ont ensuite été aliquotées délicatement et rapidement congelées dans de l'azote liquide. Les bactéries compétentes ont été conservées à -80 °C.

- *E. coli* BL21, méthode de Hanahan.

Les bactéries ont préalablement été repiquées sur un milieu LB gélosé puisensemencées dans 20 ml de milieu YT2X. Les bactéries ont été incubées à 37 °C avec agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,75. Soixante millilitres de milieu YT2X ont été ajoutés à la culture et les bactéries ont été transférées dans un erlenmyer de 1 l, puis incubées jusqu'à obtenir de nouveau une DO_{600nm} de 0,75. Le volume de la culture a ensuite été ajusté à 250 ml et les bactéries ont été incubées jusqu'à la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} de 0,6). La croissance bactérienne a ensuite été stoppée par une incubation dans la glace puis les bactéries ont été centrifugées 15 min à 3000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 ml de tampon I (Acétate de Potassium 30 mM, $MgCl_2$ 80 mM, KCl 100 mM, $CaCl_2$ 13 mM, glycérol 15 %) à 4°C. Les bactéries ont de nouveau été centrifugées à 3000 g pendant 8 min puis resuspendues dans 10 ml de tampon II froid (MOPS 10mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, KCl 10mM, glycérol 15 %) avant d'être rapidement aliquotées et congelées dans de l'azote liquide. Les bactéries compétentes ont été conservées à -80 °C.

➤ *Transformations de bactéries compétentes par choc thermique*

- Transformation des bactéries DH5 α

Après ajout de 2 μ l de β -mercaptoéthanol à 0,5 M, 50 μ l de bactéries DH5 α compétentes ont été incubées avec 5 μ l de produits de la ligature pendant 30 min dans la glace. Un choc thermique a permis l'intégration du vecteur dans les bactéries compétentes, cette étape consiste en un passage rapide de 0°C à 42 °C (30 s dans un bain-marie) suivi d'une nouvelle incubation de 2 min à 0°C dans la glace sans agitation. Cent quatre-vingt microlitres de milieu LB ont été ajoutés aux bactéries et les parois cellulaires ont été régénérées au cours d'une incubation de 1h30 à 37 °C sous agitation. La totalité des cellules a été étalée sur un milieu gélosé LB sélectif préparé avec 50 μ g/ml d'ampicilline. Les bactéries transformées avec un plasmide recombinant (bactéries dites positives) apparaissent après une nuit d'incubation à 37°C.

- Transformation des bactéries BL21

Cinquante microlitres de cellules BL21compétentes ont été incubées avec 3 μ l de vecteur recombinant issus d'une production par *Midi* préparation d'ADN plasmidique sur la glace pendant 30 min, puis un choc thermique a été réalisé comme précédemment. Les bactéries ont ensuite été incubées avec 180 μ l de milieu LB pendant une 1 h 30 à 37 °C avec agitation,

avant d'être étalées sur milieu gélosé LB sélectif avec ampicilline (50 µg/ml) et incubées une nuit à 37 °C.

2.6.6. Isolation du plasmide

➤ *Mini préparation d'ADN plasmidique*

Les bactéries DH5α transformées sont mises en culture afin de se multiplier et ainsi produire des copies du vecteur contenant l'insert à étudier, en quantité suffisante pour réaliser une étape de vérification.

Une dizaine de colonies DH5α obtenues par transformation a été repiquée, à l'aide d'une pointe de pipette stérile, dans 2 ml de milieu LB liquide préparé avec de l'ampicilline (50 µg/ml) et cultivée durant une nuit à 37°C sous agitation. Les cellules de la pré-culture sont centrifugées 30 s à 14 000 g puis le culot cellulaire a été vortexé avant d'être resuspendu successivement dans 200 µl de tampon P1 (Qiagen, Courtaboeuf, France) à 4 °C, 200 µl de tampon P2 et P3 (Qiagen). Après une légère agitation manuelle, le mélange a été incubé 5 min dans la glace. Après 5 min de centrifugation à 14 000g pour éliminer les débris cellulaires, 500 µl de surnageant ont été transférés dans un autre tube afin de purifier l'ADN. L'ADN a été précipité avec 350 µl d'isopropanol puis après une centrifugation de 5 min à 14 000 g, le culot a été lavé avec 300µl d'éthanol 70 %. Après 5min de séchage à température ambiante, l'ADN plasmidique a été resuspendu dans 50 µl d'eau distillée stérile. Une digestion par des enzymes de restriction (Cf §III 2.6.3) ou une PCR (Cf §III 2.6.1) a été réalisée sur le produit de la mini préparation d'ADN afin de vérifier la taille correcte de l'insert. Les colonies ont été considérées comme positives si l'insert amplifié par PCR ou libéré par la digestion présentait la taille attendue.

➤ *Midi préparation d'ADN plasmidique*

Les bactéries DH5α transformées (dites positives) ont été mises en culture afin de se multiplier et produire des copies du vecteur recombinant en quantité suffisamment importante pour permettre de réaliser la seconde transformation des bactéries BL21 (Cf §III 2.6.5).

Les pré-cultures des colonies DH5α positives utilisées pour la mini préparation ont été réensemencées dans 50 ml de milieu LB préparé avec 50 µg/ml d'ampicilline. Les bactéries DH5α ont été cultivées durant une nuit à 37°C sous agitation permanente. Les cellules sont centrifugées 5 min à 5500 g puis une Midi préparation a été réalisée afin de purifier le

plasmide, conformément aux instructions du fournisseur (QiafilterTM plasmid midi kit ; Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN issu de cette Midi préparation contient le plasmide recombinant, et est utilisé pour la transformation des bactéries BL21.

2.6.7. Induction à l'IPTG et purification par chromatographie d'affinité sur colonnes de Nickel

Environ 10 colonies issues d'une transformation de *E. coli* BL21 avec un plasmide recombinant, ont été prélevées à l'aide d'un scalpel directement dans la gélose et mises en culture dans 50 ml de milieu LB préparé avec 50 µg/ml d'ampicilline à 37°C sous une agitation de 200 rpm jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de 0,6. Après l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM, les bactéries ont de nouveau été incubées 4 h à 37°C pour permettre l'expression de la protéine recombinante marquée à l'histidine. A ce stade, une petite fraction de culture a été prélevée et conservée à -80°C dans un cryotube avec 5% de glycérol pour une future production d'antigènes. Les bactéries restantes ont été centrifugées 10 min à 4 500 g et congelées une nuit à -20 °C. Les cellules bactériennes ont été lysées mécaniquement par 3 cycles rapides de décongélation à l'eau chaude puis de congélation dans de l'azote liquide. Puis les cellules ont été incubées 30 min à température ambiante sous agitation dans un tampon d'urée à pH8 (urée 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M). Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation de 10 min à 13 000 g et le surnageant a ensuite été incubé pendant 1 à 2 h à 4 °C sous agitation avec 0,6 ml de billes (ProBondTM resin, Invitrogen/Life technologies, Saint-Aubain, France) préalablement lavées avec le tampon d'urée pH 8.. Le mélange a ensuite été filtré à travers une colonne chromatographique (Poly-Prep chromatography columns, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) préalablement équilibrée avec le tampon d'urée de pH 8. Les billes ont été lavées avec 4 ml du tampon urée de pH 8 puis avec 4 ml du même tampon avec un pH 6,3. L'élution des protéines marquées à l'histidine a été réalisée avec 3 ml du tampon urée de pH 4. Les protéines ont alors été conservées dans le tampon urée pH 4 à -20°C. La concentration des protéines a été déterminée par spectrophotométrie (lecture à 280 nm) et un gel SDS-PAGE a été réalisé afin de visualiser la taille et la pureté de la protéine recombinante (Cf §III 2.5.2).

2.7. Dosage des IgG spécifiques des antigènes recombinants par ELISA pour le diagnostic des PHS

Le test ELISA indirect est couramment utilisé pour le diagnostic sérologique des maladies dues à des micro-organismes. C'est une technique immuno-enzymatique quantitative qui permet de doser les anticorps spécifiques dirigés contre un antigène donné dans le sérum. La révélation est une réaction colorimétrique utilisant la peroxydase.

2.7.1. Antigènes utilisés

La recherche d'IgG spécifiques par ELISA a été réalisée avec des antigènes recombinants issus de *M. immunogenum*, de *S. rectivirgula* et d'*Aspergillus*.

2.7.2. Mode opératoire de l'ELISA

Les antigènes recombinants ont d'abord été fixés sur une plaque ELISA de 96 puits (Polysorp, Nunc, Thermo Scientific) à une concentration de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ avec une solution de fixation (K_2HPO_4 50 mM pH 8,5) à 4 °C pendant une nuit minimum. Après deux rinçages avec la solution de saturation (NaH_2PO_4 50 mM, Sorbitol 0,33 M, BSA 0,15 %), 100 μl de cette solution ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque a été incubée 1h à 37°C. Après quatre lavages avec un tampon Tris (Tris 0,1 M, NaCl 0,3 M, Tween 20 0,25 %), 100 μl de sérums dilués au 1/100e dans une solution PBST (PBS, Tween20 0,1 %, BSA 0,1 %) ont été déposés dans chaque puits en triplicat et la plaque a été incubée de nouveau 1 h à 37 °C. Sur chaque plaque a également été déposé un pool de sérums servant de référence standard, un blanc (solution de dilution seule). Après une seconde étape de 4 lavages, 100 μl d'anti-IgG humain couplé à la peroxydase (*anti-human IgG (Fc specific)-peroxidase*, Sigma-aldrich®) dilué au 1/4000^e ont été déposés dans chaque puits et la plaque est incubée une nouvelle fois 1 h à 37 °C. Après une nouvelle série de lavages, 100 μl de TMB (RD Biotech, France, Besançon) ont été déposés par puits et la plaque a été incubée 10 min à température ambiante à l'obscurité. La réaction a été stoppée par ajout de 100 μl d'une solution d'acide sulfurique à 1 N. La $\text{DO}_{450\text{nm}}$ de chaque puits a été déterminée au moyen d'un lecteur de plaques (Victor™ 2 Multilabel Counter, Wallac / PerkinElmer, Courtaboeuf, France) (Figure 13).

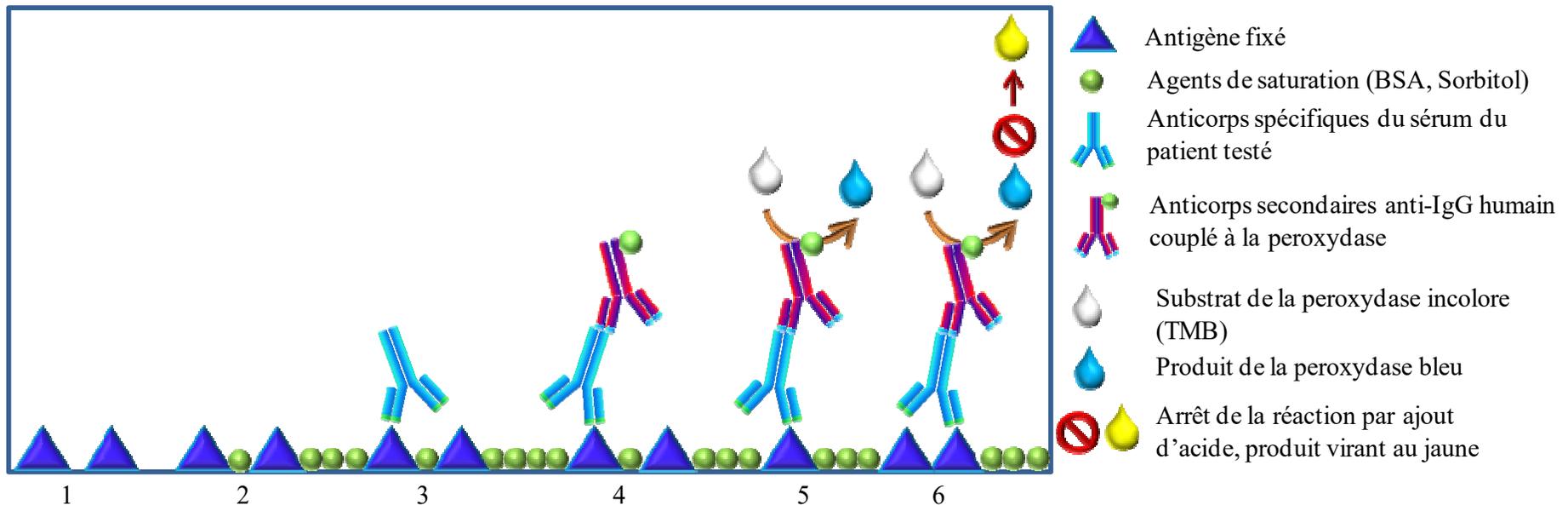


Figure 13 : Schéma du principe du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

2.8. Traitement des résultats et analyse statistique

2.8.1. Evaluation de l'efficacité de l'ELISA par analyse en courbe ROC

L'efficacité des ELISA s'analyse principalement avec le test en courbe ROC (Receiver-Operating Characteristics) grâce au logiciel Stata 9 (StataCorp LP, College Station, TX, USA), plusieurs paramètres permettent de définir l'efficacité de l'antigène dans le test diagnostic :

- la sensibilité (Se) : capacité du test à donner un résultat positif quand la maladie est présente.
- la spécificité (Sp): capacité du test à donner un résultat négatif lorsque la maladie est absente.
- l'aire sous la courbe ou AUC (Area Under the Curve) : est la mesure de l'aire de la surface située entre le tracé de la courbe est la médiane (Figure 14). Plus la valeur tend vers 1, plus le test classe les sujets selon le bon statut.
- le pourcentage de valeurs correctement classées : capacité du test à donner le bon statut (sujets malades et témoins confondus)

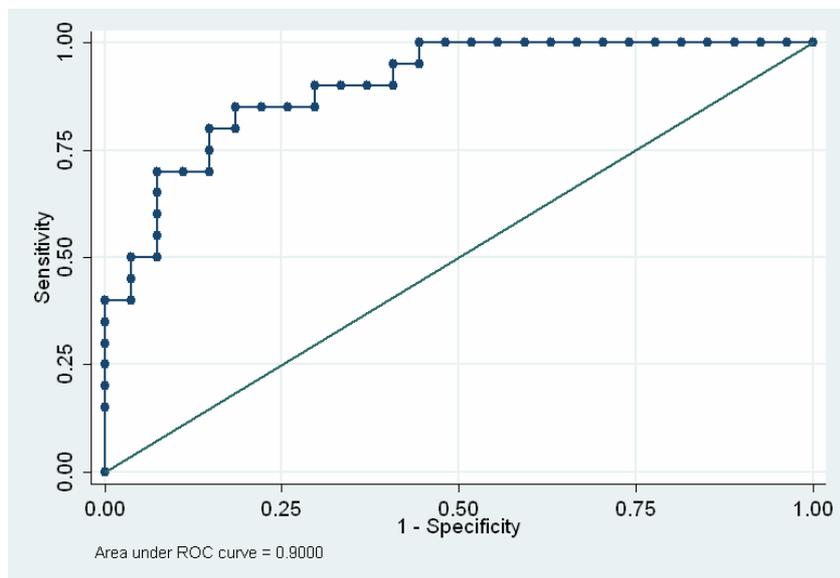


Figure 14 : Exemple d'une courbe ROC

Principe du test en courbe ROC : Chaque valeur de DO (ou index, score, etc...) a été considéré comme une valeur seuil pour laquelle a été calculé un pourcentage de sérums

correctement classés, la sensibilité, et la spécificité. L'ensemble des paires Se et $(1-Sp)$ ont été reportées sur un graphique et l'aire sous la courbe est calculée par rapport à une ligne médiane : plus l'aire sous la courbe est grande plus les sensibilités et/ ou spécificités sont élevées. Le seuil choisi correspond à la valeur pour laquelle le pourcentage des valeurs correctement classées est le plus élevé. Si plusieurs valeurs donnent un pourcentage équivalent, le seuil permettant d'obtenir la plus grande sensibilité est choisi.

Dans cette étude, les antigènes ont été sélectionnés comme efficaces pour le diagnostic lorsque l'AUC était supérieure à 0,75, avec le pourcentage de valeurs correctement classées et la sensibilité supérieurs à 75%.

2.8.2. Traitements des résultats bruts

Les résultats d'ELISA ont été convertis en index (DO de l'échantillon / DO du pool). L'écart type et le coefficient de variation des triplicats ont été évalués et lorsque le coefficient de variation dépassait 20%, la valeur incohérente a été supprimée. La moyenne des réplicats a ensuite été calculée afin d'obtenir la valeur finale d'index utilisée pour l'évaluation de l'efficacité de chaque antigène par analyse en courbe ROC. Puis, l'efficacité des combinaisons de plusieurs antigènes recombinants a été évaluée de la manière suivante : pour chaque antigène un seuil_{index} a été déterminé grâce à la première analyse en courbe ROC et chaque valeur d'index a ensuite été convertie en scores semi-quantitatifs selon la règle suivante :

- 0 = index de l'échantillon < au seuil_{index}(- 20%)
- 1 = seuil_{index} (-20%) < index < seuil_{index}(+ 20%)
- 2 = index > au seuil_{index} (+ 20%)

Ces scores semi-quantitatifs (0, 1 ou 2) obtenus ont été additionnés pour plusieurs antigènes, et une nouvelle analyse en courbe ROC a été réalisée, permettant de définir un seuil en score.

Le résultat de la combinaison a été interprété en trois niveaux A, B ou C sur le même modèle que l'électrosynérèse, selon le seuil_{score} déterminé :

- A= scores combinés \geq seuil_{score} déterminé
- B= scores combinés = seuil_{score} - 1
- C= scores combinés < seuil_{score} - 1

3. Résultats

3.1. Développement de tests sérologiques pour le diagnostic de la maladie du poumon de mécanicien

3.1.1. Protéines immuno-réactives issues de *M. immunogenum* utiles au sérodiagnostic de la maladie du poumon de mécanicien

Immuno-reactive proteins from Mycobacterium immunogenum useful for serodiagnosis of metalworking fluids hypersensitivity pneumonitis.

Roussel S., Rognon B., **Barrera C.**, Reboux G., Salamin K., Grenouillet F., Thaon I., Dalphin J.C., Tillie-Leblond I., Quadroni M., Monod M., Millon L.

International Journal of Medical Microbiology

➤ *Présentation de l'étude et rappel des principales étapes méthodologiques*

La maladie du poumon de mécanicien est causée par l'exposition aux aérosols de fluides de coupe contaminés par des bactéries et certaines espèces de moisissures. Un nombre important de travailleurs américains sont exposés aux fluides de coupe mais aucune étude de prévalence de la maladie n'a été réalisée et il se peut qu'elle soit sous-estimée à cause d'un diagnostic difficile à établir. En vue d'améliorer et de standardiser le diagnostic sérologique du PDM, l'analyse des protéines de *Mycobacterium immunogenum*, l'agent principalement responsable de la maladie, a été réalisée afin d'identifier les antigènes spécifiques et les développer en antigènes recombinants. Une approche immunoprotéomique a été réalisée par Gupta et al. (2009) révélant 33 protéines immuno-réactives avec le sérum d'un lapin immunisé. Des cas groupés de PHS liée aux fluides de coupe ont été rapportés dans le Nord de la France et la même approche a été réalisée avec des sérums de patients humains.

La description complète des méthodes est rédigée dans la partie III 2 (page 72). Nous rappelons ici seulement les principales étapes méthodologiques spécifiques à cette partie du travail concernant *M immunogenum*. L'étude porte sur 14 cas de PDM et 12 témoins exposés asymptomatiques provenant principalement de la même usine dans le Nord de la France. Des patients atteints d'une autre PHS (poumon de fermier), des patients ayant la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) ou colonisé par d'autres espèces de mycobactéries ont été

recrutés afin de valider l'efficacité des antigènes recombinants issus de *M. immunogenum*. Les protéines immuno-réactives de *M. immunogenum* ont été repérées par Western blot 2D et analysées par spectrométrie de masse puis celles d'intérêt diagnostique ont été développées en antigènes recombinants. Le niveau d'IgG spécifiques a été évalué par ELISA pour chaque sérum de patients.

➤ *Résultats*

Environ 350 spots étaient visualisés sur le gel d'électrophorèse 2D coloré au bleu de Coomassie et seulement 17 spots ont été révélés par Western blotting avec le sérum d'un patient PDM, puis analysés par spectrométrie de masse. Onze protéines ont été identifiées et 6 d'entre elles ont été produites en antigènes recombinants :

- Probable acyl-CoA déshydrogénase,
- Probable acyl-CoA déshydrogénase FadE,
- Probable cytosol aminopeptidase,
- Dihydrolipoyl déshydrogénase,
- Sérine hydroxyméthyltransférase
- Superoxyde dismutase.

Les antigènes recombinants produits dans cette étude ont tous une sensibilité au-delà de 80% et une spécificité au-delà de 60%. Leur utilisation permet d'améliorer le sérodiagnostic par la standardisation, en particulier grâce à l'utilisation de la protéine recombinante acyl-CoA déshydrogénase qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité (100%) en ELISA.

➤ *Conclusion*

Dans cette étude, nous avons pu constater que les protéines immuno-réactives de *M. immunogenum* étaient des enzymes ayant un rôle important dans le métabolisme du micro-organisme et certaines sont connues pour jouer un rôle dans la virulence d'autres pathogènes. L'acyl-CoA déshydrogénase et la superoxyde dismutase ont été également révélées par des anticorps de lapin immunisé par *M. immunogenum* (Gupta et al., 2009). Dans ce présent travail, les protéines immuno-réactives, ont été révélées par des anticorps de patients atteints de PDM. Cette méthode permet d'être plus proche de la réalité de l'environnement et de l'exposition des malades que l'expérimentation animale en laboratoire.

Le taux d'IgG spécifiques des antigènes recombinants de *M. immunogenum* chez les patients colonisés par d'autres mycobactéries est faible, il n'y a pas de réaction croisée entre ces

différentes maladies. A contrario, les patients atteints de la maladie du poumon de fermier ont un taux d'IgG spécifiques non nul suggérant des protéines ou des épitopes communs aux différents micro-organismes impliqués dans les PHS. Pour le diagnostic de cette PHS, les différentes techniques de diagnostic sont efficaces (techniques d'immuno-précipitations avec des antigènes somatiques et ELISA avec des antigènes recombinants) et l'utilisation d'antigènes recombinants permet principalement de standardiser la méthode.

➤ *Texte de l'article*



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.de/ijmmImmuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis

Sandrine Roussel^{a,b}, Bénédicte Rognon^{a,b}, Coralie Barrera^a, Gabriel Reboux^{a,b}, Karine Salamin^c, Frédéric Grenouillet^{a,b}, Isabelle Thaon^{a,d}, Jean-Charles Dalphin^{a,e}, Isabelle Tillie-Leblond^f, Manfredo Quadroni^g, Michel Monod^c, Laurence Millon^{a,b,*}

^a UMR/CNRS Chrono-Environnement 6249, University of Franche-Comté, France

^b Department of Parasitology-Myology, University Hospital of Besançon, France

^c Department of Dermatology, Laboratoire de Mycologie, University Hospital Vaudois of Lausanne, Switzerland

^d Department of Occupational Health, University Hospital of Besançon, France

^e Department of Pneumology, University Hospital of Besançon, France

^f Department of Pneumology, University of Lille, France

^g Protein Analysis Facility, Center for Integrative Genomics, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2010

Received in revised form 15 June 2010

Accepted 5 July 2010

Keywords:

Hypersensitivity pneumonitis

Serodiagnosis

Mycobacterium immunogenum

Recombinant antigens

ELISA

Acyl-CoA dehydrogenase

ABSTRACT

Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis (MWF-HP) is a pulmonary disease caused by inhaling microorganisms present in the metalworking fluids used in the industrial sector. *Mycobacterium immunogenum* is the main etiological agent. Among the clinical, radiological and biological tools used for diagnosis, serological tests are important. The aim of this study was to identify immunogenic proteins in *M. immunogenum* and to use recombinant antigens for serological diagnosis of MWF-HP. Immunogenic proteins were detected by two-dimensional Western blot and candidate proteins were identified by mass spectrometry. Recombinant antigens were expressed in *Escherichia coli* and tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the sera of 14 subjects with MWF-HP and 12 asymptomatic controls exposed to *M. immunogenum*. From the 350 spots visualized by two-dimensional gel electrophoresis with *M. immunogenum* extract, 6 immunogenic proteins were selected to be expressed as recombinant antigens. Acyl-CoA dehydrogenase antigen allowed for the best discrimination of MWF-HP cases against controls with an area under the receiver operating characteristics (ROC) curve of 0.930 (95% CI = 0.820–1), a sensitivity of 100% and a specificity of 83% for the optimum threshold. Other recombinant antigens correspond to acyl-CoA dehydrogenase FadE, cytosol aminopeptidase, dihydrolipoyl dehydrogenase, serine hydroxymethyltransferase and superoxide dismutase. This is the first time that recombinant antigens have been used for the serodiagnosis of hypersensitivity pneumonitis. The availability of recombinant antigens makes it possible to develop standardized serological tests which in turn could simplify diagnosis, thus making it less invasive.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis (MWF-HP) is caused by exposure to inhaled antigens such as fungi or bacteria present in the metalworking fluid used in the industrial sector (Beckett et al., 2005; Fox et al., 1999; Rosenman, 2009). In the United States, 1.2 million people are exposed to MWF and more than one hundred cases of MWF-HP have been described in North America (Kreiss and Cox-Ganser, 1997; Rosenman, 2009).

The prevalence of MWF-HP remains unknown. Because HP is difficult to diagnose, it is possible that the disease is confounded with other diseases with similar symptoms and that the true number of cases of MWF-HP is underestimated.

Clinical diagnosis of HP requires an association of clinical and biological markers, typically evidence of interstitial markings on chest radiography, serum precipitating antibodies against offending antigens, a lymphocytic alveolitis on bronchoalveolar lavage, and/or a granulomatous reaction on lung biopsy (Girard et al., 2009).

Improvement and standardization of serodiagnosis is an important avenue for research in the management of HP (Lacasse et al., 2008). Considered by some authors to be a marker of exposure (Garipey et al., 1989; Kusaka et al., 1989), the presence of precipitins or of immunoglobulin G (IgG) is a useful diagnostic

* Corresponding author at: Department of Parasitology-Myology, CHU J. Minjoz, 3, Boulevard Fleming, 25030 Besançon cedex, France.

Tel.: +33 381 668 068; fax: +33 381 668 914.

E-mail address: lmillon@univ-fcomte.fr (L. Millon).

criterion in areas of high prevalence of HP (Lacasse et al., 2003) and is improved by the use of relevant antigens to which patients are exposed (Fenoglio et al., 2007; Kaukonen et al., 1993; Reboux et al., 2007). These antigens are extracted from microorganisms identified by sampling in the patient's environment. However, antigen production is not standardized and the protein composition of samples is dependent on several factors, such as the strain, culture conditions and nature of the antigen (metabolic, somatic or both) (Horner et al., 1995; Simon-Nobbe et al., 2008). The use of recombinant antigens makes it possible to standardize immunological techniques, and has proven its efficiency for the diagnosis of infectious or allergic diseases (Sarfati et al., 2006; Vailes et al., 2001). However, recombinant antigens have never been used for HP diagnosis.

Mycobacterium immunogenum has been identified as the main etiological agent of MWF-HP (Wallace et al., 2002) and is able to induce HP in mice (Thorne et al., 2006). Recently, Gupta et al. (2009) identified 33 antigenic proteins of *M. immunogenum* that can trigger an immune response in rabbits.

The aim of our study was to test recombinant antigens corresponding to immuno-reactive proteins from *M. immunogenum* in the serodiagnosis of MWF-HP. First, immuno-reactive proteins were identified with sera from 6 MWF-HP cases and exposed controls. Second, genes coding for immuno-reactive proteins were cloned and recombinant antigens were produced. Third, recombinant antigens were tested by ELISA with sera from MWF-HP patients, exposed controls, patients with another type of hypersensitivity pneumonitis, patients with tuberculosis, and patients infected or colonized by *Mycobacterium avium* or *M. abscessus*.

Materials and methods

Subjects

Thirteen MWF-HP patients and twelve healthy exposed controls were employed at the same factory in the city of Lille, in northern France. An additional MWF-HP factory employee was recruited in Metz, in northeastern France (department of Moselle); i.e., 14 MWF-HP subjects and 12 exposed controls were included. They were diagnosed between January 2004 and September 2007 at the University Hospital Pneumology Department in Lille according to previously published criteria (Bourke et al., 2001; Girard et al., 2009). Clinical data concerning patients and controls are described in another article (Tillie-Leblond et al., 2010).

Three other groups of controls were used: 12 patients with another type of hypersensitivity pneumonitis called farmer's lung disease (FLD), 15 patients with tuberculosis and 15 patients infected or colonized with *M. avium* or *M. abscessus*. Patients with FLD had been enrolled in a previous study (Roussel et al., 2010). All of them were dairy farmers who were newly diagnosed with FLD between March 2007 and May 2008. They were not exposed to metalworking fluids or to *M. immunogenum* in their occupational environment. In the second group, the diagnosis of tuberculosis was clinically established, and *Mycobacterium tuberculosis* was isolated. For the last group, *Mycobacterium avium* ($n=9$) or *M. abscessus* ($n=6$) were isolated. Some of these patients presented with clinical symptoms, whereas others did not.

Informed written consent was obtained from all subjects. A blood sample taken for each participating subject was kept refrigerated, then centrifuged within less than 4 h of sampling. Immunological tests were performed on the serum.

Mycobacterial strain

The strain of *M. immunogenum* used for immunological investigations was a strain isolated in a metalworking fluid taken from the factory in Lille when cases of MWF-HP were diagnosed. This strain was identified using hsp2 and rpoB sequencing as described previously and was referenced under number DSMZ 45496 at the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Braunschweig).

Preparation of protein fractions

M. immunogenum cells from 20 densely grown Muller-Hinton culture media were first suspended in 60 ml of 1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM phenantroline, 1 μ M pepstatin (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA)). The mixture was lysed by grinding with an Ultraturax® device (Ultraturax® T25 basic, IKA Labortechnik) then by sonication using 5 cycles of alternate 1 min pulsing and 1 min chilling on ice. Cell fragments were eliminated by two subsequent centrifugations for 3 min at 10,000 rpm at 4°C. Then 100 μ l of 0.1% deoxycholic acid solution (Sigma-Aldrich®) per millilitre supernatant was added and the mixture was incubated for 5 min at room temperature. Proteins were pelleted on ice for 15 min with 70 μ l of 0.6 M trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich®) per millilitre of supernatant. Precipitated proteins were subsequently pelleted by centrifugation (Beckman Coulter®, JA 20.1 rotor, 4°C, 15 min, 30,000 g). Protein extracts were purified with an SDS-PAGE Clean-Up Kit (Roche Diagnostics®, Basel, Switzerland) as recommended by the manufacturer. Protein concentrations of the purified extracts were determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions.

2D-gel electrophoresis and staining procedure

Protein fractions that were generated as described above and contained 54 μ g of protein were resuspended in 2D-PAGE lysis buffer (5 mM magnesium acetate, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, and 30 mM Tris, pH 8). After sonication and centrifugation, the supernatants were diluted in an equal volume of the same buffer supplemented with 2 mg/ml DTT and 2% (v/v) Pharmalyte 3–10 (GE Healthcare®, Freiburg, Germany). Immobiline DryStrip gels pH 3–10 NL, 11 cm (GE Healthcare®) were rehydrated according to the manufacturer's instructions prior to first-dimension separation with a cup-loading sample application. Isoelectric focusing was carried out on an Ettan IPGphor electrophoresis system (GE Healthcare®) with a total focusing of 30,000 Vh according to the manufacturer's manual and instructions. Prior to the second dimension, strips were equilibrated for 10 min in a reducing buffer containing 6 M urea, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 32 mM DTT, and 100 mM Tris, pH 8. This was followed by 10 min alkylation in a buffer containing 6 M urea, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 240 mM iodoacetamide and 100 mM Tris, pH 8. Second-dimension separation was carried out on a 12 cm \times 16 cm 10% acrylamide gel surmounted by a 4% stacking gel. The IPG strip from the first dimension was loaded onto the slab gels together with a molecular mass marker and run across the stacking gel at 100 V for 30 min and 150 V for 1 h. Following electrophoresis, proteins were stained with colloidal Coomassie Blue and image acquisition was performed with a visible light densitometer. Spot detection and alignment with the Western blot image was performed using Melanie 6.0 software (Genebio®, Geneva, Switzerland).

Protein identification by mass spectrometry (MS)

Gel spots were excised from the SDS-PAGE gels and transferred to special 96-well plates (Perkin Elmer Life Sciences®). MS identification was performed as previously described (Giddey et al., 2007). MS/MS datasets were searched using Mascot (Matrix Science®, London, UK; version 2.2.0) against the set of 5091 protein sequences from *M. abscessus*, a closely related species, extracted from release 14.4 of the UNIPROT database.

Western blot transfer and hybridization

After electrophoresis, proteins were transferred for 3 h at a constant voltage of 80V and in Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) onto 0.45 µm nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell®, Dassel, Germany) using the Mini Trans-Blot® Cell system (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France). The nitrocellulose sheets were then saturated for 30 min with Tris-buffered saline (TBS)-Tween-bovine serum albumin (BSA) (50 mM Tris/HCl pH 8, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20, 3% BSA (Sigma®, Steinheim, Germany)). Sera were diluted 1:2000 in TBS-Tween-BSA. After four 5-min washings with TBS-Tween-BSA, the nitrocellulose sheets were incubated at room temperature for 1 h, with goat anti-human IgG alkaline phosphatase conjugates (Sigma®, Steinheim, Germany) diluted 1:4000 in TBS-Tween-BSA. After four washing steps with TBS-Tween-BSA, spots were visualized after a 10-min incubation in phosphate buffer pH 9.5 (100 mM Tris 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) supplemented with 0.15 mM nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Roche diagnosis®, Mannheim, Germany). The reaction was stopped by multiple washing steps with distilled water.

Recombinant antigens

M. immunogenum genomic DNA from a 1-week-old culture on Muller-Hinton medium plates was extracted with a High Pure PCR Template Preparation Kit according to the manufacturer's instructions (Roche). Large peptides (200–300 aa) corresponding to six sequenced *M. abscessus* proteins were produced using the pET expression system from Novagen (Darmstadt, Germany). The plasmid pET-11a was changed to incorporate the sequence 5'-CATGACCATCACCATCACCATGGTAAGGATC-3' encoding a Met-His₆-amino acid sequence between the unique NheI and BamHI cloning sites. The 6th His residue in the newly generated plasmid pET-11aH6 was encoded by a single NcoI cloning site. The pairs of sense/antisense primers to amplify DNA are given in Table 1. The products were digested with NcoI/BamHI or Rca/BglII and cloned into the NcoI and BamHI sites of pET-11aH6. The resulting plasmids were termed pAg1 to pAg6.

Heterologous 6 × His-tagged peptides were produced in *E. coli* BL21 transformed with pAg1 to pAg6. Cells were grown at 37 °C to an optical density of 600 nm (OD_{600 nm}) of 0.6, and 6 × His-tagged peptide expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.1 mM. Incubation was continued for an additional 4 h at 37 °C. Cells were collected by centrifugation (4500 g, 4 °C, 15 min) and 6 × His-tagged peptides were extracted with guanidine hydrochloride buffer and Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) columns as recommended by the manufacturer. Protein concentrations were determined spectrophotometrically measuring OD_{280 nm}.

ELISA

The wells of 96-well plates (PolySorp Immunomodule®, Nalge Nunc Rochester, NY) were coated with 200 µl of 1 µg/ml antigen solution in 50 mmol/l K₂HPO₄ buffer, pH 8.5 at 4 °C for 48 h. Excess

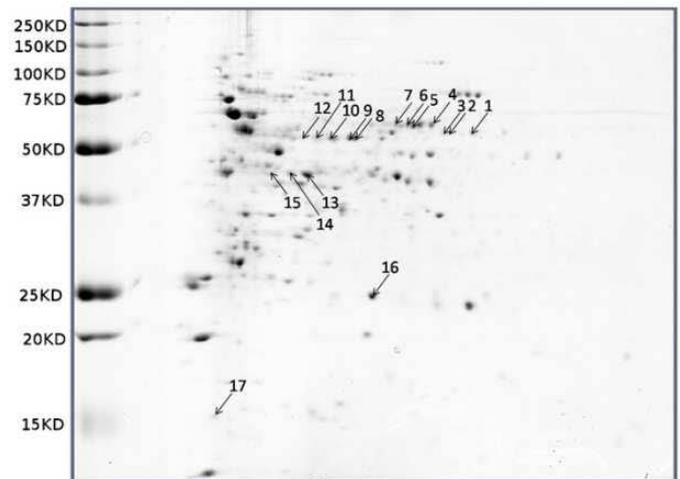


Fig. 1. Two-dimensional (2D) electrophoresis gel pattern of *Mycobacterium immunogenum* antigens stained with colloidal Coomassie Blue.

binding sites were blocked at 37 °C for 1 h with 250 µl of 50 mmol/l NaH₂PO₄, containing 0.5% bovine serum albumin and 60 g/l sorbitol. ELISA tests for specific IgG were then conducted as previously described (Reboux et al., 2007). Sera were diluted at 1:100 and peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma®, Saint Louis, MO) was diluted at 1:4000. Results were expressed as OD_{450 nm}.

Statistical analysis

Sera were tested in triplicate on ELISA plates and variation coefficients were calculated. Sera for which the variation coefficient was higher than 20% for an OD mean above 0.050 were tested again. Means of OD validated by variation coefficient were used for statistical analysis by receiver operating characteristics curves (ROC) with STATA9 software (StataCorp, College Station, TX). Sensitivity and specificity tables were calculated for each OD value and the value which showed the best percentage of correctly classified cases and controls was chosen as a threshold. When several thresholds were equivalent, the one with the best sensitivity was chosen. ROC allowed recombinant antigens to be compared by examining the area under the curve.

Results

Identification of immuno-reactive proteins and production of recombinant antigens

Two 2D electrophoresis gels were prepared simultaneously. The first one was stained by colloidal Coomassie Blue (Fig. 1). The proteins in *M. immunogenum* extract were well separated and nearly 350 spots could be visualized. Proteins from the second 2D electrophoresis gel were transferred onto a nitrocellulose membrane and revealed with the serum of a MWF-HP subject (Fig. 2). This serum was selected because it yielded the highest number of colored bands and the weakest background on one-dimensional Western blots (data not shown). Before incubation with the serum, proteins transferred onto the nitrocellulose membrane were stained with Ponceau Red. This made it possible to select and mark intense reference spots on the nitrocellulose membrane and facilitated the alignment of the spot pattern colored by Coomassie Blue and by Western blot. Seventeen spots on the *M. immunogenum* extract 2D separation gave a clear signal after incubation of the membrane with the MWF-HP serum. The intensity of the signal varied significantly between spots. Software-assisted

Table 1

List of primers used to amplify the open reading frame of the genes coding for the antigens specific to MWF-HP patients.

Target gene			Primer sequence (5'-3')
Probable acyl-CoA dehydrogenase	FP	P1	<u>G</u> TTCATGGGACCAACACGTTACCCCGCGC
	RP	P2	GTTGGATCCTACAGGACAACGACGCCTTC
Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	FP	P3	GTTTCATGAGGCCGATACGCATGTCGTCACC
	RP	P4	GTTAGATCTCAGTCGCCGACTTGACGGT
Probable cytosol aminopeptidase	FP	P5	GTTTCATGAGAGCGCATACAGGCCACCTTCG
	RP	P6	GTTAGATCTCACCCTTGGCCGGCATGTC
Dihydrolipoyl dehydrogenase	FP	P7	GTTCCATGGGACTGCACACTATGACGTCGTC
	RP	P8	GTTGGATCCTCAGAAGTTGATCATGTGCCCC
Serine hydroxymethyltransferase	FP	P9	GTTTCATGAGACGACTTCAGCCTCCAGCGAT
	RP	P10	GTTAGATCTCTACAAAGTGAGGCCCGGGTAC
Superoxide dismutase	FP	P11	GTTCCATGGGCTGAGTACACACTGCCCGAT
	RP	P12	GTTGGATCCTCAGCCGAAGATCAGGCCCA

FP, forward primers; RP, reverse primers.

Restriction sites within primer sequences are underlined.

image alignment determined the selection of spots for excision. In most cases a Coomassie-detectable spot could be assigned to a Western blot spot. In some cases, however, blot signals corresponded to gel locations where no colloidal Coomassie Blue staining was visible, which implies a low concentration of the antigen. "Empty" gel spots were nevertheless cut and analyzed in such cases.

Seventeen gel spots were cut from the stained 2D electrophoresis gel and protein identities were determined by mass spectrometry (Table 2) by searching in the *M. abscessus* proteome. Several spots with the same molecular weight but a different isoelectric point were shown to contain the same protein, although they were sometimes combined with another. Spots 4–7, for example, all contained the acyl-CoA dehydrogenase FadE. Overall, 11 distinct proteins were identified on 17 spots. Interestingly, 12 out of the 17 spots contained either a known or a putative dehydrogenase.

A further 2D-PAGE analysis was undertaken to assess the immunoreactivity of a larger panel of sera against the detected antigens. Five 2D electrophoresis gels were run with the same extract of *M. immunogenum* and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Proteins on the membranes were stained with Ponceau Red. Nitrocellulose membranes were revealed with 3 other sera from MWF-HP subjects and 2 sera from exposed controls. Of the 17 proteins identified by mass spectrometry, only those more frequently revealed with MWF-HP sera than with control sera were selected to be produced as recombinant antigens. Cytosol aminopeptidase (B1MNX9), acyl-CoA dehydrogenase (B1MEV6) and acyl-CoA dehydrogenase FadE (B1MG19) were bound by

antibodies from 3 MWF-HP sera, not with control sera. Serine hydroxymethyltransferase (B1MKN2) and dihydrolipoyl dehydrogenase (B1MIH9) were revealed with 2 MWF-HP sera and not with control sera. Superoxide dismutase (B1MEF4) was revealed with 3 MWF-HP and 1 control sera. These 6 proteins were selected to be produced as recombinant antigens. The molecular masses for these proteins range from 23 to 58.7 kDa and the respective genes are 624–1635 bp long (Table 3).

Putative dihydrolipoamide acyltransferase component (B1MMJ9), putative hydrogenase/reductase (B1MM26) and putative organic hydroperoxide resistance protein/OsmC-like protein (B1MJ60) were not selected to be produced as recombinant antigens either because they were revealed by only one MWF-HP serum or because they were revealed equally by both MWF-HP and control sera.

The recombinant antigens produced were coated in 96-well plates for immunological investigation by ELISA.

ELISA tests

The six sera previously used to select immuno-reactive proteins were not tested in ELISA. In this way, ELISA were performed with 20 sera (10 MWF-HP and 10 controls) to look for IgG against the 6 recombinant antigens and the total protein extract from *M. immunogenum*. Sensitivity and specificity of ELISA tests for optimal threshold are indicated in Table 3. Areas under the curve (and 95% confidence intervals) were 0.930 (0.820–1) for acyl-CoA dehydrogenase recombinant antigen, 0.770 (0.547–0.993) for acyl-CoA dehydrogenase FadE recombinant antigen, 0.720 (0.480–0.960) for cytosol aminopeptidase recombinant antigen, 0.850 (0.676–1) for dihydrolipoyl dehydrogenase recombinant antigen, 0.780 (0.564–0.996) for serine hydroxymethyltransferase recombinant antigen, 0.760 (0.524–0.996) for superoxide dismutase recombinant antigen and 0.920 (0.761–1) for total protein extract of *M. immunogenum*. The two most evident antigens were those corresponding to acyl-CoA dehydrogenase (B1MEV6) and dihydrolipoyl dehydrogenase (B1MIH9).

Acyl-CoA dehydrogenase recombinant antigen was then used in ELISA to measure IgG in sera from MWF-HP ($n = 10$) and in sera from patients with another hypersensitivity pneumonitis (FLD) ($n = 12$), patients with tuberculosis ($n = 15$) and from patients infected or colonized by *Mycobacterium avium* or *M. abscessus* ($n = 15$). An ELISA test allowed us to discriminate between patients with MWF-HP and patients with FLD with a high sensitivity (100%, 95% CI: 69.2–100) but a low specificity (58.33%, 95% CI: 27.7–84.8). Area under the curve was 0.825 (95% CI: 0.651–0.999). An ELISA

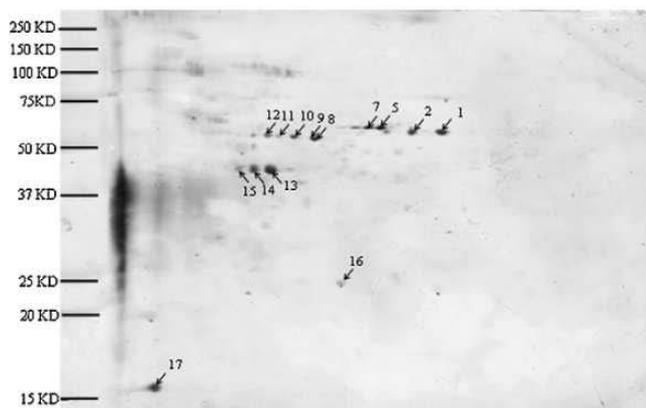


Fig. 2. Two-dimensional gel Western blot revealed with one MWF-HP serum. Numbered spots correspond to proteins identified by mass spectrometry (Table 2).

Table 2

Proteins of *Mycobacterium immunogenum* identified by mass spectrometry from spots cut from the 2D electrophoresis gel. Spot numbers correspond to those shown on nitrocellulose membranes (Figs. 1 and 2).

Spot no.	Protein ID	UNIPROT accession code	Mw (kDa, calculated)	MASCOT score	Unique peptides matched	Analysis
1	Probable cytosol aminopeptidase	B1MNX9	52.0	49	1	M
2	Probable cytosol aminopeptidase	B1MNX9	52.0	111	5	L
	Probable acyl-CoA dehydrogenase	B1MEV6	50.0	82	2	
3	Probable acyl-CoA dehydrogenase	B1MEV6	50.0	140	3	L
4	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	B1MG19	58.7	256	6	L
5	Catalase	B1MFQ0	54.7	110	4	M
	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	B1MG19	58.7	76	2	
6	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	B1MG19	58.7	103	2	M
7	Catalase	B1MFQ0	54.7	65	3	M
	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	B1MG19	58.7	59	1	
8	Serine hydroxymethyltransferase	B1MKN2	51.6	359	6	M
	Dihydrolipoyl dehydrogenase	B1MIH9	49.6	93	1	
9	Dihydrolipoyl dehydrogenase	B1MIH9	49.6	321	6	M
10	Serine hydroxymethyltransferase	B1MKN2	51.6	95	3	M
	Dihydrolipoyl dehydrogenase	B1MIH9	49.6	78	2	
11	Dihydrolipoyl dehydrogenase	B1MIH9	49.6	215	4	L
12	Putative dihydrolipoamide acyltransferase component	B1MMJ9	44.7	132	4	L
13	Putative dehydrogenase/reductase	B1MM26	41.6	79	3	M
14	Putative dehydrogenase/reductase	B1MM26	41.6	42	2	M
15	No result	–	–	–	–	L
16	Superoxide dismutase	B1MEF4	23.0	230	3	M
17	Putative organic hydroperoxide resistance protein/OsmC-like protein	B1MJ60	14.7	62	1	M
	50S ribosomal protein L7	B1MH69	13.2	42	2	

M, MALDI-TOF MS; L, LC-MS/MS.

test allowed for a clear discrimination between patients with MWF-HP, patients with tuberculosis, and patients infected or colonized by *M. avium*/*M. abscessus*, with high sensitivities (100%, 95% CI: 69.2–100 in both comparisons) and high specificities (100%, 95% CI: 78.2–100 and 93.33%, 95% CI: 68.1–99.8, respectively). Area under ROC curves were 1 (1–1) and 0.970 (907–1), respectively.

Discussion

In this study, 6 immuno-reactive proteins from *M. immunogenum* were characterized and expressed as recombinant antigens. The antigen corresponding to acyl-CoA dehydrogenase protein gave the highest sensitivity and specificity (Se = 100% and Sp = 80% for the optimum threshold). Other recombinant proteins were acyl-CoA dehydrogenase FadE, cytosol aminopeptidase, dihydrolipoyl dehydrogenase, serine hydroxymethyltransferase and superoxide dismutase.

The acyl-CoA dehydrogenase and the acyl-CoA dehydrogenase FadE are flavoproteins involved in the fatty acid cycle. They catalyze the desaturation of acyl-CoA esters and play an important role in the oxidation of fatty acyl-CoA esters. So these enzymes, which are essential for the life of microorganisms, are particularly useful for *M. immunogenum*, which grows in oleaginous substrates. Acyl-CoA dehydrogenase FadE seems to have a role in infection processes for *Mycobacterium tuberculosis* (Chang et al., 2007). Cytosol aminopep-

tidase, involved in processing and regular turnover of intracellular proteins, catalyzes the removal of unsubstituted N-terminal amino acids from various peptides. Dihydrolipoyl dehydrogenase plays a role in the decomposition of the dihydrolipoamide in lipoamide. Dihydrolipoamide dehydrogenase, is a virulence factor in *Mycobacterium tuberculosis*. Serine hydroxymethyltransferase catalyzes the interconversion of serine and glycine and provides most of the one-carbon units available to the cell (Appaji Rao et al., 2003). Superoxide dismutase plays an important role in the conversion of oxygen free radical superoxide to hydrogen peroxide and molecular oxygen. This extracellular secreted enzyme protects mycobacteria from oxidative stress and contributes to their survival and their establishment inside host.

A recent study by Gupta et al. (2009) enhanced understanding of *M. immunogenum* antigenic proteins (Gupta et al., 2009). In this study, 33 antigenic proteins revealed by polyclonal antibodies from sensitized rabbits were highlighted. Two antigens are likely to be common to this study and ours: acyl-CoA dehydrogenase and superoxide dismutase, but when aligned together, the corresponding peptide sequences present only 30% and 80% identity, respectively. Antigens from our study were identified based on *M. abscessus* sequences unlike those described by Gupta et al., which are determined on the basis of alignments performed with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium leprae*. The originality of our study was the targeting of IgG, which are antibodies specific to HP (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Gamboa

Table 3

Optimal threshold, sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative likelihood ratio (LR+ and LR–) obtained with the six recombinant antigens.

Protein identity	Molecular weight (kDa)	Threshold (OD _{450nm})	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR– (95% CI)
Probable acyl-CoA dehydrogenase	50	0.119	1 (0.6–1)	0.8 (0.4–1)	5 (1.4–17.3)	0
Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE	58.7	0.096	0.9 (0.5–1)	0.6 (0.3–0.9)	2.2 (1–4.9)	0.1 (0–1.2)
Probable cytosol aminopeptidase	52	0.247	0.8 (0.4–1)	0.6 (0.3–0.9)	2 (0.9–4.5)	0.3 (0.1–1.3)
Dihydrolipoyl dehydrogenase	49.6	0.229	0.9 (0.5–1)	0.7 (0.3–0.9)	3 (1.1–7.9)	0.1 (0–1)
Serine hydroxymethyltransferase	51.7	0.036	0.8 (0.4–1)	0.7 (0.4–0.9)	2.7 (1–7.2)	0.3 (0.1–1.1)
Superoxide dismutase	23	0.162	0.9 (0.5–1)	0.7 (0.3–0.9)	3 (1.1–7.9)	0.1 (0–1)
Total protein extract	–	0.096	0.9 (0.5–1)	1 (0.6–1)	Infinity	0.1 (0–0.6)

CI, confidence interval.

et al., 2005; Gari et al., 1986; Reboux et al., 2007), and to perform immunological tests with sera from patients sensitized by occupational exposure to MWF contaminated by *M. immunogenum*.

Proteins were relatively well conserved in species closely related taxonomically such as *M. immunogenum* and *M. abscessus*. Comparisons between available sequences for 11 proteins showed up to 94% identities between the two species, using blastP program (<http://www.ncbi.nih.gov>). Identity decreases when we consider other *Mycobacterium* species. In our study, ELISA tests using acyl-CoA dehydrogenase recombinant antigen from *M. immunogenum* were negative with sera from patients colonized and infected by *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. abscessus*. When we compare patients with the same pulmonary disease (hypersensitivity pneumonitis) but with differences in exposure (metalworking fluid with *M. immunogenum* versus hay with moulds and actinomycetes), specificity was neither high nor low, suggesting that common proteins or antigenic sites between microorganisms can be found to diagnose hypersensitivity pneumonitis.

Symptoms of HP appear soon after exposure to offending antigens. Immunological mechanisms involved during the initial contact between microorganisms and host immune cells have not been clearly established in the literature. Fever 4–5 h after exposure suggests an early contact between microorganisms and the immune system, without multiplication, growth or germination of the microorganism. In this way, cell wall proteins would likely be recognized as antigens in HP. Unexpectedly, cytosolic and secreted proteins were identified as major antigens in our study. This has already been reported in other studies (Blyth, 1978; Gupta et al., 2009). Moreover, serologic tests performed with metabolic antigens (containing only secreted proteins) show that antibodies bind secreted proteins.

Up to now, the use of recombinant antigens has not been used in HP serodiagnosis. In contrast, it is of common usage in the diagnosis of other diseases linked to exposure to microorganisms, such as IgE-mediated allergy. About 10 recombinant or purified antigens, mainly originating from *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus* species (Horner et al., 1995; Simon-Nobbe et al., 2008; Valenta and Kraft, 1995), have been tested for etiological diagnosis. The approach developed in the present study to characterize immuno-reactive proteins from the main agent of MWF-HP could be extended to other HP and etiological agents.

Until now, serological diagnosis of HP has been carried out using only crude extracts of microorganisms as antigens. Antigenic components of crude extracts are variable, even in commercialized products (Agarwal et al., 1982; Bush, 1993; Horner et al., 1995). Variations in antigen composition and concentration between extracts are ascribable to the variety of procedures and buffers used in their preparation. Microorganisms are usually made from cultures and the growth of organisms in culture is dependent on temperature, moisture, light, growth time and culture media (Bush and Yunginger, 1987; Horner et al., 1995). Within the same given procedure, strain differences in antigen composition and concentration within a given species may result in variations (Portnoy et al., 1993). Finally, microorganisms produce morphologically variant forms and no study has truly determined which form is predominantly involved in the disease (Roussel et al., 2010; Weissman et al., 1987). Another problem encountered with antigen extracts from crude microorganisms is the conservation and degradation of proteins. The buffer used can alter proteins, and proteolytic enzymes released by the extraction process can degrade antigenic proteins. In contrast, recombinant antigens present definite advantages: they can be produced as pure and defined molecules in large quantities with a standardized procedure, and the risk for antigenic protein alteration in extracts is lower than with crude extracts. Consequently, the serodiagnosis of HP will probably be improved

by the standardization of an immunological procedure that uses recombinant antigens.

In this study, six immuno-reactive proteins from *M. immunogenum* were characterized, constructed as recombinant antigens and tested by ELISA for their efficiency in distinguishing MWF-HP and exposed controls. The serodiagnosis test using acyl-CoA dehydrogenase antigen, alone or in combination with other recombinant antigens, now needs to be validated in a prospective study that includes a large cohort of patients with MWF-HP.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency (PHS-ICAD project, reference SEST-044), by the “Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés” and by Besançon University Hospital Research Found (STEFI project). The authors are grateful to N. Richardson-Peuteuil and F. Sheppard of the Clinical Investigation Center (Inserm) of Besançon for their editorial assistance.

References

- Agarwal, M.K., Jones, R.T., Yunginger, J.W., 1982. Immunochemical and physicochemical characterization of commercial *Alternaria* extracts: a model for standardization of mold allergen extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 432–436.
- Appaji Rao, N., Ambili, M., Jala, V.R., Subramanya, H.S., Savithri, H.S., 2003. Structure–function relationship in serine hydroxymethyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 24–29.
- Beckett, W., Kallay, M., Sood, A., Zuo, Z., Milton, D., 2005. Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental mycobacteria. *Environ. Health Perspect.* 113, 767–770.
- Blyth, W., 1978. The occurrence and nature of alveolitis-inducing substances in *Aspergillus clavatus*. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 272–282.
- Bourke, S.J., Dalphin, J.C., Boyd, G., McSharry, C., Baldwin, C.I., Calvert, J.E., 2001. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur. Respir. J.* 32, S81–S92.
- Bush, R.K., 1993. Fungal extracts in clinical practice. *Allergy Proc.* 14, 385–390.
- Bush, R.K., Yunginger, J.W., 1987. Standardization of fungal allergens. *Clin. Rev. Allergy* 5, 3–21.
- Chang, J.C., Harik, N.S., Liao, R.P., Sherman, D.R., 2007. Identification of mycobacterial genes that alter growth and pathology in macrophages and in mice. *J. Infect. Dis.* 196, 788–795.
- Erkinjuntti-Pekkanen, R., Reiman, M., Kokkarinen, J.I., Tukiainen, H.O., Terho, E.O., 1999. IgG antibodies, chronic bronchitis, and pulmonary function values in farmer's lung patients and matched controls. *Allergy* 54, 1181–1187.
- Fenoglio, C.M., Reboux, G., Sudre, B., Mercier, M., Roussel, S., Cordier, J.F., Piarroux, R., Dalphin, J.C., 2007. Diagnostic value of serum precipitins to mold antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur. Respir. J.* 29, 706–712.
- Fox, J., Anderson, H., Moen, T., Gruetzmacher, G., Hanrahan, L., Fink, J., 1999. Metalworking fluid-associated pneumonitis: an outbreak investigation and case-control study. *Am. J. Ind. Med.* 35, 58–67.
- Gamboa, P.M., Urbaneja, F., Olaizola, I., Boyra, J.A., Gonzalez, G., Antepará, I., Urrutia, I., Jauregui, I., Sanz, M.L., 2005. Specific IgG to *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micropolyspora faeni* and *Aspergillus fumigatus* in building workers exposed to esparto grass (plasterers) and in patients with esparto-induced hypersensitivity pneumonitis. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 15, 17–21.
- Gari, M., Pnon, J.M., Poirriez, J., Boulant, J., Geers, R., Thoannes, H., 1986. Enzyme-linked immunofiltration assay (ELIFA) for the detection of specific antibodies (IgG–IgM–IgA–IgE) in farmer's lung disease. *Clin. Exp. Allergy* 16, 553–562.
- Garipey, L., Cormier, Y., Laviolette, M., Tardif, A., 1989. Predictive value of bronchoalveolar lavage cells and serum precipitins in asymptomatic dairy farmers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1386–1389.
- Giddey, K., Monod, M., Barblan, J., Potts, A., Waridel, P., Zaugg, C., Quadroni, M., 2007. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in vitro conditions. *J. Proteome Res.* 6, 3081–3092.
- Girard, M., Lacasse, Y., Cormier, Y., 2009. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 64, 322–334.
- Gupta, M.K., Subramanian, V., Yadav, J.S., 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, 2319–2330.
- Horner, W.E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., Lehrer, S.B., 1995. Fungal allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 161–179.
- Kaukonen, K., Savolainen, J., Viander, M., Kotimaa, M., Terho, E.O., 1993. IgG and IgA subclass antibodies against *Aspergillus umbrosus* in farmer's lung disease. *Clin. Exp. Allergy* 23, 851–856.
- Kreiss, K., Cox-Ganser, J., 1997. Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: a workshop summary. *Am. J. Ind. Med.* 32, 423–432.

- Kusaka, H., Homma, Y., Ogasawara, H., Munakata, M., Tanimura, K., Ukita, H., Denzumi, N., Kawakami, Y., 1989. Five-year follow-up of *Micropolyspora faeni* antibody in smoking and nonsmoking farmers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 695–699.
- Lacasse, Y., Assayaq, E., Cormier, Y., 2008. Myths and controversies in hypersensitivity pneumonitis. *Respir. Crit. Care Med.* 29, 631–642.
- Lacasse, Y., Selman, M., Costabel, U., Dalphin, J.C., Ando, M., Morell, F., Erkinjuntti-Pekkanen, R., Muller, N., Colby, T.V., Schuyler, M., Cormier, Y., 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 952–958.
- Portnoy, J., Pucheco, F., Barnes, C., Upadrashta, B., Crenshaw, R., Esch, R., 1993. Selection of representative *Alternaria* strain groups on the basis of morphology, enzyme profile, and allergen content. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91, 773–782.
- Reboux, G., Piarroux, R., Roussel, S., Millon, L., Bardonnat, K., Dalphin, J.C., 2007. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J. Med. Microbiol.* 56, 1317–1321.
- 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., Reboux, G., Rognon, B., Monod, M., Grenouillet, F., Quadroni, M., Fellrath, J.M., Aubert, J.D., Dalphin, J.C., Millon, L., 2010. Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in serological diagnosis of farmer's lung disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 160–167.
- Sarfati, J., Monod, M., Recco, P., Sulahian, A., Pinel, C., Candolfi, E., Fontaine, T., Debeauvais, J.P., Tabouret, M., Latge, J.P., 2006. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55, 279–291.
- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Poll, V., Rid, R., Breitenbach, M., 2008. The spectrum of fungal allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145, 58–86.
- Thorne, P.S., Adamcakova-Dodd, A., Kelly, K.M., O'Neill, M.E., Duchaine, C., 2006. Metalworking fluid with mycobacteria and endotoxin induces hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 759–768.
- Tillie-Leblond, I., Grenouillet, F., Reboux, G., Roussel, S., Chouraki, B., Lorthois, C., Dalphin, J.C., Wallaert, B., Millon, L., 2010. Hypersensitivity pneumonitis and metalworking fluids contaminated by Mycobacteria. *Eur. Respir. J.*, in press.
- Vailes, L.D., Perzanowski, M.S., Wheatley, L.M., Platts-Mills, T.A., Chapman, M.D., 2001. IgE and IgG antibody responses to recombinant Alt a 1 as a marker of sensitization to *Alternaria* in asthma and atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* 31, 1891–1895.
- Valenta, R., Kraft, D., 1995. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 751–756.
- Wallace, R.J., Zhang, Y., Wilson, R.W., Mann, L., Rossmoore, H., 2002. Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5580–5584.
- Weissman, D.N., Halmepuro, L., Salvaggio, J.E., Lehrer, S.B., 1987. Antigenic/allergenic analysis of basidiomycete cap, mycelia, and spore extracts. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 84, 56–61.

3.1.2. Validation des antigènes recombinants pour le diagnostic de la maladie du poumon de mécanicien

External validation of recombinant antigens for serodiagnosis of Machine Operator's Lung

Barrera C., Reboux G., Warfolomeow I., Rognon B., Millon L., Roussel S.

American Journal of Industrial Medicine, accepté

➤ *Présentation de l'étude et rappel des principales étapes méthodologiques*

Notre équipe a contribué au développement de test diagnostique non invasive pour la maladie du PDM avec dans un premier temps le développement d'une électrosynérèse sur acétate de cellulose avec des antigènes somatiques de *M. immunogenum* entre autre (Tillie-Leblond et al., 2011), puis d'un test ELISA avec des antigènes recombinants (Roussel et al., 2011). La protéine recombinante acyl-CoA déshydrogénase est particulièrement efficace puisqu'elle permet d'obtenir une sensibilité de 100% et une spécificité de 80%. Cependant ces antigènes recombinants ont été développés et validés dans un système fermé, où les sujets, les témoins et la souche de *M. immunogenum* provenaient principalement d'une seule usine du Nord de la France. Les objectifs de cette étude étaient donc de faire une validation externe de la technique (ELISA avec les antigènes recombinants produits et décrits en §III 3.1.1) et de donner des arguments diagnostiques supplémentaires via les tests sérologiques développés par notre laboratoire (ELISA, mais aussi électrosynérèse avec des extraits somatiques de *M. immunogenum*) à 10 cas suspectés de PDM provenant d'entreprises allemandes.

Les 10 patients suspectés de PDM proviennent de trois usines allemandes. Les résultats des électrosynérèses et d'ELISA sont classés en trois niveaux A, B ou C reflétant la sensibilisation globale de chaque patient (A= résultat en faveur d'une PHS ; B= Suspicion d'une PHS, à confirmer par une nouvelle sérologie dans quelques mois ; C= Niveau d'anticorps trop faible, absence d'arguments en faveur d'une PHS).

➤ *Résultats*

Les 10 patients atteints de PDM sont des ouvriers ou agents de maintenance en contact avec des fluides de coupe et la présence de *M. immunogenum* a été confirmée soit par culture soit par biologie moléculaire. Les symptômes et les résultats des divers examens sont compatibles avec une PHS, et aucun patient n'est actuellement fumeur. L'utilisation des antigènes

somatiques de *M. immunogenum* en électrosynérèse ou recombinants en ELISA permet de faire le diagnostic de PDM aussi bien que lors de l'étude précédente (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats obtenus pour les deux techniques : électrosynérèse sur acétate de cellulose et ELISA

Patient	Electrosynérèse (arcs)					ELISA (Index)						
	<i>M. immunogenum</i>	Interprétation	<i>P. oleovorans</i>	<i>B. simplex</i>	<i>F. solani</i>	Acyl-CoA déshydrogénase ^e	Dihydrolipoyl déshydrogénase ^e	Interprétation	Acyl-CoA déshydrogénase ^e FadE	Cytosol aminopeptidas ^e	Serine hydroxyméthyl transférase	Superoxyde dismutase
I	2	C	2	2	0	0.232	0.103	C	0.157	0.208	0.429	0.198
II	13	A	2	4	3	0.786	5.880	A	0.956	3.840	0.719	7.113
III	5	A	1	1	1	0.250	0.663	B	0.266	0.403	0.172	0.304
IV	6	A	1	2	1	0.465	1.309	A	0.283	0.291	0.251	0.300
V	5	A	2	2	0	0.385	0.369	B	0.546	0.289	0.404	0.320
VI	4	B	1	1	1	0.544	0.537	A	0.617	0.994	0.604	1.067
VII	4	B	1	2	0	1.089	6.355	A	1.396	1.661	0.817	1.931
VIII	4	B	1	1	1	0.581	5.219	A	0.460	0.544	0.455	0.669
IX	6	A	3	5	4	0.346	3.342	A	0.526	0.451	0.388	0.850
X	6	A	1	2	1	0.340	0.348	B	0.444	0.417	0.341	0.346
Seuil	5		4	4	3	Seuil	0.491	0.575	0.764	0.490	0.627	0.499
± 1 arc	4		3	3	2	± 1 ET	[0.323-0.658]	[0.475-0.675]	[0.647-0.880]	[0.430-0.550]	[0.444-0.808]	[0.425-0.573]

ET : écart type ; valeurs en gras : > au seuil ± 1 arc / ± 1 ET

Les sérums de ces patients nous ont permis de valider l'efficacité des antigènes recombinants acyl-CoA déshydrogénase et dihydrolipoyl déshydrogénase. Ces deux antigènes combinés ensemble permettent d'améliorer la sensibilité de l'ELISA passant de 80% et 70% à 90% (seul un cas sur les dix est classé par la sérologie dans la catégorie C, donc sans argument sérologique en faveur d'une PHS).

➤ Conclusion

Les performances du diagnostic sérologique utilisant des antigènes recombinants d'une seule souche de *M. immunogenum* sont aussi bonnes pour les cas français que pour les cas allemands. Ainsi, malgré le risque de rencontrer des souches différentes dans l'environnement des patients, conférant parfois des différences dans la pathogénicité et l'immunogénicité, les deux antigènes recombinants peuvent être considérés comme des biomarqueurs de la maladie.

Néanmoins, la faiblesse de cette étude est le manque de témoins exposés asymptomatiques. Ceci nous aurait permis de calculer la spécificité des antigènes. De plus, il ne faut pas perdre de vue que des changements de pratiques ou d'autres événements non planifiables peuvent faire évoluer la flore microbienne des fluides de coupe et faire apparaître de nouveaux agents étiologiques. Le suivi microbiologique environnemental reste indispensable dans ce genre de maladie et un diagnostic sérologique basé sur la réponse immunologique doit évoluer en conséquence.

L'ELISA utilisant les antigènes recombinants de *M. immunogenum* est un outil standardisé prometteur pour le diagnostic des PDM en complément des critères cliniques et radiologiques.

➤ *Texte de l'article*

External Validation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Machine Operator's Lung

Coralie Barrera, MSc,¹ Gabriel Reboux, PhD,^{1,2*} Isabel Warfolomeow, PhD,³
Bénédicte Rognon, PhD,^{1,2} Laurence Millon, PharmD, PhD,^{1,2,4} and Sandrine Roussel, PhD^{1,2}

Background Machine operator's lung (MOL) is a hypersensitivity pneumonitis the diagnosis of which is difficult. Our laboratory previously developed an ELISA test using recombinant antigens from *Mycobacterium immunogenum* isolated in French plant. The objective was to validate the previous ELISA results with ten new suspected cases from Germany.

Methods Two serological analyses were performed: ELISA with the six recombinant antigens, and electrosyneresis with crude antigens of *M. immunogenum* and three other main species isolated from contaminated metalworking fluids.

Results The two recombinant antigens acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase, combined together, and electrosyneresis are useful in making the diagnosis regardless of the clinical and radiological data. Finally 9 out of the 10 suspected cases were declared as MOL.

Conclusions Despite the geographical distance, the crude and recombinant antigens produced to investigate the clustered French cases also proved to be useful in diagnosing the suspected cases in Germany. *Am. J. Ind. Med.*

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: Acyl-CoA dehydrogenase; dihydrolipoyl dehydrogenase; metalworking fluid; *Mycobacterium immunogenum*; hypersensitivity pneumonitis

INTRODUCTION

Machine operator's lung (MOL), a hypersensitivity pneumonitis, is caused by microorganisms growing in metalworking fluids (MWF) [Bernstein et al., 1995]. The microbiological contamination of MWF has been described since the 1980s with some bacteria like *Pseudomonas* and fungi like *Fusarium* [Passman, 2004]. To control this contamination, biocides were added to MWF, thus changing the microbial composition [Dilger et al., 2005]. *Mycobacterium immunogenum*, a fast-growing mycobacteria described and included in the *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group [Wilson et al., 2001], has been recognized as the main etiological agent of MOL [Kreiss and Cox-Ganser, 1997; Shelton et al., 1999; Wilson et al., 2001; Wallace et al., 2002; Gupta and Rosenman, 2006; Thorne et al., 2006]. Immunological evidence and murin models have also confirmed the role of this microorganism in MOL [Shelton et al., 1999; Gordon

¹UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement, University of Franche-Comté, Besançon, France

²Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

³Occupational Health and Safety Department, Berufsgenossenschaft Holz und Metall (BGHM), Mainz, Germany

⁴Clinical Investigation Center (Inserm CIT 808), University Hospital of Besançon, Besançon, France

Contract grant sponsor: French Ministry of Health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique national SOPHIA); Contract grant number: n°09/512.

Disclosure Statement: The authors report no conflicts of interests.

*Correspondence to: Gabriel Reboux, PhD, Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Bd Fleming, 25 000 Besançon, France.

E-mail: gabriel.reboux@univ-fcomte.fr

Accepted 23 September 2013

DOI 10.1002/ajim.22270. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

et al., 2006; Gupta et al., 2009; Roussel et al., 2011; Tillie-Leblond et al., 2011]. Like other hypersensitivity pneumonitis pathologies, MOL is difficult to diagnose, as it requires an association of clinical and biological markers [Girard et al., 2009]. Our laboratory has contributed to the development of serological tests which make diagnosis less invasive. First, Tillie-Leblond et al. [2011] showed that electrosyneresis and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) techniques with crude antigens from *M. immunogenum* were promising tools for serodiagnosis with a sensitivity of 77% and 92% and a specificity of 92% and 100% respectively [Tillie-Leblond et al., 2011]. Then, Roussel et al. [2011] developed an ELISA with recombinant antigens from *M. immunogenum* to standardize the serodiagnosis. The acyl-CoA dehydrogenase recombinant antigen was especially useful with a sensitivity of 100% and a specificity of 83% [Roussel et al., 2011].

Serological tests were performed with an isolated strain of *M. immunogenum* that came from the plant where 13 of the 15 French patients were identified [Tillie-Leblond et al., 2011]. So the tests were assessed in a closed system. The authors suggested that a validation with a cohort of other patients with MOL should be done. Indeed, strains of *M. immunogenum* could be different from one plant to another. Distinct chemotypes or genotypes of *M. immunogenum* strains are known to exist and thus, antigen activity and/or biocide susceptibility can differ from one strain to another [Khan et al., 2005; Selvaraju et al., 2008].

In this study we aim at performing an external validation of our techniques, for serodiagnosis of MOL in patients working in industrial settings with different environmental conditions. To this end, we collected serum from 10 suspected cases of MOL from three different plants in Germany. In this new series of cases, we evaluated diagnosis performance of electrosyneresis and ELISA using the crude extracts and the six recombinant antigens previously described [Roussel et al., 2011; Tillie-Leblond et al., 2011].

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Suspected case subjects (n = 10) were recruited when they consulted the department of Occupational Health and Safety (BGHM, Germany), according to clinical, biological, radiological and environmental investigations [Lacasse et al., 2003]. They requested our laboratory to perform serodiagnosis to complete the HP medical check-up. No additional blood sampling was done for our study. The 10 male patients came from three different plants in Germany named P1, P2, P3. Their immunological response was studied by electrosyneresis on cellulose acetate with four crude somatic antigens and by ELISA with six recombinant

antigens from *M. immunogenum* to provide additional diagnostic criteria. Protocol for evaluation of serodiagnosis using recombinant antigens was approved by one unit of the French ethics committee (Comité de Protection des Personnes Est-II (CPP-Est II)) located at regional health agency of Franche-Comté (ARS de Franche-Comté, France). The identification number of our study is "PHRC-SOPHIA" n° 09/512. No informed consent was required, because the serum analyses were performed in support of the clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis, as permitted by requirements in France and Germany.

Sera from four MOL patients included in Tillie-Leblond et al. [2011] were also used in ELISA as reference sera.

MWF Contamination

In HP diagnosis, evidence of microorganism exposure must be observed. Samples of MWFs in the three plants were analyzed by either culture alone or both culture and quantitative PCR (qPCR).

Immunological Methods

Electrosyneresis

Four crude somatic antigens were tested by electrosyneresis: *M. immunogenum*, *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus simplex*, and *Fusarium solani*. Strains, culture, antigen production and electrosyneresis methods were described by Tillie-Leblond et al. [2011]. Each serum of new suspected cases of MOL was tested twice.

For *M. immunogenum*, there were three levels of interpretation based on a threshold determined in the Tillie-Leblond study (positive if ≥ 5 arcs) [Tillie-Leblond et al., 2011], and using a precision factor previously estimated at ± 1 arc by Reboux et al. [2001]. If the result was ≥ 5 arcs (positive), the level was "A" and the interpretation was "serological results in favor of MOL." If the result was equal to 4 arcs (borderline positive), the level was "B" and, the interpretation was "suspected case, must be confirmed by a new serological test in a few months." If the number of arcs was < 4 arcs (negative), the level was "C" and the interpretation was "level of antibodies too low, not in favor of MOL."

For *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus simplex* and *Fusarium solani*, the thresholds used in our routine practice were applied (positive if ≥ 4 , ≥ 4 , and ≥ 3 arcs, respectively).

Enzyme linked immunosorbent assay

Detection of MOL-specific IgG antibodies was performed by ELISA with the six recombinant antigens from *M. immunogenum* described by Roussel et al. [2011]: probable acyl-CoA dehydrogenase, probable acyl-CoA dehydrogenase

FadE, probable cytosol aminopeptidase, dihydrolipoyl dehydrogenase, serine hydroxymethyltransferase and superoxide dismutase. On each ELISA plate, four sera from the French MOL cases were tested as a reference. Each serum sample was tested in triplicate. The three optical density (OD) values were blank-corrected and averaged, and a standard deviation and variation coefficient were calculated. If the variation coefficient was higher than 20%, outliers were deleted. Then values were normalized based on the mean of the OD values obtained for the four French MOL sera. For each of the recombinant antigens, the thresholds previously determined by Roussel et al. [2011] were also normalized. Values superior at the normalized threshold (± 1 standard deviation) were considered positive.

Overall, when interpreting ELISA using recombinant antigens, there were three levels of serological interpretation inspired by the electrosynthesis interpretation: level A if the value was positive for at least 2 recombinant antigens, level B if the value was positive for one antigen, and level C if the value was negative for all antigens.

Immunoelectrophoresis

A complementary test was performed for subjects also exposed to another source of antigens potentially involved in

hypersensitivity pneumonitis. The FSK4 Avian Immunodiffusion kit™ (Microgen Bioproducts®, Camberley, England) was used according to manufacturer's instructions. Five antigens were tested: pigeon serum, budgerigar serum, poultry serum, pigeon faecal extract, budgerigar faecal extract.

RESULTS

Subjects

As shown in Table I, MOL was suspected in 10 male patients from three different German factories named P1 (subject I), P2 (subjects II and III), and P3 (subjects IV to X). Their mean age was 52.4 years (range 43–59 years), and they were non-smokers or ex-smokers who had stopped smoking at least 10 years before the beginning of the study. All patients had been exposed to MWFs. There were eight machine workers exposed to MWF daily and two machine maintenance technicians (patients I and III), exposed frequently but more irregularly. Workers III, VII, IX, and X noted an onset of symptoms in the evening after work. Five workers (IV, V, VI, VIII, IX) noticed an improvement with cessation of exposure to MWF. All workers noted an improvement due to a change

TABLE I. Clinical Features of the 10 Suspected Cases of MOL

Patient	Symptoms	Date of early symptoms	Professional and hobbies exposure	DL _{CO} /VA (% pred)	PaO ₂ (KPa)	Imaging data	Lymphocytes (%) in BAL
I	Bronchitis, dyspnea	2002	Irregularly to MWF	106.3	10.38	Diffuse ground glass opacities	ND
II	Dyspnea	2006	MWF	57.5	11.06	Diffuse interstitial pneumonitis	ND
III	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	ND	Irregularly to MWF	91.5	10.53	Diffuse ground glass opacities	ND
IV	Influenza-like symptoms ^a , weight loss, related to work period	2008	MWF	120	11.26	Diffuse ground glass opacities	78
V	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2009	MWF	89.4	10.56	Diffuse ground glass opacities, reticular patterns	ND
VI	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2009	MWF	104.8	10.9	Diffuse ground glass opacities	ND
VII	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2009	MWF, poultry	64.1	8.7	Diffuse ground glass opacities	73
VIII	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2009	MWF	83	8.5	Normal, slight bronchiectatic changes	27.8
IX	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2009	MWF, pigeon	80.7	9.07	Ground glass opacities	ND
X	Influenza-like symptoms ^a , related to work period	2010	MWF	66	10.53	Ground glass opacities	21

MWF, metalworking fluids; DL_{CO}/VA % pred, carbon monoxide diffusing capacity in percentage of prediction; PaO₂, arterial oxygen tension; KPa, KiloPascal; BAL, bronchoalveolar lavage; ND, not done.

^aInfluenza-like symptoms = Cough, dyspnea, fever, fatigue, chills.

in workstation and one noted an improvement when wearing a respiratory mask (Patient IX). Two workers were also exposed to another source of antigens linked to another hypersensitivity pneumonitis (poultry for patient VII, pigeon for patient IX).

Plants and Bacterial Contamination

The patients came from three different non-automotive plants with approximately 6,000 (P1) 3,000 (P2), and 1,500 (P3) workers. These plants transform metal parts using emulsified mineral oil diluted from 2% to 10%. Neither synthetic nor semi-synthetic oil was used. Biocides in MWF were directly incorporated by the oil manufacturer, and plants P1 and P3 added additional biocides to the settling tanks before MWF recycling while plant P2 did not. Two samples for P1, one sample for P2 and three samples for P3 were positives, either by culture or by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The total bacterial contamination observed by culture was between 10^3 colony forming unity (CFU)/ml and 6.6×10^6 CFU/ml for P1, above 9.1×10^6 CFU/ml for P2 and an average of 2.0×10^6 CFU/ml for P3. All isolated *Mycobacterium* genus from MWFs in the three plants by culture belonged to the species *M. immunogenum* and concentrations were 2.0×10^3 CFU/ml. Moreover, qPCR showed a contamination by *M. immunogenum* between 9.4×10^4 cells equivalent (CE)/ml and 1.1×10^8 CE/ml for P3. CE includes viable and non-viable cells and explains why the amount per qPCR is systematically greater than the amount obtained by culture.

Immunological Responses

Electrosyneresis

Electrosyneresis on cellulose acetate was performed to detect precipitins arcs against four antigens. The number of arc precipitins was always higher for *M. immunogenum* than the three other antigens, as shown in Table II. Only two patients showed positive results when using *B. simplex* and *F. solani* antigens and one with *P. oleovorans*. Nine patients showed positive results when using *M. immunogenum* antigens. According to the established rules, six patients were assigned to level A, three to level B and the remaining one to level C (Patient I).

ELISA

The results of the six recombinant antigens available were shown in Table II. Acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase were the most effective antigens with eight and seven positive sera corresponding to a

sensitivity of 80% and 70% respectively. Combination of these two antigens gave a sensitivity of 90%. The acyl-CoA dehydrogenase FadE, cytosol aminopeptidase, serine hydroxymethyltransferase, and superoxide dismutase antigens were not discriminant because only two to five sera were positive. According to the rules, six patients were classified in level A, three in level B, and the remaining one (Patient I) was negative by ELISA for all recombinant antigens and was classified in level C. When using the same rules with only the two recombinant antigens acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase, patients were classified in levels A, B, C in the same manner. Thus, only these two antigens could be used to simplify routine testing.

Immuno-electrophoresis

Additional serological tests were carried out for patients VII and IX, due to poultry or pigeon exposure. Serological analyses were negative and thus reduced the likelihood of a possible avian source as responsible for HP symptoms in these patients.

DISCUSSION

Crude antigens and two of the six recombinant antigens from the *M. immunogenum* strain isolated from a single French work place were effective in diagnosing MOL cases from other, industrial settings in another country (Germany) [Roussel et al., 2011; Tillie-Leblond et al., 2011]. Serological results were concordant using the two techniques for all patients (Table II). Except for Patient I, who was irregularly exposed to MWF and had a weak MOL specific IgG level, all patients were confirmed as MOL or suspected cases of MOL by serological tests presenting a strong concordance with clinical data.

Using electrosyneresis with a threshold of 5 ± 1 arcs, sensitivity was 90% with the *M. immunogenum* crude antigen making the use of other crude antigens for the electrosyneresis method unnecessary. The ELISA results confirmed that the two recombinant antigens acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase were the most effective antigens for serodiagnosis of MOL [Roussel et al., 2011]. When used together, sensitivity was further enhanced to 90%. This work is limited by the absence of exposed controls from the three German plants to evaluate the specificity of electrosyneresis and ELISA. However, specificity was determined in the previous study at 80% and 70% for acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase respectively [Roussel et al., 2011].

A total bacterial contamination of 7×10^5 CFU/ml (10 – 1.6×10^8 CFU/ml) was observed in the STEFI study of 19 plants from the Franche-Comté area (France), with no cases of MOL nor isolation of *M. immunogenum* by culture [Murat

TABLE II. Results Obtained for Both Serological Analyses

Patient	Electrosynthesis (arcs)				ELISA (Index)							
	<i>M. immunogenum</i> interpretation	<i>P. oleovorans</i>	<i>B. simplex</i>	<i>F. solani</i>	Global interpretation	Dihydropyridyl dehydrogenase	Acyl-CoA dehydrogenase	Global interpretation	FadE	Cytosol aminopeptidase	Serine hydroxymethyl transferase	Superoxide dismutase
I	2	2	2	0	C	0.103	0.232	C	0.157	0.208	0.429	0.198
II	13	2	4	3	A	5.880	0.786	A	0.956	3.840	0.719	7.113
III	5	1	1	1	A	0.663	0.250	B	0.266	0.403	0.172	0.304
IV	6	1	2	1	A	1.309	0.465	A	0.283	0.291	0.251	0.300
V	5	2	2	0	A	0.369	0.385	B	0.546	0.289	0.404	0.320
VI	4	1	1	1	B	0.537	0.544	A	0.617	0.994	0.604	1.067
VII	4	1	2	0	B	6.355	1.089	A	1.396	1.661	0.817	1.931
VIII	4	1	1	1	B	5.219	0.591	A	0.460	0.544	0.455	0.669
IX	6	3	5	4	A	3.342	0.346	A	0.526	0.451	0.388	0.850
X	6	1	2	1	A	0.348	0.340	B	0.444	0.417	0.341	0.346
Threshold	5	4	4	3		0.575	0.491		0.764	0.490	0.627	0.499
±1 arc	4	3	3	2		[0.475-0.675]	[0.323-0.658]		[0.647-0.880]	[0.430-0.550]	[0.444-0.808]	[0.425-0.573]

Number of arcs obtained by electrosynthesis on cellulose acetate with four crude antigens: *Mycobacterium immunogenum*, *Pseudomonas oleovorans*, *Bacillus simplex*, *Fusarium solani*; ELISA (IgG expressed in Index) (Optical densities / referenced value) for six recombinant antigens of *M. immunogenum*, acyl-CoA dehydrogenase, acyl-CoA dehydrogenase, FadE, cytosol aminopeptidase, dihydropyridyl dehydrogenase, serine hydroxymethyltransferase, superoxide dismutase. Threshold values obtained in the previous study [Roussel et al., 2011] were normalized with the referenced value. Values in bold were superior at the arcs threshold or ELISA threshold values mean ± standard deviation, and were considered positive.

et al., 2012]. In plants with French cases of MOL previously reported by Tillie-Leblond et al., the mean total bacterial contamination was 206 CFU/ml only (0 to >1,000 CFU/ml) [G. Reboux, unpublished data], similar to that of another plant of Murat study named AP3 with a case of MOL [Murat et al., 2012]. However, in this present work, the total bacterial contamination was above the average of French STEFI plant contamination; only the MWF sample for German factory P1 was lower. The use of more biocides by the P1 and P3 plants did not change the overall bacterial contamination in comparison with the P2 German plant.

M. immunogenum contamination was detected by qPCR only in 7% of MWFs of the 19 STEFI plants and was not detected in culture [Murat et al., 2012]. Forty percent of the MWF samples in plants described by Tillie-Leblond et al. [2011] was exclusively contaminated by *M. immunogenum* from 2 to 4,000 CFU/ml [G. Reboux, unpublished data]. This finding is similar to that of plant AP2 (an automotive plant also described by Murat et al. with a MOL case) where nearly half of the samples was contaminated between 100 to 5,000 CFU/ml (mean of 1,958 CFU/ml). Plant AP3 had only 5% positive samples to *M. immunogenum* by culture ($10\text{--}5.6 \times 10^5$ CFU/ml) while qPCR detected this species in 30% of the MWF samples. This species was detected in our present study in all positive samples ($n = 6$) by culture, qPCR or both. In fact, only the three samples of the German P3 plant were analyzed by qPCR and revealed a total contamination of 5.5×10^7 CE/ml. In contrast, *M. immunogenum* contamination of the MWF samples of AP3 and STEFI plants was below 10^5 CE/ml, in accordance with results of another study [Shelton et al., 1999].

The concentration of *M. immunogenum* by culture of the three French plants with MOL cases is similar to that of the three German plants (2,000 CFU/ml for German plants vs. 847 CFU/ml for "Tillie-Leblond" plant and 1,958 CFU/ml for AP2), except for AP3 which is somewhat lower (550 CFU/ml). Moreover, in comparison to the 19 STEFI plants with no MOL cases, the total bacterial contamination was higher for the three German plants.

The three German plants in which 10 new cases were found, were nonautomotive industries while according to previous studies, the risk of MOL in this kind of industry appeared to be lower [Kreiss and Cox-Ganser, 1997; Murat et al., 2012]. In addition, synthetic fluids may induce more respiratory symptoms than soluble mineral oil [Bukowski, 2003]. Therefore, although the three German plants initially presented a low risk of MOL, 10 cases were finally reported. Clearly, it seems that only the presence of *M. immunogenum* was useful in evaluating a risk of MOL either by culture or by qPCR regardless of the concentration. The various types of industry and MWF were less relevant. Risk evaluation is essential because according to the NIOSH report at the end of the 1990s, more than one million machine workers were exposed to fluids in the United States [Centers

for Disease Control and Prevention, 2002]. Indeed, the risk of MOL concerns a large number of workers from the industrial sector, and development and validation of a standardizable ELISA test is challenging. However, the use of a panel of recombinant antigens seems to be the best way to improve MOL serodiagnosis.

Our experience for diagnosis of MOL from French and German plants showed that serodiagnosis was effective using crude and recombinant antigens from only one strain from one species, *M. immunogenum*. However, we must keep in mind that variations in MWF's composition in terms of the species could happen, and could change the immunological reactivity of exposed patients. Indeed, specific MWF environmental conditions (temperature, pH, chemistry, biocide treatment, contamination by other microorganisms) can strongly influence *M. immunogenum* growth [Moore et al., 2000; Passman, 2004; Falkinham, 2009]. Furthermore, changes in environmental conditions can occur because of unplanned events, the kind of materials used [Falkinham, 2009; Murat et al., 2012] and how practices evolve (as shown in another hypersensitivity pneumonitis [Reboux et al., 2006]). In the same way, variation in genotype and phenotype are likely to happen, since many different clones have been found in MWF [Khan et al., 2005]. Mutations depend on the mutation rate (usually around 10^{-7}), the growth rate (it is well known that the *Mycobacterium chelonae/abscessus* group has a rapid growth rate), and the growth period (MWF were usually renewed after several months). Therefore, conditions are favorable to the development of mutations. Moreover, the use of biocides could contribute to a selection pressure thus increasing the number of biocide resistant strains, and facilitating the growth of human pathogenic bacteria compared to non-treated MWF [Dilger et al., 2005]. Finally, individual variation of phenotype could lead to the observation of different immunogenicity, pathogenicity, and production of antibodies at different levels [de Souza and Wiker, 2011; Hernández-Pando et al., 2012; Stepanova et al., 2012]. However, the two recombinant antigens proposed for serodiagnosis are potentially useful, documenting exposure in individuals with symptoms, physical findings, pulmonary function and radiographic changes consistent with HP.

In conclusion, using crude antigens from one isolate of *M. immunogenum* in electrosynthesis and both recombinant antigens (acyl-CoA dehydrogenase and dihydrolipoyl dehydrogenase) to determine IgG antibody level was effective for the serodiagnosis of MOL cases suspected in plants from another country. ELISA provided a standardized, rapid, none invasive and relatively cheap test to facilitate the diagnosis of MOL. However, regular monitoring of MWF contamination is required to assess microbiological changes, and to add antigens from other species and other recombinant antigens to the tested panel if necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by French Ministry of Health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique national SOPHIA) n°09/512 SOPHIA. The authors would like to thank Pamela Albert for her editorial assistance.

REFERENCES

- Bernstein DI, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL. 1995. Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest* 108:636–641.
- Bukowski JA. 2003. Review of respiratory morbidity from occupational exposure to oil mists. *Appl Occup Environ Hyg* 18:828–837.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Respiratory illness in workers exposed to metalworking fluid contaminated with non-tuberculous mycobacteria—Ohio, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:349–352.
- de Souza GA, Wiker HG. 2011. A proteomic view of mycobacteria. *Proteomics* 11:3118–3127.
- Dilger S, Fluri A, Sonntag HG. 2005. Bacterial contamination of preserved and non-preserved metal working fluids. *Int J Hyg Environ Health* 208:467–476.
- Falkinham JO. 2009. Effects of biocides and other metal removal fluid constituents on *Mycobacterium immunogenum*. *Appl Environ Microbiol* 75:2057–2061.
- Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. 2009. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 64:322–334.
- Gordon T, Nadziejko C, Galdanes K, Lewis D, Donnelly K. 2006. *Mycobacterium immunogenum* causes hypersensitivity pneumonitis-like pathology in mice. *Inhal Toxicol* 18:449–456.
- Gupta A, Rosenman KD. 2006. Hypersensitivity pneumonitis due to metal working fluids: Sporadic or under reported? *Am J Ind Med* 49:423–433.
- Gupta MK, Subramanian V, Yadav JS. 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: 2319–2330.
- Hernández-Pando R, Marquina-Castillo B, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D. 2012. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 12:725–731.
- Khan IU, Selvaraju SB, Yadav JS. 2005. Occurrence and characterization of multiple novel genotypes of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium chelonae* in metalworking fluids. *FEMS Microbiol Ecol* 54:329–338.
- Kreiss K, Cox-Ganser J. 1997. Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: A workshop summary. *Am J Ind Med* 32: 423–432.
- Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y, Group HS. 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:952–958.
- Moore JS, Christensen M, Wilson RW, Wallace RJ, Zhang Y, Nash DR, Shelton B. 2000. Mycobacterial contamination of metalworking fluids: Involvement of a possible new taxon of rapidly growing mycobacteria. *AIHAJ* 61:205–213.
- Murat JB, Grenouillet F, Reboux G, Penven E, Batchili A, Dalphin JC, Thaon I, Millon L. 2012. Factors influencing the microbial composition of metalworking fluids and potential implications for machine operator's lung. *Appl Environ Microbiol* 78:34–41.
- Passman F. 2004. Microbial problems in metalworking fluids. *Tribology and Lubrication Technology* 60:24–27.
- Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnet K, Dalphin JC. 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1534–1539.
- Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med* 13:267–273.
- Roussel S, Rognon B, Barrera C, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, Thaon I, Dalphin J-C, Tillie-Leblond I, Quadroni M, Monod M, Millon L. 2011. Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. *Int J Med Microbiol* 301:150–156.
- Selvaraju SB, Khan IU, Yadav JS. 2008. Differential biocide susceptibility of the multiple genotypes of *Mycobacterium immunogenum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:197–203.
- Shelton BG, Flanders WD, Morris GK. 1999. *Mycobacterium* sp. as a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers. *Emerg Infect Dis* 5:270–273.
- Stepanova H, Pavlova B, Stromerova N, Ondrackova P, Stejskal K, Slana I, Zdrahal Z, Pavlik I, Faldyna M. 2012. Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection. *Vet Microbiol* 159:343–350.
- Thorne PS, Adamcakova-Dodd A, Kelly KM, O'neill ME, Duchaine C. 2006. Metalworking fluid with mycobacteria and endotoxin induces hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 173:759–768.
- Tillie-Leblond I, Grenouillet F, Reboux G, Roussel S, Chouraki B, Lorthois C, Dalphin JC, Wallaert B, Millon L. 2011. Hypersensitivity pneumonitis and metalworking fluids contaminated by mycobacteria. *Eur Respir J* 37:640–647.
- Wallace J, Zhang Y, Wilson RW, Mann L, Rossmoore H. 2002. Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Appl Environ Microbiol* 68:5580–5584.
- Wilson RW, Steingrube VA, Böttger EC, Springer B, Brown-Elliott BA, Vincent V, Jost KC, Zhang Y, Garcia MJ, Chiu SH, Onyi GO, Rossmoore H, Nash DR, Wallace RJ. 2001. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: An international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1751–1764.

3.2. Développement de tests sérologiques pour le diagnostic de la maladie du poumon de fermier

3.2.1. Analyses microbiologiques des fourrages

La connaissance de la contamination microbiologique des fourrages permet de définir quels sont les principaux micro-organismes présents dans l'environnement agricole et permet de faire évoluer le choix des antigènes à tester pour le diagnostic sérologique du PDF.

➤ *Type de fermes analysées*

Dans le cadre du protocole SOPHIA, des analyses de fourrages ont pu être réalisées dans 22 fermes. Pour 16 fermes sur 22, le témoin apparié travaille dans la même exploitation agricole que le malade (lien de parenté : conjoint(e)/fils/frère/neveu) et donc l'analyse des fourrages de la ferme n'est réalisée qu'une seule fois. Pour les 6 autres fermes, le témoin réside dans la même commune que le malade mais travaille sur une autre exploitation agricole.

Les fermes des agriculteurs recrutés dans les centres de Besançon, Neuchâtel et Clermont-Ferrand ont des altitudes similaires correspondant à un climat de moyenne montagne et le type d'agriculture pratiquée est principalement l'élevage bovin pour la production de lait. Les fermes des patients de Saint-Etienne ont une altitude de plaine et ont un type d'agriculture différent (élevage de moutons). Le genre de ferme rencontrée est partagé entre le type dit traditionnel, classique et moderne (Tableau 6).

Tableau 6 : Répartition des fermes étudiées en fonction du type d'agriculture et du type de ferme

	Besançon (n=12)	Rennes (n=5)	Neuchâtel (n=2)	Saint- Etienne (n=2)	Clermont- Ferrand (n=1)	Total
Altitude moyenne	728 m	62 m	908 m	310 m	850 m	
Bovins	12	5	1	0	1	19
Ovins	1	0	0	2	0	3
Elevage Equidés	0	0	1	0	0	1
Culture céréalière	6	3	0	1	1	11
Traditionnelle	5	2	1	1	0	9
Type de ferme Classique	4	3	0	1	0	8
Moderne	3	0	1	0	1	5

➤ *Micro-organismes*

Au total, 167 échantillons ont été analysés (au 01/07/2013) dont 122 étaient des fourrages (foin, regain, luzerne, paille), 34 étaient des aliments pour bétails ou des céréales (blé, orge, orge aplati, avoine, maïs, triticale, granulés, farine), 6 étaient des produits ensilés ou enrubannés et enfin 5 étaient des poussières d'étable. Parmi les fourrages, 66% sont conditionnés en balle ronde de haute densité, 16% en balle de moyenne et faible densité et 18% sont conditionnés en vrac. Au moins un des échantillons de fourrage prélevé dans chacune des fermes est contaminé par les espèces *Eurotium sp.* (*Aspergillus* du groupe *glaucus*) et *W. sebi*, mais la contamination ne dépasse pas toujours le seuil de référence établi lors d'études précédentes. Le genre *Saccharomonospora* est retrouvé fréquemment en quantité élevée (89% des fermes) (Tableau 7). *S. rectivirgula*, la principale étiologie n'est pas isolée systématiquement dans les fermes mais lorsqu'elle est présente, elle l'est en grande quantité (80% des fermes ont des fourrages contaminés par *S. rectivirgula* au-delà du seuil de référence) (Tableau 7).

Tableau 7 : Pourcentage de fermes et d'échantillons présentant les espèces impliquées dans l'étiologie du PDF, et pourcentage de fermes dont au moins un des échantillons de fourrages dépasse le seuil de référence.

	Présence dans les fermes* (n=22)	Présence dans les échantillons* (n=122)	Fermes avec échantillons supérieur au seuil
<i>L. corymbifera</i>	86%	42%	63%
<i>Eurotium spp.</i>	100%	84%	77%
<i>W. sebi</i>	100%	82%	55%
<i>S. rectivirgula</i>	68%	38%	80%
<i>Saccharomonospora spp.</i>	86%	65%	89%
<i>T. vulgaris</i>	27%	14%	67%

* Uniquement les résultats de l'analyse microbiologique des fourrages (paille, foin, luzerne, regain) en UFC/g sont comparés avec la base de référence.

Le Tableau 8 présente l'ensemble des espèces identifiées lors de l'analyse microbiologique. *T. vulgaris* est isolé en faible quantité dans les foins mais, ce micro-organisme est difficile à identifier et sa croissance peut être inhibée par la présence en grande quantité des autres espèces. L'estimation de sa présence dans les foins est donc certainement à reconsidérer. Le genre *Aspergillus* est très représenté dans les foins avec pas moins de 8 espèces différentes rencontrées (sans compter *Eurotium spp.*). Les genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, et *Alternaria* ainsi que des levures et des *Streptomyces* sont également fréquemment isolés

dans les fermes. Les résultats pour Clermont-Ferrand ne sont pas représentatifs des fermes de la région puisque l'analyse n'a été réalisée que sur 9 échantillons d'une même ferme. Aucune conclusion ne peut être tirée sur la relation entre la survenue de la maladie et la contamination dans les fourrages, puisque la majorité des témoins travaillent dans la même ferme que le patient.

Tableau 8 : Nombre moyen de colonies pour les espèces retrouvées dans l'ensemble des prélèvements de chaque centre en UFC/g de fourrage.

	Besançon (n=76)	Rennes (n=20)	Neuchâtel (n=14)	Saint- Etienne (n=14)	Clermont- Ferrand (n=9)
<u>Etiologies du PDF</u>					
<i>Absidia corymbifera</i>	90 400	600	265 400	700	100
<i>Eurotium spp.</i>	617 200	212 000	213 900	44 700	4 700
<i>Wallemia sebi</i>	309 700	186 000	480 300	11 900	11 200
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	9 800	1 300	5 100	100	0
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	600	100	200	100	0
<i>Saccharomonospora sp.</i>	5 400	1 400	11 000	400	300
<u>Autres micro-organismes</u>					
Moisissures					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	500	0	2 100	300	2 500
<i>Aspergillus nidulans</i>	500	0	0	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	300	0	300	300	0
<i>Aspergillus flavus</i>	100	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	100	11 200	4 000	100	100
<i>Aspergillus ochraceus</i>	19 200	900	0	0	0
<i>Aspergillus candidus</i>	17 300	0	0	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	200	0	0
<i>Mucor</i>	100	3 300	0	0	100
<i>Fusarium sp.</i>	400	2 800	2 000	100	0
<i>Alternaria spp.</i>	100	500	600	3 200	100
<i>Cladosporium spp.</i>	23 900	13 900	19 100	300	2 900
<i>Penicillium spp.</i>	613 200	8 000	6 200	300	0
Autres*	200	0	700	900	1 900
FNI**	9 400	3 500	12 100	0	0
Levures					
<i>Rhodotorula sp.</i>	5 000	5 000	0	100	0
Levures non identifiées	21 500	55 800	1 400	200	1 800
Bactéries filamenteuses					
<i>Streptomyces mésophiles</i>	818 600	17 700	52 700	800	1 800
<i>Streptomyces thermophiles</i>	700	1 400	1 800	2 100	1 500

*Autres = *Aureobasidium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Scopulariopsis sp.* ; **FNI = Filaments non identifiés

3.2.2. Identification des protéines immuno-réactives spécifiques de *S. rectivirgula* pour le développement d'antigènes recombinants et mise au point d'un test ELISA standardisé

Immunoreactive proteins of Saccharopolyspora rectivirgula for Farmer's Lung serodiagnosis

Barrera C., Millon L., Rognon B., Quadroni M., Roussel S., Dalphin J.C., Court-Fortune I., Caillaud D., Jouneau S., Fellrath J.M., Zaugg C., Monod M., Reboux G.

Soumis à International Journal of Medical Microbiology, en révision

➤ *Présentation de l'étude et rappel des principales étapes méthodologiques*

Saccharopolyspora rectivirgula est un actinomycète retrouvé dans les fourrages moisissés, c'est l'espèce historiquement et principalement incriminée dans le PDF. L'analyse des protéines immuno-réactives par une approche immunoprotéomique a prouvé son efficacité (§III 3.1.1) (Roussel et al., 2011) pour le développement d'antigènes recombinants utiles au diagnostic du PDM. Dans ce travail, une stratégie identique a été appliquée à *S. rectivirgula* pour le développement d'antigènes recombinants utiles au diagnostic du PDF.

La description complète des méthodes est rédigée dans la partie III 2. Nous rappelons ici seulement les principales étapes méthodologiques spécifiques à cette partie du travail concernant *S. rectivirgula*. Les principaux centres investigateurs (Besançon, Clermont-Ferrand, Neuchâtel, Saint-Etienne) ont recrutés 41 patients atteints de poumon de fermier (18 durant la période 2009-2012 et 23 sur la période 2005-2008) ainsi que des témoins exposés asymptomatiques (n=43). Les sérums prélevés lors de l'inclusion ont été conservés à -80°C, puis utilisés pour le développement et l'évaluation des nouveaux tests diagnostiques.

Afin de permettre l'identification des protéines immuno-réactives par spectrométrie de masse, une base de données génomique a été spécialement créée. Un extrait d'ADN de *S. rectivirgula* a été séquencé partiellement et aligné au génome de l'espèce la plus proche et séquencée, *Saccharopolyspora erythraea*, afin de déterminer les ORF (*open reading frame*) potentiels codant pour des protéines. Un extrait protéique de la souche de *S. rectivirgula* DSMZ 43113 a été préparé, puis les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse 2D. Les spots spécifiques de la maladie, repérés par Western blot comparativement avec les sérums de patients et de témoins exposés, ont été découpés sur le gel d'électrophorèse, puis soumis à

une analyse par spectrométrie de masse. La séquence des protéines immuno-réactives a été déterminée, puis leur gène a été amplifié par PCR afin de développer les antigènes recombinants dans un système d'expression par *Escherichia coli*. Ces protéines recombinantes ont été ensuite testées par ELISA.

➤ *Résultats*

○ Résultats préliminaires non publiés

Les antigènes de *S. rectivirgula* extraits et purifiés sont séparés sur un gel d'acrylamide à 15% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose afin de réaliser le Western blot. Parmi l'ensemble des sérums de cas de PDF et de témoins exposés asymptomatiques 28 et 29 respectivement ont été testés en Western blot 1D afin de choisir les sérums les plus représentatifs pour le Western blot 2D. Pour tester ces 57 sérums, 6 lots de membrane de nitrocellulose ont été préparés. La répétabilité entre chaque lot est bonne puisque les profils de bandes révélées par les sérums PBHS1 et TEA2 servant de contrôle sont similaires (Figure 15). De manière générale, les bandelettes révélées avec les sérums de malades sont plus sombres que celles des témoins, ce qui traduit une plus grande quantité d'IgG spécifiques chez les malades. Les bandes révélées par les sérums de patients se situent principalement dans les hauts poids moléculaires (entre 50 et 100 kDa). Par ailleurs certains sérums de témoins ne révèlent aucune bande ou très légèrement (par exemple TEA9, TEA27, TEA49). Aucune analyse poussée par un logiciel de traitement d'image n'a été réalisé sur ces blots et aucune bande commune n'a pu être détectée comme spécifique de manière significative. Cette étape préliminaire de Western blot 1D a permis de choisir les sérums à utiliser pour l'étape du Western blot 2D sur les critères suivants : un bruit de fond faible, des bandes distinctes et une quantité de sérum suffisamment disponible (PBHS16, PBHS21, PNHS3, PNHS4).

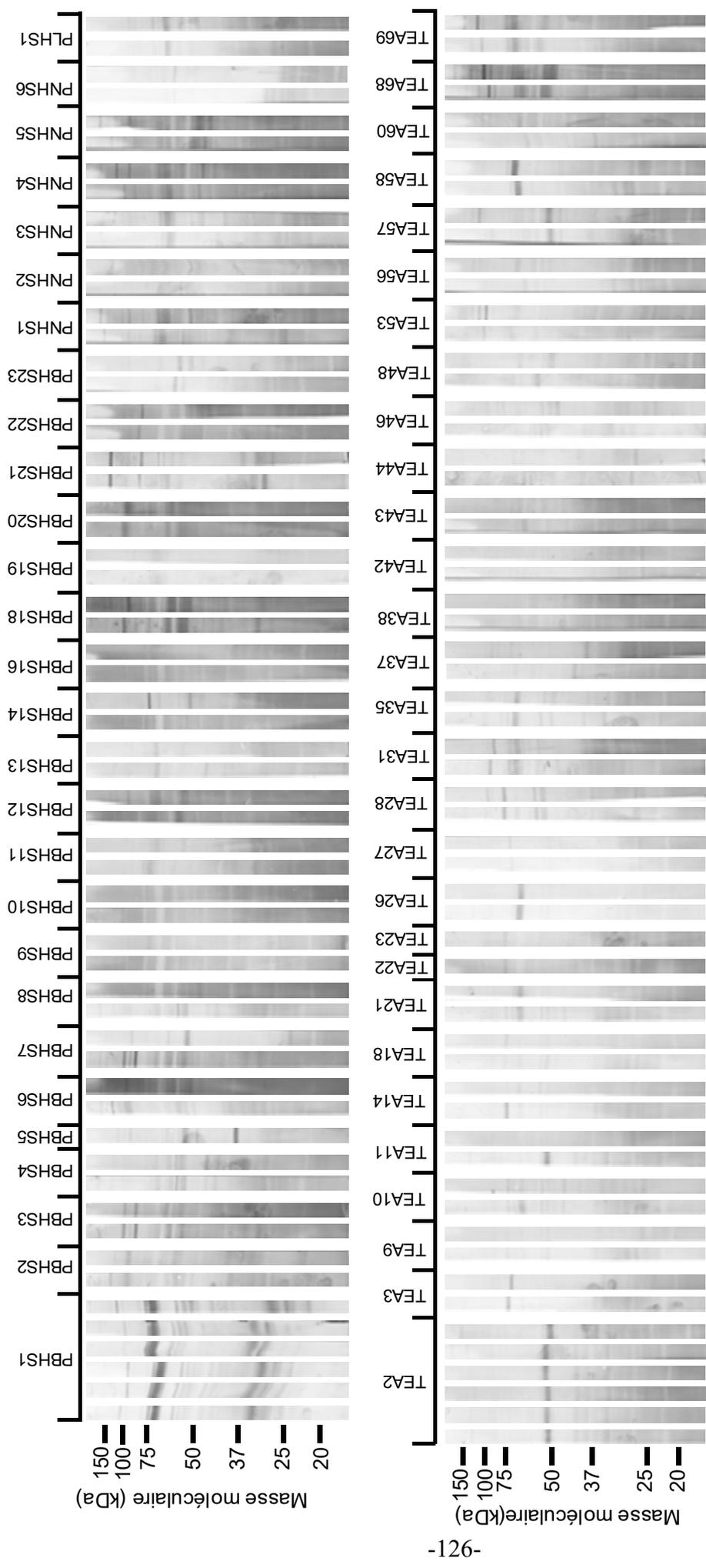


Figure 15 : Western blot avec les antigènes purifiés de *S. recitvirgula*: 28 sérums de cas de PDF (en haut) et 29 sérums de témoins exposés asymptomatiques (en bas) ont été incubés avec des bandelettes de nitrocellulose. Chaque lot de membrane de nitrocellulose est testé avec un sérum de malade (PBHS1) et un sérum de témoin (TEA2).

○ Résultats de l'étude (soumise à Respiratory Research)

L'électrophorèse 2D a révélé environ 200 spots dans l'extrait antigénique purifié de *S. rectivirgula*. Parmi ces spots, 77 ont été révélés avec un pool de 4 sérums de patients sélectionnés sur la base des Western blot 1D. Par comparaison avec les Western blot 2D révélés avec des sérums de témoins, 41 spots spécifiques de la maladie ont été identifiés par spectrométrie de masse, correspondant à 28 protéines différentes. Seize protéines parmi les 28 ont été développées en antigènes recombinants (correspondant en réalité à 17 antigènes recombinants car l'une des protéines a été scindée en deux), puis testées en ELISA avec les sérums de malades et de témoins. Les antigènes recombinants nommés SR1RB (fonction inconnue), SR5 (F0F1 ATP synthase subunit β), SR6 (twin-arginine translocation pathway signal) et SR22 (ketol-acid reductoisomerase) sont les plus sensibles (Tableau 9). Tandis que les plus spécifiques sont les antigènes SR1FA (fonction inconnue) et SR17 (Catalase HP11). La combinaison de SR1FA, SR17 et SR22 permet d'obtenir une sensibilité de 83% et une spécificité de 77%.

Tableau 9 : Résultats de l'analyse statistique des ELISA des 17 antigènes recombinants de *S. rectivirgula*.

Antigènes	Nombre de sérums	AUC	Correctement classés	Sensibilité	Spécificité	Seuil
Ag total*	53	0.75	74%	70%	78%	0.085
SR1 FA	83	0.81	76%	68%	83%	0.424
SR1 RB	84	0.78	76%	83%	70%	0.287
SR2	84	0.76	73%	51%	93%	0.474
SR4	83	0.73	70%	78%	62%	0.546
SR5	83	0.80	76%	78%	74%	0.441
SR6	84	0.84	80%	78%	81%	0.609
SR7	82	0.76	72%	61%	83%	0.526
SR9	82	0.77	74%	76%	73%	0.352
SR10	79	0.73	72%	75%	69%	0.452
SR12	82	0.69	66%	90%	41%	0.385
SR13	82	0.72	67%	49%	85%	0.695
SR16	83	0.66	67%	76%	60%	0.415
SR17	83	0.83	78%	73%	83%	0.632
SR20	83	0.72	66%	68%	64%	0.710
SR22	84	0.75	75%	76%	74%	0.376
SR25	84	0.75	70%	68%	72%	0.499
SR28	84	0.70	70%	73%	67%	0.387

*Ag total = antigènes purifiés de *S. rectivirgula*

➤ *Conclusion*

L'utilisation d'un panel de trois antigènes recombinants semble efficace pour le diagnostic du PDF et réalisable du point de vue des pratiques de laboratoires. Utilisés en panel avec les antigènes recombinants issus d'*Aspergillus* (§ III 3.2.3), ces antigènes pourraient permettre d'améliorer encore l'efficacité de l'ELISA. D'autres micro-organismes comme *W. sebi* et *L. corymbifera* sont importants dans la survenue du PDF et viendront compléter le panel. Une étude de validation à large échelle sera également nécessaire en recrutant des patients d'autres pays comme la Finlande et le Canada.

➤ *Texte de l'article*

Research article

TITLE PAGE

Immunoreactive proteins of *Saccharopolyspora rectivirgula* for farmer's lung serodiagnosis

Coralie Barrera¹, Laurence Millon^{1, 3, 11,*}, Bénédicte Rognon^{1, 3, 11}, Manfredo Quadroni⁴, Sandrine Roussel^{1, 3, 11}, Jean-Charles Dalphin^{1, 2}, Isabelle Court-Fortune⁵, Denis Caillaud⁶, Stephane Jouneau^{7,8}, Jean-Marc Fellrath⁹, Christophe Zaugg¹⁰, Michel Monod¹⁰, Gabriel Reboux^{1, 3, 11}

¹ UMR6249 Chrono-environnement, University of Franche-Comté, Besançon, France.

² Pneumology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

³ Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁴ Protein Analysis Facility, Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

⁵ Pneumology Department, University Hospital North, Saint-Etienne, France

⁶ Pneumology Department, University Hospital Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France

⁷ Pneumology Department, University Hospital of Rennes, Rennes, France

⁸ UMR1085, IRSET, Rennes 1 University, Rennes, France

⁹ Pneumology Department, Pourtalès Hospital, Neuchatel, Switzerland

¹⁰ Dermatology Department, University Hospital, Lausanne, Switzerland

¹¹ Clinical Investigation Center (Inserm CIT 808), University Hospital of Besançon, Besançon, France

Coralie Barrera : coralie.barrera@univ-fcomte.fr

Laurence Millon : laurence.millon@univ-fcomte.fr

Bénédicte Rognon : benedicte.rognon@univ-fcomte.fr

Manfredo Quadroni : manfredo.quadroni@unil.ch

Sandrine Roussel : sandrine.roussel@univ-fcomte.fr

Jean-Charles Dalphin : jean-charles.dalphin@univ-fcomte.fr

Isabelle Court-Fortune: isabelle.court_fortune@chu-st-etienne.fr

Denis Caillaud : dcaillaud@chu-clermontferrand.fr

Stephane Jouneau : Stephane.JOUNEAU@chu-rennes.fr

Jean-Marc Fellrath : Jean-Marc.Fellrath@ne.ch

Christophe Zaugg: starlab@bluewin.ch

Michel Monod : Michel.Monod@chuv.ch

Gabriel Reboux : gabriel.reboux@univ-fcomte.fr

* Corresponding author

Professor Laurence Millon, Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon

Bd Fleming, F25 000 – Besançon – France

Tel: 333 81 66 80 68

Fax: 333 81 66 89 14

e-mail: Laurence.millon@univ-fcomte.fr

Abstract

Background: Farmer's lung is a common form of hypersensitivity pneumonitis caused principally by *Saccharopolyspora rectivirgula*. We aimed to identify immunogenic proteins of *S. rectivirgula* and to synthesize specific recombinant antigens, for the development of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Methods: *S. rectivirgula* proteins were first separated by two-dimensional electrophoresis and subjected to western blotting with sera from patients and healthy exposed controls. The immunoreactive proteins identified as specific markers of the disease were then identified by mass spectrometry. We identified 28 proteins, 17 of which were produced as recombinant antigens in an *Escherichia coli* expression system. ELISA was performed with each of the 17 recombinant antigens and sera from 41 patients and 43 controls from France and Switzerland. The diagnostic performance of the ELISA was analyzed by plotting a receiver operating characteristics curve.

Results: The proteins identified play important roles in transport or nutrition, and some have been implicated in the virulence of other diseases. Proteins SR1RB, SR5, SR6 and SR22 were the most effective recombinant antigens for screening ELISA, with sensitivities of at least 75 %, and an area under the curve exceeding 0.75. SR1FA and SR17 were more specific (83% for both) than sensitive (68% and 73%, respectively). A combination of SR1FA, SR17 and SR22 distinguished between patients and controls particularly efficiently, with a sensitivity of 83% and a specificity of 77%.

Conclusions: Recombinant antigens were promising tools; however, a prospective study including patients from other countries is required for large-scale validation.

246 words

Key words

Hypersensitivity pneumonitis, recombinant antigens, enzyme-linked immunosorbent assay. Immunoproteomics, genomics

Background

Farmer's lung disease (FLD), a common type of hypersensitivity pneumonitis, is a complex syndrome caused by an exaggerated immune response to the repeated inhalation of microbial antigens and organic materials. In a farm environment, exposure over a period of several years to the dust of moldy hay or straw containing fungal and bacterial spores, leads to disease in susceptible farmers. FLD is caused principally by a thermophilic actinomycete, *Saccharopolyspora rectivirgula*, which is commonly isolated from moldy hay (Pepys et al., 1963). In Europe, several other microorganisms, including *Eurotium amstelodami* (*Aspergillus glaucus* group/ *Aspergillus vitis*), *Lichtheimia corymbifera*, *Wallemia sebi*, *Fusarium* and *Thermoactinomyces vulgaris*, have also been implicated as etiologic agents of this disease (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Lappalainen et al., 1998; Reboux et al., 2001). It remains difficult to determine which species is actually the principal causal agent. The microorganism community initially present in the field may change during storage, depending on humidity and temperature conditions, leading to the emergence of a thermophilic community composed of microorganisms such as *L. corymbifera* and *S. rectivirgula* (Roussel et al., 2004).

The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis is difficult, because it is based on a combination of clinical and biological markers, including the presence in the serum of antibodies against the causal antigens (Girard et al., 2009c). The effectiveness of serodiagnosis can be improved by the use of appropriate antigens (Fenoglio et al., 2007; Reboux et al., 2007). However, the immunoprecipitation tests routinely performed are based on the use of crude antigens and are not standardized (Simon-Nobbe et al., 2008). One of the chief recommendations of the NHLBI/ORD (National Heart, Lung, and Blood Institute and the Office of Rare Diseases) Workshop report (Fink et al., 2005) was that standardized antigens should be made available to clinicians for use in farmer's lung disease diagnosis.

Immunoproteomics has proved a useful approach to the identification of immunogenic proteins in several microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis and fungal allergies (Millon et al., 2012; Roussel et al., 2011; Singh et al., 2010a). In this approach, the proteins of an organism are first separated by two-dimensional electrophoresis and transferred to a membrane by western blot. The membrane is then probed with serum samples from various patients suffering from the disease and the signals obtained are compared with those for an identical blot probed with serum samples from healthy exposed controls. The

immunoreactive proteins identified as specific markers of the disease are then identified by mass spectrometry. This strategy has been used in the development of recombinant antigens for the effective serodiagnosis of hypersensitivity pneumonitis by standardized ELISA techniques (Millon et al., 2012; Roussel et al., 2011). We recently showed that two recombinant antigens from *Aspergillus*, glucose-6-phosphate isomerase and Glu/Leu/Phen/Val dehydrogenase, were promising tools for improving the diagnosis of farmer's lung disease (Millon et al., 2012).

The objective of this study was to identify immunogenic proteins of *S. rectivirgula* for subsequent synthesis as recombinant antigens for use in a standardized ELISA test capable of distinguishing between FLD patients and healthy exposed controls.

We identified 28 proteins; some of them play important roles in transport or nutrition, and some have been implicated in the virulence of other diseases. Seventeen proteins were produced as recombinant antigens for ELISA test. A combination of three recombinant antigens (SR1FA, SR17 and SR22) distinguished between patients and controls particularly efficiently, with a sensitivity of 83% and a specificity of 77%.

This study therefore helps to improve standardization of FLD serodiagnosis, and also identifies a potential new area for investigation about the immunological/virulence processes in hypersensitivity pneumonitis.

Methods

Patients

Patients ($n=41$) diagnosed with FLD pulmonary syndrome on the basis of consensus criteria (Schuyler and Cormier, 1997) were consecutively recruited from the pneumology departments of five university hospitals in France and Switzerland (additional file 1, Table E1). The healthy exposed controls ($n=43$) were healthy farmers recruited from the same areas. The protocol was approved by the local ethics committee. Blood samples were taken from each subject giving written informed consent, and were centrifuged within four hours of sampling. The serum samples obtained were immediately frozen and stored at -80°C .

Development of recombinant antigens

The genome of *S. rectivirgula*, has not yet been sequenced. We therefore carried out partial sequencing of an FLD-linked hay isolate (DSMZ43113) to create a genomic database for protein identification by mass spectrometry as part of the immunoproteomics approach.

The proteins of *S. rectivirgula* were extracted and separated by two-dimensional electrophoresis, then transferred to a nitrocellulose membrane for western blotting with serum samples from FLD patients ($n=4$) and controls ($n=9$). We then identified FLD-specific spots, by comparing the membranes probed with FLD and control sera. These specific spots were excised, and the corresponding proteins were identified by mass spectrometry. Seventeen FLD-specific proteins were then produced as recombinant antigens in an *Escherichia coli* expression system. Details of the methods used to create a genomic data base, to identify FLD-specific proteins and to produce recombinant antigens are provided in an additional file 2.

ELISA tests

ELISA was carried out in three experiments, with $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ of each of the 17 recombinant antigens from *S. rectivirgula*. Crude antigen ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) from *S. rectivirgula* was also tested. Serum samples from patients and controls were deposited, in triplicate, in the wells of a 96-well plate, as described by Roussel *et al.* (Roussel *et al.*, 2011). Each plate included a reference sample (constituted by a pool of FLD sera). We determined the optical density of each sample and the coefficient of variation was calculated for each triplicate. The two values of each triplicate that were the most similar were averaged. An index was calculated using the optical density of reference sample as follows: $\text{index} = \text{mean optical density of 2 closest replicates} / \text{optical density of the reference sample}$. For each serum sample, the result is expressed as the mean index for the three ELISA experiments.

We assessed the diagnostic performance of the ELISA test, using each of the 17 recombinant antigens, by receiver operating characteristics analysis (Stata9). The threshold or cut point was determined with the best correctly classified percentage, sensitivity, specificity and area under the curve (AUC).

The diagnostic performance of ELISA tests using combinations of two, three or more recombinant antigens was assessed with a score system. For each serum sample tested with each of the antigens, a score of 1 was assigned if the index value was within a range corresponding to the threshold $\pm 20\%$. A score of 0 corresponded to an index value below this

zone (no reactivity) and a score of 2 corresponded to an index value above this zone (strong reactivity). The scores were summed for each combination tested and a new receiver operating characteristics curve analysis was performed to evaluate the diagnostic performance of the combination.

Results

Patients

The patients and controls were comparable in terms of age and sex ratio (mean age 51 years (range: 28-77 years), male/female= 30/11 for patients, versus a mean age of 47 years (range: to 27-77 years) and male/female = 31/12 for controls). Only six patients were smokers. All the others had either never smoked or had given up smoking more than a year ago. Thirty-four patients came from the Jura mountain region (Besancon, Neuchatel, Lausanne) and seven were from the center of France (Clermont-Ferrand and Saint-Etienne). Sixteen patients presented a chronic form of hypersensitivity pneumonitis, 17 a subacute form and eight an acute form. The results of bronchoalveolar lavage and electrosyneresis on cellulose acetate and others details are shown in an additional file 1 Table E1. All but four of the patients had positive precipitin reactions indicating the presence of antibodies for at least one of the antigens tested in electrosyneresis. We found that 57 % (20/35) of the sensitized patients were sensitized to *S. rectivirgula*, 69 % (25/36) to *Wallemia sebi*, 36 % (13/36) to *Aspergillus* (*E. amstelodami*), 39 % (14/36) to *L. corymbifera*, 43 % (15/35) to *T. vulgaris*, 33 % (12/36) to *Streptomyces*, and 39 % (14/36) to *S. viridis*.

We found that 61 % of the sensitized patients were sensitized to both mold and actinomycetes, 17 % were sensitized to actinomycetes only, and 22 % were sensitized to mold only. The controls had no pulmonary symptoms, and only three subjects were sensitized to *S. rectivirgula*.

Identification of FLD-specific proteins and development of recombinant antigens

The *S. rectivirgula* protein extract yielded almost 200 spots on 2D electrophoresis gel stained with Coomassie blue (Figure 1); 77 of these spots gave a clear signal on western blotting with the pool of serum samples from FLD patients (Figure 2). A comparison of the western blots probed with FLD and control sera identified 41 of the 77 spots as potentially FLD-specific. These 41 spots were excised for analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. Twenty-eight different proteins were identified from the 41 spots excised and were named

SR1 to SR28 (additional file 3, Table E4). As shown in Table E4, a single spot could contain several proteins (e.g. spot 42, which contained SR4, SR5, SR15, SR18 and SR24), and several spots could contain the same protein (this was the case particularly for SR1, SR2, SR4 and SR9), and mass spectrometry analysis gave no result in some cases. SR1 to SR28 included 12 hydrolases (six of which were peptidases), eight oxidoreductases, five proteins linked to transport or carrier activity, one lyase, one transferase and one uncharacterized protein. The sequences of these proteins are available from the EMBL database (additional file 3, Table E4).

We selected 17 of the 28 identified proteins for the production of recombinant antigens in an *E. coli* expression system, for use in ELISA tests (SR1FA, SR1RB, SR2, SR4, SR5, SR6, SR7, SR9, SR10, SR12, SR13, SR16, SR17, SR20, SR22, SR25 and SR28) (see Figure 3).

ELISA tests

Receiver operating characteristics analysis was performed for ELISA tests, using the crude antigen and each of the 17 recombinant antigens from *S. rectivirgula*. For crude antigen extract, we obtained a sensitivity of 70 % and a specificity of 78 % (AUC 0.75).

SR1RB, SR5, SR6 and SR22 were the most effective recombinant antigens for diagnosis, with a percentage of correctly classified samples of more than 75 %, an AUC exceeding 0.75 and a sensitivity of at least 75 % (Table 1). SR1RB gave the highest sensitivity (83 %), with a specificity of 70%.

SR1FA and SR17 each had an AUC of at least 0.80, and were more specific (83% for both) than sensitive (68% and 73%, respectively; Table 1).

A combination of six antigens (SR1FA, SR1RB, SR5, SR6, SR17, and SR22) had a sensitivity of 76% and a specificity of 86% (corresponding to 10 false-negatives in 41 tests and 6 false-positives in 43 tests). We combined these six recombinant antigens in pairs. The best combination was SR1FA and SR6, with a sensitivity of 83% and a specificity of 72%. We also tested combinations of three antigens, the best combination being SR1FA, SR17 and SR22, with a sensitivity of 83% and a specificity of 77% (Table 2).

Based on the annotation of *S. erythraea* genes in the genome sequences of close relatives of *S. rectivirgula*, two of the six proteins found to be effective for diagnosis are cytoplasmic enzymes with oxidoreductase activities (SR17 and SR22), two are involved in transport

activity (SR5 and SR6) and the remaining protein SR1 (corresponding to recombinant antigens SR1FA and SR1RB) has no known function (additional file 3, Table E4).

Discussion

We produced 17 recombinant antigens from the actinomycete *S. rectivirgula*, to develop a standardized ELISA test and improve the routine screening of FLD patients. Four of these recombinant antigens (SR1B, SR5, SR6, SR22) were selected on the basis of their high sensitivity (sensitivity of at least 75 %, with an area under the curve exceeding 0.75). Another two antigens were selected on the basis of their high specificity, because a combination of highly specific and highly sensitive antigens could potentially improve the diagnostic performance of the screening test. We therefore tested combinations of these antigens and found that a combination of three antigens, SR1FA, SR17 and SR22, gave the best compromise between feasibility and efficacy. This combination was particularly effective for distinguishing between FLD patients and healthy exposed controls, with a sensitivity of 83% and a specificity of 77 %. Other combinations of two or three antigens yielded higher specificities, but at the expense of a lower sensitivity than for single antigens.

It is widely accepted that microorganisms do not grow in the lung in hypersensitivity pneumonitis, but some of the 28 immunoreactive *S. rectivirgula* proteins identified have been implicated in important functions for survival or the virulence of other pathogens. For example, the hydrolases SR2, SR4, SR14 and SR21 have been identified as putative secreted proteins, and secreted proteases are known to act as virulence factors in many pathogens (Hogan et al., 1996). The SR5 protein is an F0F1 ATP synthase subunit beta, and SR6 is a twin-arginine translocation pathway signal protein. These enzymes were identified as immunoreactive proteins in the etiological agents of brucellosis (*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) (Boigegrain et al., 2005; Ko et al., 2012; Zhao et al., 2011), and the twin-arginine translocation pathway (involving proteins like SR6) has also been implicated in the essential transport activity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* (Feltcher et al., 2010). Ketol-acid reductoisomerases (like SR22) have been implicated in *M. tuberculosis* virulence (Grandoni et al., 1998). SR9, an N-acetylglucosaminidase, may also be involved in the pathogenesis of FLD. During *Streptococcus pneumoniae* infections, N-acetylglucosaminidase and other exoglycosidases contribute directly to the persistence of the microorganism in the airways (Burnaugh et al., 2008). SR7 is an isocitrate lyase, a key enzyme of the glyoxylate cycle. This cycle has been shown to be important for disease

progression in cases of tuberculosis caused by *M. tuberculosis* (Lorenz and Fink, 2002) and is activated in pathogenic fungi during infections (Staib et al., 2010). Globally, this set of immunoreactive proteins are the hallmarks of a metabolically active organism, suggesting that *S. rectivirgula* adapts to lung conditions and survives for at least a few hours in the lung, before being eliminated by the immune system. Further studies are required to determine the role of these proteins in immunological/virulence processes.

The sensitivity of electrosyneresis with *S. rectivirgula* crude antigens for the detection of FLD patients was found to be 57 %, whereas the sensitivity of ELISA was 70 % with crude antigens and 83 % with the chosen combination of recombinant antigens. Based on electrosyneresis results, *S. rectivirgula* appeared to be the second most common etiological agent, just behind *W. sebi* (69 % of sensitized patients). In our previous studies of a cohort of French patients, low levels of precipitin reactions to *S. rectivirgula* were described (Reboux et al., 2001), with a sensitivity of less than 46 % (Reboux et al., 2007). These findings for a new cohort of patients, suggest that changes have occurred in France in the last 10 years, with a greater degree of exposure of patients to *S. rectivirgula*. Changes in European farming, with a move towards larger farms and new packing systems for hay, may account for the increasing importance of *S. rectivirgula* as an etiologic agent of FLD (Ferri et al., 2003; Reboux et al., 2006a; Roussel et al., 2004). High levels of sensitization to *S. rectivirgula* have been reported in Eastern Canada, where agriculture is highly industrialized (Blais Lecours et al., 2012; Duchaine et al., 1999).

Many of the patients studied here also had precipitin reactions indicating the presence of antibodies against the fungi *W. sebi*, *L. corymbifera* and *A. vitis* (*E. amstelodami*). A panel of these three fungal species plus *S. rectivirgula* has been recommended as a good panel for discriminating between FLD patients and healthy exposed controls in immunoprecipitation techniques (Fenoglio et al., 2007; Reboux et al., 2007). The use of recombinant antigens of *S. rectivirgula* in ELISA clearly increased diagnostic effectiveness. Similarly, the sensitivity of FLD detection in patients exposed to *Eurotium amstelodami* (*Aspergillus*) has been improved by the use of two recombinant *Aspergillus* antigens, resulting in a sensitivity of 72 % and specificities of 84 % and 94 % (Millon et al., 2012). The development of a larger panel of recombinant antigens for each etiological agent (fungal and actinomycete species) involved in FLD could also increase the sensitivity of the ELISA screening test. In the near future, we plan to add recombinant antigens from other species, such as *W. sebi* or *L. corymbifera*, to our panel. In this study, we focused on 41 cases of farmer's lung, mostly from the Jura region in

Eastern France and Switzerland. It would be interesting to test our recombinant *S. rectivirgula* antigens with FLD patients from other countries (Finland, Canada), for large-scale validation of the ELISA developed in this study.

Additional files

Additional file 1: Table E1: Characteristics of patients with farmer's lung disease. Word file, .doc extension.

Additional file 2: Development of recombinant antigens methods. It is a complete description of the methods part. This data set contains also a **Table E2 with** occurrence of spots present on the small membranes probed with individual sera (based on the comparison of the small membranes). and a **Table E3**, with the description of the primers used in this study. Word file, .doc extension.

Additional file 3: Table E4: Characteristics of the 28 immunoreactive proteins from *S. rectivirgula*. Word file, .doc extension.

Abbreviations

AUC: Area Under the Curve;

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FLD : Farmer's Lung Disease

LC-MS/MS: Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry

ROC: Receiver Operating Characteristics

kDa : kilo Daltons

Competing interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Author's contributions

LM, GR and SR were involved in the conception and design of this study. CB, BR, CZ, MQ and MM were involved in data acquisition, analysis and interpretation (bioinformatics analysis of DNA and protein sequences, recombinant antigen development, ELISA). JCD, ICF, DC, SJ and JMF were involved in patient recruitment and the collection of clinical data.

All authors were involved in the writing and revision of this article from its inception to the final submission.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency during the period 2005-2008 (PHS-ICAD project, ANR 05 SEST-044-01) and by the French Ministry of Health during the period 2009-2012 (*Projet Hospitalier de Recherche Clinique national SOPHIA*, N/2009N56 SOPHIA). We would like to thank Karine Salamin of the Dermatology Department of Lausanne University Hospital; Alexandra Potts of the Center for Integrative Genomics of Lausanne; Karine Humbert and Audrey Laboissière of the Mycology Department of Besançon University Hospital for their technical support, and Julie Sappa of Alex Edelman & Associates for editorial assistance.

References

1. Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Lacey ME, Skinner FA: **Farmer's Lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "Farmer's Lung Hay" antigen.** *Lancet* 1963, **2**:607-611.
2. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnnet K, Dalphin JC: **Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:1534-1539.
3. 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.
4. 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.
5. Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R: **Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms.** *Ann Agric Environ Med* 2006, **13**:267-273.
6. Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Bardonnnet K, Millon L, Piarroux R: **Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung.** *Occup Environ Med* 2004, **61**:e3.
7. Girard M, Lacasse Y, Cormier Y: **Hypersensitivity pneumonitis.** *Allergy* 2009, **64**:322-334.

8. Fenoglio CM, Reboux G, Sudre B, Mercier M, Roussel S, Cordier JF, Piarroux R, Dalphin JC: **Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis.** *Eur Respir J* 2007, **29**:706-712.
9. Reboux G, Piarroux R, Roussel S, Millon L, Bardouet K, Dalphin JC: **Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease.** *J Med Microbiol* 2007, **56**:1317-1321.
10. Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M: **The spectrum of fungal allergy.** *Int Arch Allergy Immunol* 2008, **145**:58-86.
11. Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, Kreiss K, Kunkel S, Lynch D, Quirce S, et al: **Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **171**:792-798.
12. Singh B, Oellerich M, Kumar R, Kumar M, Bhadoria DP, Reichard U, Gupta VK, Sharma GL, Asif AR: **Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*.** *J Proteome Res* 2010, **9**:5517-5529.
13. Millon L, Roussel S, Rognon B, Quadroni M, Salamin K, Reboux G, Barrera C, Fellrath JM, Aubert JD, Dalphin JC, Monod M: ***Aspergillus* species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2012.
14. Roussel S, Rognon B, Barrera C, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, Thaon I, Dalphin J-C, Tillie-Leblond I, Quadroni M, et al: **Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis.** *International Journal of Medical Microbiology* 2011, **301**:150-156.
15. Schuyler M, Cormier Y: **The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis.** *Chest* 1997, **111**:534-536.
16. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM: **Virulence factors of medically important fungi.** *Clin Microbiol Rev* 1996, **9**:469-488.
17. Boigegrain RA, Liautard JP, Köhler S: **Targeting of the virulence factor acetohydroxyacid synthase by sulfonyleureas results in inhibition of intramacrophagic multiplication of *Brucella suis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:3922-3925.
18. Zhao Z, Yan F, Ji W, Luo D, Liu X, Xing L, Duan Y, Yang P, Shi X, Lu Z, Wang X: **Identification of immunoreactive proteins of *Brucella melitensis* by immunoproteomics.** *Sci China Life Sci* 2011, **54**:880-887.
19. Ko KY, Kim JW, Her M, Kang SI, Jung SC, Cho DH, Kim JY: **Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis.** *Vet Microbiol* 2012, **156**:374-380.
20. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M: **Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development?** *Future Microbiol* 2010, **5**:1581-1597.

21. Grandoni JA, Marta PT, Schloss JV: **Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents.** *J Antimicrob Chemother* 1998, **42**:475-482.
22. Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ: **Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases.** *J Bacteriol* 2008, **190**:221-230.
23. Lorenz MC, Fink GR: **Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence.** *Eukaryot Cell* 2002, **1**:657-662.
24. Staib P, Zaugg C, Mignon B, Weber J, Grumbt M, Pradervand S, Harshman K, Monod M: **Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection.** *Microbiology* 2010, **156**:884-895.
25. Ferri F, Dottori M, Bedogni L, Perini S, Ligabue M: **[Exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula* among cattle breeders in the province of Reggio Emilia and the risk of extrinsic allergic alveolitis (farmer's lung)].** *Med Lav* 2003, **94**:207-215.
26. Duchaine C, Mériaux A, Brochu G, Bernard K, Cormier Y: ***Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns: application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease.** *J Med Microbiol* 1999, **48**:173-180.
27. Blais Lecours P, Veillette M, Marsolais D, Duchaine C: **Characterization of bioaerosols from dairy barns: reconstructing the puzzle of occupational respiratory diseases by using molecular approaches.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:3242-3248.

Table 1: Efficiency of recombinant antigens in ELISA, results of ROC analysis.

Antigen	Number of sera	AUC	Correctly classified	Sensitivity	Specificity	Cutoff point
Crude extract	53	0.75	74%	70%	78%	0.085
<i>SR1 FA</i>	83	0.81	76%	68%	83%	0.424
SR1 RB	84	0.78	76%	83%	70%	0.287
SR2	84	0.76	73%	51%	93%	0.474
SR4	83	0.73	70%	78%	62%	0.546
SR5	83	0.80	76%	78%	74%	0.441
SR6	84	0.84	80%	78%	81%	0.609
SR7	82	0.76	72%	61%	83%	0.526
SR9	82	0.77	74%	76%	73%	0.352
SR10	79	0.73	72%	75%	69%	0.452
SR12	82	0.69	66%	90%	41%	0.385
SR13	82	0.72	67%	49%	85%	0.695
SR16	83	0.66	67%	76%	60%	0.415
<i>SR17</i>	83	0.83	78%	73%	83%	0.632
SR20	83	0.72	66%	68%	64%	0.710
SR22	84	0.75	75%	76%	74%	0.376
SR25	84	0.75	70%	68%	72%	0.499
SR28	84	0.70	70%	73%	67%	0.387

Six recombinant proteins were considered to be biological markers of FLD. The antigens in bold typeface were considered to yield the highest sensitivity, according to the defined rule (AUC \geq 0.75; correctly classified \geq 75%; sensitivity \geq 75%). The antigens in bold and italics were the second-choice antigens, meeting one of the criteria for specificity (AUC \geq 0.75; correctly classified \geq 75%; specificity \geq 75%).

Table 2: Results of ROC analysis for combinations of two, three or more antigens.

Antigen combination*						AUC	Correctly classified	Sensitivity	Specificity	Cut point
SR1 FA	SR1RB	SR5	SR6	SR17	SR22	0.84	81%	76%	86%	7
SR1 FA	SR1RB					0.79	73%	88%	58%	2
SR1 FA		SR5				0.82	77%	66%	88%	3
	SR1RB	SR5				0.80	76%	73%	79%	3
SR1 FA			SR6			0.83	77%	83%	72%	2
	SR1RB		SR6			0.82	74%	93%	56%	2
		SR5	SR6			0.83	77%	93%	63%	2
SR1 FA				SR17		0.83	77%	63%	91%	3
	SR1RB			SR17		0.81	76%	71%	81%	3
		SR5		SR17		0.82	77%	68%	86%	3
			SR6	SR17		0.82	79%	71%	86%	3
SR1 FA					SR22	0.78	73%	59%	86%	3
	SR1RB				SR22	0.74	69%	61%	77%	3
		SR5			SR22	0.78	75%	66%	84%	3
			SR6		SR22	0.82	76%	85%	67%	2
				SR17	SR22	0.80	76%	66%	86%	3
SR1 FA	SR1RB	SR5				0.81	79%	73%	84%	4
SR1 FA	SR1RB		SR6			0.83	76%	85%	67%	3
SR1 FA	SR1RB			SR17		0.83	79%	71%	86%	4
SR1 FA	SR1RB				SR22	0.79	73%	66%	79%	4
SR1 FA		SR5	SR6			0.85	81%	73%	88%	4
SR1 FA		SR5		SR17		0.84	79%	68%	88%	4
SR1 FA		SR5			SR22	0.80	77%	68%	86%	4
SR1 FA			SR6	SR17		0.83	77%	63%	91%	5
SR1 FA			SR6		SR22	0.78	75%	71%	79%	4
SR1 FA				SR17	SR22	0.83	80%	83%	77%	3
	SR1RB	SR5	SR6			0.83	77%	90%	65%	3
	SR1RB	SR5		SR17		0.84	79%	73%	84%	4
	SR1RB	SR5			SR22	0.84	79%	71%	86%	4
	SR1RB		SR6	SR17		0.83	77%	66%	88%	4
	SR1RB		SR6		SR22	0.86	80%	85%	74%	3
	SR1RB			SR17	SR22	0.80	75%	68%	81%	4
		SR5	SR6	SR17		0.83	79%	71%	86%	4
		SR5	SR6		SR22	0.83	76%	83%	70%	3
		SR5		SR17	SR22	0.77	73%	83%	63%	3
			SR6	SR17	SR22	0.77	75%	66%	84%	4

*Only the six effective antigens were used for the combinations.

Figure legends

Figure 1: Two-dimensional electrophoretic separation of *S. rectivirgula* protein extract (Coomassie blue staining). The 77 immunoreactive spots detected with the pool of sera were localized on the gel. Spots 1-9; 11-17; 21, 22; 42-49 and 56-70 were excised from the gel for mass spectrometry analysis.

Figure 2: Two-dimensional western blot probed with a pool of sera from FLD patients (FLD16, FLD21, FLD23, FLD26). This large membrane was considered the reference membrane, and the 77 immunoreactive spots identified were located, numbered and excised from the Coomassie gel (Figure 2) and the small 2D-membranes, when visible.

Figure 3: Polyacrylamide gels for the 17 recombinant antigens (Coomassie blue staining). Figure 3A: 10% polyacrylamide gel. SR1BR: 62kDa; SR4: 55kDa; SR5: 50kDa; SR6: 73kDa; SR9: 82kDa; SR10: 60kDa; SR12: 50kDa; SR17: 79kDa. Figure 3B: 15% polyacrylamide gel. SR1FA: 29kDa; SR2: 39kDa; SR7: 48kDa; SR13: 28kDa; SR16: 47kDa; SR20: 35kDa; SR22: 37kDa; SR25: 24kDa; SR28: 43kDa.

Figure 1

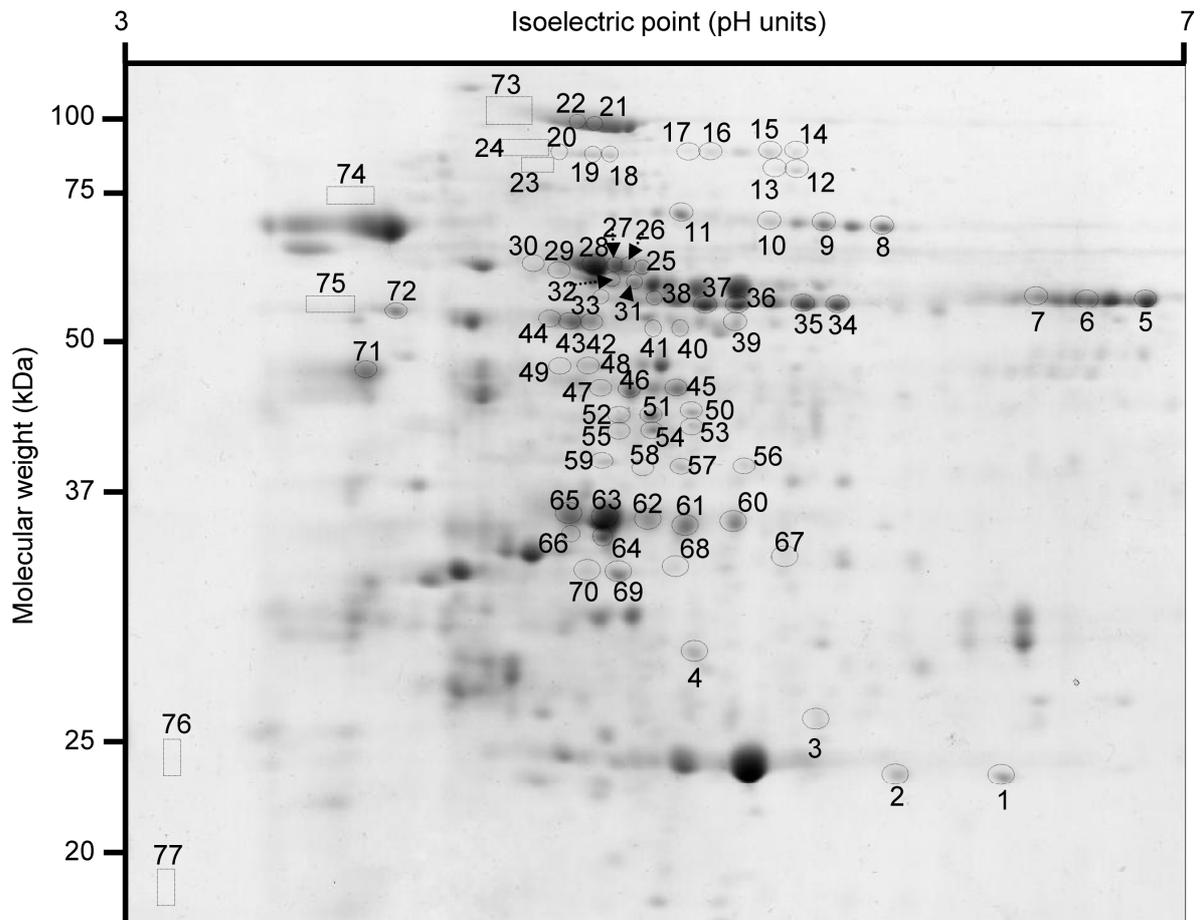


Figure 2

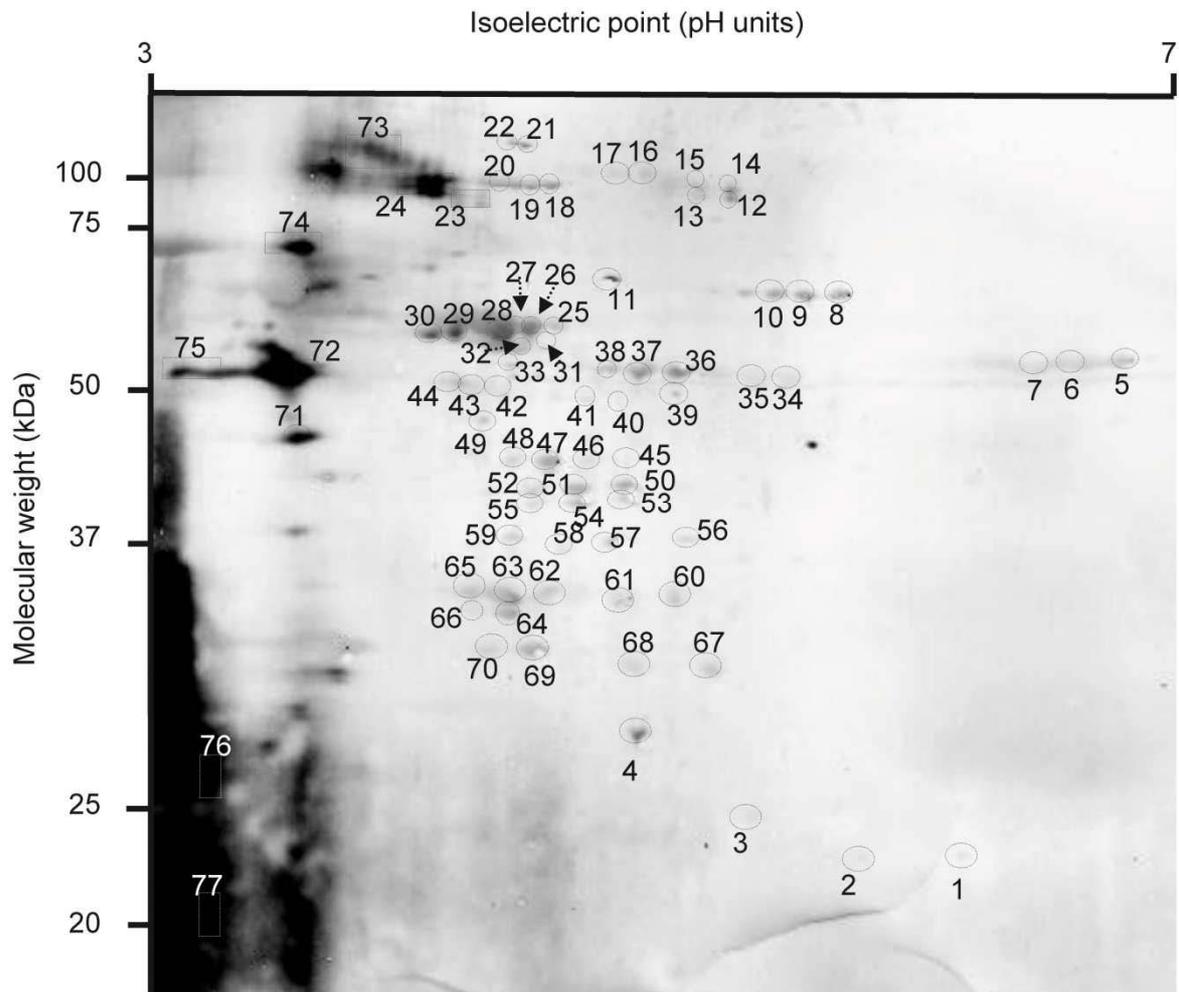
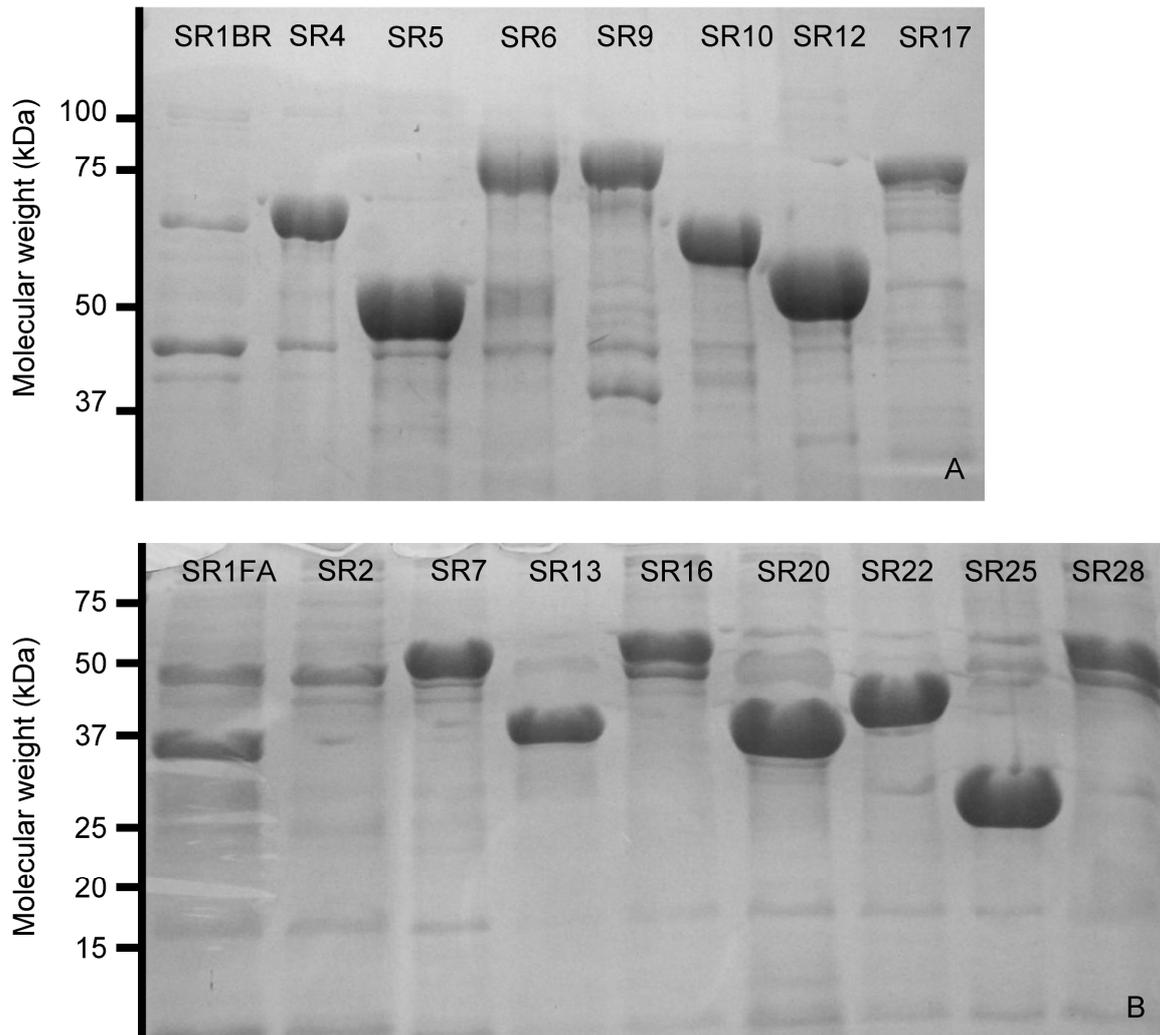


Figure 3



Additional file 1: Table E1: Characteristics of patients with FLD

Code	Age (y)	Sex	Center	Clinical Presentation	Radiologic Data	Bronchoalveolar lavage		<i>E. amstelodami</i> (≥ 3 arcs)	<i>L. corymbifera</i> (≥ 2 arcs)	<i>W. sebi</i> (≥ 2 arcs)	<i>S. rectivirgula</i> (Δ 2 arcs)	<i>T. vulgaris</i> (≥ 3 arcs)	<i>Streptomyces</i> (≥ 3 arcs)	<i>S. viridis</i> (Δ 3 arcs)
						(cells/mm ³)	Lymphocytes (%)							
FLD01	48	M	B	Subacute	GGO, AT	460	58	3	1	2	1	2	2	1
FLD02	53	M	B	Chronic	GGO	320	60	1	1	4	3	1	0	2
FLD03	51	M	B	Acute recurrent	GGO	980	82	4	1	4	1	1	2	1
FLD04	47	M	B	Subacute recurrent	Mosaic features, GGO	680	59	1	0	5	0	1	1	3
FLD05	51	F	B	Chronic	Diffuse GGO	1010	83	4	2	1	15	3	4	12
FLD06	47	F	B	Acute	Bad quality Image, No validation	710	54	0	0	0	0	1	0	2
FLD07	47	M	B	Acute	GGO	270	57	0	2	0	4	3	1	1
FLD08	59	M	B	Subacute	Small nodules, GGO	450	45	0	1	3	0	3	2	3
FLD09	35	M	B	Subacute	Small nodules	750	84	0	1	0	0	2	2	2
FLD10	51	M	B	Subacute	Small nodules, GGO	340	61	2	1	3	1	2	0	1
FLD11	51	F	B	Subacute severe	Small nodules, GGO, mosaic feature	410	65	1	1	2	7	4	2	3
FLD12	43	M	B	Chronic	Diffuse GGO, AT	360	64	1	2	6	0	1	1	4
FLD13	53	M	B	Subacute	Diffuse GGO	620	79	2	2	0	0	5	1	1
FLD14	56	F	B	Subacute	Small nodules, GGO	300	ND	0	0	0	0	4	1	0
FLD15	34	M	B	Acute	Diffuse GGO, mosaic features	970	63	1	1	5	7	0	4	3
FLD16	58	F	B	Subacute	GGO	280	24	0	0	0	2	2	3	4
FLD17	54	M	B	Chronic	GGO, AT	390	47	3	2	6	4	1	2	4
FLD18	42	M	B	Subacute severe	GGO	580	76	1	2	5	1	1	1	2
FLD19	58	F	B	Subacute	Small nodules, GGO	800	58	2	1	1	1	3	1	2
FLD20	52	F	B	Chronic	Small nodules, GGO	60	82	0	1	1	1	2	1	1

F, Female; M, Male; B, Besançon; N, Neuchâtel; L, Lausanne; C, Clermont-Ferrand; S, Saint-Etienne; ND, not done; GGO, ground glass opacities; AT, air trapping

Additional file 1: Table E1 : Characteristics of patients with FLD (Continued)

Code	Age (y)	Sex	Center	Clinical Presentation	Radiologic Data	Bronchoalveolar lavage		<i>E. amstelodami</i> (≥ 3 arcs)	<i>L. corymbifera</i> (≥ 2 arcs)	<i>W. sebi</i> (≥ 2 arcs)	<i>S. rectivirgula</i> (≥ 2 arcs)	<i>T. vulgaris</i> (≥ 3 arcs)	<i>Streptomyces</i> (≥ 3 arcs)	<i>S. viridis</i> (≥ 3 arcs)
						(cells/mm ³)	Lymphocytes (%)							
FLD21	28	M	B	Chronic	GGO, mosaic features	520	57	3	1	1	1	1	2	2
FLD22	71	F	B	Subacute	GGO, mosaic features	10		1	1	1	0	3	1	2
FLD23	40	M	B	Chronic	GGO, mosaic features, AT	450	73	1	1	2	4	1	0	1
FLD24	37	M	B	Chronic	GGO, emphysema	840	66	3	0	4	2	2	1	3
FLD25	45	M	B	Subacute	GGO, mosaic features, AT	320	54	4	3	5			2	2
FLD26	50	M	B	Acute	Small nodules, GGO	139	79	3	0	6	6	2	4	4
FLD27	50	M	B	Chronic	GGO	720	40	6	3	11	3	3	3	2
FLD28	59	M	B	Chronic	GGO, fibrosis	1540	78	2	1	1	3	4	2	3
FLD29	77	M	C	Chronic	Small nodules, GGO	420	69	0	0	0	0	2	1	1
FLD30	77	M	C	Chronic	Small nodules, GGO, AT	525	98	2	3	2	1	2	0	1
FLD31	53	M	C	Chronic	GGO, AT	205	50	6	6	11	13	4	6	7
FLD32	60	M	C	Chronic	Emphysema	340	89	3	1	2	5	4	4	3
FLD33	58	F	C	Subacute	Small nodules	3800	94	1	2	1	2	6	3	1
FLD34	45	M	L	Subacute	Small nodules	570	68	1	1	4	1	3	1	0
FLD35	54	M	N	Acute exacerbation of a chronic form	Emphysema, mosaic feature	700	15	7	6	7	7	0	6	0
FLD36	53	M	N	Subacute severe	Mosaic features, AT	1225	44	4	3	10	5	0	5	0
FLD37	63	M	N	Chronic	GGO, AT	880	90	0	0	2	1	1	1	2
FLD38	40	M	N	Acute	GGO, AT	730	65	2	1	8	2	2	1	2
FLD39	46	F	N	Subacute	Small nodules, GGO, AT	500	44	2	3	2	9	3	4	4
FLD40	55	M	S	Chronic	GGO	280	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FLD41	52	F	S	Acute	GGO	550	71	1	0	1	5	2	4	1

F, Female; M, Male; B, Besançon; N, Neuchâtel; L, Lausanne; C, Clermont-Ferrand; S, Saint-Etienne; ND, not done; GGO, ground glass opacities; AT, air trapping

Additional file 2

Development of recombinant antigens.

***Sacharopolyspora rektivirgula* DNA extraction, and database**

S. rektivirgula DNA was extracted from cells grown in 5 ml brain-heart infusion broth (BD, Le Pont de Claix, France) for 15-20 h, at 52°C, with continuous shaking. Cell pellets were obtained by centrifugation for five minutes at $4\ 000 \times g$ and washed with PBS (Eurobio Laboratoires, Courtaboeuf, France). The cell pellet was resuspended in 200 μ l of PBS supplemented with 20 μ l of 10% sodium dodecyl sulfate, and the cell walls were then digested by incubation with 100 μ g of lysozyme (Roche®, Mannheim, Germany) for 30 minutes at 37°C. The mixture was incubated for a further 15 minutes at 37°C, with 100 μ g RNase, before DNA purification with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®). Genome sequencing was performed by Microsynth (Balgach, Switzerland), using 454 FLX technology (454 Roche GS FLX, Roche®) and the contigs obtained were reconstructed with GS DeNovo Assembler 2.0.01.14 software. This run generated 250,375 reads with a mean length of 369.5 bp. Seventy-seven contigs were reconstructed.

Saccharopolyspora erythraea was the species most similar to *S. rektivirgula*, based on blastn analyses with known ribosomal sequences (data not shown). An alignment obtained with tblastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), using a cutoff of 0.5 between contig sequences and the *S. erythraea* database, made it possible to predict the location of protein-coding genes in all contigs. This alignment included 7,197 potential open reading frames. The results were compiled in a single file edited in fasta format to create the database for subsequent MS analysis.

Softberry web software
(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb>)
was used to predict the full-length open reading frames of immunoreactive proteins from the contig nucleotide sequences in the database.

Protein extract preparation

Crude antigens of *S. rektivirgula* DSMZ43113 were obtained by culture for 7 days in R8 medium, and then scraping the cells gently off the agar. Cells were resuspended in PBS, crushed, sonicated and purified as described in detail by Roussel *et al.*^E(Roussel *et al.*, 2011).

Two-dimensional gel electrophoresis and western blotting

S. rectivirgula protein extract (25 µg of protein) was suspended in loading buffer composed of 2 x DIGE lysis buffer and 2% IPG and the first dimension was run on a 7 cm Immobiline DryStrip pH 3-11NL (GE Healthcare®, Freiburg, Germany) previously rehydrated in DeStreak solution (GE Healthcare®) supplemented with 0.5 % IPG, with a cup-loading sample application. An Ettan IPGphor electrophoresis system (GE Healthcare®) was used. Before the second dimension, strips were equilibrated in two successive reducing buffers, as previously described^E(Roussel et al., 2011). For the second dimension, the strip was loaded onto a 12 % acrylamide gel and run for 5.5 h at 25 mA. The proteins were then transferred from the gel onto a nitrocellulose membrane probed with sera from patients and controls^E(Roussel et al., 2011). Before incubation with the pooled serum samples, the proteins on the membranes were stained with Ponceau red and intense spots were marked on the nitrocellulose membrane. This facilitated the alignment of the spot patterns of the gel stained with Coomassie blue and membranes on western blotting. Fourteen small membranes were probed with nine serum samples from controls and four from patients (serum samples FLD35, FLD18, FLD37, FLD14, see Table E3) and the remaining membrane was probed with a pool of four serum samples from patients (FLD pool).

Two large electrophoresis gels (12 x 16 cm, using an 18 cm Immobiline DryStrip pH3-11NL gel for the first dimension) were then prepared, using 100 µg and 50 µg of the same batch of protein fractions from *S. rectivirgula* for the first and second gels, respectively. The first gel was stained with colloidal Coomassie blue. The second was used for protein transfer onto a membrane, for detection with the FLD serum pool. The use of a large gel made it easier to locate accurately and to excise disease-specific spots for mass spectrometry analysis.

All the spots present on the large 2D membranes that were labeled with the FLD pool were located and numbered (Figure 1, Figure 2). When present, these spots were also numbered on the small membranes (not shown). Gels and blots were scanned (GS800, BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

A comparison of the membranes probed with the FLD and control sera led to the selection of FLD-specific spots for mass spectrometry analysis (Table E1). Specific FLD spots were selected on the basis of the following criteria: 1) spot observed more frequently on small membranes probed with FLD sera than with control sera; 2) spot detected by at least three of the four FLD sera on the small membranes. Some specific spots were excluded from mass

spectrometry analysis: 1) if the spot was part of a series, potentially containing an isoform of the same protein; 2) if the location of the spot was uncertain (e.g. spots located on a dark background). On the basis of these criteria, 41 spots were selected and excised from the large 2-DE gel and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (Table E1).

Mass spectrometry and protein analysis

Selected spots were excised from the large gel (Figure 2) and transferred to 96-well plates (Perkin Elmer Life Sciences, Massachusetts, USA).

Gel spots were digested with sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, Wisconsin)^E(Roussel et al., 2011). Data-dependent LC-MS/MS analysis of extracted peptide mixtures was carried out after digestion, on a 4 000 QTRAP quadrupole-linear trap mass spectrometer (AB SCIEX, Concord, Ontario) interfaced with an Eksigent Tempo nano HPLC system (Eksigent, Dublin, CA). Peptides were separated on a Pepmap C18 (75 μ m ID x 150 mm, 3.5 A) capillary column (Dionex, Amsterdam, Netherlands), with a 60-minute gradient from 5 to 85 % acetonitrile in 0.1 % formic acid at a flow rate of 200 nl min^{-1} . MS/MS spectra were de-isotoped from the raw data files and exported as mgf files (Mascot Generic File, text format), with Analyst® software (AB SCIEX). Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.0) was used to compare MS/MS spectrum samples with the newly created database of *S. rectivirgula*, with trypsin specificity, a fragment ion mass tolerance of 0.6 Da and a parent ion tolerance of 0.6 Da. The iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification, and the oxidation of methionine and N-terminal protein acetylation were treated as variable modifications. Scaffold (version Scaffold-01_06_03, Proteome Software Inc.) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at a probability greater than 95.0%, as specified by the Peptide Prophet algorithm, and if they contained at least 2 identified peptides. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated on the basis on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Protein lists for further analysis were exported with Scaffold.

We searched for a signal peptide in the amino-acid sequences of the 28 proteins, with SIG-Pred (http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html). Subcellular location was predicted with pSORTb analysis (Subcellular Localization Prediction Tool, version 3.0.2 (<http://www.psорт.org/psорт/>)). The Bioinformatics Resource Portal ExpASY was also used

to predict the isoelectric point of each protein (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Table E4).

Recombinant antigen development

Pairs of forward/reverse primers for amplifying the DNA of the protein-encoding gene of interest were designed from the nucleotide sequences in the *S. rectivirgula* database (Table E2). The DNA sequences of the *gsr2*, *gsr4*, *gsr5*, *gsr7*, *gsr9*, *gsr12*, *gsr13*, *gsr17*, *gsr20*, *gsr22* and *gsr25* genes were amplified by polymerase chain reaction from 60 nanograms of *S. rectivirgula* DNA with a ReadyMix™ Taq PCR kit (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France), with a final primer concentration of 0.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. The polymerase chain reaction was performed as followed: initial denaturation for 3 min at 94°C, was followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 30 s at 55°C and 2 min at 72°C, and a final elongation step for 10 min at 72°C. For the amplification of *gsr1-fa*, *gsr1-br*, *gsr6*, *gsr10*, *gsr16* and *gsr28*, another cycle of the polymerase chain reaction program was carried out, at an annealing temperature of 65°C, with a longer elongation step (2.5 min). The SR1 protein was synthesized as two subproteins of about 29 kDa and 62 kDa in size, because of the great length of the *gsr1* gene. The first subprotein (the N-terminus of protein SR1) was named SR1FA (encoded by the *gsr1-fa* gene) and the second, corresponding to the C-terminus, was named SR1RB (the *gsr1-rb* gene).

The PCR products were purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche®, Mannheim, Germany), digested with a pair of restriction enzymes, *NcoI/BamHI* or *RcaI/BglII*, and inserted between the corresponding sites of pET-11aH6, to generate a construct encoding the recombinant protein, as previously described^E (Roussel et al., 2011).

References

- E1. Roussel S, Rognon B, Barrera C, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, et al. Immuno-reactive proteins from Mycobacterium immunogenum useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. International Journal of Medical Microbiology 2011; 301:150-6.

Table E2: Occurrence of spots present on the small membranes probed with individual sera (based on the comparison of the small membranes). Spots are grouped into series, separated by thick lines, in the table, on the basis of their proximity. Spots were selected for MS analysis according to the criteria described in the “Two-dimensional gel electrophoresis and western blotting” section. Thirty-six of the 77 spots occurred more frequently on membranes probed with FLD sera than on membranes probed with control sera; 24 occurred more frequently on membranes probed with control sera and 17 were detected equally frequently with the two groups of sera. Spots 23, 24 and 71 to 77 (on the left of the large membrane) were not analyzed because of their location in a region of high background (see Figure 1). Spot 10 was also excluded because of its location in a series of spots (spots 8, 9 and 10). Spots 34 and 35 were not further analyzed.

Spot number	Present in FLD patient (n=4)	Present in controls (n=9)	MS analysis	Spot number	Present in FLD patient (n=4)	Present in controls (n=9)	MS analysis
1	1 (25%)	1 (11%)	yes	39	0	0	no
2	1 (25%)	1 (11%)	yes	40	0	0	no
3	2 (50%)	4 (40%)	yes	41	0	0	no
4	3 (75%)	7 (80%)	yes	42	1 (25%)	1 (11%)	yes
5	4 (100%)	9 (100%)	yes	43	2 (50%)	3 (33%)	yes
6	4 (100%)	9 (100%)	yes	44	1 (25%)	0	yes
7	3 (75%)	9 (100%)	yes	45	1 (25%)	3 (33%)	yes
8	3 (75%)	7 (80%)	yes	46	1 (25%)	1 (11%)	yes
9	3 (75%)	7 (80%)	yes	47	1 (25%)	0	yes
10	3 (75%)	6 (60%)	no	48	1 (25%)	0	yes
11	2 (50%)	1 (11%)	yes	49	1 (25%)	0	yes
12	0	0	yes	50	0	2 (22%)	no
13	1 (25%)	1 (11%)	yes	51	0	1 (11%)	no
14	0	0	yes	52	0	0	no
15	1 (25%)	1 (11%)	yes	53	0	1 (11%)	no
16	1 (25%)	0	yes	54	0	1 (11%)	no
17	1 (25%)	0	yes	55	0	0	no
18	0	2 (22%)	no	56	2 (50%)	4 (44%)	yes
19	0	2 (22%)	no	57	2 (50%)	4 (44%)	yes
20	0	1 (11%)	no	58	1 (25%)	1 (11%)	yes
21	2 (50%)	3 (33%)	yes	59	1 (25%)	0	yes
22	2 (50%)	4 (44%)	yes	60	1 (25%)	1 (11%)	yes
23	0	0	no	61	3 (75%)	4 (44%)	yes
24	0	0	no	62	3 (75%)	3 (33%)	yes
25	0	3 (33%)	no	63	1 (25%)	2 (22%)	yes
26	1 (25%)	3 (33%)	no	64	0	1 (11%)	yes
27	1 (25%)	4 (44%)	no	65	1 (25%)	0	yes
28	1 (25%)	8 (89%)	no	66	0	0	yes
29	0	0	no	67	0	1 (11%)	yes
30	0	1 (11%)	no	68	0	0	yes
31	0	2 (22%)	no	69	1 (25%)	0	yes
32	1 (25%)	2 (22%)	no	70	1 (25%)	0	yes
33	0	0	no	71	1 (25%)	0	no
34	3 (75%)	6 (60%)	no	72	2 (50%)	1 (11%)	no
35	3 (75%)	6 (60%)	no	73	0	2 (22%)	no
36	1 (25%)	4 (44%)	no	74	1 (25%)	0	no
37	1 (25%)	3 (33%)	no	75	1 (25%)	0	no
38	0	1 (11%)	no	76	0	0	no
				77	0	0	no

Table E3: List of primers used to amplify the open reading frame of the antigen-encoding genes.

Location	Primer	Oligonucleotide sequence	PCR product size (bp)	Cloning sites
gsr1-fa	SR1-f	5'-GTT CCATGGG GAGAGACGGCTCAGCAACGGCG-3'	808	<i>Nco</i> I
	SR1-a	5'-GGG AGATCTT CAGCTGCGGGCGGACAGCTCCG-3'		<i>Bgl</i> II
gsr1-br	SR1-b	5'-TGCC CCATGG ACGCAAGTGGCTCCAGCGCCGC-3'	1733	<i>Nco</i> I
	SR1-r	5'-GTT GGATCCT CAGCGGGAGAGCACCCGGTA-3'		<i>Bam</i> H I
gsr2	SR2-f	5'-GTT CCATGGG ACGACTGGACCGGAATCCACGGGC-3'	1164	<i>Nco</i> I
	SR2-r	5'-GTT GGATCCT CAGGGGGCCTGCACCAATCCGGC-3'		<i>Bam</i> H I
gsr4	SR4-f	5'-GTT CCATGGG GGTCTGCTGGCTGCTGCGTTG-3'	1524	<i>Nco</i> I
	SR4-r	5'-GTT GGATCCT CAGTCCATCCCCGGGTGACGATC-3'		<i>Bam</i> H I
gsr5	SR5-f	5'-CGT TCATG ACGTGGAGTTCGCGGGACCAG-3'	1368	<i>Rca</i> I
	SR5-r	5'-GTT AGATCTT CACTTGCCGGTGATCCGCTTGTA-3'		<i>Bgl</i> II
gsr6	SR6-f	5'-CGT TCATG ACCTGCCGTTACCGCTGCGGC-3'	1986	<i>Rca</i> I
	SR6-r	5'-GTT AGATCTT CAGCTCGCGCCGATCTCGCC-3'		<i>Bgl</i> II
gsr7	SR7-f	5'-GTT CCATGGG GAGCATCCGCGAGCAGGCGCAGAAG-3'	1311	<i>Nco</i> I
	SR7-r	5'-GTT GGATCCT CAGAAGTGCAGCAGCCTCCGTGGA-3'		<i>Bam</i> H I
gsr9	SR9-f	5'-GTT CCATGGG GGTACCAGTGGAACTACTCGCCGG-3'	2262	<i>Nco</i> I
	SR9-r	5'-GTT GGATCCT TATCGGATGCTCAACGTCGCCTT-3'		<i>Bam</i> H I
gsr10	SR10-f	5'-CGT TCATG ACGGGATCACCGAAGTACCGGTTCC-3'	1629	<i>Rca</i> I
	SR10-r	5'-GTT AGATCTT CAGCCCATGTGCGGATAGGTGTG-3'		<i>Bgl</i> II
gsr12	SR12-f	5'-GTT CCATGGG CCTGTCGAGGAGTGC GAAGTGACC-3'	1392	<i>Nco</i> I
	SR12-r	5'-GTT GGATCCT CATCCGTGCACGTGCAGCGGCTT-3'		<i>Bam</i> H I
gsr13	SR13-f	5'-GTT CCATGGG GCCGTCCGGATTCCAGGCATCGAC-3'	792	<i>Nco</i> I
	SR13-r	5'-GTT GGATCCT CAAGCCGGGATCTTCAGCACCTG-3'		<i>Bam</i> H I
gsr16	SR16-a	5'-GTT TCATG AGTCCGAATGTTCTCGTTGCCCGAA-3'	1220	<i>Rca</i> I
	SR16-b	5'-GTT AGATCTT CTACCGGCTCGCGGCCGCGCGGG-3'		<i>Bgl</i> II
gsr17	SR17-f	5'-GTT TCATG AGGCGAACAAGATCGCGATGCGAAG-3'	2121	<i>Rca</i> I
	SR17-r	5'-GTT AGATCTT CTACGCGGGCACCGATTCGGTCCT-3'		<i>Bgl</i> II
gsr20	SR20-f	5'-GTT CCATGGG GAGTGAGGTTCTGGTCTCGTTGAT-3'	960	<i>Nco</i> I
	SR20-r	5'-GTT GGATCCT CAGCCCTTGCCTTGTGATCTC-3'		<i>Bam</i> H I
gsr22	SR22-f	5'-GTT CCATGGG GCGAGCTGAAATCTTCTACGAGTCG-3'	999	<i>Nco</i> I
	SR22-r	5'-GTT GGATCCT CACTTCTGGGTCCACGACATCAA-3'		<i>Bam</i> H I
gsr25	SR25-f	5'-GTT CCATGGG GCTGGAGTGCAGGAGATGACCATC-3'	666	<i>Nco</i> I
	SR25-r	5'-GTT GGATCCT TACACGTCGGTGATGCGCAACCC-3'		<i>Bam</i> H I
gsr28	SR28-a	5'-GTT TCATG AGTCCGAATGTTCTCGTTGCCCGAA-3'	1170	<i>Rca</i> I
	SR28-b	5'-GTT AGATCTT CTACCGGCTCGCGGCCGCGCGGG-3'		<i>Bgl</i> II

Additional file 3**Table E4:** Characteristics of the 28 immunoreactive proteins from *S. rectivirgula*.

Code	Accession number	Protein identifier for <i>S. erythraea</i>	Spot number (spectra)	Mw (pI)	Secretory signal peptide	Predicted subcellular location
Hydrolase						
Peptidase						
SR 2	HE793688	Protease (YP_001106884.1)	60 (2); 61 (21); 64 (18); 65 (21); 68 (2)	39 (4.72)	No	<i>Extra</i>
SR 4	HE793690	Peptidase S15 (YP_001106346.1)	42 (26); 43 (50); 44 (43); 48 (1); 49 (1)	47 (4.84)	Yes	<i>Extra</i>
SR 14	HE793700	Carboxypeptidase (YP_001103778.1)	48 (8); 49 (4)	43 (5.2)	Yes	Unknown
SR 21	HE793707	Protease (YP_001102636.1)	67 (5)	60 (5.14)	Yes	<i>Extra</i>
SR 24	HE793710	Peptidase M16-like (YP_001103346.1)	42 (3)	49 (5.01)	No	<i>Cyto</i>
SR 27	HE793713	Peptidase S10, serine carboxypeptidase (YP_001103115.1)	46 (2)	52 (5.15)	No	<i>Cyto</i>
Glycosidase						
SR 9	HE793695	Beta-N-acetylglucosaminidase (putative secreted protein) (YP_001102638.1)	14 (4); 15 (17); 16 (7); 17 (4); 45 (3); 46 (2); 47 (1)	65 (5.48)	No	<i>Cyto</i>
SR 13	HE793699	Lysozyme M1 precursor (YP_001102944.1)	4 (14)	28 (5.21)	No	<i>Extra</i>
SR 15	HE793701	Levanase (YP_001104507.1)	42 (3); 43 (3); 44 (6)	51 (4.78)	Yes	Cell wall
Phosphatase						
SR 8	HE793694	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D (YP_001102453.1)	8 (19); 9 (30)	55 (5.56)	Yes	<i>Cyto</i>
Esterase						
SR 28	HE793714	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (YP_001102405.1)	3 (9)	28 (4.72)	Yes	Unknown
Unknown						
SR 23	HE793709	Hydrolase (YP_001105530.1)	68 (4)	32 (5.8)	No	<i>Cyto. Mb.</i>
Oxidoreductase						
SR 3	HE793689	Catalase (YP_001102577.1)	5 (59); 6 (29); 7 (37)	55 (6.04)	No	<i>Cyto</i>
SR 10	HE793696	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase precursor (YP_001104214.1)	11 (36)	59 (5.16)	No	<i>Cyto</i>

Mw, mass weight (kDa); pI, isoelectric point (pH); Cyto., cytoplasmic; Cyto. Mb, cytoplasmic membrane; Extra, extracellular

Table E4 : Characteristics of the 28 immunoreactive proteins from *S. rectivirgula*. (Continued)

Code	Accession number	Protein identifier for <i>S. erythraea</i>	Spot number (spectra)	Mw (pI)	Secretory signal peptide	Predicted subcellular location
Oxidoreductase						
SR 12	HE793698	Putative pyridine nucleotide disulfide oxidoreductase (YP_001108083.1)	6 (1); 7 (1); 67 (17)	46 (5.27)	No	<i>Cyto</i>
SR 17	HE793703	Catalase HP2 (YP_001106057.1)	12 (7); 13 (3)	79 (5.36)	No	<i>Cyto</i>
SR 18	HE793704	Putative pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (YP_001105654.1)	42 (8); 43 (1)	49 (5.78)	No	<i>Cyto</i>
SR 19	HE793705	Myo-inositol catabolism protein (YP_001105108.1)	4 (7)	32 (5.14)	No	<i>Cyto</i>
SR 22	HE793708	Ketol-acid reductoisomerase (YP_001108255.1)	57 (5)	36 (5.11)	Yes	<i>Cyto</i>
SR 25	HE793711	NADPH-dependent F420 reductase (YP_001105064.1)	3 (4)	23 (5.39)	No	<i>Cyto</i>
Transport activity						
SR 5	HE793691	F0F1 ATP synthase subunit beta (YP_001108377.1)	42 (27); 43 (23); 44 (15)	50 (4.96)	No	<i>Cyto. Mb.</i>
SR 6	HE793692	Twin-arginine translocation pathway signal (YP_001109409.1)	60 (27); 61 (27)	71 (5.04)	Yes	Unknown
SR 11	HE793697	ABC Fe(3+) transporter, substrate binding component (YP_001103535.1)	64 (4)	31 (4.82)	Yes	<i>Cyto. Mb.</i>
SR 26	HE793712	Putative ABC transporter ATP binding protein (YP_001102357.1)	67 (2)	31 (5.47)	No	<i>Cyto. Mb.</i>
SR 20	HE793706	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit (YP_001108294.1)	70(6)	33 (4.94)	Yes	Unknown
Lyase						
SR 7	HE793693	Isocitrate lyase (YP_001103696.1)	45 (46); 46 (10); 47 (4); 70 (1)	48 (5.12)	No	<i>Cyto</i>
Transferase						
SR 16	HE793702	Branched-chain alpha keto acid dehydrogenase subunit E2 (YP_001106150.1)	2 (11)	44 (4.85)	No	<i>Cyto</i>
Unknown						
SR 1	HE793687	Hypothetical protein SACE_0944 (YP_001103203.1)	46 (13); 47 (4); 57 (7); 58 (3); 59 (13); 60 (60); 61 (2); 64 (19); 65 (10); 68 (2); 69 (19); 70 (5)	87 (5.01)	Yes	Unknown

Mw, mass weight (kDa); pI, isoelectric point (pH); *Cyto.*, cytoplasmic; *Cyto. Mb*, cytoplasmic membrane; *Extra*, extracellular

3.2.3. Contribution à l'identification des protéines immuno-réactives spécifiques d'*Aspergillus* pour le développement d'antigènes recombinants et mise au point d'un test ELISA standardisé.

Aspergillus species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease.

Millon L., Roussel S., Rognon B., Quadroni M., Karin S., Reboux G., **Barrera C.**, Fellrath J.M., Aubert J.D., Dalphin J.C., Monod M.

Journal of Allergy and Clinical Immunology

Bien que ne faisant pas strictement partie du travail de thèse, les acquis techniques et stratégiques obtenus lors de l'analyse protéomique des bactéries *M immunogenum* et *S rectivirgula* ont très largement contribué à l'analyse protéomique et au développement d'antigènes recombinants spécifiques d'*Aspergillus*, dont plusieurs espèces sont impliquées comme agent étiologique du PDF.

➤ *Présentation de l'étude et rappel des principales étapes méthodologiques*

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont responsables du développement du PDF dans certains pays. En France, *Eurotium amstelodami* (*Aspergillus vitis*) est largement impliqué tandis qu'en Finlande il s'agit plutôt d'*Aspergillus fumigatus* et *A. umbrosus*. Certaines espèces d'*Aspergillus* ont un cycle sexué et produisent des ascospores. Récemment, une étude de notre laboratoire a montré que les protéines purifiées d'ascospores sont des antigènes plus efficaces pour différencier les patients atteints de PDF et les témoins exposés asymptomatiques par la technique ELISA. La production d'antigènes standardisés est l'une des recommandations actuelles pour les tests sérologiques. Le but de cette étude était de mettre en évidence des protéines immuno-réactives d'ascospores d'*Aspergillus* spécifiques du PDF, afin de les développer en antigènes recombinants pour améliorer le diagnostic.

Nous avons utilisé des antigènes d'ascospores issus de *Neosartorya fisheri*, entièrement séquencée et proche d'*A. fumigatus*, pour mettre en évidence les protéines immuno-réactives par électrophorèse bidimensionnelle suivi d'un Western blotting. Les sérums utilisés dans cette étude ont été recueillis lors d'une étude prospective sur 3 ans entre 2005 et 2008 dans trois centres hospitaliers (Besançon, Lausanne, Neuchâtel). Les protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse puis leur gène a été amplifié par PCR afin de développer les antigènes recombinants dans un système d'expression par *Escherichia coli*. Ces protéines

recombinantes sont ensuite testées par ELISA avec des sérums de patients PDF, des sérums de témoins exposés asymptomatiques, des sérums de témoins non exposés et des sérums de patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse.

➤ *Résultats*

Parmi les quelques 300 spots visibles sur le gel coloré au bleu de Coomassie avec l'extrait purifié de protéines de *N. fisheri* seulement 32 spots communs sont révélés en Western blot par les sérums de patients. Ces spots sont analysés par spectrométrie de masse permettant d'identifier 26 protéines distinctes. Parmi ces 26 protéines, seules celles apparaissant dans plusieurs spots spécifiques de la maladie ont été développées en antigènes recombinants. Il s'agit des protéines probables : Glu/Leu/Phe/Val déshydrogénase (GLPV), NAD-dépendant formate déshydrogénase (NADfd), mannitol-1-phosphate déshydrogénase (Man1PD), émolase, et glucose-6-phosphate isomérase (G6Pi). Les antigènes les plus discriminants par l'ELISA sont la GLPV et la G6Pi avec des sensibilités de 72% et des spécificités de 94% et 84%. En combinant les résultats de ces deux antigènes, le test ELISA est amélioré avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 84%.

➤ *Conclusion*

L'utilisation d'antigènes recombinants dans le test ELISA permet d'améliorer la standardisation, mais aussi les performances diagnostiques, par rapport aux tests ELISA utilisant des extraits antigéniques totaux. Par contre, la sensibilité obtenue est inférieure à celle obtenue avec les techniques usuelles d'immuno-précipitation utilisant un panel d'antigènes issus de différents micro-organismes impliqués dans l'étiologie du PDF (sensibilité comprise entre 89 et 100%) (Fenoglio et al., 2007). Comme dans le cas des techniques d'immuno-précipitation, le développement d'un panel d'antigènes recombinants issus de différents micro-organismes est nécessaire pour améliorer les performances du test.

Les protéines les plus performantes pour le diagnostic du PDF, la GLPV et la G6Pi, avaient été identifiées précédemment par une approche immunoprotéomique similaire (Singh et al., 2010b). Dans cette étude, le repérage des spots d'intérêt avait été réalisé par des Western blot IgE avec des sérums de patient atteints d'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA), ce qui ouvre des perspectives d'utilisation des antigènes recombinants produits pour le diagnostic des ABPA ou d'autres pathologies allergiques impliquant les *Aspergillus*.

➤ *Texte de l'article*

- Albert D, Dunham J, Khan S, Stansberry J, Kolasinski S, Tsai D, et al. Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1724-31.
- Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 2004;50:2580-9.
- Goto S, Goto H, Tanoshima R, Kato H, Takahashi H, Sekiguchi O, et al. Serum sickness with an elevated level of human anti-chimeric antibody following treatment with rituximab in a child with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2009;89:305-9.
- Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Wolbink GJ, Mansour K, et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2740-50.
- Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin Immunol* 2009;132:334-41.
- Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:1043-6.
- Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21:3940-7.

Available online April 26, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.022>

***Aspergillus* species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease**

To the Editor:

Farmer's lung disease (FLD) is the most frequent occupational hypersensitivity pneumonitis. In the East of France and Finland, various genera of mold (*Aspergillus*, *Absidia* = *Lichtheimia*, and *Wallemia*) have been suggested as the main causative agents of FLD.^{1,2} Immunologic studies have also shown that sera from patients with FLD specifically react with *Aspergillus* species from the glaucus group (*Aspergillus vitis/Eurotium amstelodami*).^{1,3}

Several species of the *Aspergillus* genus have a well-characterized sexual cycle. This is the case for *A vitis/E*

amstelodami, which are the anamorph/teleomorph, respectively, of the same fungus,⁴ and for *Neosartorya fischeri*, a species closely related to *Aspergillus fumigatus*.⁵ Sexual reproduction is performed by conidia produced by conidial heads of aspergilli. Sexual reproduction is characterized by the production of ascospores. 1,3-β-Glucanase-treated protein extract (BGPE) from *E amstelodami* ascospores was recently demonstrated to be the most efficient antigen for differentiating between patients with FLD and healthy control subjects by using an ELISA serologic test.⁶

Developing a battery of standardized antigens known to cause FLD and making them available to clinicians for use in diagnosis is recommended in the report from the National Heart, Lung, and Blood Institute/Office of Rare Diseases Workshop.⁷ The aim of the present study was to characterize immunogenic proteins of ascospores and to synthesize standardized recombinant antigens to improve the serologic diagnosis of FLD.

The proteins of BGPE from *N fischeri* ascospores were first separated by 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and revealed by means of Western blotting with sera from 6 patients with FLD compared with serum from 1 healthy exposed control subject. We used *N fischeri* rather than *E amstelodami* because entire genome sequences were available for further bioinformatic analysis. Immunoreactive proteins were identified by using mass spectrometry. Five immune-reactive proteins found to be FLD specific were produced as recombinant antigens.

ELISA was performed with the 5 recombinant antigens and sera from 4 groups of patients: patients with FLD (n = 18), exposed control subjects (n = 32), nonexposed control subjects (n = 32), and patients with interstitial lung disease (ILD; n = 11). The protocol was approved by the local ethics committee.

A complete description of the patient and control groups (see Tables E1 and E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), as well as descriptions of the methods for

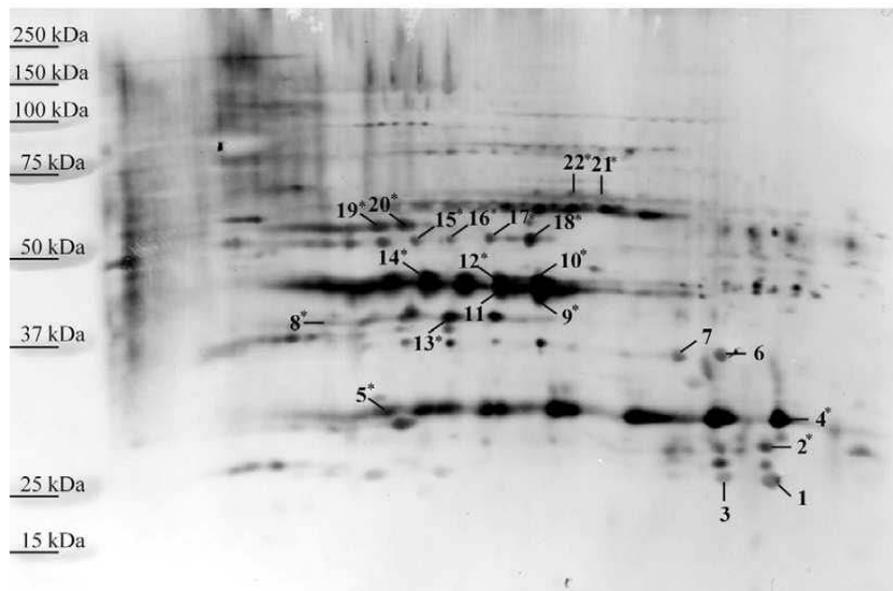


FIG 1. Two-dimensional electrophoretic separation of protein extracts followed by Western blot detection with serum from FLD3. The 22 numbered spots were also visible on at least one of the 5 supplementary membranes revealed by sera from FLD1, FLD2, FLD4, FLD5, or FLD8 and provided clear mass spectrometric identification of 26 different proteins (see Table I). Seventeen spots (*) were FLD specific.

TABLE I. Proteins identified by means of mass spectrometry in spots cut from the 2-DE gel

Spot no.	MS analysis	Protein identity	UNIPROT accession no.	MW (kDa)	Protein identification probability (%)	Unique peptides	MASCOT score
1	M	Superoxide dismutase	A1D1W3	23.4	99	2	86
2*	M	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	A1DER2	16.0	100	4	290
3	M	Superoxide dismutase	A1D1W3	23.4	100	3	138
4*	LC	Proteasome subunit α type	A1D0A	30.0	100	4	153
		Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW1	49.3	100	3	68
		Aminotransferase, putative	A1DHN5	49.7	10	2	55
5*	LC	Short-chain dehydrogenase, putative	A1CXA1	31.0	100	8	311
		Putative uncharacterized protein	A1CZ91	32.3	100	4	153
		Dienelactone hydrolase family protein	A1DL05	27.8	100	6	99
		Short-chain dehydrogenase	A1DBG2	33.1	100	3	69
6	M	Autophagic serine protease Alp2	A1DER5	52.6	100	5	221
		Malate dehydrogenase	A1DCR4	35.8	100	3	100
7	M	Malate dehydrogenase	A1DCR4	35.8	100	3	156
		Autophagic serine protease Alp2	A1DER5	52.6	100	4	143
8*	M	Extracellular lipase, putative	A1D0B2	31.0	100	2	146
9*	?	NAD-dependent formate dehydrogenase	A1DLY1	45.7	100	8	363
		Fructose-bisphosphate aldolase	A1D6Q6	39.8	100	7	255
		Aspartate transaminase, putative	A1DGQ3	50.4	100	3	143
		Cysteine-rich secreted protein	A1D8Y5	36.8	100	3	115
		Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	A1DGY9	42.9	98	2	76
10*	M	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	A1DGY9	42.9	100	6	364
11	LC	Fructose-bisphosphate aldolase	A1D6Q6	39.8	100	7	316
		NAD-dependent formate dehydrogenase	A1DLY1	45.7	100	6	256
		Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	A1DGY9	42.9	100	4	220
		Translation initiation factor, putative	A1CY38	41.4	99	3	84
		Quinone oxidoreductase, putative	A1D552	36.5	100	2	80
12*	LC	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	A1DGY9	42.9	100	11	594
		Isovaleryl-CoA dehydrogenase IvdA, putative	A1DEU1	46.4	100	3	111
		Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCh, putative	A1D379	39.2	98	2	42
13*	M	NAD-dependent formate dehydrogenase	A1DLY1	45.7	100	4	67
14*	M	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	A1DGY9	42.9	100	5	241
15*	M	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW1	49.3	100	5	184
16*	M	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW1	49.3	100	4	75
17*	M	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW1	49.3	100	4	48
18*	M	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW1	49.3	100	7	247
19*	M	Enolase	A1DM76	47.3	100	5	220
20*	M	Enolase	A1DM76	47.3	100	6	327
21*	M	Glucose-6-phosphate isomerase	A1DGR4	61.4	100	8	307
22*	LC	Glucose-6-phosphate isomerase	A1DGR4	61.4	100	19	807
		Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, putative	A1CXW11	49.3	99	2	51
		Putative uncharacterized protein	A1D6F3	56.9	98	2	49
		3-Ketosteroid- δ -1-dehydrogenase, putative	A1DDH3	61.4	99	2	48
		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Ugp1, putative	A1D962	58.0	99	2	46

Proteins in boldface were chosen to be produced as recombinant antigens.

L, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry; M, matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry; MS, mass spectrometry; MW, molecular weight.

*FLD-specific spots.

producing BGPE, identifying immune-reactive proteins by means of mass spectrometry, producing recombinant antigens (see Table E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), ELISA testing, and statistical analysis, are provided in the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

Approximately 300 individual spots could be visualized on the 2-DE gel stained with Coomassie blue. Approximately 130 spots provided a clear signal after Western blotting with the serum from FLD3 (Fig 1). Of the 130 spots, 32 were also visible on at least one of 5 supplementary membranes revealed by using FLD1, FLD2,

FLD4, FLD5, or FLD8 sera. These 32 common spots were excised from the Coomassie blue–stained gel and processed for protein identification by means of mass spectrometry. In total, 26 different proteins were clearly identified from 22 different spots (Table I). Of the 22 spots selected after mass spectrometric analysis, 17 were FLD specific (ie, not revealed with the healthy exposed control serum [EC1] or were more intensely revealed with FLD sera than with the EC1 serum), suggesting that the 21 corresponding proteins might be good candidates for differentiating patients with FLD from exposed control subjects by using ELISA serologic tests. Of these 21 proteins, only 5 with

isoforms identified in at least 2 distinct spots were selected to be produced as recombinant antigens: nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent formate dehydrogenase, mannitol-1-phosphate dehydrogenase, glutamate/leucine/phenylalanine/valine (Glu/Leu/Phe/Val) dehydrogenase, enolase, and glucose-6-phosphate isomerase.

The recombinant antigens were used for immunologic investigation in ELISAs. Sensitivity, specificity, likelihood ratios, and the ELISA area under the curve results for optimal thresholds are indicated in Table E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org. As indicated by areas under the curve of 0.89 and 0.87, the best recombinant antigens for differentiating between patients with FLD and exposed control subjects were Glu/Leu/Phen/Val dehydrogenase and glucose-6-phosphate isomerase, with sensitivities of 72% and specificities of 94% and 84%, respectively. A score combining the positivity for these 2 antigens increased the sensitivity of the ELISA to 89%, with a specificity of 84%.

Our experimental approach, combining the use of sera from patients with FLD to screen for antigenic proteins from ascospores and the use of available genomic data from *Aspergillus* species close to the species implicated as a causative agent of FLD, led to the production of 2 recombinant antigens that were remarkably effective in differentiating between patients with FLD and exposed control farmers by using ELISA serologic tests.

Glucose-6-phosphate isomerase and Glu/Leu/Phen/Val dehydrogenase were previously identified among immunogenic proteins from *A fumigatus* that have been revealed by using IgE and IgG immunoblots with pooled sera from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis.⁸ These proteins were shown to selectively react with IgE. Interestingly, the same proteins revealed by different isotypes of immunoglobulin are useful for the serologic diagnosis of both diseases.

The ability to differentiate between patients with FLD and exposed control subjects by using ELISAs with ascospore crude extract was evaluated in a previous study⁶ and was demonstrated as follows: sensitivity, 71%; specificity, 87%, positive likelihood ratio, 5.6; negative likelihood ratio, 0.3; and area under the curve, 0.85. Sensitivity was at 89% when a score combining the results of ELISAs with the 2 recombinant antigens was used. This was higher than the sensitivity of the serologic tests that are currently used for FLD diagnosis (sensitivity of 67% for electrosynthesis and double diffusion with crude antigenic extracts of 5 microorganisms from the agricultural environment: *E amstelodami*, *Lichtheimia corymbifera*, *Wallemia sebi*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, and mesophilic *Streptomyces* species).⁹ Specificity was at 84%, whereas it was between 89% and 100% for routine immunoprecipitation techniques.

At a time when quality procedure, control, and methodological validation of laboratory techniques are essential, the availability of large quantities of antigens produced with a standardized and reproducible procedure is a key issue. Because of the low volume of serum necessary for ELISA analysis (1 μ L per test), numerous antigens can be tested for a single serum sample in 1 experiment. Testing several recombinant antigens from various environmental microorganisms known to cause FLD on the same plate can easily be considered to improve the sensitivity of serologic diagnosis.

Our strategy, consisting of using sera from patients with FLD to identify immunogenic proteins from environmental microorganisms, could be applied to other microorganisms known to be

causative agents of FLD, with the aim of proposing panels of recombinant antigens able to improve the sensitivity and standardization of serologic diagnosis. However, only a prospective study including patients with FLD and control subjects can determine whether ELISA with individual recombinant antigens, combinations of recombinant antigens, or both increases diagnostic performance compared with existing techniques.

We thank the Mutualité Sociale Agricole and the PAPP group ("Réseau des Pathologies Pulmonaires Agricoles") for their help in recruiting exposed control subjects. We also thank Frances Sheppard from the Clinical Investigation Center (CIC Inserm) of Besançon for her editorial assistance.

Laurence Millon, PharmD, PhD^{a,b}
Sandrine Roussel, PhD^{a,b}
Benedicte Rognon, PhD^{a,b}
Manfredo Quadroni, PhD^d
Karin Salamin, BSc^e
Gabriel Reboux, PhD^{a,b,c}
Coralie Barrera, MSc^a
Jean-Marc Fellrath, MD^f
John D. Aubert, MD, PhD^g
Jean-Charles Dalphin, MD, PhD^{a,h}
Michel Monod, PhD^e

From ^aCNRS, University of Franche-Comté, UMR 6249 Chrono-Environnement, Besançon, France; ^bthe Department of Parasitology-Mycology, ^cthe Clinical Investigation Center (Inserm CIT 808), and ^dthe Department of Pneumology, University Hospital of Besançon, Besançon, France; ^ethe Protein Analysis Facility, Center for Integrative Genomics, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; ^fthe Department of Dermatology, Mycology, and ^gthe Department of Pulmonary Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; and ^hthe Department of Pulmonary Medicine, University Hospital, Neuchâtel, Switzerland. E-mail: Laurence.millon@univ-fcomte.fr.

Supported by the French National Research Agency (PHS-ICAD project, ANR 05 SEST-044-01) and by the French Ministry of Health (PHRC national SOPHIA).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnnet K, et al. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1534-9.
2. Lappalainen S, Pasanen AL, Reiman M, Kallioikoski P. Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:585-92.
3. 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;54:1181-7.
4. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvald JC, Andersen B. Food and indoor fungi. Utrecht (The Netherlands): CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center; 2010; pp. 68-9.
5. Moran GP, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* 2011;10:34-42.
6. Roussel S, Reboux G, Rognon B, Monod M, Grenouillet F, Quadroni M, et al. Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in farmer's lung disease serological diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:160-7.
7. Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:792-8.
8. Singh B, Sharma G, Oellerich M, Kumar R, Singh S, Bhadoria D, et al. Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia. *J Proteome Res* 2010;9:5530-41.
9. Fenoglio CM, Reboux G, Sudre B, Mercier M, Roussel S, Cordier JF, et al. Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2007;29:706-12.

Available online May 16, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.039>

METHODS

Patients with FLD and control subjects

Patients with FLD were farmers who had just received a diagnosis in the pneumology departments of hospitals in Lausanne, Neuchâtel (Switzerland), and Besançon (France) between September 2006 and May 2008. All 18 patients with FLD were given a diagnosis according to consensual criteria (Table E1)^{E1} and had at least 1 positive serologic test result using electrosynthesis with 1 presumed agent of FLD. Electrosynthesis on cellulose acetate was performed with a crude extract of *E amstelodami* (BBCM/IHEM16286), *L corymbifera* (BBCM/IHEM3809), *W sebi* (BBCM/IHEM16284), and *S rectivirgula* (DSMZ43747), as previously described.^{E2} The threshold of positivity for FLD diagnosis was previously determined as 3 precipitin arcs for the *E amstelodami* extract and 2 precipitin arcs for the *L corymbifera*, *W sebi*, and *S rectivirgula* extracts.^{E3} The numbers of precipitin arcs obtained for patients with FLD are reported in Table E2.

Exposed control subjects (n = 32) were healthy farmers recruited during occupational medicine visits organized by a social security regimen for farmers ("Mutualité Sociale Agricole"). Spirometry, serology, and standardized medical questionnaires were used to ascertain that none of the patients presented with any general or respiratory symptoms. Nonexposed control subjects (n = 32) were healthy nonfarmer volunteers living in an urban area (Paris). They were recruited during blood donations in a specialized center. A questionnaire was used to establish that control subjects were not exposed to a farming environment, birds, or molds in their dwellings. All were nonsmokers.

ILDs (n = 11) were nonspecific interstitial pneumonia, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative interstitial pneumonia/respiratory bronchiolitis-associated ILD, and drug or connective tissue disease-associated ILD.

The protocol was approved by the local ethics committee. Blood samples were taken for each subject who had provided written consent and centrifuged within 4 hours after sampling. Serum was immediately stored at -80°C.

Preparation of BGPE from ascospores

Ascospores of 20 densely grown malt agar culture media samples of *N fischeri* (NF9; Pasteur Institute, Paris, France) were first suspended in 60 mL of phosphate NaCl buffer (10 mmol/L Na₃PO₄ and 0.15 mol/L NaCl, pH 6). A 5-minute centrifugation was performed to pellet the ascospores, and then the ascospores were resuspended in 5 mL of 0.1 mol/L Tris-HCl buffer at pH 8.5. BGPE was prepared as previously described^{E4} and purified with an SDS-PAGE clean-up kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). BGPE was then suspended in an ELISA coating buffer. Protein concentration of the purified extract was determined by using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), according to the manufacturer's instructions.

2-DE, staining procedure, and Western blotting

BPBE that was generated as described above and contained 54 µg of proteins was suspended in 2-dimensional PAGE lysis buffer (5 mmol/L magnesium acetate, 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% [wt/vol] 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, and 30 mmol/L Tris, pH 8.5). After sonication and centrifugation, the supernatant was diluted in an equal volume of the same buffer supplemented with 2 mg/mL dithiothreitol and 2% (vol/vol) Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) and separated by using 2-DE. Immobiline DryStrip gels (pH 3-10 NL, 11 cm; GE Healthcare) were rehydrated according to the manufacturer's instructions before first-dimension separation with a cup-loading sample application. Isoelectric focusing was carried out on an Ettan IPGphor electrophoresis system (GE Healthcare), with a total focusing of 30,000 Vh, according to the manufacturer's manual and instructions. Before the second dimension, strips were equilibrated for 15 minutes in a reducing buffer containing 6 mol/L urea, 2% (wt/vol) SDS, 30% (vol/vol) glycerol, 32 mmol/L dithiothreitol, and 50 mmol/L Tris at pH 6.8. This was followed by a 10-minute alkylation in a buffer containing 6 mol/L urea, 2% (wt/vol) SDS, 30% (vol/vol) glycerol, 240 mmol/L iodoacetamide, and 100 mmol/L Tris at pH 8. Second-dimension separation was carried out on a 7 × 9-cm 10% acrylamide gel surmounted by a 4% stacking gel. The IPG strip from the first dimension was loaded onto the slab gels together with a molecular mass size marker and run

across the stacking gel at 80 V for 30 minutes and 120 V for 1 hour. After electrophoresis, proteins were stained with colloidal Coomassie blue or transferred onto the nitrocellulose membrane for Western blotting with sera from FLD3, FLD1, FLD2, FLD4, FLD5, or FLD8 and with 1 serum from a healthy exposed control subject (EC1). These sera were selected by using previous 1-dimensional Western blot experiments (data not shown): FLD3 because it yielded the highest number of colored bands and the weakest background; FLD1, FLD2, FLD4, FLD5, or FLD8 because they showed a majority of bands common to patients with FLD; and EC1 because it was representative of most of the bands present in exposed control subjects.

Spot detection and alignment

Spot detection and alignment between gel and Western blot imaging were performed by using Melanie 6.0 software (Genebio, Geneva, Switzerland). Before incubation with the serum, proteins transferred onto the nitrocellulose membrane were stained with Ponceau red. This made it possible to select and mark intense reference spots on the nitrocellulose membrane and facilitated the alignment of the spot patterns between the Coomassie blue-colored gel and the Western blot membrane.

Protein identification by means of mass spectrometry

Gel spots were excised from SDS-PAGE and transferred to special 96-well plates (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Massachusetts). Tryptic digestion and protein identification by means of tandem mass spectrometry on a MALDI-TOF/TOF instrument (Applied Biosystems 4700 Proteome Analyzer; Applied Biosystems, Framingham, Mass) was performed essentially as previously described.^{E5} When no identification was obtained or the results were ambiguous, the samples were reanalyzed by using nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a Thermo Scientific LTQ-Orbitrap XL essentially as described.^{E6} Tandem mass spectrometric datasets were searched by using Mascot (version 2.2.0; Matrix Science, London, United Kingdom) against the set of 10,426 protein sequences from *N fischeri* extracted from release 14.4 of the UNIPROT database. Mass tolerance for precursor peptide matching was at 20 and 10 ppm for MALDI-TOF/TOF and Orbitrap data, respectively. MASCOT database search results were imported into Scaffold software (Proteome Software, Portland, Ore) and filtered based on protein identification probability with a threshold at 95%.

Production of recombinant antigens

With the aim of simplifying our procedure, we used available cDNA from *A fumigatus* to amplify sequences coding for the proteins of interest. The coverage of the 5 selected proteins was 100% with corresponding proteins in *A fumigatus* (Af293, GenBank). Identity with *A fumigatus* Af293 sequences was 99% for Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, glucose-6-phosphate isomerase, and enolase; 98% for NAD-dependent formate dehydrogenase Aci/FdH; and 97% for mannitol-1-phosphate dehydrogenase.

Large peptides corresponding to 5 sequenced proteins were produced by using the pET expression system from Novagen (Darmstadt, Germany). The P1/P2, P3/P4, P5/P6, P7/P8, and P9/P10 pairs of sense/antisense primers (Table E3) were used to amplify sequence coding for the proteins of interest from *A fumigatus* cDNA.^{E7} PCR products were digested with *NcoI/BamHI* or *RcaI/BglII* and cloned into the *NcoI* and *BamHI* sites of pET-11aH6, which is a derivative of pET-11a.^{E8} The plasmid pET-11aH6 was generated by incorporating the sequence 5'-CATGCACCATCACCATCACCATGGTAAG-GATC-3' encoding a Met-His₆ amino acid sequence between the unique *NheI* and *BamHI* cloning sites of pET 11a. The sixth His residue in pET-11aH6 was encoded by a unique *NcoI* cloning site. The plasmids obtained after cloning were termed pAg1 to pAg5.

Heterologous 6×His-tagged peptides were produced in *Escherichia coli* BL21 transformed with pAg1 to pAg5. Cells were grown at 37°C to an OD of 600 nm (OD_{600nm}) of 0.6, and 6×His-tagged peptide expression was induced by adding isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside to a final

concentration of 0.1 mmol/L. Incubation was continued for an additional 4-hour period at 37°C. Cells were collected by means of centrifugation (4500g at 4°C for 15 minutes), and 6×His-tagged peptides were extracted with guanidine hydrochloride buffer and Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) columns, as recommended by the manufacturer. Protein concentrations were determined spectrophotometrically measuring OD_{280nm}.

ELISA

ELISAs were performed with 93 sera (18 from patients with FLD, 32 from exposed control subjects, 32 from nonexposed control subjects, and 11 from patients with ILD) to look for IgG against the 5 recombinant antigens synthesized. The wells of 96-well plates (PolySorp Immunomodule; Nalge Nunc, Rochester, NY) were coated with 200 µL of 1 µg/mL recombinant antigen solution in 50 mmol/L K₂HPO₄ buffer, pH 8.5, at 4°C for 48 hours. ELISAs for specific IgG were then conducted as previously described.^{E4} Well intensities were read with a spectrophotometer at 450 nm (Titertek Multiskan, Helsinki, Finland), and the results were expressed in OD.

Statistical analysis

Sera were deposited in triplicate on ELISA plates, and variation coefficients were calculated. Sera for which the variation coefficient was superior to 20% for an OD mean of greater than 0.050 were tested again. Means of ODs validated by variation coefficient were used for statistical analysis by using receiver operating characteristic curves with STATA9 software (StataCorp, College Station, Tex). Sensitivity and specificity tables were calculated for each OD, and the value that showed the best percentage of correctly classified patients and control subjects was chosen as the threshold. When several thresholds were equivalent, the one with the best sensitivity was chosen. Receiver operating characteristics allowed recombinant antigens to be

compared by examining the area under the curve. The area under the curve was considered significant when the 95% CI did not include the value 0.5. An ELISA test with recombinant antigen was considered high performance when the area under the curve was greater than 0.8.

REFERENCES

- E1. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, et al. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:952-8.
- E2. Reboux G, Piarroux R, Roussel S, Millon L, Bardonnat K, Dalphin JC. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J Med Microbiol* 2007;56:1317-21.
- E3. Fenoglio CM, Reboux G, Sudre B, Mercier M, Roussel S, Cordier JF, et al. Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2007;29:706-12.
- E4. Roussel S, Reboux G, Rognon B, Monod M, Grenouillet F, Quadroni M, et al. Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in farmer's lung disease serological diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:160-7.
- E5. Giddey K, Monod M, Barblan J, Potts A, Waridel P, Zaugg C, et al. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in vitro conditions. *J Proteome Res* 2007;6:3081-92.
- E6. Sriranganadane D, Waridel P, Salamin K, Reichard U, Grouzmann E, Neuhaus JM, et al. *Aspergillus* protein degradation pathways with different secreted protease sets at neutral and acidic pH. *J Proteome Res* 2010;9:3511-9.
- E7. Monod M, Paris S, Sarfati J, Jatou-Ogay K, Ave P, Latgé JP. Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;106:39-46.
- E8. Reichard U, Le'chenne B, Asif AR, Streit F, Grouzmann E, Jousson O, et al. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1739-48.

TABLE E1. Characteristics of patients with FLD

Patient no.	Age (y)	Sex	Smoker	Hospital	Clinical presentation	Radiologic data	Bronchoalveolar lavage	
							Cell/mm ³	Lymphocytes (%)
FLD1	48	M	No	Besançon	Acute recurrent	Ground-glass opacities	760	47
FLD2	48	M	No	Besançon	Subacute	Ground-glass opacities Air trapping	460	58
FLD3	53	M	No	Besançon	Chronic	Ground-glass opacities	320	60
FLD4	51	M	No	Besançon	Acute recurrent	Ground-glass opacities	980	82
FLD5	47	M	No	Besançon	Subacute recurrent	Mosaic feature Ground-glass opacities	680	59
FLD6	51	F	No	Besançon	Chronic	Diffuse ground-glass opacities	1010	83
FLD7	47	M	No	Besançon	Acute	Ground-glass opacities	270	57
FLD8	59	M	No	Besançon	Subacute	Small nodules Ground-glass opacities	450	45
FLD9	51	M	No	Besançon	Subacute	Small nodules Ground-glass opacities	340	61
FLD10	51	F	No	Besançon	Subacute severe	Small nodules Ground-glass opacities Mosaic feature	410	65
FLD11	43	M	No	Besançon	Chronic	Diffuse ground-glass opacities Air trapping	360	64
FLD12	53	M	Yes	Besançon	Subacute	Diffuse ground-glass opacities	620	79
FLD13	34	M	No	Besançon	Acute	Diffuse ground-glass opacities Mosaic feature	970	63
FLD14	45	M	Yes	Lausanne	Subacute	Small nodules Ground-glass opacities Mosaic feature	570	68
FLD15	61	M	No	Neuchatel	Acute exacerbation of a chronic form	Diffuse ground-glass opacities Air trapping Mosaic feature	700	15
FLD16	54	M	No	Neuchatel	Acute exacerbation of a chronic form	Emphysema Mosaic feature	400	64
FLD17	53	M	No	Neuchatel	Subacute severe	Mosaic feature Air trapping	1225	44
FLD18	54	M	No	Besançon	Chronic	Ground-glass opacities Air trapping	390	47

F, Female; M, male.

TABLE E2. Serologic diagnosis using crude antigen extracts from *Eurotium amstelodami*, *Lichtheimia corymbifera*, *Wallemia sebi*, and *Saccharopolyspora rectivirgula*

Case no.	Electrosyneresis on cellulose acetate			
	No. of arcs			
	<i>E amstelodami</i> (threshold ≥3 arcs)	<i>L corymbifera</i> (threshold ≥2 arcs)	<i>W sebi</i> (threshold ≥2 arcs)	<i>S rectivirgula</i> (threshold ≥2 arcs)
FLD1	2	2	4	0
FLD2	3	1	2	1
FLD3	1	1	4	3
FLD4	4	1	4	1
FLD5	1	0	5	0
FLD6	4	2	1	15
FLD7	0	2	0	4
FLD8	0	1	3	0
FLD9	2	1	3	1
FLD10	1	1	2	7
FLD11	1	2	6	0
FLD12	2	2	0	0
FLD13	1	1	5	7
FLD14	1	1	4	1
FLD15	1	0	4	3
FLD16	7	6	7	7
FLD17	4	3	10	5
FLD18	3	2	6	4

Positive results are indicated in boldface.

TABLE E3. List of primers used

Target gene	Primer sequence (5'-3')
NAD-dependent formate dehydrogenase	
FP	TCTTCGGTACGTCCAGGGCCC
RP	GTTGGATCCTTACTTCTGTCTCTGGCCGTA
Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	
FP	GTTCCCATGGTATGGGAAAGAAGGCTATCCAG
RP	GTTGGATCCCTACTTGCTGTCCTTCTGCACC
Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	
FP	GTTCCCATGGTATGTCTAACCTTCCTCAGGAG
RP	GTTGGATCCTTACCACCAGTCACCCTGCTC
Enolase	
FP	GTTCCATGGGCCTATCTCCAAGATCCAC
RP	CTTGGATCCTTACAGGTTGACGGCAGTGCG
Glucose-6-phosphate isomerase	
FP	GTTTCATGAGATGCCTGGTTTTTCGCAGGC
RP	GTTAGATCTTAAAGCCAGGTTGGCCTTCTT

FP, Forward primer; *RP*, reverse primer.

TABLE E4. Sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios, and area under the curve obtained for the 5 recombinant antigens with sera from patients with FLD and control subjects

Protein name	Sensitivity (% [95% CI])	Specificity (% [95% CI])	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)	AUC (95% CI)
Patients with FLD (n = 18) vs exposed control subjects (n = 32)					
NAD-dependent formate dehydrogenase	61 (36-83)	84 (67-95)	3.9 (2.6-5.8)	0.5 (0.2-1.2)	0.72 (0.55-0.89)
Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	56 (31-79)	69 (60-84)	1.8 (1.1-2.9)	0.6 (0.3-1.3)	0.62 (0.45-0.78)
Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	72 (47-90)	94 (79-99)	11.6 (8.6-15.6)	0.3 (0.1-1.4)	0.89 (0.80-1)
Enolase	33 (13-59)	84 (67-95)	2.1 (1.1-4.2)	0.8 (0.3-1.9)	0.53 (0.35-0.70)
Glucose-6-phosphate isomerase	72 (47-90)	84 (67-95)	4.6 (3.3-6.4)	0.3 (0.1-1.0)	0.87 (0.78-0.97)
Patients with FLD (n = 18) vs nonexposed control subjects (n = 32)					
NAD-dependent formate dehydrogenase	61 (36-83)	91 (75-98)	6.5 (4.4-9.6)	0.4 (0.1-1.5)	0.93 (0.85-1)
Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	56 (31-79)	47 (29-65)	1.0 (0.6-1.8)	0.9 (0.5-1.7)	0.51 (0.33-0.68)
Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	72 (47-90)	84 (67-95)	4.6 (3.3-6.4)	0.3 (0.1-1.0)	0.88 (0.79-0.98)
Enolase	33 (13-59)	88 (71-96)	2.7 (1.4-5.2)	0.8 (0.3-2.0)	0.67 (0.52-0.82)
Glucose-6-phosphate isomerase	72 (47-90)	63 (44-79)	1.9 (1.3-2.9)	0.4 (0.2-1.1)	0.75 (0.60-0.89)
Patients with FLD (n = 18) vs patients with ILD (n = 11)					
NAD-dependent formate dehydrogenase	61 (36-83)	91 (59-100)	6.7 (4.4-10.2)	0.4 (0.1-3.0)	0.72 (0.51-0.93)
Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	56 (31-79)	82 (48-98)	3.1 (1.9-5.0)	0.5 (0.1-2.1)	0.73 (0.54-0.92)
Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	72 (47-90)	64 (31-89)	2.0 (1.2-3.4)	0.4 (0.1-1.3)	0.72 (0.53-0.91)
Enolase	33 (13-59)	91 (59-100)	3.7 (1.9-7.2)	0.7 (0.1-4.9)	0.57 (0.33-0.80)
Glucose-6-phosphate isomerase	72 (47-90)	72 (39-94)	2.6 (1.7-4.2)	0.4 (0.1-1.3)	0.70 (0.48-0.91)

AUC, Area under the curve; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio; Se, sensitivity; Sp, specificity.

3.2.4. Evaluation des antigènes recombinants d'*Aspergillus fumigatus* avec les sérums de la population complète des PDF

Les deux antigènes recombinants d'*Aspergillus* GLPV et G6Pi, les plus discriminants dans le diagnostic du PDF ont été produits dans une deuxième manipulation, et ont été évalués avec l'ensemble des sérums des patients inclus dans les 2 protocoles cliniques (PHS ICAD et PHRC SOPHIA, soit 43 patients et 44 témoins). Le Tableau 10 montre les résultats de sensibilité, spécificité et AUC obtenus. Dans cette nouvelle série comprenant un nombre très supérieur de patients, les AUC sont de 0.67 et 0.70 pour la GLPV et la G6Pi, respectivement, avec des valeurs de spécificité et sensibilité également inférieure à celle de la série précédente.

Tableau 10 : Résultats des analyses statistiques des tests ELISA de la 2^{ème} étude d'évaluation des antigènes recombinants G6Pi et GLPV avec 43 sérums de PDF et 44 sérums de témoins exposés.

	ELISA	
	G6Pi	GLPV
AUC	0,67	0,70
Sensibilité	63%	53%
Spécificité	68%	82%

V. Evaluation d'autres tests sérologiques contribuant à l'amélioration du diagnostic du PDF

1. Patients, matériel et méthodes

1.1. Patients

Les sérums de cas de PDF et de témoins exposés asymptomatiques sont les mêmes que décrits précédemment.

1.2. Matériel

Les souches de moisissures et actinomycètes qui ont été utilisées pour les différents tests sérologique étaient: *L. corymbifera*, *E. amstelodami*, *W. sebi* (souches de la collection environnementale du laboratoire) et *T. vulgaris* (DSMZ43016). Les espèces *L. corymbifera* et *E. amstelodami* sont cultivées sur le milieu DG18 à 30°C, *W. sebi* sur milieu Malt sel à 20°C et *T. vulgaris* sur milieu R8 à 44°C. La souche *S. rectivirgula* DSMZ43113 a également été utilisée pour les différents autres tests ci-après.

1.3. Méthodes

1.3.1. Recherche de précipitines

La recherche de précipitines a été réalisée par le laboratoire de Mycologie-Parasitologie du CHU de Besançon par la technique d'électrosynérèse sur acétate de cellulose utilisée en routine, sur tous les sérums adressés dans le cadre des protocoles PHS ICAD et SOPHIA (soit 128 sujets : 52 PDF et 76 témoins exposés). Huit antigènes somatiques lyophilisés ont été testés et pour chaque espèce un seuil de positivité a permis de déterminer la positivité du test : *E. amstelodami* (≥ 3 arcs), *L. corymbifera* (≥ 2 arcs), *W. sebi* (≥ 2 arcs), *Fusarium oxysporum* (≥ 2 arcs), *S. rectivirgula* (≥ 2 arcs), *T. vulgaris* (≥ 3 arcs), *S. viridis* (≥ 3 arcs) et *Streptomyces* mésophiles (≥ 3 arcs). Le laboratoire a rendu ensuite une interprétation diagnostique en trois niveaux :

- A= « Arguments immunologiques en faveur d'une PHS »
- B= « Arguments immunologiques en accord avec une suspicion de PHS, mais doit être confirmée par une nouvelle sérologie dans quelques mois »
- C= « Absence ou peu d'argument immunologiques en faveur d'une PHS ».

1.3.2. ELISA IgG et IgA avec des antigènes purifiés et somatiques

➤ Préparation des antigènes purifiés

Les protéines des actinomycètes (*T. vulgaris* et *S. rectivirgula*) ont été extraites et purifiées comme décrits précédemment (§III 2.5.1, page 81).

Les souches de moisissures ont été mises en culture sur le milieu solide adéquat durant une semaine. Les spores ont été récoltées en raclant doucement les colonies, de manière à ne pas décoller les filaments, avec le tampon A. Le liquide ainsi récolté a été centrifugé 5 min à 5000 rpm, 4 °C. Puis le culot a été resuspendu dans 5 ml d'un tampon B (Tris HCl 0,1N pH7,5) supplémenté d'inhibiteurs de protéases : PMSF 1 mM, phenanthroline 1 mM et pepstatine 2 µM. Pour rompre les liaisons β 1-3 glucane de la paroi des champignons, 400 UI de lyticase (Lyticase from *Arthrobacter luteus*, Sigma-Aldrich®) agissant à température ambiante pendant 1 h sous une légère agitation ont été ajoutés aux cellules. La solution a ensuite été centrifugée à 10 000 rpm pendant 3 min, 4 °C. Le surnageant a été filtré avec un filtre de 45 µm (Millipore) et les protéines ont ensuite été précipitées à l'acide trichloracétique avant d'être purifiées par le coffret SDS-PAGE clean-up comme décrit précédemment §III 2.5.1 (page 81).

➤ Dosage des IgG spécifiques par test ELISA

Les IgG spécifiques pour les antigènes purifiés de spores d'*E. amstelodami* et *L. corymbifera*, *S. rectivirgula*, *T. vulgaris* et pour les antigènes somatiques de *W. sebi* ont aussi été recherchés suivant le même protocole ELISA que pour les antigènes recombinants (§III 2.7).

➤ Dosage des IgA spécifiques par test ELISA

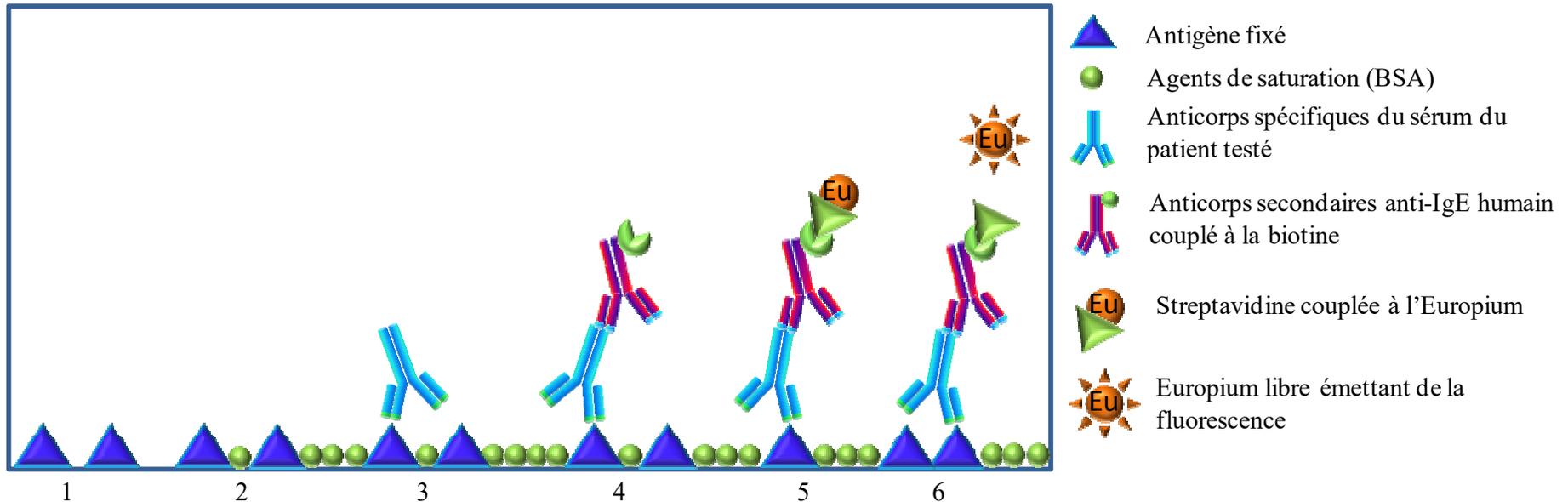
Les IgA spécifiques des espèces *S. rectivirgula*, *T. vulgaris*, *E. amstelodami* et *L. corymbifera* ont été recherchés par une technique ELISA dont le protocole dérive de celui présenté dans le chapitre §III 2.7.2 (page 94).

Les antigènes purifiés ont été fixés sur des plaques 96 puits de type Polysorp à une concentration de 10 µg/ml. L'anti-IgA humain couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich) a été dilué dans le tampon PBST au 1/2000^e. Les autres étapes ont été réalisées selon le protocole de l'ELISA utilisé pour le dosage des IgG spécifiques. Les sérums ont été testés en triplicat et l'expérience a été renouvelée une seconde fois. Les DO_{450nm} ont été transformées en index100, comme indiqué dans le chapitre §III 2.8.

➤ *Dosage des IgG₄ spécifiques par test DELFIA®*

Le test DELFIA® (*Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay*) est un test d'immuno-dosage comme l'ELISA encore appelé TR-FIA (*Time-resolved FluoroImmunoAssay*). Le tapissage des puits par les antigènes purifiés de *S. rectivirgula* permet la fixation d'anticorps anti-*S. rectivirgula* spécifiques de la sous-classe d'immunoglobuline IgG₄ présents dans les sérums des sujets. Les complexes formés ont été révélés avec des anti-IgG₄ humain couplés à la biotine puis par la streptavidine marquée à l'euporium (Eu³⁺). La lecture de la fluorescence est effectuée à l'aide du programme « Euporium » du fluorimètre VictorTM 2 Multilabel Counter (Perkin-Elmer), et les résultats sont exprimés en nombre de coups.

Le tapissage des plaques opaques 96 puits Optiplate (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) a été effectué avec 200 µl d'une solution d'antigènes purifiés à une concentration de 10 µg/ml dans du tampon PBS. Après 4 rinçages avec de la solution de lavage spécial DELFIA® (*DELFIA® Wash buffer concentrate*, Perkin-Elmer), la saturation des sites de fixation en excès a été réalisée avec une solution de BSA purifiée à 0,25% (Perkin-Elmer) puis la plaque a été incubée 1h à température ambiante. Après une nouvelle série de 5 rinçages, 50µl de sérums dilués au 1/50^{ème} dans une solution de dilution (*DELFIA® Assay Buffer*, Perkin-Elmer) ont été déposés dans chaque puits en triplicat. Un blanc réactionnel et un pool de sérums permettant la standardisation de la plaque ont également été déposés. La plaque a ensuite été incubée pendant 2h à température ambiante. Après une troisième série de lavages, 50µl d'anticorps secondaire anti-IgG₄ humain biotinylé (Sigma-Aldrich) dilué au 1/1000^{ème} dans la solution de dilution ont été déposés dans les puits et l'incubation a été poursuivie 2h à température ambiante. Les puits ont à nouveau été lavés et 50 µl d'une solution de streptavidine marquée à l'euporium (*DELFIA® streptavidin labelled europium*, Perkin-Elmer) ont été ajoutés dans les puits pour 30 min d'incubation sous agitation lente à température ambiante. Après une dernière série de huit lavages, la plaque a été incubée 5 min avec une solution de développement (*DELFIA® Enhancement solution*, Perkin-Elmer) sous agitation lente avant d'être placée dans la fluorimètre pour la mesure de la fluorescence de chaque puits.



1. Fixation de l'antigène; 2. Saturation; 3. Incubation du sérum, fixation des anticorps spécifiques à l'antigène; 4. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la biotine; 5. Incubation de la streptavidine couplée à l'Europium; 6. Libération de l'Europium par incubation avec une solution de développement et émission de la fluorescence. Après chaque étape une série de 5 lavages successifs est réalisée sauf après l'étape 5, où une série de 8 lavages est réalisée. Après l'étape 6, la lecture de la fluorescence est réalisée sur un lecteur de plaque (Excitation à 340nm, émission à 615nm).

Figure 16 : Schéma du principe du test DELFIA® (Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunsorbent Assay)

1.3.3. Calcul de la charge immunitaire

La collaboration avec le laboratoire de biochimie du CHU de Besançon nous a permis d'obtenir les dosages des taux d'IgG, IgA, IgM et IgE totales, pour les sérums des patients issus de l'étude PHS-ICAD. La charge immunitaire en Ig spécifique est calculé de la manière suivante : Taux d'IgG ou IgG₄ ou IgA spécifiques (en index100) / taux d'IgG total (en g/l) * 100 (en unité arbitraire).

1.3.4. Etape d'adaptation technique pour des ELISA de routine

Afin de valider un protocole simplifié permettant l'utilisation du test ELISA avec les antigènes recombinants en routine dans le laboratoire hospitalier, les solutions de fixation et de lavage utilisées dans le protocole § III 2.7.2 ont été remplacées par des solutions prêtes à l'emploi. Pour un emploi en routine, l'étape de fixation des antigènes a été réalisée à l'avance et différentes conditions de conservation des plaques ont été testées.

➤ *Test des différentes solutions*

La solution de fixation (ou solution de coating) a été remplacée par une solution de tampon physiologique PBS pH 7,4 (0,01 M, sachets prêt à être dissout dans 1L d'eau, Sigma-aldrich®).

La solution de lavage a été remplacée par du TBS pH8 (0,05 M, sachets prêt à être dissout dans 1L d'eau, Sigma-aldrich®), un autre tampon physiologique, additionné de 0,25 % de Tween20. Une autre solution de lavage issue d'un kit de diagnostic commercialisé par BioRad a été testée.

Les solutions de saturation et de dilution restent inchangées.

➤ *Conservation*

Trois moyens de conservation des plaques préalablement incubées avec les antigènes et saturées (ou non) ont été testés ceci pour permettre une exécution plus rapide du test :

- 1) conservation à -20°C après fixation des antigènes et saturation selon le protocole habituel.
- 2) conservation à 4°C après fixation des antigènes puis lyophilisation des plaques
- 3) conservation à 4°C après fixation des antigènes, saturation puis lyophilisation des plaques.

Le test est réalisé ensuite le lendemain de la préparation des plaques, puis à 1 mois, 3 mois et 6 mois de conservation.

➤ *Application au diagnostic de routine*

Les sérums adressés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de mai à décembre 2012 pour sérologie PDF ont été testés en parallèle avec les techniques utilisées en routine dans ce laboratoire (double diffusion, électrosynérèse) et avec un test ELISA « maison ». Une plaque ELISA comportant 8 antigènes différents en ligne a été mise en place de manière prospective dans le laboratoire de Mycologie du CHU : ligne A : *E. amstelodami*, ligne B : *L. corymbifera*, ligne C : *W. sebi*, ligne D : *S. rectivirgula*, ligne E : *T. vulgaris*, deux antigènes recombinants issus d'*A. fumigatus*, ligne F : *GLPV*, ligne G : *G6Pi*, un antigène recombinant issu de *S. rectivirgula*, ligne H : SR9. Le dépôt des sérums et des pools a été réalisé de la manière suivante : dans la première colonne a été déposé de la solution de dilution seule (blanc réactionnel), dans la seconde colonne a été déposé le pool positif dilué au 1/100^e dans de la solution de dilution, dans la 3^{ème} colonne le pool négatif, dans la 4^{ème} le pool de référence, et dans les 8 colonnes suivantes quatre sérums de patients suspectés de PDF déposés en duplicat (2 colonnes par sérum testé).

1.4. Tests statistiques et traitement des données

Les données ont été converties en index et l'efficacité du test a été évaluée par une analyse en courbe ROC comme décrits précédemment §III 2.8.

Le logiciel R (R version 2.14.0 ; R Development Core Team, 2005) a été utilisé pour les tests d'analyses de variances (test paramétrique, anova) ou de Wilcoxon (test non-paramétrique) ou pour des tests de corrélations de pearson. Ces tests statistiques ont été utilisés pour comparer les données obtenues pour les groupes de témoins et de patients ou pour comparer les résultats de deux techniques.

Le test de Wilcoxon a été utilisé lorsque les résidus du modèle en analyse de variance ne suivaient pas une loi normale (vérifié préalablement par le test de Kolmogorov-Smirnov). Le test de Kruskal-Wallis (test non-paramétrique) a parfois été utilisé pour des comparaisons multiples. Les résultats ont été considérés comme statistiquement différents lorsque la probabilité (p-value) obtenue était inférieure à 0,05.

2. Résultats

2.1. Recherche de précipitines

Les résultats d'électrosynérèse montrent que les témoins exposés sont parfois sensibilisés aux antigènes mais globalement, peu de témoins sont considérés comme positifs (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats d'électrosynérèse

Antigène (seuil)	PDF (n=52)				Témoins exposés (n=76*)			
	Négatif			Positif	Négatif			Positif
	Non S	S	Tot		Non S	S	Tot	
<i>L. corymbifera</i> (≥ 2 arcs)	24%	38%	62%	38%	46,0%	45,0%	91%	9%
<i>W. sebi</i> (≥ 2 arcs)	14%	21%	35%	65%	50%	23%	73%	27%
<i>E. amstelodami</i> (≥ 3 arcs)	23%	48%	71%	29%	58%	39%	97%	3%
<i>S. rectivirgula</i> (≥ 2 arcs)	20%	29%	49%	51%	70%	20%	90%	10%
<i>T. vulgaris</i> (≥ 3 arcs)	18%	51%	69%	31%	23%	73%	95%	4%
<i>Streptomyces</i> (≥ 3 arcs)	13%	60%	73%	27%	45%	55%	100%	0%
<i>S. viridis</i> (≥ 3 arcs)	17%	52%	69%	31%	14%	86%	100%	0%

*22 sérums de témoins exposés utilisés pour *W. sebi*, *Streptomyces* et *T. vulgaris* ; Non S = Non sensibilisé (0 arc de précipitines) ; S = négatif sensibilisé (1 arc ou plus selon le seuil admis) ; Tot = Total des négatifs.

La corrélation des résultats d'électrosynérèse en nombre d'arcs de précipitines pour *S. rectivirgula* et d'ELISA en score (utilisant la meilleure combinaison d'antigènes recombinants issus de *S. rectivirgula* : SR1FA, SR17 et SR22) a été étudiée. Les deux techniques sont corrélées positivement (test de spearman, p-value = $1.895.10^{-8}$) (Figure 17).

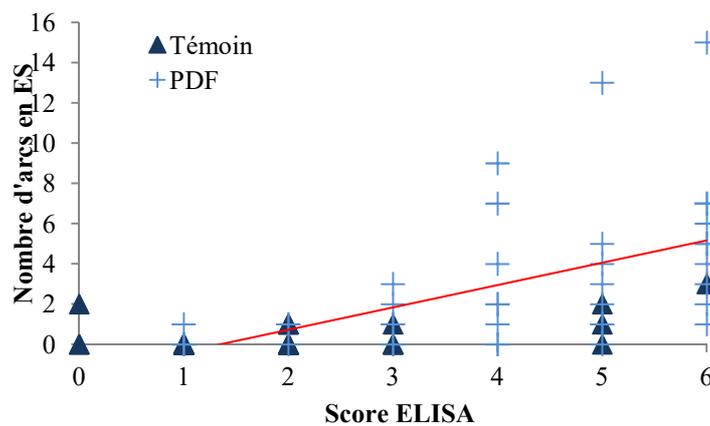


Figure 17: Corrélation entre le nombre d'arcs obtenu en électrosynérèse pour les antigènes de *S. rectivirgula* et le score obtenu pour la combinaison des trois antigènes recombinants SR1FA, SR17 et SR22.

2.2. Recherche des IgG spécifiques d'extraits antigéniques purifiés

Les AUC obtenus pour le test ELISA-IgG avec les extraits antigéniques purifiés de *S. rectivirgula*, *T. vulgaris* et *L. corymbifera* ne dépassent pas 0,75 (Figure 18). Les tests ELISA avec les extraits antigéniques purifiés d'*E. amstelodami* et les antigènes somatiques de *W. sebi* permettent une meilleure discrimination des patients et des témoins exposés, avec des AUC au-delà de 0,80 (Figure 18) et une sensibilité et spécificité de 82% pour *E. amstelodami*, une sensibilité de 76% et une spécificité de 93% pour *W. sebi*.

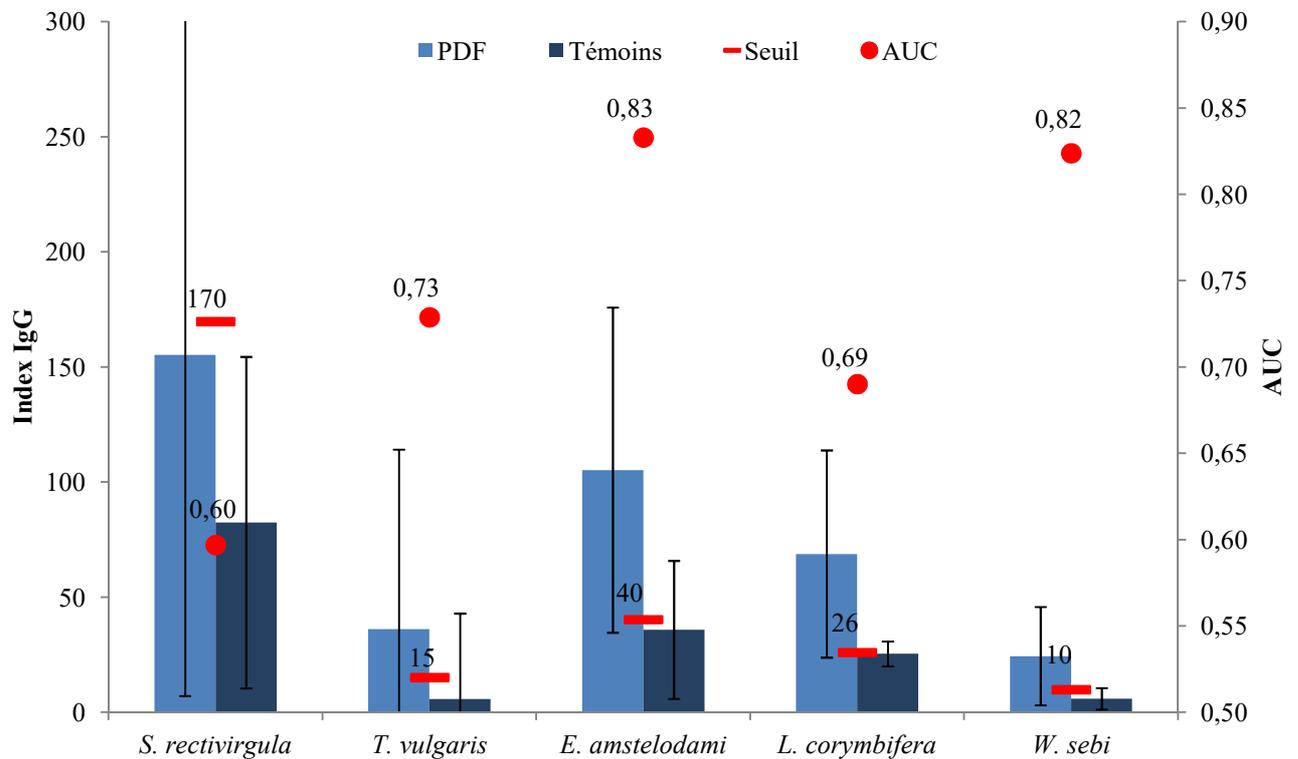


Figure 18 : Index moyens en IgG spécifiques et résultats de l'analyse statistique en courbe ROC pour les cinq espèces testées : *S. rectivirgula*, *T. vulgaris*, *E. amstelodami*, *L. corymbifera* et *W. sebi*.

2.3. Recherche des IgA spécifiques d'extraits antigéniques purifiés

Le diagnostic sérologique du PDF par le dosage des IgA semble intéressant puisqu'avec les extraits antigéniques purifiés de *L. corymbifera*, *S. rectivirgula* et *E. amstelodami*, on obtient une AUC supérieure à 0,75. En particulier avec *L. corymbifera* l'AUC est à 0,83 (Figure 19). Le seuil défini par l'analyse en courbe ROC permet d'obtenir une sensibilité de 89% pour *L. corymbifera*, mais la spécificité ne dépasse pas 70%. Inversement, pour *S. rectivirgula*, la

sensibilité ne dépasse pas 70% par contre la spécificité est de 89%. Pour *E. amstelodami*, un compromis entre sensibilité (79%) et spécificité (75%) est obtenu.

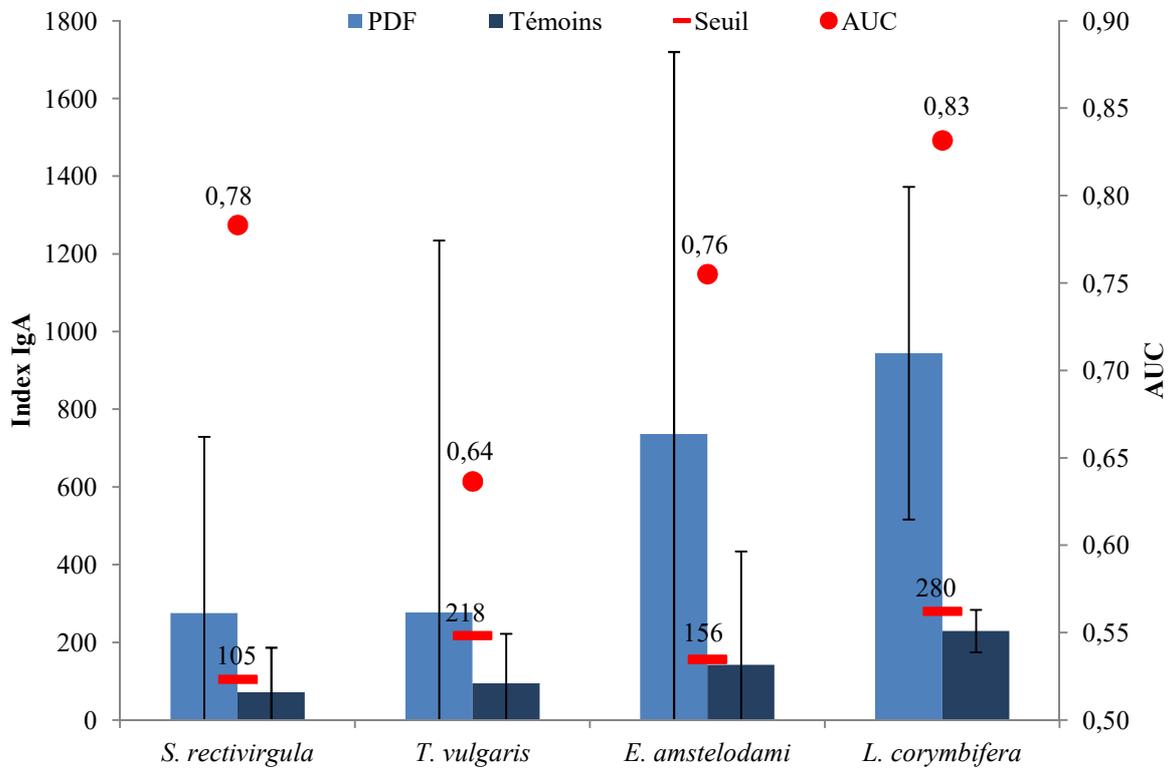


Figure 19 : Index moyens en IgA spécifiques et résultats de l'analyse statistique en courbe ROC pour les quatre espèces testées : *S. rectivirgula*, *T. vulgaris*, *E. amstelodami*, *L. corymbifera*.

2.4. Recherche des IgG₄ spécifiques de *S. rectivirgula* par test DELFIA®

Le taux d'anticorps de la sous-classe IgG₄ a été évalué par la méthode DELFIA® pour les antigènes purifiés de *S. rectivirgula*, la moyenne obtenue en valeur d'index est de 137 [11-725] pour les PDF et une moyenne de 95 [10-189] pour les TEA. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes.

2.5. Charge immunitaire

Les dosages des immunoglobulines totales IgG, IgA, IgM et IgE ne montrent pas de différences significatives entre le groupe des patients PDF et le groupe des témoins exposés asymptomatiques. La charge immunitaire en IgA calculée pour *S. rectivirgula* montre une différence significative ($p=0,02$) entre le groupe des patients PDF et des TEA.

2.6. Adaptation technique pour des ELISA de routine

Le remplacement de la solution de fixation des antigènes dite « maison » par un sachet de PBS « prêt à l'emploi » n'entraîne pas de différence dans les DO_{250nm} obtenues pour les 3 pools de sérums testés (pool positif, pool négatif et pool de référence). Parmi les trois solutions de lavage testées la solution « prête à l'emploi » n'est pas différente de la solution « maison ». Par contre la solution provenant d'un autre kit commercial n'est pas adaptée à notre ELISA, puisque les DO_{250nm} obtenue sont globalement plus haute. Pour la mise en place d'un ELISA prospectif, les solutions dites « prête à l'emploi » de fixation des antigènes et de lavage sont retenues.

La conservation à $-20^{\circ}C$ des plaques après fixation des antigènes puis saturation montre une augmentation des DO_{250nm} des trois pools testés au cours du temps, due sans doute à la dégradation des antigènes et du tapissage de BSA (saturation) entraînant des liaisons non spécifiques des anticorps avec la plaque. La conservation à $4^{\circ}C$ des plaques lyophilisées après fixation des antigènes et saturation ou fixation des antigènes seulement, ne montre pas de différence significative des index calculés pour les valeurs du pool positif et négatif jusqu'à 6 mois de conservation. Et il n'y a pas de différence entre les plaques ayant eu l'étape de saturation et celle sans saturation.

Ainsi les plaques peuvent être conservées durant 6 mois à $4^{\circ}C$ après fixation des antigènes, saturation et lyophilisation. On obtient un coefficient de variation de 27% pour le pool positif (moyenne pour les 8 antigènes) mais cette variation n'est pas corrélée avec le temps de conservation.

Dans l'essai d'application en routine des tests ELISA développés, environ deux plaques par mois pendant 6 mois ont été réalisées. Le coefficient de variation obtenu est de l'ordre de 29% pour le pool de référence et de 29% pour le pool positif (en termes d'index par rapport au pool de référence). Ainsi les variations observées durant les tests de conservation ne sont pas différentes des variations observées lors des tests sur des plaques où l'antigène a été fraîchement fixé.

Les données cliniques concernant les patients dont les sérums ont été testés dans cet essai préliminaire en routine sont en cours d'acquisition. La confrontation des résultats biologiques et des données cliniques permettront l'évaluation des performances de ce test en routine.

VI. Discussion et conclusion

1. Analyse environnementale et prévalence des précipitines

Le protocole d'étude a été assez bien accepté dans le milieu agricole par les malades. Nous sommes parfois confrontés à quelques réticences pour le recrutement de témoin apparié (15% de patients du protocole de recherche SOPHIA n'ont pas de témoin apparié). Pour le milieu industriel, le recrutement de patients PDM et de témoin a été beaucoup plus limité, mais les difficultés principales résident dans le recueil d'informations environnementales précises, car le souci de confidentialité et d'anonymat est très fort dans certaines usines.

1.1.L'environnement agricole

La majorité des fermes de cette étude se situe entre 700 et 900m d'altitude pour les sites de Besançon, Clermont-Ferrand et Neuchâtel, or ce sont les zones les plus à risque pour la contamination microbienne (Gbaguidi-Haore et al., 2009).

En Europe, différents micro-organismes sont en cause dans la survenue du PDF avec un niveau d'importance changeant selon le pays (Bellanger et al., 2010; Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999; Lappalainen et al., 1998; Reboux et al., 2001; Roussel et al., 2005b). En France, les espèces *L. corymbifera* et *Eurotium spp.* étaient considérées comme les principaux agents étiologiques, et *W. sebi* n'était considéré que comme secondairement impliqué tout comme *S. rectivirgula* (Dalphin et al., 1991; Dalphin et al., 1994; Reboux et al., 2001; Roussel et al., 2005b). *W. sebi* est également connu pour son implication dans les allergies (Sakamoto et al., 1989). Une précédente étude réalisée par notre laboratoire en 2001 avait montré que *W. sebi* n'était présent que dans 48% des échantillons agricoles (Reboux et al., 2001) contre 82% dans cette nouvelle étude (Tableau 7). De plus, la sérologie montre que les sujets sont sensibilisés fortement à *W. sebi* puisque 65% des PDF sont considérés comme positifs (≥ 2 arcs), ce qui rend cette espèce plus importante au sein de l'ensemble des agents étiologiques du PDF (Tableau 11).

S. rectivirgula est en augmentation dans les fourrages puisqu'en 2006, cette espèce n'était observée que dans 5% des échantillons agricoles de fermes du Doubs (France) (Reboux et al., 2006a) contre 38% dans cette étude (soit 68% des fermes présentant *S. rectivirgula* dans au moins un échantillon) (Tableau 7). La prévalence de précipitines pour *S. rectivirgula* chez les

éleveurs laitiers de Franche-Comté était comprise entre 27,1% et 10,4% selon les techniques de double diffusion et d'immuno-électrophorèse (Dalphin et al., 1994). Dans cette nouvelle étude, l'analyse sérologique par électrosynérèse montre que plus de la moitié des PDF sont sensibilisés à *S. rectivirgula* et que 29% des autres cas présentent une réaction contre cette espèce (au moins un arc de précipitines), portant ainsi à 80% la prévalence des précipitines dans le groupe des malades du PDF. Cette espèce semble donc de plus en plus impliquée dans l'étiologie du PDF en France. En Finlande, une augmentation de la sensibilisation à *S. rectivirgula* a été rapportée entre les années 1970-1980 et la fin des années 1990 (Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999). Au Canada dès les années 1980, *S. rectivirgula* est l'espèce prédominante avec l'observation de 65 sujets sensibilisés sur 75 sujets étudiés (Cormier et al., 1985).

L. corymbifera semble diminuer dans les fourrages depuis le début des années 2000. Une étude de 2001 observait une contamination dans 58% et 66% des échantillons analysés selon la provenance de l'échantillon d'une ferme sans cas de PDF ou avec cas de PDF (Reboux et al., 2001). La présence de *L. corymbifera* dans les fourrages de cette présente étude, est similaire à deux études de 2004 et 2006 où 38 à 49% des échantillons agricoles des fermes du Doubs (France) présentaient une contamination à cette espèce (Reboux et al., 2006a; Roussel et al., 2004).

Les espèces du groupe *Eurotium sp.* sont présentes dans toutes les fermes recrutées et dans 84% des échantillons, mais la sérologie montre que seulement 29% de PDF sont positifs en électrosynérèse avec cet antigène, contre 3% des témoins exposés. Pour cette espèce, les résultats contrastent avec ceux des études antérieures qui avaient permis de considérer *E. amstelodami* comme un agent étiologique fréquent après *L. corymbifera* en Franche-Comté (Reboux et al., 2001; Reboux et al., 2007; Roussel et al., 2004; Roussel et al., 2005b).

T. vulgaris, est une espèce difficile à cultiver *in vitro* (14% d'échantillons positifs), mais sa présence dans l'environnement agricole n'est pas remise en cause par cette étude car au total 82% des PDF ont des précipitines (31% de PDF positifs + 51% de PDF ayant au moins un arc de précipitines, Tableau 11). Cette espèce pourrait être quantifiée par des méthodes de biologie moléculaire comme la PCR quantitative (qPCR) (Betelli et al., 2013) en adaptant la méthode sur des liquides de rinçage de foin.

Il est difficile d'établir la responsabilité d'un ou plusieurs agents étiologiques dans le PDF, car vraisemblablement l'implication de certaines espèces change au cours du temps et selon les

pays. Il est connu que la composition microbiologique des fourrages dépend des conditions de récolte et de stockage (pluviométrie, type de végétation, pratiques agricoles, type et taille de la ferme) (Gbaguidi-Haore et al., 2009; Gruchow et al., 1981; Reboux et al., 2006a; Roussel et al., 2004; Terho et al., 1987). La communauté de micro-organismes initialement présente dans les fourrages évolue pendant la période de stockage en corrélation avec le taux d'humidité et la température, pouvant ainsi favoriser la croissance d'espèces thermotolérantes comme *L. corymbifera* et *S. rectivirgula* (Festenstein et al., 1965; Gregory et al., 1964). Chacune des espèces impliquées dans le PDF sont potentiellement présentes dans les fourrages en quantité plus ou moins importante selon la date d'échantillonnage (Gbaguidi-Haore et al., 2009). La modernisation des fermes depuis bientôt 15 ans favorise la prolifération des actinomycètes notamment par le changement de conditionnement du foin (balle ronde de forte densité) (Ferri et al., 2003; Ranalli et al., 1999; Reboux et al., 2006a; Roussel et al., 2004). Les efforts pour un meilleur séchage des fourrages, grâce à une sensibilisation des agriculteurs aux problèmes de moisissures et à la modernisation, auraient tendance *a contrario* à favoriser le développement d'espèce comme *W. sebi*.

Dans notre étude, la différence d'implication des diverses espèces (augmentation de l'importance de *W. sebi* et de *S. rectivirgula* et diminution de celle d'*E. amstelodami* et de *L. corymbifera*), est probablement due aussi à une plus grande diversité de patients provenant non seulement de la Franche-Comté (région principalement étudiée dans les études antérieures) mais aussi du centre de la France (Clermont-Ferrand et Saint-Etienne), de Rennes et de Suisse. Les pratiques agricoles exercées dans chacune des régions peuvent diverger. Notamment, les producteurs de lait franc-comtois pour la fabrication du fromage Comté suivent des normes strictes pour l'alimentation du bétail qui se fait principalement par le foin. En comparaison, la pratique de l'ensilage est moins à risque (Arya et al., 2006). De plus, même au sein d'une région, il y a autant de pratiques que d'agriculteurs qui gèrent leur exploitation de manière indépendante (méthodes de travail, organisation de la période de récolte, équipements, etc...) (Dalphin et al., 1991). L'augmentation de la taille des fermes françaises pourrait augmenter le risque de PDF. En effet, au Canada où l'agriculture est quasi industrielle, le risque du PDF est positivement corrélé à la taille de l'exploitation et *S. rectivirgula* reste incontestablement l'agent principal du PDF (Blais Lecours et al., 2012; Cormier et al., 1985; Duchaine et al., 1999).

Le problème de l'identification des agents étiologiques du PDF reste complexe, mais pour les études sur des modèles cellulaires et/ ou animaux, *S. rectivirgula* reste l'agent le plus utilisé

pour induire la PHS (Bellanger et al., 2010; Blanchet et al., 2011; Jimenez-Alvarez et al., 2010; Kim et al., 2010; Park et al., 2010; Schuyler et al., 2000, 2003). Cependant, une étude récente a montré que ce n'était pas le meilleur candidat pour les modèles murins, et que *Pantoea agglomerans* (principal étiologie en Pologne) et *A. fumigatus* permettraient de mieux induire la réponse immunitaire et les lésions tissulaires d'une PHS (Lemieszek et al., 2011).

1.2.L'environnement industriel

La présence de *M. immunogenum* dans les fluides de coupe a été confirmée dans les usines des cas de PDM (usines des cas allemands, usine des cas français (Murat et al., 2012; Tillie-Leblond et al., 2011), et du cas recruté dans le cadre du protocole SOPHIA mais non traité dans ce travail de thèse), confirmant le lien de causalité avec la survenue de la PHS. Il semblerait que la présence de *M. immunogenum*, détectée indifféremment par qPCR ou par culture et quelque soit sa concentration, soit le seul critère utile à l'évaluation du risque de PDM dans une usine. Il est estimé que la contamination par les mycobactéries peut aller jusqu'à 10^6 UFC/ml ou 10^6 équivalents cellules/ml de fluides de coupe (Murat et al., 2012; Shelton et al., 1999) et que plus d'un million d'ouvriers américains sont exposés aux fluides de coupe. Ainsi le risque de développer une PHS est réel, bien que la maladie soit assez peu fréquemment diagnostiquée. Dans la cadre du PDM, la surveillance de la contamination microbiologique des fluides de coupe est importante, car comme cela a été vu pour le PDF, un changement de pratique peut entraîner des variations de la contamination (Reboux et al., 2006a). La contamination des fluides est aussi différente selon la composition du fluide utilisé, du type de biocide, du type de métal usiné et du temps d'utilisation du fluide (Falkinham, 2009; Murat et al., 2012).

L'environnement des fluides de coupe est propice à la mutation génétique et donc à l'apparition potentielle de différents phénotypes puisque les fluides sont traités avec des biocides (activateurs de mutations par pression de sélection). Le nombre de mutations dépend du taux de mutation de l'espèce (communément autour de 10^{-7} pour les mycobactéries), de la vitesse de croissance (les mycobactéries du complexe *M. chelonae/M. abscessus* ont une croissance rapide), et la période de croissance (la cuve de fluide est renouvelée après plusieurs mois d'utilisation). Or, la variation de phénotype chez certaines mycobactéries peut conduire à l'observation d'une différence au niveau de l'immunogénicité, de la pathogénicité et une différence au niveau de la production des anticorps (de Souza and Wiker, 2011; Hernández-

Pando et al., 2012; Stepanova et al., 2012). Par conséquent, les conditions sont réunies pour favoriser les mutations et la vigilance doit être importante. Différents génotypes ont déjà été mis en évidence (Khan et al., 2005), mais aucune étude d'immunogénicité n'a encore été réalisée à ce jour. Cependant, les différents travaux de cette thèse ont montré que les tests sérologiques (électrosynérèse/antigène total et ELISA/antigène recombinant) avaient la même sensibilité lorsqu'ils étaient réalisés avec les sérums de PDM allemands ou avec les sérums des cas provenant de la même usine que la souche de *M. immunogenum* à partir de laquelle avaient été produits les différents types d'antigènes.

Les antigènes recombinants issus de cette souche de *M. immunogenum* permettent probablement de faire le diagnostic de la maladie, quelque soit la provenance des patients. Ceci devra être vérifié de façon prospective.

1.3.Conclusion :

L'évolution des techniques industrielles et agricoles entraîne une modification de la flore microbienne, et la surveillance constante des substrats agricoles ou industriels (où se développent les micro-organismes) est indispensable pour adapter le panel d'antigènes à tester pour les diverses techniques sérologiques. Une analyse environnementale systématique chez les nouveaux patients diagnostiqués n'est pas nécessaire mais une étude globale tous les 10 ans semble adaptée dans le milieu agricole. Les pratiques et la contamination des fourrages francs-comtois et suisses sont assez bien connues et la poursuite du recrutement de nouveaux patients des centres de Rennes, Saint-Etienne et Clermont-Ferrand nous donnera un aperçu plus global de la situation française. La surveillance dans le milieu industriel doit être plus fréquente à cause de l'utilisation massive de biocides et le risque de changement de la flore microbienne et de mutations est sans doute plus considérable. Le développement ces dernières années de nouvelles méthodes de biologies moléculaires permettant la détection de l'ADN des espèces présentes dans l'air ou dans un substrat (Betelli et al., 2013; Blais Lecours et al., 2012; Schäfer et al., 2011; Zeng et al., 2004), peuvent faciliter la surveillance des environnements professionnels.

2. Caractéristiques des antigènes identifiés

Au total 71 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse (17 pour *M. immunogenum*, 28 pour *S. rectivirgula*, 26 pour *Aspergillus sp.*) et 28 antigènes recombinants ont été produits : 6 issus de *M. immunogenum*, 17 issus de *S. rectivirgula* et 5 issus d'*Aspergillus sp.*

2.1. Comparaison aux études antérieures sur *S. rectivirgula*

2.1.1. Antigènes sécrétés vs antigènes totaux purifiés

Les 28 protéines de *S. rectivirgula* identifiées incluent 12 hydrolases (dont 6 sont des peptidases), 8 oxydo-réductases, 5 protéines ayant une fonction liée à une activité de transport, 1 lyase, 1 transférase et 1 protéine dont la fonction n'est pas connue (§ III 0.0.0.□, pages 154-155). D'après les prédictions de la localisation cellulaire, la moitié de ces enzymes sont cytoplasmiques. La plupart des études sur les antigènes de *S. rectivirgula* utilisaient les antigènes issus du filtrat de culture, donc des antigènes sécrétés de *S. rectivirgula* (Cf Tableau 1). Ce choix était notamment justifié par une étude comparant les résultats d'ELISA avec des antigènes mycéliens et des antigènes sécrétés qui avait montré que le taux d'anticorps détecté était plus élevé pour les tests utilisant les antigènes sécrétés (Ojanen et al., 1980). Ceci n'est pas toujours vrai pour l'étude d'autres espèces (Ojanen et al., 1982). Mais nous avons pu montrer, tout comme l'étude de Kaukonen (Kaukonen et al., 1996), que les antigènes cytoplasmiques et les protéines membranaires sont également immuno-réactifs et que certains d'entre eux peuvent permettre le diagnostic. Cette étude a permis de faire tomber le concept couramment accepté que seules les protéines sécrétées sont à l'origine de la production d'anticorps spécifiques de la maladie. Ceci est confirmé ici grâce à l'identification précise des protéines par spectrométrie de masse.

2.1.2. Poids/pH

Un groupe de protéines avec des points isoélectriques compris entre 5,37-5,67 et des poids moléculaires compris entre 25-45kDa, et un autre groupe avec des points isoélectriques situés entre 6,38-6,64 et des poids moléculaires entre 55-60kDa avaient été mis en évidence précédemment par électrophorèse bidimensionnelle (Kurup, 1987). Pour les protéines que nous avons identifiées, les points isoélectriques sont surtout situés entre 4,7 et 5,5 et les poids

moléculaires sont compris principalement entre 30 et 60kDa. Une protéine sécrétée de 60kDa avait été proposée pour le diagnostic du PDF (Iranitalab et al., 1989; Kumar et al., 1993), cette protéine pourrait être apparentée à la protéase SR21 retrouvée dans notre étude. Cependant, le Western blot n'ayant pas révélé une grande spécificité de cette protéine pour la maladie, elle n'a pas été produite en antigène recombinant et son utilité diagnostique n'a donc pas été testée. La protéine SR13, une protéine extracellulaire précurseur d'une lysozyme pourrait également être apparentée à la protéine de 28 kDa décrite dans l'étude de Kumar et d'Aznar (Aznar et al., 1988; Kumar et al., 1993) ou celle de Kurup de 29 kDa (Kurup et al., 1981). Une protéine immuno-réactive spécifique du PDF de 51kDa a été mise en évidence (Kurup et al., 1981), et selon le poids moléculaire, elle pourrait correspondre à la protéine SR15 (levanase), bien que celle-ci ne semble pas être une protéine sécrétée. Aznar (1988) met aussi en évidence une protéine de 49kDa pouvant correspondre à deux protéines cytoplasmiques de notre étude SR18 (une oxydo-réductase) et SR24 (une peptidase), mais ces protéines n'ont pas été produites en antigènes recombinants. Melinn montre que deux protéines de 36 et 46 kDa entre autres, peuvent permettre le diagnostic du PDF (Melinn and McLaughlin, 1992) : elles pourraient correspondre aux protéines SR22 et SR12. La protéine recombinante SR22 en combinaison avec deux autres antigènes est efficace pour le diagnostic. Par ailleurs, des protéines de faible poids moléculaire (protéines de 11, 12 ou 16kDa) ont été impliquées dans les réactions immunitaires (Iranitalab et al., 1989; Kurup et al., 1984; Mundt et al., 1996). Celles-ci n'ont pas été retrouvées, les protéines identifiées dans notre étude sont rarement en-dessous de 30kDa.

2.1.3. Fonctions enzymatiques

Les toutes premières études tentant de caractériser les antigènes de *S. rectivirgula* ont montré que la fraction antigénique avait une activité qualifiée de « chymotrypsine » (Fletcher et al., 1970; Nicolet et al., 1977; Nicolet and Bannerman, 1975; Schällibaum et al., 1977) et estérase (Kurup et al., 1987; Nicolet et al., 1977). Notre étude apporte des précisions à ces observations anciennes. En effet, parmi les 28 protéines que nous avons identifiées, il y a 6 protéases et une estérase (SR28, glycérophosphoryl diester phosphodiesterase).

Dans les anciens travaux de Kurup, aucune activité de N-acétyl- β -glucosidase n'avait été détectée dans les souches finlandaise ou américaine de *S. rectivirgula* testées. Or Ramasamy met en évidence une protéine de 66kDa avec une activité de β -glucosidase (Ramasamy et al., 1987). Mais les activités enzymatiques d'une espèce peuvent être différentes d'une souche à

l'autre (Kurup et al., 1987). La protéine identifiée par Ramasamy peut tout à fait correspondre à la protéine SR9 de notre étude, même si les points isoélectriques de la protéine ne coïncident pas, car une protéine peut avoir des isoformes de différents points isoélectriques (Mundt et al., 1996). Une activité d'alkaline phosphatase avait été identifiée chez certaines souches d'*A. fumigatus* et *S. rectivirgula* (Kurup et al., 1987). La protéine SR8 dans notre étude présente une activité de ce type.

Finalement, d'après ces anciennes études jamais plus d'une trentaine d'antigène chez *S. rectivirgula* n'a été reconnu par les anticorps : 29 dans l'étude de Fletcher (Fletcher et al., 1970), 27 dans l'étude de Kurup (Kurup et al., 1981) et 28 pour notre étude. On peut imaginer que les protéines antigéniques identifiées varient en fonction des méthodes d'extraction, de culture, de souches, d'analyses, d'anticorps cibles et de l'origine des patients. Notre étude ne révèle que 28 protéines antigéniques qui ne sont probablement qu'une petite partie des antigènes de *S. rectivirgula*. Cependant, grâce aux nouvelles technologies utilisées (séquençage ADN, spectrométrie de masse), elle est la première à identifier et caractériser des protéines impliquées dans les réactions immunologiques des PHS.

2.2. Implication dans d'autres pathologies / facteur de virulence

2.2.1. Les hydrolases

➤ Les protéases

L'identification de protéases : SR2, SR4, SR14, SR21, SR24 et SR27 pour *S. rectivirgula*, la cytosol aminopeptidase pour *M. immunogenum* et une sérine protéase, une hydrolase et une sous-unité α du protéasome pour *Aspergillus*, n'est pas surprenante puisque cette famille d'enzymes est connue pour être facteur de virulence chez de nombreux pathogènes fongiques dont *Aspergillus* (Hogan et al., 1996; Monod et al., 2002; Monod et al., 1999). Des sérines protéases ont été identifiées chez *Thermoactinomyces candidus* comme antigénique et probablement impliquées dans l'induction de la réponse inflammatoire dans le PDF (Roberts et al., 1983).

La cytosol aminopeptidase identifiée chez *M. immunogenum* est une enzyme jouant un rôle dans la digestion des protéines. Les aminopeptidases représentent une large famille d'enzymes dont l'action est de digérer les peptides en hydrolysant l'extrémité N-terminal des acides aminés. D'après la littérature, la cytosol aminopeptidase n'est pas connue pour être une

protéine antigénique, mais d'autres aminopeptidases comme la leucine aminopeptidase ont été identifiées comme étant antigéniques et utiles dans le diagnostic d'infections parasitaires (Marcilla et al., 2008). Par ailleurs, une activité de leucine aminopeptidase avait été identifiée dans certaines souches d'*A. fumigatus* et *S. rectivirgula* de l'étude de Kurup (Kurup et al., 1987).

La présence de ces protéinases soulève l'hypothèse d'une éventuelle croissance des micro-organismes dans le poumon conduisant à la libération de ces enzymes et donc la production d'anticorps anti-protéinases chez les patients (Roberts et al., 1983).

➤ *Les glycosidases*

La protéine SR9 est une N-acétylglucosaminidase connue chez *Streptococcus pneumoniae* pour dégrader les glycoconjugués des tissus pulmonaires afin de s'en servir comme source de carbone et assurer sa croissance à l'intérieur de l'hôte (Burnaugh et al., 2008). Nous avons identifié un précurseur de lysozyme (SR13), une autre glycosidase, chez *S. rectivirgula*. Or, chez *S. pneumoniae* le rôle d'une protéine de type lysozyme a été étudiée dans le processus de virulence (Huang et al., 2011).

➤ *Les phosphatases*

Une alcaline phosphatase (homologie avec SR8) chez *Pseudomonas aeruginosa* jouerait un rôle dans la virulence en coordination avec d'autres enzymes (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995).

➤ *Les estérases*

Une lipase extracellulaire dont la fonction est l'hydrolyse des lipides a été identifiée chez *Aspergillus*, or ce type d'enzyme chez les pathogènes opportunistes peut contribuer à leur persistance et virulence dans les tissus humains (Hube et al., 2000).

2.2.2. Les oxydoréductases

Les superoxydes dismutases (SOD) et les catalases sont des enzymes qui permettent la protection contre le stress oxydatif et contribuent à la survie et la persistance du micro-organisme dans l'hôte (Das et al., 2008). Elles sont considérées comme des facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* et *A. fumigatus* (Das et al., 2008; Mandell, 1975; Rementeria et al., 2005). Deux catalases ont été identifiées par spectrométrie de masse chez *S.*

rectivirgula (SR3 et SR17, produites en antigène recombinant) et chez *M. immunogenum* (non produite en antigène recombinant). Ce type d'enzyme recombinante a aussi été démontré comme biomarqueur de toutes les formes d'aspergillose (Sarfati et al., 2006). La SOD a été identifiée chez *M. immunogenum* et *Aspergillus* dans notre étude. Elle a également été révélée par l'équipe de Gupta chez *M. immunogenum* (Gupta et al., 2009) et chez *A. fumigatus* comme allergène (Bowyer and Denning, 2007; Cramer et al., 1996; Rementeria et al., 2005). La spectrométrie de masse a permis d'identifier deux SOD chez *Aspergillus*. Il est connu que deux types de SOD existent, l'une porteuse Cu-Zn considérée comme un antigène (interaction avec les IgA) et l'autre porteuse de Fe-Mn (autrement connue sous le nom de Asp f6) (Rementeria et al., 2005) et plutôt considérée comme un allergène (interaction avec les IgE).

L'acyl-CoA déshydrogénase et l'acyl-CoA déshydrogénase FadE sont deux enzymes impliquées dans le cycle oxydatif des acides gras. Elles sont donc essentielles pour le développement et la croissance de l'organisme.

La DHD identifiée chez *M. immunogenum* est impliquée dans la décomposition des lipoamides en dihydrolipoamides. Elle n'est pas mentionnée dans la littérature en tant qu'antigène, mais une protéine voisine, par sa fonction physiologique, la dihydrolipoamide déshydrogénase, est connue pour être un facteur de virulence chez *Mycobacterium tuberculosis* et aussi chez un virus (Deb et al., 2002; Wu et al., 2002). Par ailleurs, nous avons observé que les protéines recombinantes DHD de *M. immunogenum* et SR12 de *S. rectivirgula* présentent des homologies de séquences (95% de recouvrement, travaux non développés dans ce document). Mais alors que la DHD est un biomarqueur performant pour le diagnostic du PDM, SR12 n'est pas efficace pour le diagnostic du PDF dans cette série (AUC de 0,69, pourcentage de sujets correctement classés 66%, sensibilité de 90%, spécificité de 41%). Cependant l'antigène recombinant DHD issu de *M. immunogenum* a été testé en ELISA avec des sérums de PDF et a permis de discriminer les malades PDF des témoins exposés. L'hypothèse d'épitopes communs entre les antigènes de *M. immunogenum* et de *S. rectivirgula*, permettant le diagnostic par la recherche d'anticorps spécifiques, est posée.

La NAD-dépendante formate déshydrogénase, la malate déshydrogénase ainsi qu'une isomérase, la glucose-6-phosphate isomérase (G6Pi), sont trois enzymes d'*Aspergillus* produites dans notre étude en antigènes recombinants, qui ont été aussi identifiées précédemment comme biomarqueurs de l'ABPA (Aspergillose Bronchopulmonaire Allergique) (Singh et al., 2010a). Dans cette étude, ces protéines ont été identifiées comme

biomarqueur grâce à une démarche immunoprotéomique comparable à la notre, mais basée sur la détection des immuno-protéines par Western blot IgE avec des sérums de patients atteints d'ABPA. La malate déshydrogénase ainsi que la sous-unité du protéasome ont aussi été détectées par des sérums de patients atteints d'aspergillose invasive (Shi et al., 2012).

2.2.3. Les isomérases

La protéine SR22, une *ketol-acid reductoisomerase* est également un facteur de virulence chez *M. tuberculosis* (Grandoni et al., 1998).

2.2.4. Les protéines de transport

La protéine SR5 issue de *S. reactivigula*, une F0F1 ATP synthase, avait été identifiée comme un antigène de *M. immunogenum* dans l'étude de Gupta (Gupta et al., 2009). Cette dernière n'a pas été identifiée dans notre propre étude sur les antigènes du PDM, mais elle est aussi connue comme protéine immuno-réactive dans les études sur la brucellose (Boigegrain et al., 2005; Ko et al., 2012; Zhao et al., 2011).

La protéine SR6, une *twin-arginine translocation pathway signal protein* impliquée dans la voie de translocation de l'arginine a été identifiée comme une voie indispensable à la virulence chez *M. tuberculosis* (Feltcher et al., 2010; Ochsner et al., 2002).

2.2.5. Les lyases

La protéine SR7 est une isocitrate lyase impliquée dans la synthèse d'hydrates de carbone. Elle est utile dans la persistance de *M. tuberculosis* dans le poumon puisqu'elle participe à la nutrition dans des conditions de carences alimentaires extrêmes (Lorenz and Fink, 2001, 2002). La voie enzymatique dont fait partie l'isocitrate lyase (cycle du glyoxylate) est aussi reconnue comme un facteur de virulence (Staib et al., 2010).

L'énolase est un allergène retrouvé chez de nombreux micro-organismes (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Alternaria alternate*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*) (Benndorf et al., 2008; Bowyer and Denning, 2007). Elle est nommée en tant qu'allergène Asp f22 chez *A. fumigatus* (Rementeria et al., 2005).

2.2.6. Les transférases

La sérine hydroxyméthyltransférase produite en antigène recombinant chez *M. immunogenum* ne permet pas une bonne discrimination des patients atteints de PDM. Cette enzyme n'est pas connue dans la littérature comme antigène ni facteur de virulence.

2.3. Conclusion et perspectives :

Malgré les différences taxonomiques des trois micro-organismes étudiés - une mycobactérie, un actinomycète et une moisissure- des protéines immuno-réactives communes ont été identifiées. Certaines similitudes sont également observées avec des agents infectieux humains responsables d'infections pulmonaires (*M. tuberculosis*, pneumocoque, ...). Cependant, une PHS n'est pas une infection mais une maladie de type allergique sans développement du micro-organisme dans l'hôte. *A. fumigatus* est un cas à part puisque cette moisissure est responsable d'allergies et d'infections. La présence d'enzymes telles que la N-acétylglucosaminidase (SR9), l'isocitrate lyase (SR7) et des protéases sécrétées chez *S. rectivirgula* ou bien la présence de SOD, de catalases, de DHD chez *M. immunogenum*, pourraient permettre leur survie dans le poumon. En effet, la présence de ces protéines témoigne d'un métabolisme actif. Par ailleurs, une étude ancienne montre que des souches de *S. rectivirgula* retrouvées dans des biopsies de patients étaient cultivables (Treuhaff et al., 1979). Ces observations bousculent le concept de l'absence de survie des micro-organismes responsables de PHS dans les voies respiratoires. En effet, les micro-organismes que nous avons étudiés sont munis de toutes les « armes » pour persister dans le poumon, notamment par la présence de protéinases (Roberts et al., 1983).

Il est communément admis que les protéines immuno-réactives ou antigènes ne sont pas des facteurs de virulence. Mais une étude ancienne montre au contraire qu'une enzyme purifiée issue de *S. rectivirgula* pourrait jouer un rôle dans les dommages tissulaires et dans la production des anticorps entraînant le dépôt d'immuns complexes (Schällibaum et al., 1977). Ainsi, certaines des 28 protéines immuno-réactives de *S. rectivirgula* pourraient être testées sur des modèles animaux et cellulaires pour étudier les mécanismes initiaux et les voies cellulaires impliqués dans le déclenchement de la maladie, comme cela a déjà été réalisé par notre laboratoire avec des extraits totaux de micro-organismes (Bellanger et al., 2013; Bellanger et al., 2010).

3. Le diagnostic sérologique utilisant les antigènes recombinants

Dans le cadre du diagnostic sérologique du PDM, les antigènes somatiques utilisés en électrosynérèse et les deux antigènes recombinants acyl-CoA déshydrogénase et DHD utilisés en combinaison par test ELISA, sont efficaces pour dépister les cas de PDM provenant de différents sites industriels. Dans une étude antérieure réalisée au sein du laboratoire de Mycologie de Besançon, un extrait antigénique total de *M. immunogenum* avait été testé également en ELISA avec les mêmes sérums (les 14 cas français), et une sensibilité de 92,31% et une spécificité de 100% avait été observées (Tillie-Leblond et al., 2011). Dans notre travail, l'utilisation d'antigènes recombinants se révèle en moyenne aussi sensible (92,86% pour la SOD et la DHD) ou plus sensible (100% acyl-CoA déshydrogénase) mais moins spécifique que l'utilisation d'un extrait antigénique total (entre 60-80%). L'utilisation d'antigène recombinant possède l'avantage de standardiser les tests, même si ici elle ne donne pas les mêmes niveaux de spécificité que l'extrait total de mycobactérie (100%). Les antigènes recombinants ne reflètent pas la complexité de l'extrait antigénique et leur utilisation peut faire perdre de la sensibilité ou de la spécificité au test (Busse et al., 2008; Melinn and McLaughlin, 1992). Dans notre cas, on peut supposer que la combinaison des deux antigènes recombinants (acyl-CoA déshydrogénase et DHD) pourra améliorer aussi la spécificité du test. Pour l'instant, la spécificité du test utilisant ces antigènes seuls ou en combinaison n'a pas pu être confirmée, l'étude de validation sur les cas allemands restant incomplète puisqu'aucun témoin exposé n'a été recruté.

Les travaux sur le sérodiagnostic du PDF montrent que la combinaison des trois antigènes recombinants issus de *S. reactivigula* (SR1FA, SR17 et SR22) et que la combinaison des deux antigènes recombinants d'*Aspergillus* (GLPV et G6Pi), ont des sensibilités comprises entre 83%-89% et des spécificités entre 77%-84%. Les efforts de recrutement des 6 principaux centres investigateurs du protocole PHRC SOPHIA ont permis d'obtenir le sérum de 43 cas de PDF et 42 témoins (52 PDF recrutés mais 43 sérums disponibles au moment des analyses). Ces effectifs sont remarquables pour ce type de maladie, et permettent d'assurer la robustesse de nos tests statistiques.

L'utilisation des antigènes recombinants en test ELISA permet d'améliorer la sensibilité par rapport à un test ELISA avec des antigènes purifiés de *S. reactivigula* (sensibilité de 70%).

Les résultats de l'analyse en courbe ROC des ELISA-IgG de l'étude antérieure de Reboux *et al.*, avaient montré des AUC faibles pour des antigènes totaux de différents micro-organismes (Reboux *et al.*, 2007). L'utilisation des antigènes recombinants seuls ou en association apporte une standardisation et une amélioration des performances du test. D'autre part, des combinaisons permettant d'améliorer les performances diagnostiques peuvent encore être testées. Par exemple, réaliser le test ELISA en mélangeant des antigènes recombinants dans le même puits de la plaque, plutôt que d'additionner les scores, pourrait avoir un intérêt (Johnson *et al.*, 1992; List *et al.*, 2010). Le mélange des antigènes totaux avec les antigènes recombinants (Busse *et al.*, 2008) est probablement aussi une perspective intéressante, puisque les antigènes totaux apportent des informations supplémentaires de par leur nature complexe (mélange d'antigènes) et par la conservation des protéines natives glycosylées (LaBerge and Stahmann, 1966; Mundt *et al.*, 1996).

Globalement, les sensibilités obtenues avec les antigènes recombinants pour le diagnostic du PDM sont meilleures que celles du PDF. Ceci peut s'expliquer car l'environnement industriel est caractérisé par une communauté microbienne peu diversifiée alors que l'environnement agricole est plus complexe, avec une variété plus importante de micro-organismes. En effet, les résultats des électrosynérèses montrent que les patients PDM sont sensibilisés quasi exclusivement à *M. immunogenum* (peu de sensibilisation aux espèces *P. oleovorans*, *B. simplex* et *F. solani*) alors que les patients PDF peuvent cumuler une sensibilisation à plusieurs micro-organismes. La combinaison des deux antigènes recombinants de *M. immunogenum* montre une bonne corrélation avec les tests d'immuno-précipitation utilisant un extrait de *M. immunogenum*, de même que la combinaison des trois antigènes recombinants SR1FA, SR17 et SR22 avec l'interprétation des résultats de l'électrosynérèse utilisant les antigènes de *S. rectivirgula*. La corrélation est moins évidente avec les antigènes recombinants d'*Aspergillus*. En effet, l'étude de validation sur un plus grand nombre de patients montre une baisse de la sensibilité et de la spécificité par rapport à la première étude publiée. La plus grande diversité de patients peut expliquer que la sensibilisation à ce type d'antigène soit moins importante.

Nos résultats montrent que le test ELISA utilisant des antigènes recombinants pourrait être une bonne technique de dépistage, et pourrait être couplé aux techniques d'immuno-précipitation, qui sont des techniques de confirmation.

Les tests ELISA pour le diagnostic du PDF pourraient être améliorés par association de plusieurs antigènes recombinants issus de plusieurs espèces, comme c'est le cas pour les techniques d'immuno-précipitation (Fenoglio et al., 2007; Reboux et al., 2007). Les patients PDF de cette étude sont particulièrement immunisés en électrosynérèse contre *W. sebi* et le dosage des IgG spécifiques anti-*W. sebi* en ELISA discrimine de manière satisfaisante les patients des témoins. Le développement d'antigènes recombinants issus de cette espèce est envisagé, d'autant plus qu'en Finlande, elle est aussi reconnue dans la survenue du PDF (Lappalainen et al., 1998). Des antigènes issus de *L. corymbifera* sont en cours de production et de validation au sein de notre laboratoire et viendront compléter le panel.

La difficulté des tests sérologiques réside encore dans l'optimisation de la spécificité puisqu'un nombre non négligeable de sujets asymptomatiques ont un niveau important d'IgG spécifiques aux micro-organismes, et il est difficile d'établir un seuil optimal (De Champs et al., 1997; Konishi et al., 1985; Reboux et al., 2007). La population générale est exposée à une multitude de moisissures et actinomycètes. Un grand nombre de ces micro-organismes prolifère dans les maisons (aliments, plâtre, papiers peints, pièces humides, etc) et peut être à l'origine d'une production d'IgG. Cependant, les personnes exposées dans leur environnement professionnel (agriculteurs, ouvriers des scieries) ont d'autant plus d'IgG sériques qu'une plus forte exposition est observée (Eduard, 1995). Les tests utilisant les antigènes d'*Aspergillus* posent encore plus de difficultés parce que l'espèce *A. fumigatus* est largement présente dans l'environnement, et on estime que plusieurs centaines de spores sont inhalés par jour et par personne (Rementeria et al., 2005). De plus, elle est associée à d'autres maladies : aspergillose invasive, ABPA, allergies, parfois même associée à des cas de tuberculose ce qui pourrait donner un faux diagnostic de PDF (Rottoli et al., 1995).

La présence de ces IgG n'est pas toujours associée à une maladie et la présence d'IgG ne prédit pas non plus un risque accru de développer la maladie plus tard (Cormier et al., 2004). Le taux d'IgG varie aussi en fonction de la nationalité des patients (comparaison d'agriculteurs finlandais et américains (Kurup et al., 1987)), de facteurs génétiques et du moment où le sérum a été prélevé (Eduard, 1995; Hébert et al., 1985; Rautalahti et al., 1990). Dans notre étude, la plupart des cas et témoins PDF et PDM viennent de la même ferme/même usine. Nos résultats montrent donc qu'à exposition égale, le niveau d'anticorps spécifique est globalement plus faible chez les témoins. Ainsi, les tests de sérodiagnostic développés ne sont pas seulement des marqueurs d'exposition, mais bien de vrais outils de dépistage de la maladie.

Dans ce travail, nous avons réalisé des essais préliminaires permettant de définir des conditions satisfaisantes (conservation et composition des solutions) pour la mise en place d'un test ELISA prospectif au sein du laboratoire de Mycologie de Besançon. Le test est assez reproductible pour envisager de transposer telle quelle cette technique en routine hospitalière, mais des essais restent encore à faire pour améliorer la stabilité de l'ELISA (test de conservation des plaques coatées, et des pools de sérums de référence et pool positif). Une alternative à l'ELISA serait l'utilisation de la technique du Dot-Blot ou DIBA (*Dot-ImmunoBinding assay*) qui est une technique très reproductible. En effet, les membranes de nitrocellulose fixée avec les antigènes peuvent être conservées plus de 6 mois à -20°C sans affecter la reproductibilité (Mäntyjärvi and Kurup, 1988). Une autre alternative pourrait être la technique du Western blotting 1D avec les différents antigènes recombinants, car les membranes peuvent être conservées à 4°C pendant plusieurs mois (données personnelles). Pour le diagnostic de routine, ces techniques seraient plus faciles à mettre en œuvre que l'ELISA. En effet, l'ELISA nécessitant de faire l'analyse au moins en duplicat, notre plan de plaque à 96 puits élaboré pour la routine hospitalière comporte au maximum 8 antigènes, et permet de tester 4 sérums seulement. Le dot-blot permettrait de tester un nombre plus important d'antigènes à la fois avec une même quantité de sérum, et réduire le temps de manipulation. L'avantage de l'ELISA est la lecture automatisée de la plaque alors que l'interprétation du dot-blot se fait de manière plus subjective. Cette technique de Dot-blot correspondrait plutôt à une technique de confirmation (comme le Western blot) et non de dépistage, et pourrait faire l'objet de développements intéressants.

3.1. Conclusion et perspectives

L'utilisation d'antigènes recombinants pour le diagnostic ELISA des PHS améliore les performances du test en comparaison de l'utilisation des antigènes totaux et purifiés, tout en apportant une standardisation dans la réalisation de ces antigènes. Pour les antigènes recombinants du PDM, les résultats sont équivalents. La combinaison de plusieurs antigènes recombinants améliore davantage les performances diagnostiques. Par ailleurs, la sensibilité et/ou la spécificité pourraient être davantage augmentées pour le PDF en développant des antigènes recombinants issus d'autres espèces comme *W. sebi* et *L. corymbifera* (actuellement en cours d'étude). Et ainsi un panel d'antigènes recombinants pourraient être testés en ELISA, de la même manière qu'on teste actuellement un panel d'antigènes totaux avec les tests

d'immuno-précipitation (Fenoglio et al., 2007; Reboux et al., 2007). D'autres techniques utilisant les antigènes recombinants produits, tel que la technique du Dot blot, pourraient être développées.

4. Autres tests sérologiques contribuant à l'amélioration du diagnostic du PDF

Les IgG restent la classe d'anticorps la plus couramment employée pour le diagnostic des PHS, mais les IgA peuvent jouer un rôle dans la discrimination des patients et des témoins exposés asymptomatiques (Aznar et al., 1988; Gari et al., 1985; Ojanen, 1992; Solal-Céligny et al., 1982). Une étude antérieure conduite par notre laboratoire avait cependant montré que le test ELISA-IgA réalisé avec des antigènes totaux de micro-organismes (*L. corymbifera*, *E. amstelodami*, *W. sebi*, *S. rectivirgula*) n'était pas efficace pour discriminer les patients PDF des témoins avec des AUC inférieures à 0,65 (Reboux et al., 2007). L'étude actuelle, utilisant des antigènes purifiés montre que le dosage des IgA spécifiques pour trois espèces, *L. corymbifera*, *E. amstelodami* et *S. rectivirgula* (et sa charge immunitaire en IgA) présente un intérêt diagnostique du PDF (AUC > 0,75) expliqué en partie par le protocole de purification des protéines. L'étude d'Ojanen montre que le dosage des IgA pour l'espèce *A. fumigatus*, cumulé aux résultats de dosage des IgG de *T. vulgaris*, peut permettre le diagnostic d'un PDF, avec un pourcentage de sujets correctement classés de 94% (Ojanen, 1992). Les IgA semblent jouer un rôle non négligeable dans la recherche d'anticorps spécifiques de la maladie. Dans un premier temps, les antigènes recombinants développés sur la base de la détection avec des IgG, pourraient être testés avec un anticorps secondaire de détection spécifiques aux IgA, permettant de savoir si les antigènes impliqués dans les complexes antigènes-IgG et antigènes-IgA sont les mêmes. Par la suite, la démarche utilisée pour le développement des antigènes recombinants, basée dans ce travail sur la recherche des IgG spécifiques, pourrait aussi être réalisée avec la recherche d'IgA spécifique. Par le passé, il a été montré que les sous-classes d'IgG pouvaient aussi permettre le diagnostic du PDF, les IgG₃ selon Stokes et ses collaborateurs (Stokes et al., 1981) et les IgG₂ selon Mundt (Mundt et al., 1996). La sous-classe IgG₁ est la classe majeure des sous-classes d'IgG mais elle représenterait seulement l'exposition et non la maladie (Stokes et al., 1981). La recherche de la sous-classe des IgG₄ spécifiques des antigènes de *S. rectivirgula* par la méthode DELFIA® n'a pas permis de mettre en évidence une spécificité dans la maladie du PDF.

4.1. Conclusion et perspectives :

En plus d'un test ELISA basé sur la recherche d'IgG, la recherche d'IgA est envisagée et reste à être testée. A contrario, la recherche de sous-classes d'IgG ne semble pas intéressante pour le diagnostic des PHS. En revanche, le bénéfice dû à la mise au point de la technique DELFIA® pourra être transposé pour la recherche d'anticorps dans d'autres pathologies étudiées au laboratoire (broncho-pneumopathie chronique obstructive, asthme).

Les tests ELISA développés dans ce travail doivent encore faire l'objet d'études pour améliorer encore la standardisation (stabilité, conservation, etc). Afin de démontrer leur utilité comme test de dépistage en diagnostic de routine, une étude prospective a été initiée au sein du laboratoire de Mycologie du CHU Jean Minjoz de Besançon. La valorisation des tests ELISA mis au point par un transfert vers l'industrie, pour le développement d'un kit commercialisable, est envisagée. En effet, les tests sérologiques pour le diagnostic des PHS sont des demandes courantes dans les laboratoires d'analyse médicale, et les tests actuels utilisant des antigènes totaux ne répondent pas au besoin de standardisation des laboratoires.

5. Conclusion générale

Les PHS sont principalement des maladies professionnelles et elles ont un impact psychologique et économique important. Il est primordial de les dépister rapidement et de façon fiable. Un patient avec un diagnostic confirmé de PDM se verra perdre toute chance d'évolution de carrière, contraint à des aménagements de poste ou bien à l'arrêt total de son activité. Pour un agriculteur avec un PDF diagnostiqué, le réaménagement de son lieu de travail par la construction d'un bâtiment moderne et aéré est un investissement difficile à financer, et la reconversion professionnelle est difficilement évoquée.

Ce travail de thèse permet une nette progression dans le diagnostic des PHS grâce au développement de tests sérologiques innovants, utilisant des antigènes recombinants. Il ne change cependant pas la manière de procéder au diagnostic final. Seule l'association des différents critères cliniques, radiologiques, fonctionnels et immunologiques permettent d'établir le diagnostic de PHS, qu'elle soit d'origine professionnelle ou non.

Dans ce travail de thèse, les performances diagnostiques de 28 antigènes recombinants issus de trois micro-organismes et impliqués dans deux PHS ont été étudiées. Deux antigènes recombinants issus de *M. immunogenum* s'avèrent performants pour le diagnostic du PDM, et une validation externe a permis de confirmer les résultats. Cinq antigènes recombinants sont performants pour le diagnostic du PDF (2 issus d'*Aspergillus*, 3 issus de *S. rectivirgula*) et une étude prospective a été initiée très récemment pour valider leur utilisation dans un test ELISA de routine. D'autres antigènes recombinants issus de *L. corymbifera* (déjà en cours de production) et de *W. sebi* viendront compléter le panel d'antigènes pour l'élaboration d'un test ELISA global et standardisé. Des améliorations techniques pour un usage de ce test en routine hospitalière ont été apportées, mais d'autres paramètres restent à étudier pour une application à échelle industrielle dans le cadre d'un kit commercialisable.

Par ailleurs, cette étude, grâce à l'identification des protéines immuno-réactives par spectrométrie de masse, permet d'améliorer les connaissances sur les antigènes notamment sur l'existence d'éventuels épitopes communs aux différentes protéines des différents micro-organismes. L'identification des protéines impliquées dans les interactions initiales entre agents étiologiques et cellule de l'hôte, et la meilleure connaissance de leur fonction ouvrent également de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes physiopathologiques et des voies cellulaires impliquées dans les PHS.

VII. Bibliographie

- Aberer, W., M. Woltsche, I. Woltsche-Kahr, and B. Kränke, 2001, IgG antibodies typical for extrinsic allergic alveolitis--an inter-laboratory quality assessment: *Eur J Med Res*, v. 6, p. 498-504.
- Agache, I. O., and L. Rogozea, 2013, Management of hypersensitivity pneumonitis: *Clin Transl Allergy*, v. 3, p. 5.
- American Thoracic Society, 1998, Respiratory health hazards in agriculture. Medical section of the American lung association.: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 158, p. S1-S76.
- Amner, W., C. Edwards, and A. J. McCarthy, 1989, Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*: *Appl Environ Microbiol*, v. 55, p. 2669-74.
- Ando, M., K. Konishi, R. Yoneda, and M. Tamura, 1991, Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan.: *J Allergy Clin Immunol*, v. 87, p. 1002-9.
- Aquino-Galvez, A., A. Camarena, M. Montaña, A. Juarez, A. C. Zamora, G. González-Avila, M. Checa, G. Sandoval-López, G. Vargas-Alarcon, J. Granados, A. Pardo, J. Zúñiga, and M. Selman, 2008, Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis: *Exp Mol Pathol*, v. 84, p. 173-7.
- Arya, A., K. Roychoudhury, and C. P. Bredin, 2006, Farmer's lung is now in decline: *Ir Med J*, v. 99, p. 203-5.
- Aznar, C., P. M. Andre, J. Deunff, and R. Robert, 1988, Investigation of human immune response to *Micropolyspora faeni* antigens by enzyme-linked immunoelectrodiffusion assay and immunoblotting.: *J Clin Microbiol*, v. 26, p. 443-7.
- Bakalova, S., A. Doycheva, I. Ivanova, V. Groudeva, and R. Dimkov, 2007, Bacterial microflora of contaminated metalworking fluids: *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 21, p. 437.
- Bamdad, S., 1980, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG antibodies in farmers' lung disease: *Clin Allergy*, v. 10, p. 161-71.
- Bang, K. M., D. N. Weissman, G. A. Pinheiro, V. C. Antao, J. M. Wood, and G. Syamlal, 2006, Twenty-three years of hypersensitivity pneumonitis mortality surveillance in the United States: *Am J Ind Med*, v. 49, p. 997-1004.
- Beckett, W., M. Kallay, A. Sood, Z. Zuo, and D. Milton, 2005, Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental mycobacteria.: *Environ Health Perspect*, v. 113, p. 767-70.
- Behrens, T., H. Pohlabein, B. Mester, I. Langner, N. Schmeisser, and W. Ahrens, 2012, Exposure to metal-working fluids in the automobile industry and the risk of male germ cell tumours: *Occup Environ Med*, v. 69, p. 224-6.
- Bellanger, A. P., J. R. Pallandre, C. Borg, S. Loeffert, H. Gbaguidi-Haore, and L. Millon, 2013, Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis (actinomycetes, mycobacteria and filamentous fungi) induce a Th1-polarized immune response: *Clin Vaccine Immunol*.
- Bellanger, A. P., G. Reboux, F. Botterel, C. Candido, S. Roussel, B. Rognon, J. C. Dalphin, S. Bretagne, and L. Millon, 2010, New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease.: *Med Mycol*, v. 48, p. 981-7.
- Benndorf, D., A. Muller, K. Bock, O. Manuwald, O. Herbarth, and M. von Bergen, 2008, Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*: *Allergy*, v. 63, p. 454-60.

- Bernstein, D. I., Z. L. Lummus, G. Santilli, J. Siskosky, and I. L. Bernstein, 1995, Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols: *Chest*, v. 108, p. 636-41.
- Betelli, L., P. Duquenne, F. Grenouillet, X. Simon, E. Scherer, E. Gehin, and A. Hartmann, 2013, Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR: *J Microbiol Methods*, v. 92, p. 25-32.
- Blais Lecours, P., M. Veillette, D. Marsolais, and C. Duchaine, 2012, Characterization of bioaerosols from dairy barns: reconstructing the puzzle of occupational respiratory diseases by using molecular approaches: *Appl Environ Microbiol*, v. 78, p. 3242-8.
- Blanchet, M. R., J. L. Bennett, M. J. Gold, E. Levantini, D. G. Tenen, M. Girard, Y. Cormier, and K. M. McNagny, 2011, CD34 is required for dendritic cell trafficking and pathology in murine hypersensitivity pneumonitis: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 184, p. 687-98.
- Boigegrain, R. A., J. P. Liautard, and S. Köhler, 2005, Targeting of the virulence factor acetohydroxyacid synthase by sulfonyleureas results in inhibition of intramacrophagic multiplication of *Brucella suis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 3922-5.
- Bouchard, S., F. Morin, G. Bedard, J. Gauthier, J. Paradis, and Y. Cormier, 1995a, Farmer's lung and variables related to the decision to quit farming: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 152, p. 997-1002.
- Bouchard, S., F. Morin, G. Bédard, J. Gauthier, J. Paradis, and Y. Cormier, 1995b, Farmer's lung and variables related to the decision to quit farming: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 152, p. 997-1002.
- Bourke, S. J., J. C. Dalphin, G. Boyd, C. McSharry, C. I. Baldwin, and J. E. Calvert, 2001, Hypersensitivity pneumonitis: current concepts: *Eur Respir J Suppl*, v. 32, p. 81s-92s.
- Bowyer, P., and D. W. Denning, 2007, Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus* spp: the relevance of genomics to everyday research: *Med Mycol*, v. 45, p. 17-26.
- Brummund, W., V. P. Kurup, A. Resnick, T. J. Milson, and J. N. Fink, 1988, Immunologic response to *Faenia rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*) in a dairy farm family: *J Allergy Clin Immunol*, v. 82, p. 190-5.
- Bukowski, J. A., 2003, Review of respiratory morbidity from occupational exposure to oil mists: *Appl Occup Environ Hyg*, v. 18, p. 828-37.
- Burnaugh, A. M., L. J. Frantz, and S. J. King, 2008, Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases.: *J Bacteriol*, v. 190, p. 221-30.
- Busse, C., A. Strubel, and P. Schnitzler, 2008, Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies.: *J Clin Virol*, v. 43, p. 137-41.
- 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*, v. 163, p. 1528-33.
- Canter, N., 2009, New test method for detecting microbes in MWFs, p. 8-9.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2002, Respiratory illness in workers exposed to metalworking fluid contaminated with nontuberculous mycobacteria--Ohio, 2001: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 51, p. 349-52.
- Cormier, Y., and J. Bélanger, 1985, Long-term physiologic outcome after acute farmer's lung: *Chest*, v. 87, p. 796-800.
- Cormier, Y., and J. Bélanger, 1989, The fluctuant nature of precipitating antibodies in dairy farmers: *Thorax*, v. 44, p. 469-73.

- Cormier, Y., J. Bélanger, and P. Durand, 1985, Factors influencing the development of serum precipitins to farmer's lung antigen in Quebec dairy farmers: *Thorax*, v. 40, p. 138-42.
- Cormier, Y., and M. Desmeules, 1994, Treatment of hypersensitivity pneumonitis (HP): comparison between contact avoidance and corticosteroids.: *Can Respir J*, v. 1, p. 223-228.
- Cormier, Y., E. Israel-Assayag, M. Fournier, and G. M. Tremblay, 1993, Modulation of experimental hypersensitivity pneumonitis by Sendai virus.: *J Lab Clin Med*, v. 121, p. 683-8.
- Cormier, Y., and E. Israël-Assayag, 2000, The role of viruses in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis: *Curr Opin Pulm Med*, v. 6, p. 420-3.
- Cormier, Y., and M. Laviolette, 1996, Alvéolite allergique extrinsèque, *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Pneumologie* 6-039-E-30, p. 6p.
- Cormier, Y., L. Létourneau, and G. Racine, 2004, Significance of precipitins and asymptomatic lymphocytic alveolitis: a 20-yr follow-up.: *Eur Respir J*, v. 23, p. 523-5.
- Crameri, R., A. Faith, S. Hemmann, R. Jaussi, C. Ismail, G. Menz, and K. Blaser, 1996, Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*: *J Exp Med*, v. 184, p. 265-70.
- Cyprowski, M., M. Piotrowska, Z. Zakowska, and I. Szadkowska-Stańczyk, 2007, Microbial and endotoxin contamination of water-soluble metalworking fluids: *Int J Occup Med Environ Health*, v. 20, p. 365-71.
- Dalphin, J., 2001, La maladie du poumon de fermier. Nouveaux visages et concepts actuels: *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, v. 41, p. 245-252.
- Dalphin, J.-C., 2003, Alvéolites allergiques extrinsèques, in E. S. e. M. E. SAS, ed., *Pneumologie*, v. *Encycl Méd Chir*: Paris.
- Dalphin, J.-C., G. Reboux, A. Lefebvre, and I. Thaon, 2009a, Pneumopathies d'hypersensibilité, in Flammarion, ed., *Traité de Pneumologie*: Paris.
- 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*, v. 50, p. 941-4.
- Dalphin, J. C., J. Maitre, and J. C. Pairon, 2009b, [Occupational respiratory diseases: the end of a series... and a story with no end]: *Rev Mal Respir*, v. 26, p. 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*, v. 46, p. 619-23.
- Dalphin, J. C., B. Toson, E. Monnet, D. Pernet, A. Dubiez, J. J. Laplante, J. M. Aiache, and A. Depierre, 1994, Farmer's lung precipitins in Doubs (a department of France): prevalence and diagnostic value.: *Allergy*, v. 49, p. 744-50.
- Dangman, K. H., S. R. Cole, M. J. Hodgson, C. Kuhn, M. L. Metersky, P. Schenck, and E. Storey, 2002, The hypersensitivity pneumonitis diagnostic index: use of non-invasive testing to diagnose hypersensitivity pneumonitis in metalworkers: *Am J Ind Med*, v. 42, p. 150-62.
- Dangman, K. H., E. Storey, P. Schenck, and M. J. Hodgson, 2004, Effects of cigarette smoking on diagnostic tests for work-related hypersensitivity pneumonitis: data from an outbreak of lung disease in metalworkers: *Am J Ind Med*, v. 45, p. 455-67.
- Das, D., S. S. Saha, and B. Bishayi, 2008, Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines: *Inflamm Res*, v. 57, p. 340-9.

- Dawkins, P., A. Robertson, W. Robertson, V. Moore, J. Reynolds, G. Langman, E. Robinson, J. Harris-Roberts, B. Crook, and S. Burge, 2006, An outbreak of extrinsic alveolitis at a car engine plant: *Occup Med (Lond)*, v. 56, p. 559-65.
- De Champs, C., C. Martin, D. Caillaud, and J. M. Aiache, 1997, Détection des anticorps anti-*Micropolyspora faeni*: comparaison de la méthode ELISA aux techniques *in vitro* classiques: *Rev fr Allergol*, v. 37, p. 423-430.
- de Souza, G. A., and H. G. Wiker, 2011, A proteomic view of mycobacteria: *Proteomics*, v. 11, p. 3118-27.
- Deb, D. K., P. Dahiya, K. K. Srivastava, R. Srivastava, and B. S. Srivastava, 2002, Selective identification of new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach: *Tuberculosis (Edinb)*, v. 82, p. 175-82.
- 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*, v. 7, p. 156-60.
- Depierre, A., J. C. Dalphin, D. Pernet, A. Dubiez, C. Faucompré, and J. L. Breton, 1988, Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the French Doubs province.: *Thorax*, v. 43, p. 429-35.
- Deschênes, D., S. Provencher, and Y. Cormier, 2012, Farmer's lung-induced hypersensitivity pneumonitis complicated by shock: *Respir Care*, v. 57, p. 464-6.
- Dilger, S., A. Fluri, and H. G. Sonntag, 2005, Bacterial contamination of preserved and non-preserved metal working fluids: *Int J Hyg Environ Health*, v. 208, p. 467-76.
- Duchaine, C., A. Mériaux, G. Brochu, K. Bernard, and Y. Cormier, 1999, *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns: application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease.: *J Med Microbiol*, v. 48, p. 173-80.
- Eduard, W., 1995, Immunoglobulin G antibodies against moulds and actinomycetes as biomarkers of exposure in the working environment: *Occupational hygiene*, v. 1, p. 247-260.
- Elsmore, R., 1989, The survival of *Legionella pneumophila* in dilute metalworking fluids: *Tribology international*, v. 22, p. 213-217.
- Erkinjuntti-Pekkanen, R., J. I. Kokkarinen, H. O. Tukiainen, J. Pekkanen, K. Husman, and E. O. Terho, 1997, Long-term outcome of pulmonary function in farmer's lung: a 14 year follow-up with matched controls: *Eur Respir J*, v. 10, p. 2046-50.
- 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*, v. 54, p. 1181-7.
- Falkinham, J. O., 2003, Mycobacterial aerosols and respiratory disease: *Emerg Infect Dis*, v. 9, p. 763-7.
- Falkinham, J. O., 2009, Effects of biocides and other metal removal fluid constituents on *Mycobacterium immunogenum*: *Appl Environ Microbiol*, v. 75, p. 2057-61.
- Feltcher, M. E., J. T. Sullivan, and M. Braunstein, 2010, Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development?: *Future Microbiol*, v. 5, p. 1581-97.
- Fenclová, Z., D. Pelclová, P. Urban, T. Navrátil, P. Klusácková, and J. Lebedová, 2009, Occupational hypersensitivity pneumonitis reported to the Czech National Registry Of Occupational Diseases in the period 1992-2005: *Ind Health*, v. 47, p. 443-8.
- 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*, v. 29, p. 706-12.

- Ferri, F., M. Dottori, L. Bedogni, S. Perini, and M. Ligabue, 2003, [Exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula* among cattle breeders in the province of Reggio Emilia and the risk of extrinsic allergic alveolitis (farmer's lung)]. *Med Lav*, v. 94, p. 207-15.
- Festenstein, G. N., J. Lacey, F. A. Skinner, P. A. Jenkins, and J. Pepys, 1965, Self-heating of hay and grain in Dewar flasks and the development of farmer's lung antigens: *J Gen Microbiol*, v. 41, p. 389-407.
- Fink, J. N., 2000, Immunologic orchestration of hypersensitivity pneumonitis: *J Lab Clin Med*, v. 136, p. 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*, v. 171, p. 792-8.
- Fletcher, S. M., C. J. Rundle, and I. G. Murray, 1970, The extracellular antigens of *Micropolyspora faeni*: their significance in farmer's lung disease: *J Hyg (Lond)*, v. 68, p. 401-9.
- Fraser, V. J., M. Jones, P. R. Murray, G. Medoff, Y. Zhang, and R. J. Wallace, 1992, Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine: *Am Rev Respir Dis*, v. 145, p. 853-5.
- Fuller, C. J., 1953, Farmer's lung: a review of present knowledge.: *Thorax*, v. 8, p. 59-64.
- Gamboa, P. M., F. Urbaneja, I. Olaizola, J. A. Boyra, G. González, I. Antépara, I. Urrutia, I. Jáuregui, and M. L. Sanz, 2005, Specific IgG to *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micropolyspora faeni* and *Aspergillus fumigatus* in building workers exposed to esparto grass (plasterers) and in patients with esparto-induced hypersensitivity pneumonitis.: *J Investig Allergol Clin Immunol*, v. 15, p. 17-21.
- Gamian, A., H. Mordarska, I. Ekiel, J. Ulrich, B. Szponar, and J. Defaye, 1996, Structural studies of the major glycolipid from *Saccharopolyspora* genus.: *Carbohydr Res*, v. 296, p. 55-67.
- Gangwar, M., Z. U. Khan, H. S. Randhawa, and J. Lacey, 1989, Distribution of clinically important thermophilic actinomycetes in vegetable substrates and soil in north-western India: *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 56, p. 201-9.
- Gari, M., P. Richebe, B. Mouysset, and J. M. Pinon, 1985, [A fatal case of farmer's lung: a study of specific classes of antibodies in the serum and broncho-alveolar lavage]: *Rev Mal Respir*, v. 2, p. 11-4.
- Gari, M., P. Smets, J. M. Pinon, P. Recco, and J. P. Sequela, 1982, Use of immuno-electro-diffusion on cellulose acetate for the research of the precipitating antibodies in the screening of patients suspected of farmer's lung disease: *Mycopathologia*, v. 78, p. 151-3.
- Gariépy, L., Y. Cormier, M. Laviolette, and A. Tardif, 1989, Predictive value of bronchoalveolar lavage cells and serum precipitins in asymptomatic dairy farmers.: *Am Rev Respir Dis*, v. 140, p. 1386-9.
- Gbaguidi-Haore, H., S. Roussel, G. Reboux, J. C. Dalphin, and R. Piarroux, 2009, Multilevel analysis of the impact of environmental factors and agricultural practices on the concentration in hay of microorganisms responsible for farmer's lung disease: *Ann Agric Environ Med*, v. 16, p. 219-25.
- Girard, M., E. Israël-Assayag, and Y. Cormier, 2009a, Mature CD11c(+) cells are enhanced in hypersensitivity pneumonitis.: *Eur Respir J*, v. 34, p. 749-56.
- Girard, M., Y. Lacasse, and Y. Cormier, 2009b, Hypersensitivity pneumonitis: *Allergy*, v. 64, p. 322-34.

- Girard, M., Y. Lacasse, and Y. Cormier, 2009c, Hypersensitivity pneumonitis.: Allergy, v. 64, p. 322-34.
- Gordon, T., C. Nadziejko, K. Galdanes, D. Lewis, and K. Donnelly, 2006, Mycobacterium immunogenum causes hypersensitivity pneumonitis-like pathology in mice, *Inhal Toxicol*, v. 18: United States, p. 449-56.
- Grandoni, J. A., P. T. Marta, and J. V. Schloss, 1998, Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents: *J Antimicrob Chemother*, v. 42, p. 475-82.
- Grant, I. W., W. Blyth, V. E. Wardrop, R. M. Gordon, J. C. Pearson, and A. Mair, 1972, Prevalence of farmer's lung in Scotland: a pilot survey: *Br Med J*, v. 1, p. 530-4.
- Gregory, P. H., G. N. Festenstein, M. E. Lacey, F. A. Skinner, J. Pepys, and P. A. Jenkins, 1964, Farmer's Lung Disease: The development of antigens in moulding hay: *J Gen Microbiol*, v. 36, p. 429-39.
- Gregory, P. H., and M. E. Lacey, 1963, Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease.: *J Gen Microbiol*, v. 30, p. 75-88.
- Gruchow, H. W., R. G. Hoffmann, J. J. Marx, D. A. Emanuel, and A. A. Rimm, 1981, Precipitating antibodies to farmer's lung antigens in a Wisconsin farming population: *Am Rev Respir Dis*, v. 124, p. 411-5.
- Gump, D. W., F. L. Babbott, C. Holly, and D. L. Sylwester, 1979, Farmer's lung disease in Vermont: *Respiration*, v. 37, p. 52-60.
- Gupta, A., and K. D. Rosenman, 2006, Hypersensitivity pneumonitis due to metal working fluids: Sporadic or under reported?: *Am J Ind Med*, v. 49, p. 423-33.
- 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*, v. 8, p. 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*, v. 51, p. 581-92.
- Hernández-Pando, R., B. Marquina-Castillo, J. Barrios-Payán, and D. Mata-Espinosa, 2012, Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*: *Infect Genet Evol*, v. 12, p. 725-31.
- Hogan, L. H., B. S. Klein, and S. M. Levitz, 1996, Virulence factors of medically important fungi.: *Clin Microbiol Rev*, v. 9, p. 469-88.
- Homma, Y., T. Terai, and M. Matsuzaki, 1986, Incidence of serum-precipitating antibodies to farmer's lung antigens in Hokkaido: *Respiration*, v. 49, p. 300-6.
- Hoppin, J. A., D. M. Umbach, G. J. Kullman, P. K. Henneberger, S. J. London, M. C. Alavanja, and D. P. Sandler, 2007, Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study: *Occup Environ Med*, v. 64, p. 334-41.
- Huang, J., X. Jiang, M. Huang, X. Yang, M. Liu, H. Wang, and J. Meng, 2011, [Influence of lysozyme-like protein on virulence and capsular polysaccharide synthesis of *Streptococcus pneumoniae*]: *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v. 51, p. 59-65.
- Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schäfer, 2000, Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members: *Archives of Microbiology*, v. 174, p. 362-374.
- Husman, K., I. Vohlonen, E. O. Terho, and R. A. Mäntyjärvi, 1987, Precipitins against microbes in mouldy hay in the sera of farmers with farmer's lung or chronic bronchitis and of healthy farmers: *Eur J Respir Dis Suppl*, v. 152, p. 122-7.

- 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*, v. 177, p. 5258-68.
- Hébert, J., J. Beaudoin, M. Laviolette, R. Beaudoin, J. Bélanger, and Y. Cormier, 1985, Absence of correlation between the degree of alveolitis and antibody levels to *Micropolysporum faeni*: *Clin Exp Immunol*, v. 60, p. 572-8.
- Iranitalab, M., E. Jarolim, H. Rumpold, R. Steiner, H. Ebner, H. Feldner, O. Scheiner, and D. Kraft, 1989, Characterization of *Micropolyspora faeni* antigens by human antibodies and immunoblot analysis: *Allergy*, v. 44, p. 314-21.
- Ismail, T., C. McSharry, and G. Boyd, 2006, Extrinsic allergic alveolitis: *Respirology*, v. 11, p. 262-8.
- Jimenez-Alvarez, L., J. Zúñiga, M. Gaxiola, M. Checa, C. Becerril, F. Mendoza, A. Pardo, and M. Selman, 2010, Inflammatory response and dynamics of lung T cell subsets in Th1, Th2 biased and Th2 deficient mice during the development of hypersensitivity pneumonitis.: *Exp Mol Pathol*, v. 88, p. 407-15.
- Johnson, A. M., H. Roberts, and A. M. Tenter, 1992, Evaluation of a recombinant antigen ELISA for the diagnosis of acute toxoplasmosis and comparison with traditional antigen ELISAs.: *J Med Microbiol*, v. 37, p. 404-9.
- Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge, 1995, Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion: *J Bacteriol*, v. 177, p. 3998-4008.
- Kapoor, R., and J. S. Yadav, 2009, Development of a species-specific colorimetric-PCR assay for detection and species differentiation of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium chelonae* and its comparison with quantitative real-time PCR for field metalworking fluids: *Mol Cell Probes*, v. 23, p. 75-82.
- Kapoor, R., and J. S. Yadav, 2010, Development of a rapid ATP bioluminescence assay for biocidal susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria: *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 3725-8.
- Katila, M. L., and R. A. Mäntyjärvi, 1987, Prognostic value of precipitins for working ability in dairy farmers: *Eur J Respir Dis Suppl*, v. 152, p. 146-54.
- Kaukonen, K., L. J. Pelliniemi, J. Savolainen, and E. O. Terho, 1996, Identification of the reactive subunits of *Aspergillus umbrosus* involved in the antigenic response in farmer's lung: *Clin Exp Allergy*, v. 26, p. 689-96.
- Khan, I. U., S. B. Selvaraju, and J. S. Yadav, 2005, Occurrence and characterization of multiple novel genotypes of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium chelonae* in metalworking fluids: *FEMS Microbiol Ecol*, v. 54, p. 329-38.
- Khan, I. U., and J. S. Yadav, 2004, Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids: *Mol Cell Probes*, v. 18, p. 67-73.
- Khan, Z. U., M. Gangwar, S. N. Gaur, and H. S. Randhawa, 1995, Thermophilic actinomycetes in cane sugar mills: an aeromicrobiologic and seroepidemiologic study.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 339-44.
- Kim, Y. I., J. E. Park, D. D. Brand, E. A. Fitzpatrick, and A. K. Yi, 2010, Protein kinase D1 is essential for the proinflammatory response induced by hypersensitivity pneumonitis-causing thermophilic actinomycetes *Saccharopolyspora rectivirgula*.: *J Immunol*, v. 184, p. 3145-56.
- Kirchner, D. B., 2002, The spectrum of allergic disease in the chemical industry: *Int Arch Occup Environ Health*, v. 75 Suppl, p. S107-12.

- Ko, K. Y., J. W. Kim, M. Her, S. I. Kang, S. C. Jung, D. H. Cho, and J. Y. Kim, 2012, Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis: *Vet Microbiol*, v. 156, p. 374-80.
- Kokkarinen, J., H. Tukiainen, and E. O. Terho, 1994, Mortality due to farmer's lung in Finland: *Chest*, v. 106, p. 509-12.
- Konishi, K., S. Murakami, K. Kokubu, H. Itoh, T. Mouri, and M. Tamura, 1985, Determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of specific IgG antibody activities for diagnosis of farmer's lung disease.: *Tohoku J Exp Med*, v. 147, p. 135-44.
- Koschel, D., J. Holfert, A. Rolle, O. Holotiuk, and G. Höffken, 2012, Farmer's lung in a case after bullectomy: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 158, p. 313-6.
- Kotimaa, M. H., K. H. Husman, E. O. Terho, and M. H. Mustonen, 1984, Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland: *Scand J Work Environ Health*, v. 10, p. 115-9.
- Kreiss, K., and J. Cox-Ganser, 1997, Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: a workshop summary: *Am J Ind Med*, v. 32, p. 423-32.
- Kumar, A., N. Elms, and V. P. Kurup, 1993, Monoclonal antibodies against farmer's lung antigens having specific binding to IgG antibodies.: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 102, p. 67-71.
- Kurup, V. P., 1987, Detection of relevant farmer's lung antigens by using immunoblots of two-dimensional electrophoresis: *Diagn Clin Immunol*, v. 5, p. 25-9.
- Kurup, V. P., and J. N. Fink, 1975, A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis: *J Clin Microbiol*, v. 2, p. 55-61.
- Kurup, V. P., and J. N. Fink, 1977, Extracellular antigens of *Micropolyspora faeni* grown in synthetic medium: *Infect Immun*, v. 15, p. 608-13.
- Kurup, V. P., J. N. Fink, and D. M. Bauman, 1976, Thermophilic actinomycetes from the environment: *Mycologia*, v. 68, p. 662-6.
- Kurup, V. P., K. V. John, E. Y. Ting, K. Somasundaram, A. Resnick, and J. J. Marx, 1984, Immunochemical studies of a purified antigen from *Micropolyspora faeni*: *Mol Immunol*, v. 21, p. 215-21.
- Kurup, V. P., R. A. Mäntyjärvi, E. O. Terho, T. H. Ojanen, and J. H. Kalbfleisch, 1987, Circulating IgG antibodies against fungal and actinomycete antigens in the sera of farmer's lung patients from different countries: *Mycopathologia*, v. 98, p. 91-9.
- Kurup, V. P., E. Y. Ting, J. N. Fink, and N. J. Calvanico, 1981, Characterization of *Micropolyspora faeni* antigens: *Infect Immun*, v. 34, p. 508-12.
- LaBerge, D. E., and M. A. Stahmann, 1966, Antigens from *Thermopolyspora polyspora* involved in farmer's lung: *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 121, p. 463-8.
- Lacasse Y, Israel AE, Laviolette M, and C. Y, 2004, Clinical and immunopathological aspects of hypersensitivity pneumonitis.: *Rev Mal Respir*, v. 21, p. 769-781.
- Lacasse, Y., M. Selman, U. Costabel, J. C. Dalphin, M. Ando, F. Morell, R. Erkinjuntti-Pekkanen, N. Muller, T. V. Colby, M. Schuyler, Y. Cormier, and H. S. Group, 2003, Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis.: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 168, p. 952-8.
- Lacasse, Y., M. Selman, U. Costabel, J. C. Dalphin, F. Morell, R. Erkinjuntti-Pekkanen, N. L. Mueller, T. V. Colby, M. Schuyler, V. Jomphe, Y. Cormier, and H. S. Group, 2009, Classification of hypersensitivity pneumonitis: a hypothesis: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 149, p. 161-6.
- Lafontaine, M., 2002, Risques liés à l'utilisation des fluides de coupe. Hygiène et sécurité du travail: *Cahiers de notes documentaires*, v. 186, p. 28-38.

- Lalancette, M., G. Carrier, M. Laviolette, S. Ferland, J. Rodrigue, R. Bégin, 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*, v. 148, p. 216-21.
- 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*, v. 81, p. 585-92.
- Larsson, K., P. Malmberg, A. Eklund, L. Belin, and E. Blaschke, 1988, Exposure to microorganisms, airway inflammatory changes and immune reactions in asymptomatic dairy farmers. Bronchoalveolar lavage evidence of macrophage activation and permeability changes in the airways: *Int Arch Allergy Appl Immunol*, v. 87, p. 127-33.
- Lemieszek, M., M. Chilosi, M. Golec, C. Skórska, F. Huaux, Y. Yakoub, C. Pastena, I. Daniele, G. Cholewa, J. Sitkowska, W. Lisowska, J. Zwoliński, J. Milanowski, B. Mackiewicz, A. Góra, and J. Dutkiewicz, 2011, Mouse model of hypersensitivity pneumonitis after inhalation exposure to different microbial antigens associated with organic dusts: *Ann Agric Environ Med*, v. 18, p. 159-68.
- Lewis, D. M., E. Janotka, M. P. Whitmer, and T. A. Bledsoe, 2001, Detection of microbial antigens in metal working fluids: *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 47, p. 89-94.
- List, C., W. Qi, E. Maag, B. Gottstein, N. Müller, and I. Felger, 2010, Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray: *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, p. e771.
- Lorenz, M. C., and G. R. Fink, 2001, The glyoxylate cycle is required for fungal virulence.: *Nature*, v. 412, p. 83-6.
- Lorenz, M. C., and G. R. Fink, 2002, Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence.: *Eukaryot Cell*, v. 1, p. 657-62.
- Lucchesi, E. G., S. Y. Eguchi, and Â. M. Moraes, 2012, Influence of a triazine derivative-based biocide on microbial biofilms of cutting fluids in contact with different substrates: *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 39, p. 743-748.
- M. Lewis, D., E. Janotka, M. P. Whitmer, and T. A. Bledsoe, 2001, Detection of microbial antigens in metal working fluids: *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 47, p. 89-94.
- Madsen, D., L. E. Klock, F. J. Wenzel, J. L. Robbins, and C. D. Schmidt, 1976, The prevalence of farmer's lung in an agricultural population: *Am Rev Respir Dis*, v. 113, p. 171-74.
- Male, D., J. Brostoff, D. Roth, and I. Roitt, 2007, *Immunologie: Campus références*: Paris, Elsevier Masson, 600 p.
- Malinen, A. P., R. A. Erkinjuntti-Pekkanen, P. L. Partanen, H. T. Rytönen, and R. L. Vanninen, 2003, Long-term sequelae of Farmer's lung disease in HRCT: a 14-year follow-up study of 88 patients and 83 matched control farmers.: *Eur Radiol*, v. 13, p. 2212-21.
- 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*, v. 103, p. 1202-9.
- Maloney, S., S. Welbel, B. Daves, K. Adams, S. Becker, L. Bland, M. Arduino, R. Wallace, Y. Zhang, and G. Buck, 1994, *Mycobacterium abscessus* pseudoinfection traced to an automated endoscope washer: utility of epidemiologic and laboratory investigation: *J Infect Dis*, v. 169, p. 1166-9.

- Mandell, G. L., 1975, Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction: *J Clin Invest*, v. 55, p. 561-6.
- Mantyjärvi, R. A., P. Jousilahti, and M. L. Katila, 1980, Antibodies to *Aspergillus fumigatus* in farmers' lung patients measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): *Clin Allergy*, v. 10, p. 187-94.
- Marcilla, A., J. E. De la Rubia, J. Sotillo, D. Bernal, C. Carmona, Z. Villavicencio, D. Acosta, J. Tort, F. J. Bornay, J. G. Esteban, and R. Toledo, 2008, Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections: *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, p. 95-100.
- Marvisi, M., L. Balzarini, C. Mancini, and P. Mouzakiti, 2012, A new type of Hypersensitivity Pneumonitis: salami brusher's disease: *Monaldi Arch Chest Dis*, v. 77, p. 35-7.
- Marx, J. J., D. A. Emanuel, W. V. Dovenbarger, M. E. Reinecke, R. C. Roberts, and M. W. Treuhaft, 1978, Farmer's lung disease among farmers with precipitating antibodies to the thermophilic actinomycetes: a clinical and immunologic study: *J Allergy Clin Immunol*, v. 62, p. 185-9.
- Marx, J. J., and R. L. Gray, 1982, Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and double immunodiffusion test for the detection and quantitation of antibodies in farmer's lung disease: *J Allergy Clin Immunol*, v. 70, p. 109-13.
- McDonald, J. C., M. H. Beck, Y. Chen, and N. M. Cherry, 2006, Incidence by occupation and industry of work-related skin diseases in the United Kingdom, 1996-2001: *Occup Med (Lond)*, v. 56, p. 398-405.
- McGrath, D. S., J. Kiely, B. Cryan, and C. P. Bredin, 1999, Farmer's lung in Ireland (1983-1996) remains at a constant level: *Ir J Med Sci*, v. 168, p. 21-4.
- Melinn, M., and H. McLaughlin, 1989, Farmers lung: a three year survey and comparison of ELISA and CIEP techniques in antibody detection: *Ir J Med Sci*, v. 158, p. 173-4.
- Melinn, M., and H. McLaughlin, 1992, Comparison of methods of production of farmer's lung antigens: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 99, p. 56-62.
- Metzger, F., A. Haccuria, G. Reboux, N. Nolard, J. C. Dalphin, and P. De Vuyst, 2010, Hypersensitivity pneumonitis due to molds in a saxophone player.: *Chest*, v. 138, p. 724-6.
- Milanowski, J., J. Dutkiewicz, H. Potoczna, L. Kuś, and B. Urbanowicz, 1998, Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of twenty cases: *Ann Agric Environ Med*, v. 5, p. 31-43.
- Millon, L., S. Roussel, B. Rognon, M. Quadroni, K. Salamin, G. Reboux, C. Barrera, J. M. Fellrath, J. D. Aubert, J. C. Dalphin, and M. Monod, 2012, *Aspergillus* species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease: *J Allergy Clin Immunol*.
- Monkare, S., and T. Haahtela, 1987, Farmer's lung--a 5-year follow-up of eighty-six patients: *Clin Allergy*, v. 17, p. 143-51.
- Monod, M., S. Capoccia, B. Léchenne, C. Zaugg, M. Holdom, and O. Jousson, 2002, Secreted proteases from pathogenic fungi.: *Int J Med Microbiol*, v. 292, p. 405-19.
- Monod, M., K. Jatou-Ogay, and U. Reichard, 1999, *Aspergillus fumigatus*-secreted proteases as antigenic molecules and virulence factors.: *Contrib Microbiol*, v. 2, p. 182-92.
- Moore, J. S., M. Christensen, R. W. Wilson, R. J. Wallace, Y. Zhang, D. R. Nash, and B. Shelton, 2000, Mycobacterial contamination of metalworking fluids: involvement of a possible new taxon of rapidly growing mycobacteria: *AIHAJ*, v. 61, p. 205-13.

- Morgan, D. C., J. T. Smyth, R. W. Lister, R. J. Pethybridge, J. C. Gilson, P. Callaghan, and G. O. Thomas, 1975, Chest symptoms in farming communities with special reference to farmer's lung: *Br J Ind Med*, v. 32, p. 228-34.
- Muilenberg, M. L., H. A. Burge, and T. Sweet, 1993, Hypersensitivity pneumonitis and exposure to acid-fast bacilli in coolant aerosols: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 91, p. 311.
- Mundt, C., W. M. Becker, and M. Schlaak, 1996, Farmer's lung: patients' IgG2 antibodies specifically recognize *Saccharopolyspora rectivirgula* proteins and carbohydrate structures.: *J Allergy Clin Immunol*, v. 98, p. 441-50.
- Murat, J. B., F. Grenouillet, G. Reboux, E. Penven, A. Batchili, J. C. Dalphin, I. Thaon, and L. Millon, 2012, Factors influencing the microbial composition of metalworking fluids and potential implications for machine operator's lung: *Appl Environ Microbiol*, v. 78, p. 34-41.
- Mäntyjärvi, R. M., and V. P. Kurup, 1988, Dot-immunobinding assay in the detection of IgG antibodies against farmer's lung antigens: *Mycopathologia*, v. 103, p. 49-54.
- Nademi, Z., S. Todryk, and C. Baldwin, 2013, Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung: *Mol Immunol*, v. 54, p. 227-32.
- 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*, v. 83, p. 1207-17.
- Nicolet, J., E. Bannerman, R. De Haller, and M. Wanner, 1977, Farmer's lung: immunological response to a group of extracellular enzymes of *Micropolyspora faeni*, An Experimental and field study, *Clin. Exp. Immunol.*, p. 401-406.
- Nicolet, J., and E. N. Bannerman, 1975, Extracellular enzymes of *Micropolyspora faeni* found in moldy hay: *Infect Immun*, v. 12, p. 7-12.
- Ochsner, U. A., A. Snyder, A. I. Vasil, and M. L. Vasil, 2002, Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 8312-7.
- Ojanen, T., 1992, Class specific antibodies in serodiagnosis of farmer's lung.: *Br J Ind Med*, v. 49, p. 332-6.
- Ojanen, T. H., M. L. Katila, and R. A. Mäntyjärvi, 1980, The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of farmer's lung: *Allergy*, v. 35, p. 537-42.
- Ojanen, T. H., E. O. Terho, and R. A. Mäntyjärvi, 1982, Comparison of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus umbrosus* antigens in serological tests of farmer's lung: *Allergy*, v. 37, p. 297-301.
- Oliynyk, M., M. Samborsky, J. B. Lester, T. Mironenko, N. Scott, S. Dickens, S. F. Haydock, and P. F. Leadlay, 2007, Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338.: *Nat Biotechnol*, v. 25, p. 447-53.
- Omland, Ø., 2002, Exposure and respiratory health in farming in temperate zones--a review of the literature.: *Ann Agric Environ Med*, v. 9, p. 119-36.
- Park, D., 2012, The Occupational Exposure Limit for Fluid Aerosol Generated in Metalworking Operations: Limitations and Recommendations: *Safety and health at work*, v. 3, p. 1-10.
- Park, H. J., H. S. Kim, and D. H. Chung, 2010, Fcγ receptors modulate pulmonary inflammation by activating innate immune cells in murine hypersensitivity pneumonitis.: *Immune Netw*, v. 10, p. 26-34.
- Passman, F., 2004, Microbial problems in metalworking fluids: *Tribology and lubrication technology*, v. 60, p. 24-27.

- Passman, F. J., 1992, Controlling microbial contamination in metal working fluids, *in* S. o. M. Engineers, ed., Cincinnati, Ohio, USA.
- Passman, F. J., and H. W. Rossmore, 2002, Reassessing the health risks associated with employee exposure to metalworking fluid microbes: LUBRICATION ENGINEERING-ILLINOIS-, v. 58, p. 30-38.
- Patterson, R., M. Roberts, R. C. Roberts, D. A. Emanuel, and J. N. Fink, 1976, Antibodies of different immunoglobulin classes against antigens causing farmer's lung: *Am Rev Respir Dis*, v. 114, p. 315-24.
- Pepys, J., and P. A. Jenkins, 1965, Precipitin (F.L.H.) Test in Farmer's Lung: *Thorax*, v. 20, p. 21-35.
- Pepys, J., P. A. Jenkins, G. N. Festenstein, P. H. Gregory, M. E. Lacey, and F. A. Skinner, 1963, Farmer's Lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "Farmer's Lung Hay" antigen.: *Lancet*, v. 2, p. 607-11.
- Prazmo, Z., E. Krysinska-Traczyk, C. Skorska, J. Sitkowska, G. Cholewa, and J. Dutkiewicz, 2003, Exposure to bioaerosols in a municipal sewage treatment plant.: *Ann Agric Environ Med*, v. 10, p. 241-8.
- Ramasamy, M., Z. U. Khan, and V. P. Kurup, 1987, A partially purified antigen from *Faenia rectivirgula* in the diagnosis of farmer's lung disease: *Microbios*, v. 49, p. 171-82.
- 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*, v. 151, p. A605.
- Ranalli, G., L. Grazia, and A. Roggeri, 1999, The influence of hay-packing techniques on the presence of *saccharopolyspora rectivirgula*: *J Appl Microbiol*, v. 87, p. 359-65.
- Rautalahti, M., E. O. Terho, and T. Ojanen, 1990, Changes in the titers of IgG antibodies against farmer's lung antigens in the sera of healthy dairy farmers: *Ann Allergy*, v. 64, p. 455-8.
- 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*, v. 163, p. 1534-9.
- 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*, v. 56, p. 1317-21.
- Reboux, G., M. Reiman, S. Roussel, K. Taattola, L. Millon, J. C. Dalphin, and R. Piarroux, 2006a, Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms.: *Ann Agric Environ Med*, v. 13, p. 267-73.
- Reboux, G., S. Roussel, and F. Grenouillet, 2006b, Moisissures de l'environnement agricole: *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, v. 16, p. 248-262.
- Reijula, K. E., 1993, Two bacteria causing farmer's lung: fine structure of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Saccharopolyspora rectivirgula*.: *Mycopathologia*, v. 121, p. 143-7.
- Rementeria, A., N. López-Molina, A. Ludwig, A. B. Vivanco, J. Bikandi, J. Pontón, and J. Garaizar, 2005, Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence.: *Rev Iberoam Micol*, v. 22, p. 1-23.
- Rhodes, G., A. Fluri, M. Gerber, A. Henderson, A. Ruefenacht, and R. W. Pickup, 2008, Detection of *Mycobacterium immunogenum* by real-time quantitative Taqman PCR: *J Microbiol Methods*, v. 73, p. 266-8.
- Rhodes, G., A. Fluri, A. Ruefenacht, M. Gerber, and R. Pickup, 2011, Implementation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Mycobacterium immunogenum* in metalworking fluids: *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, v. 8, p. 478-483.

- 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*, v. 84, p. 839-44.
- Roberts, R. C., 1974, Fractionation and chemical characterization studies on *Micropolyspora faeni* antigens: *Ann N Y Acad Sci*, v. 221, p. 199-204.
- Roberts, R. C., L. P. Nelles, M. W. Treuhaft, and J. J. Marx, 1983, Isolation and possible relevance of *Thermoactinomyces candidus* proteinases in farmer's lung disease: *Infect Immun*, v. 40, p. 553-62.
- Roberts, R. C., F. J. Wenzel, and D. A. Emanuel, 1973, Serum immunoglobulin levels in farmer's lung disease: *J Allergy Clin Immunol*, v. 52, p. 297-302.
- Roberts, R. C., F. J. Wenzel, and D. A. Emanuel, 1976a, Precipitating antibodies in a midwest dairy farming population toward the antigens associated with farmer's lung disease: *J Allergy Clin Immunol*, v. 57, p. 518-24.
- Roberts, R. C., D. P. Zais, and D. A. Emanuel, 1976b, The frequency of precipitins to trichloroacetic acid-extractable antigens from thermophilic actinomycetes in farmer's lung patients and asymptomatic farmers: *Am Rev Respir Dis*, v. 114, p. 23-8.
- Roberts, R. C., D. P. Zais, J. J. Marx, and M. W. Treuhaft, 1977, Comparative electrophoresis of the proteins and proteases in thermophilic actinomycetes: *J Lab Clin Med*, v. 90, p. 1076-85.
- Rottoli, P., M. G. Perari, R. Severini, V. Beltrami, and M. Vagliasindi, 1995, Detection of specific antibodies in immune complexes of farmer's lung patients: *J Investig Allergol Clin Immunol*, v. 5, p. 191-7.
- Roussel, S., G. Reboux, J.-C. Dalphin, and R. Piarroux, 2005a, alvéolites allergiques extrinsèques et exposition aux moisissures: *Revue francophone des laboratoires*, v. 373, p. 51-60.
- Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, K. Bardonnat, L. Millon, and R. Piarroux, 2004, Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung.: *Occup Environ Med*, v. 61, p. 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*, v. 160, p. 273-9.
- Roussel, S., G. Reboux, L. Millon, J.-C. Dalphin, and R. Piarroux, 2006, Pneumopathies d'hypersensibilités et exposition aux moisissures et actinomycètes de l'environnement: *Journal de Mycologie Médicale*, v. 16, p. 239-247.
- Roussel, S., G. Reboux, B. Rognon, M. Monod, F. Grenouillet, M. Quadroni, J. M. Fellrath, J. D. Aubert, J. C. Dalphin, and L. Millon, 2010, Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in farmer's lung disease serological diagnosis: *Clin Vaccine Immunol*, v. 17, p. 160-7.
- Roussel, S., B. Rognon, C. Barrera, G. Reboux, K. Salamin, F. Grenouillet, I. Thaon, J.-C. Dalphin, I. Tillie-Leblond, M. Quadroni, M. Monod, and L. Millon, 2011, Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 150-156.
- Rylander, R., 2006, Endotoxin and occupational airway disease: *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, v. 6, p. 62-6.
- Saha, R., and R. S. Donofrio, 2012, The microbiology of metalworking fluids: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 94, p. 1119-30.

- Saha, R., R. S. Donofrio, and S. T. Bagley, 2010, Development of a real-time TaqMan assay to detect mendocina sublineage *Pseudomonas* species in contaminated metalworking fluids: *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 37, p. 843-8.
- Saha, R., R. S. Donofrio, D. M. Goeres, and S. T. Bagley, 2012, Rapid detection of rRNA group I pseudomonads in contaminated metalworking fluids and biofilm formation by fluorescent in situ hybridization: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 94, p. 799-808.
- Sakamoto, T., A. Urisu, M. Yamada, Y. Matsuda, K. Tanaka, and S. Torii, 1989, Studies on the osmophilic fungus *Wallemia sebi* as an allergen evaluated by skin prick test and radioallergosorbent test: *Int Arch Allergy Appl Immunol*, v. 90, p. 368-72.
- Salvaggio, J. E., 1997, Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis): past, present and future: *Clin Exp Allergy*, v. 27 Suppl 1, p. 18-25.
- Sampaio, J. L., D. N. Junior, D. de Freitas, A. L. Höfling-Lima, K. Miyashiro, F. L. Alberto, and S. C. Leão, 2006, An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*: *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 3201-7.
- Sarfati, J., M. Monod, P. Recco, A. Sulahian, C. Pinel, E. Candolfi, T. Fontaine, J. P. Debeaupuis, M. Tabouret, and J. P. Latgé, 2006, Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis.: *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 55, p. 279-91.
- Sastre, J., P. Mur, M. G. Potro, and E. Aguado, 2012, Hypersensitivity pneumonitis caused by metalworking fluid: *Allergol Immunopathol (Madr)*.
- Schaaf, B. M., U. Seitzer, V. Pravica, S. P. Aries, and P. Zabel, 2001, Tumor necrosis factor- α -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 163, p. 379-82.
- Schuyler, M., and Y. Cormier, 1997, The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis: *Chest*, v. 111, p. 534-6.
- Schuyler, M., K. Gott, and A. Cherne, 2000, Mediators of hypersensitivity pneumonitis.: *J Lab Clin Med*, v. 136, p. 29-38.
- Schuyler, M., K. Gott, and A. Cherne, 2003, Experimental hypersensitivity pneumonitis: role of MCP-1.: *J Lab Clin Med*, v. 142, p. 187-95.
- Schäfer, J., P. Kämpfer, and U. Jäckel, 2011, Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by Quantitative Real-Time PCR: *Annals of Occupational Hygiene*, v. 55, p. 612-619.
- Schällibaum, M., M. W. Hess, J. Nicolet, and H. König, 1977, Histopathological and immunohistological changes in the rabbit lung after experimental exposure to a purified enzyme of *Micropolyspora faeni*: *Clin Exp Immunol*, v. 28, p. 535-41.
- Seguela, J. P., P. Recco, Y. Rouch, M. D. Linas, D. Pourciel, and M. Borderies, 1978, [Two surveys on farmer's lung disease and bird breeder's disease in the Pyrenees region]: *Poumon Coeur*, v. 34, p. 209-17.
- Selman, M., Y. Lacasse, A. Pardo, and Y. Cormier, 2010, Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi.: *Proc Am Thorac Soc*, v. 7, p. 229-36.
- Selvaraju, S. B., R. Kapoor, and J. S. Yadav, 2008a, Peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) assay for specific detection of *Mycobacterium immunogenum* and DNA-FISH assay for analysis of pseudomonads in metalworking fluids and sputum: *Mol Cell Probes*, v. 22, p. 273-80.
- Selvaraju, S. B., I. U. Khan, and J. S. Yadav, 2005, Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline: *Appl Environ Microbiol*, v. 71, p. 542-6.
- Selvaraju, S. B., I. U. Khan, and J. S. Yadav, 2008b, Differential biocide susceptibility of the multiple genotypes of *Mycobacterium immunogenum*: *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 35, p. 197-203.

- Selvaraju, S. B., I. U. Khan, and J. S. Yadav, 2011, Susceptibility of *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* to Formaldehyde and Non-Formaldehyde Biocides in Semi-Synthetic Metalworking Fluids: *Int J Mol Sci*, v. 12, p. 725-41.
- Sennekamp, J., M. Joest, I. Sander, S. Engelhart, and M. Raulf-Heimsoth, 2012, [Farmer's lung antigens in Germany]: *Pneumologie*, v. 66, p. 297-301.
- Shelton, B. G., W. D. Flanders, and G. K. Morris, 1999, *Mycobacterium* sp. as a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers: *Emerg Infect Dis*, v. 5, p. 270-3.
- Shen, Y. E., V. P. Kurup, and J. N. Fink, 1991, Circulating antibodies against thermophilic actinomycetes in farmers and mushroom workers: *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, v. 35, p. 309-16.
- Shi, L. N., F. Q. Li, M. Huang, J. F. Lu, X. X. Kong, S. Q. Wang, and H. F. Shao, 2012, Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis: *BMC Microbiol*, v. 12, p. 11.
- Simon-Nobbe, B., U. Denk, V. Pöll, R. Rid, and M. Breitenbach, 2008, The spectrum of fungal allergy.: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 145, p. 58-86.
- Singh, B., M. Oellerich, R. Kumar, M. Kumar, D. P. Bhadoria, U. Reichard, V. K. Gupta, G. L. Sharma, and A. R. Asif, 2010a, Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*.: *J Proteome Res*, v. 9, p. 5517-29.
- Singh, B., G. L. Sharma, M. Oellerich, R. Kumar, S. Singh, D. P. Bhadoria, A. Katyal, U. Reichard, and A. R. Asif, 2010b, Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia.: *J Proteome Res*, v. 9, p. 5530-41.
- Solal-Céligny, P., M. Laviolette, J. Hébert, and Y. Cormier, 1982, Immune reactions in the lungs of asymptomatic dairy farmers: *Am Rev Respir Dis*, v. 126, p. 964-7.
- Staib, P., C. Zaugg, B. Mignon, J. Weber, M. Grumbt, S. Pradervand, K. Harshman, and M. Monod, 2010, Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection.: *Microbiology*, v. 156, p. 884-95.
- Stepanova, H., B. Pavlova, N. Stromerova, P. Ondrackova, K. Stejskal, I. Slana, Z. Zdrahal, I. Pavlik, and M. Faldyna, 2012, Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection: *Vet Microbiol*, v. 159, p. 343-50.
- Stokes, T. C., C. W. Turton, and M. Turner-Warwick, 1981, A study of immunoglobulin G subclasses in patients with farmer's lung: *Clin Allergy*, v. 11, p. 201-7.
- Sweeney, P. J., 1952, Farmer's lung; a clinical account of a disease probably caused by fungi.: *Ulster Med J*, v. 21, p. 150-4.
- Takemura, T., T. Akashi, H. Kamiya, S. Ikushima, T. Ando, M. Oritsu, M. Sawahata, and T. Ogura, 2012, Pathological differentiation of chronic hypersensitivity pneumonitis from idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia: *Histopathology*, v. 61, p. 1026-35.
- 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*, v. 1, p. 13-8.
- 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*, v. 152, p. 47-56.
- Terho, E. O., and J. Lacey, 1979, Microbiological and serological studies of farmers' lung in Finland: *Clin Allergy*, v. 9, p. 43-52.

- Tewksbury, D. A., J. J. Marx, R. C. Roberts, and D. A. Emanuel, 1981, Angiotensin-converting enzyme in farmer's lung: *Chest*, v. 79, p. 102-4.
- Thaon, I., G. Reboux, S. Moulonguet, and J. C. Dalphin, 2006, [Occupational hypersensitivity pneumonitis]: *Rev Mal Respir*, v. 23, p. 705-25.
- Thorne, P. S., A. Adamcakova-Dodd, K. M. Kelly, M. E. O'Neill, and C. Duchaine, 2006, Metalworking fluid with mycobacteria and endotoxin induces hypersensitivity pneumonitis in mice.: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 173, p. 759-68.
- Tillie-Leblond, I., F. Grenouillet, G. Reboux, S. Roussel, B. Chouraki, C. Lorthois, J. C. Dalphin, B. Wallaert, and L. Millon, 2011, Hypersensitivity pneumonitis and metalworking fluids contaminated by mycobacteria: *Eur Respir J*, v. 37, p. 640-7.
- Toubas, D., A. Prévost, F. Deschamps, and J. M. Pinon, 1995, [Extrinsic allergic alveolitis of occupational origin]: *Presse Med*, v. 24, p. 1391-6.
- Trafny, E. A., R. Lewandowski, I. Zawistowska-Marciniak, and M. Stepińska, 2013, Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids: *World J Microbiol Biotechnol*.
- Treuhart, M. W., R. C. Roberts, C. Hackbarth, D. A. Emanuel, and J. J. Marx, 1979, Characterization of precipitin response to *Micropolyspora faeni* in farmer's lung disease by quantitative immunoelectrophoresis: *Am Rev Respir Dis*, v. 119, p. 571-8.
- Tsogtbaatar, G., M. Tachibana, K. Watanabe, S. Kim, H. Suzuki, and M. Watarai, 2008, Enzyme-linked immunosorbent assay for screening of canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase: *J Vet Med Sci*, v. 70, p. 1387-9.
- Unaogu, I. C., H. C. Gugnani, and J. Lacey, 1994, Occurrence of thermophilic actinomycetes in natural substrates in Nigeria.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 65, p. 1-5.
- Veillette, M., G. Page, P. S. Thorne, and C. Duchaine, 2008, Real-time PCR quantification of *Mycobacterium immunogenum* in used metalworking fluids: *Journal of occupational and environmental hygiene*, v. 5, p. 755-760.
- Vohlonen, I., K. Husman, E. O. Terho, and K. Tupi, 1987, Prevalence of serum precipitins against microbes in mouldy hay, and of chronic bronchitis and farmer's lung with respect to farmers' occupational health hazards: *Eur J Respir Dis Suppl*, v. 152, p. 139-45.
- Wallace, J., Y. Zhang, R. W. Wilson, L. Mann, and H. Rossmore, 2002, Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis: *Appl Environ Microbiol*, v. 68, p. 5580-4.
- Wilson, R. W., V. A. Steingrube, E. C. Böttger, B. Springer, B. A. Brown-Elliott, V. Vincent, K. C. Jost, Y. Zhang, M. J. Garcia, S. H. Chiu, G. O. Onyi, H. Rossmore, D. R. Nash, and R. J. Wallace, 2001, *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy: *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, p. 1751-64.
- Wu, Y. Y., T. C. Hsu, T. Y. Chen, T. C. Liu, G. Y. Liu, Y. J. Lee, and G. J. Tsay, 2002, Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection.: *Clin Exp Immunol*, v. 128, p. 347-52.
- Ylönen, J. K., T. H. Ojanen, H. J. Jägerroos, and R. A. Mäntyjärvi, 1989, Comparative immunochemical analysis of five *Thermoactinomyces* strains: *Int Arch Allergy Appl Immunol*, v. 90, p. 405-10.
- Zacharisen, M. C., A. R. Kadambi, D. P. Schlueter, V. P. Kurup, J. B. Shack, J. L. Fox, H. A. Anderson, and J. N. Fink, 1998, The spectrum of respiratory disease associated with exposure to metal working fluids: *J Occup Environ Med*, v. 40, p. 640-7.

- Zeng, Q.-Y., S.-O. Westermark, Å. Rasmuson-Lestander, and X.-R. Wang, 2004, Detection and Quantification of *Wallemia sebi* in Aerosols by Real-Time PCR, Conventional PCR, and Cultivation: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 7295-7302.
- Zhao, Z., F. Yan, W. Ji, D. Luo, X. Liu, L. Xing, Y. Duan, P. Yang, X. Shi, Z. Lu, and X. Wang, 2011, Identification of immunoreactive proteins of *Brucella melitensis* by immunoproteomics: *Sci China Life Sci*, v. 54, p. 880-7.

VIII. Annexes

1. Fiche de renseignements pour les prélèvements agricoles

Prélèvement de fourrages pour les analyses microbiologiques

La première étape consiste à définir dans votre ferme des **lots** de produits agricoles (foins, paille, ensilage... ou autres produits d'origine végétale). Un lot rassemble les végétaux récoltés le même jour, dans la même zone géographique (champs proches), avec les mêmes conditionnements (balles rondes, vrac...), et stockés dans un même bâtiment. Définir 10 lots au maximum.

Pour **chaque lot** faire un **prélèvement** :

- Frottez vous les mains avec la solution hydro-alcoolique entre chaque prélèvement.
- Prenez une poignée du fourrage, paille ou autre et mettez-la dans un pot à couvercle rouge fourni. Inscrivez le numéro et le nom du lot sur le pot (par exemple : « n°1, foin du champ de la combe 2010 », « n° 2 paille achetée 2009 »)
- Le prélèvement **ne doit pas être fait en surface** :
 - pour les balles rondes, prélevez sous la surface sans ficelle à 30 cm du bord et à 15 cm de profondeur (la longueur d'une main)
 - Pour les bottes rectangulaires de faible, de moyenne ou de haute densité prélevez 15 cm en dessous de la surface au centre de la botte
 - Pour le vrac, prélevez 40 cm à l'intérieur du tas (la longueur de l'avant bras).
 - Pour les ensilages et les enrubannés : 15 cm sous le plastique ou le front de coupe

Remplissez le tableau page 2 et répondez au questionnaire professionnel page 3.

Placez ces feuilles remplies et les prélèvements dans le colis. (Gardez la solution hydro-alcoolique). Déposez le colis (prépayé) à un guichet de la poste.

*Pr Laurence Millon
pour le groupe SOPHIA*

Pour vous aidez à remplir le questionnaire, vous pouvez contacter G. Reboux 03.81.66.91.65.

MERCI DE VOTRE PARTICIPATION !

Lot N°	nom	Date de récolte	Type de produit (1)	Type de conditionnement (2)	Conditions de récolte (3)	Quantité récoltée (4)	Lieu de stockage	Commentaire libre
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

(1) foin, regain, refus, paille, blé, maïs, avoine, ensilage, ...

(2) vrac, balle ronde, balle rectangulaire, faible moyenne ou haute densité, foin enrubanné, ensilage en silo, sous bâche...

(3) récolté par temps sec, pluvieux, nuageux, orageux, ré-étendu après avoir été mouillé...

(4) En nombre de balles ou d'autochargeuse en indiquant le tonnage unitaire : poids de l'auto-chargeuse / Poids moyen des balles de fourrages :

DESCRIPTIF DE LA FERME

Votre nom, prénom :

Adresse :

.....

.....

Taille de l'exploitation :

..... hectares total de prairie de fauche

dont ha « naturelle » etha « ensencée » (moins de 5 ans)

Nombre de bêtes :

Nombre de personnes sur l'exploitation :

Altitude :

Type d'activité (lait, céréales, ...) :

Logement des animaux (bâtiment principal) :

Longueur : Largeur : Hauteur faitage :

Hauteur chenaux : en m (approximatif)

Vaches entravés En stabulation libre bâtiment ouvert fermé

Logettes Air paillé

Salle de traite : oui non

Distance entre votre habitation et la ferme : ou même bâtiment

Diriez vous que votre ferme est : Moderne Classique Traditionnelle

Bâtiment de stokage :

Ouvert Fermé Au-dessus de l'étable : Oui Non

Tout métallique Tout bois Mixte

Deuxième bâtiment de stokage : (le cas échéant)

Ouvert Fermé Au-dessus de l'étable : Oui Non

Tout métallique Tout bois Mixte

Vos tâches et votre temps de travail :

Temps passé par jour dans l'étable :

Temps passé par jour à l'affouragement :

Temps passé par jour au paillage :

Durée de la période de stabulation : mois / an

Portez vous un masque de protection respiratoire ?

Si oui : tout le temps pour certaines tâches Type de masque

Les résultats des analyses microbiologiques vous seront envoyés dans les trois mois avec un commentaire.

Prélèvements de fourrages

2. Etapes préliminaires pour la mise au point de du test ELISA

2.1. Choix du type de plaque

Le revêtement des puits des plaques ELISA a une influence sur l'adsorption de l'antigène au plastique, ainsi le type de revêtement a une influence sur la spécificité du test. Trois types de plaques les plus couramment utilisées Polysorp, Maxisorp et Multisorp (Nunc, ThermoScientific) ont été testées selon le mode opératoire décrit en §III 2.7.2. L'expérience a été réalisée le même jour avec les mêmes stocks de solutions, pour éviter les biais dus à d'autres paramètres. Sur chaque plaque 96 puits ont été fixés les 8 antigènes totaux et recombinants en ligne : A : *E. amstelodami*, B : *L. corymbifera*, C : *W. sebi*, D : *S. rectivirgula*, E : *T. vulgaris*, et 3 antigènes recombinants issus d'*A. fumigatus*, F : GLPV, G : G6Pi, H : NAD dependent. L'évaluation a été réalisée avec 3 pools de sérums : pool positif, pool négatif et pool de référence, et 4 sérums notés B, D O et R (quatre sérums de patients issus de la sérothèque du laboratoire et sensibilisés à certains antigènes responsables du PDF (hors études SOPHIA et PHS-ICAD)).

La plaque à revêtement Multisorp ne montre aucune différence entre les sérums pour chaque antigène. Des liaisons non spécifiques se créent car les valeurs du pool négatif ne sont pas différentes du pool positif. La plaque à revêtement Maxisorp montre une valeur de blanc (DO_{250nm} des puits sans sérum) de 2 à 3 fois plus élevée que le blanc de la plaque Polysorp. Le bruit de fond est considérable pour ce type de plaque. La plaque Polysorp semble être la plus adaptée à la fois pour les antigènes totaux et pour les antigènes recombinants car le blanc se situe autour d'une valeur de DO_{250nm} de 0,05, et un contraste est observé entre les différents pools et sérums.

L'utilisation de la plaque à revêtement Polysorp a été retenue pour l'ensemble des expériences de ce travail de thèse.

2.2. Choix des anti- IgG humain

Il existe différents type d'anticorps anti-IgG humain se fixant sur des parties différentes de l'anticorps primaire. La spécificité des 4 types d'anticorps fournis par Sigma-Aldrich® et

couplés à la peroxydase, a été testée selon le protocole de base décrit dans le paragraphe §III 2.7.2.

- Anti-IgG Humain *Fc specific* : se fixe sur les chaînes lourdes et légères de la partie constante de l'anticorps.
- Anti-IgG Humain *gamma γ chain*: se fixe uniquement sur les chaînes lourdes mais indifféremment sur la partie variable et constante.
- Anti-IgG Humain *Fab specific* : se fixe sur les chaînes lourdes ou légères de la partie variable.
- Anti-IgG Humain *whole molecule*: est un mélange de différents types d'anticorps.

L'expérience a été menée avec les 8 antigènes utilisés précédemment et avec les 3 pools et les 4 sérums B, D, O et R. Le protocole décrit en §III 2.7.2 a été respecté, seul le type d'anticorps secondaire a été changé.

Les résultats de l'expérience montrent que l'anti-IgG Humain *gamma γ chain*, se fixe peu aux anticorps primaires car les DO_{250nm} sont faibles par rapport aux trois autres expériences réalisées avec les trois autres types d'anticorps secondaires. A contrario, l'anti-IgG Humain *whole molecule* montre des DO_{250nm} plus hautes, et les anti-IgG Humain *Fc specific* et *Fab specific* ont des DO_{250nm} moyennes et similaires. Un test de Student a été réalisé sur le logiciel Stata9 permet de confirmer ces observations. Le choix s'est porté de manière égale sur les anti-IgG Humain *Fc specific* et *Fab specific*, mais l'anti-IgG Humain *Fab specific* se fixant sur des parties variables de l'anticorps primaire, il a été jugé bon de privilégier l'utilisation de l'anti-IgG Humain *Fc specific* se fixant sur les parties constantes de l'anticorps.