

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES**

Ecole Doctorale n°554
Environnements-Santé

Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement à Besançon,

Le 6 décembre 2017

Par

Adeline ROUZET

**Identification des protéines antigéniques impliquées dans
la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux.**

Directeur de thèse : Dr Sandrine ROUSSEL

Co-directeurs : Dr Gabriel REBOUX, Dr Benoit VALOT

UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement

Composition du Jury:

Pr. Christophe HENNEQUIN

Rapporteur

Pr. Laurence DELHAES

Rapporteur

Pr Paul DE-VUYST

Président du Jury

Dr Gabriel REBOUX

Co-directeur de thèse

Dr Benoit VALOT

Co-directeur de thèse

Dr Sandrine ROUSSEL

Directeur de thèse

Remerciements

Chaque thèse de doctorat a son histoire. La mienne située à l'interface entre l'Environnement et la Santé a été une véritable aventure, un enrichissement personnel et professionnel considérable conduisant au dépassement de soi. Le chemin emprunté pour arriver à cette étape fut long, parfois difficile mais ce fut une merveilleuse aventure humaine et scientifique. Ce travail a été possible grâce à de nombreuses personnes que je souhaite remercier chaleureusement en préambule de ce mémoire.

Tout d'abord je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux de recherche, et tout particulièrement les Professeurs Laurence Delhaes et Christophe Hennequin, d'avoir acceptés d'être rapporteurs de ceux-ci. Je sais à quel point votre temps est précieux, et je vous remercie d'accorder votre attention et votre expertise à ce travail. Je tiens également à remercier vivement le Professeur Paul De-Vuyst d'avoir accepté de faire partie du jury, ainsi que pour son implication, ses remarques avisées et son aide précieuse dans l'élaboration de ce projet.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, le Docteur Sandrine Roussel avec qui ce travail a débuté en Master 2. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir offert l'opportunité de mener à bien ce projet passionnant. Merci pour vos conseils, vos encouragements et pour votre optimisme sans faille. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée me permettant de réaliser mes travaux en toute autonomie. L'idée de « voler de ses propres ailes » (pardonnez-moi le jeu de mot) est un peu effrayante, mais j'ai l'impression d'avoir mûri, d'avoir acquis une certaine confiance grâce à vous.

Je remercie avec une profonde gratitude le Docteur Gabriel Reboux, co-directeur de ce travail de thèse d'avoir cru en mes capacités, de m'avoir permis d'exprimer des hypothèses sans limites sur le PEO, de m'avoir fait confiance et de m'avoir accordée beaucoup de temps pour la rédaction des articles. Malgré notre désaccord sur le rôle joué par le « petit pois » dans la survenue du PEO, ça a été un plaisir de travailler ensemble.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Benoit Valot, co-directeur de ce travail de thèse. Je le remercie pour son exigence et sa rigueur scientifique ainsi que pour son expertise en Protéomique qui a été d'un apport considérable à ce travail. Je tiens également à le remercier sincèrement pour le temps qu'il a accordé à l'élaboration des articles et à la relecture attentive de ce mémoire. Enfin, je tiens à le remercier pour son soutien...il a été présent pour moi, dans les bons moments mais aussi dans les passages les plus difficiles de cette thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur Laurence Millon, responsable du service de Parasitologie-Mycologie, pour sa disponibilité, sa confiance et son soutien depuis les prémices de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon comité de thèse Françoise Botterel et Jean-Benjamin Murat pour leurs disponibilités et leurs précieux conseils tout au long de cette expérience.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Emeline pour sa disponibilité et pour tous les services rendus, Anne-Pauline pour les prélèvements de fientes réalisés à Houston, et à toutes les techniciennes pour leur accueil et leur sympathie. Je souhaite en particulier remercier Karine et Manon pour la réalisation des analyses de double diffusion et d'immunoélectrophorèse. Enfin, je remercie Jennifer, pour sa bonne humeur quotidienne et pour son professionnalisme.

Je remercie vivement le Professeur Jean-Charles Dalphin et le Docteur Anne Gondouin, pour leur disponibilité et leur aide dans l'élaboration de l'étude Hypersens et lors de l'inclusion des témoins. Je les remercie également pour nos divers échanges sur la maladie et pour leur expertise dans le domaine des PHS. Je tiens également à remercier le Professeur Selman pour sa sympathie à mon égard, et d'avoir accepté de collaborer avec nous sur ce projet, malgré les difficultés administratives.

Un grand merci aux éleveurs de pigeons de la région de Franche-Comté d'avoir accepté de collaborer avec nous dans le projet Hypersens. Je remercie tout particulièrement Jean-Marie Garnier, pour son investissement : de la collecte des fientes, en passant par la mise en place de dispositifs expérimentaux dans ces volières, il m'a permis de découvrir le monde des passionnés de pigeons. Son aide m'a été très précieuse au cours de ce projet et je le remercie sincèrement.

Ma gratitude s'adresse aussi à tous mes collègues/amis de la fac avec qui j'ai traversé cette aventure.

Un énorme merci à mes deux colocos de bureau, Coralie et Audrey, pour leur soutien, leur encouragement, leur bonne humeur, pour ces moments de rigolades et pour leur amitié. Merci à Coralie, de m'avoir formé à (presque) toutes les techniques que je maîtrise désormais. Merci à Audrey, pour sa fidèle assistance technique dans les tests ELISA, et pour sa présence lors de certains prélèvements laissant des souvenirs inoubliables... Merci à Steffi, pour sa joie de vivre, pour son écoute, et pour son partage d'expérience. Merci à Alice, ma stagiaire de master 2 devenue thésarde à son tour. Merci pour sa générosité, pour ces précieux conseils et pour son soutien sans faille jusqu'au bout. Merci à Jenny, pour nos discussions sur les arts martiaux, je te remercie aussi pour ton écoute. J'associe également à ces remerciements les « bactérios » : Merci à Paulo pour sa bonne humeur, pour sa disponibilité et son aide lors des clonages difficiles. Merci à Arnaud, Lois, Hélène, Eleni, Anaïs, Catherine, Katy et Patrick

pour les moments conviviaux de midi passés ensemble. Merci à Marie du service d'hygiène, pour nos discussions scientifiques, et pour son aide dans les démarches administratives associées à la soutenance de thèse.

Mes remerciements vont également aux dirigeants de l'UMR Chrono-Environnement pour leur confiance et pour la mise à disposition du matériel informatique nécessaire à la réussite de cette thèse. Un grand merci aux dames de l'AFFDU d'avoir récompensé mon travail de thèse, mais aussi de leur intérêt et leur gentillesse.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Merci à tous mes amis qui m'ont entouré durant ces années : Camille, Fabrice, Jordan et Julie, Martine et Dom, Pierre et Flavie, Mathieu, Francis, Claire, Patrick, Pierre, Félix, Fabien, Roland, Didier, Sébastien, (et j'en oublie surement...).

On ne choisit pas sa famille et c'est là que je me dis que j'ai quand même beaucoup de chance !

A mes parents, Marina, Dominique, mes cousins, ma cousine Mary pour la relecture attentive de ce mémoire, ma filleule, mon grand-père, à ma belle-famille : Kolab, Vannak et Fred, Khémaly et Damien, Déborah et Sova et à mes neveux et nièces, pour leur soutien sans limite, pour leur encouragement, pour ces belles surprises de la vie, vous êtes une famille formidable ! Un grand merci à ma tante Myriam d'avoir cru en moi, de m'avoir souvent remotivée et d'avoir accepté de relire ce mémoire. Je remercie mille fois mes parents sans qui je n'aurai pu accomplir ce travail. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix et encouragée pour que j'aille le plus loin possible. Je remercie mon cher et tendre qui me supporte depuis plus de 15 ans maintenant, ce travail est aussi le tien. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien, pour ta philosophie de vie qui m'apaise au quotidien, mais aussi pour ton aide dans ce travail. Une nouvelle page se tourne et je suis heureuse de la poursuivre à tes côtés.

Ma mémoire est bien trop petite pour contenir toutes les personnes qui m'ont si gentiment aidé au cours de ma thèse. Si vous êtes en faites partie, et que vous n'êtes pas personnellement cités ci-dessus, je m'en excuse et vous envoi mille mercis.

Table des matières

Introduction	13
1. Contexte	14
2. Objectifs	16
Synthèse bibliographique	18
1. Définition et généralités sur les PHS	19
1.1 Antigènes	20
1.2 Epidémiologie	22
2. Maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux	24
2.1 Introduction	24
2.2 Multi-exposition aviaire	24
2.3 Physiopathologie	25
2.5 Aspects cliniques, radiologiques, fonctionnels et biologiques.	29
2.6 Traitement	41
2.7 Suivi de l'évolution de la maladie	42
2.8 Epidémiologie	43
2.9 Le poumon d'éleveur d'oiseaux : une forme particulière de PHS ?	47
2.10 Conclusion	48
3. Recherche de biomarqueurs pour le diagnostic sérologique du PEO	49
3.1 Description des matrices antigéniques	49
3.2 Caractérisation des protéines antigéniques	52
3.3 Approche immunoprotéomique pour la détection de protéines biomarqueurs pour le diagnostic sérologique des PHS	55
Chapitre 1 : Comparaison de l'efficacité de différents panels antigéniques pour le diagnostic sérologique du PEO	57
1. Contexte	58
2. Objectifs	59
3. Matériel et méthodes	59
4. Principaux résultats	61
5. Article Journal of Medical Microbiology 2017	61
6. Conclusion	66

Chapitre 2 : Spécificité des protéines antigéniques des fientes de pigeon, perruche et poule.	67
1. Contexte	68
2. Objectifs	68
3. Matériel et méthodes	68
4. Principaux résultats	70
5. Article Journal of Toxicology and Environmental Health 2014	70
6. Conclusion	78
Chapitre 3 : Identification des protéines antigéniques et description des matrices aviaires	79
1. Contexte	80
2. Objectifs	80
3. Matériel et méthodes	81
4. Principaux résultats	88
5. Article Journal of Immunological Methods 2017	89
6. Expérience complémentaire : Spécificité géographique des protéines antigéniques	99
7. Conclusion	101
Chapitre 4 : Protéines communes aux fientes de pigeon, perruche et poule	102
1. Contexte	103
2. Objectifs	103
3. Matériel et méthodes	104
4. Principaux résultats	105
5. Article Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology	105
6. Conclusion	112
Discussion générale	113
Conclusion et perspectives	121
Annexes	124
Références bibliographiques	128

Liste des Figures et des Tableaux

Figures

Figure 1:	Objectifs de thèse.	17
Figure 2 :	Physiopathologie de la maladie, source : (Bogaert et al., 2009).	26
Figure 3:	Coupe de tomodensitométrie thoracique chez un patient PEO. Aspect de fibrose pulmonaire	30
Figure 4:	Exemples de lames de double diffusion (A) et d'immunoélectrophorèse (B) positives.	34
Figure 5:	Schéma du principe du test ELISA	35
Figure 6 :	Schéma de la dynamique et de l'évolution possible de la maladie du PEO.	48
Figure 7 :	Illustration des matrices d'exposition : fientes, plumes et squames de pigeon.	49
Figure 8 :	Description de l'approche utilisée pour l'identification, la production et la validation des protéines utiles pour le diagnostic sérologique des PHS.	56
Figure 9 :	Méthodologie appliquée pour comparer l'efficacité de différents panels antigéniques.	60
Figure 10 :	Méthodologie associée à la description des protéines antigéniques spécifiques d'espèce.	69
Figure 11 :	Approche méthodologique associée à l'étude.	83
Figure 12 :	Schéma de principe d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS).	86
Figure 13 :	Exemple de spectre de masse identifié.	86
Figure 14 :	Procédure Hot Fusion pour le clonage de l'insert dans le plasmide Pet151/D-TOPO.	87
Figure 15 :	Gel SDS-PAGE.	99
Figure 16 :	Diagramme de Venn illustrant les protéines spécifiques et communes aux fientes de pigeons français et mexicains.	100
Figure 17 :	Méthodologie pour l'identification des protéines communes aux fientes de pigeon, perruche et poule et pour la recherche de protéines impliquées dans les réactions antigéniques croisées.	104

Tableaux

Tableau 1 :	Caractéristiques des antigènes impliqués dans les PHS et dans l'Asthme inspiré de Bourke et al., 2001.	20
Tableau 2 :	Formes de PHS les plus connues et antigènes associés, inspiré de Morell et al., 2016.	21
Tableau 3 :	Critères diagnostiques proposés par Schuyler et Cormier en 1997.	27
Tableau 4 :	Six critères prédicteurs du diagnostic des PHS proposés par Lacasse et al. 2003.	28
Tableau 5 :	Panel antigénique proposé par Phadia pour la recherche d'anticorps spécifiques IgG pour le diagnostic sérologique du PEO (Source : catalogue ThermoFisher scientifique 2017).	37
Tableau 6 :	Avantages et inconvénients des différentes techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic du PEO.	39
Tableau 7 :	Etudes de prévalence de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux.	43
Tableau 8 :	Comparaison des caractéristiques cliniques, physiologiques, radiologiques, histologique et du pronostic de la maladie du poumon de fermier et du poumon d'éleveur d'oiseaux.	47
Tableau 9 :	Liste des publications ayant décrit des antigènes impliqués dans la maladie du PEO.	53
Tableau 10 :	Critères d'inclusion des patients et des témoins exposés asymptomatiques dans la cohorte Hypersens.	82
Tableau 11 :	Classification des protéines antigéniques identifiées selon leur fréquence de détection dans les analyses western blot.	88
Tableau 12 :	Comparaison des protéines des fientes de pigeon, perruche et poule réalisée avec l'application Venn diagram generator.	111

Liste des abréviations

CVF :	Capacité Vitale Forcée
DD :	Double Diffusion
DLCO :	Diffusion Libre du monoxyde de Carbone
ELISA :	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ES :	Electrosynérèse
HLA :	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HS:	Hypersensitivité
IEP :	Immuno-electrophorèse
IFN :	Interféron
IgG / IgA / IgM :	Immunoglobuline G/A/M
IGLL1:	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1</i>
IL :	Interleukines
IPG:	<i>Immobilized pH Gradient</i>
IPTG :	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa:	kilo Dalton
KL-6:	Krebs Von den Lungen-6
LBA:	Lavage Broncho-Alvéolaire
LC-MS/MS:	<i>Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry</i>
m.o:	micro-organismes
ORF:	<i>Open Reading Frame</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDF:	Poumon de fermier
PDM:	Poumon de mécanicien
PEO:	Poumon d'éleveur d'oiseaux
PHS:	Pneumopathies d'hypersensibilité
ProE:	Proprotéinase E
SDS-PAGE:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SP-D:	<i>Surfactant Protein D</i>
TDM:	tomodensitométrie
TEA:	Témoins Exposés Asymptomatiques
TNE :	Témoins Non Exposés
TNF:	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
WB:	<i>Western Blotting</i>

Valorisation scientifique

Publications à comité de relecture

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Bénédicte ROGNON, Coralie BARERRA, Paul DE-VUYST, Jean-Charles DALPHIN, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2014;77 (12):724-30. doi: [10.1080/15287394.2014.889616](https://doi.org/10.1080/15287394.2014.889616)

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Jean-Charles DALPHIN, Anne GONDOUIN, Paul DE-VUYST, Thierry BALLIAU, Laurence MILLON, Benoit VALOT, Sandrine ROUSSEL. *An immunoproteomic approach revealed antigenic proteins enhancing serodiagnosis performance of Bird fancier's lung*. Journal of immunological methods. 2017;450:58. doi : [10.1016/j.jim.2017.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.012)

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Audrey LABOISSIERE, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Usefulness of à la carte antigens for bird fancier's lung serodiagnosis: total dropping extract and/or dropping's microflora antigens*. Journal of medical microbiology. 2017;66(10):1467-70. doi: [10.1099/jmm.0.000586](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000586).

Adeline ROUZET, Benoit VALOT, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Common proteins located in pigeon, budgerigar and hen droppings related to Bird Fancier's Lung*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. Practitioner's Corner Vol 28 [3], 2018. doi: [10.18176/jiaci.0223](https://doi.org/10.18176/jiaci.0223).

Publication sans comité de relecture

Adeline ROUZET, Elevage de pigeons: Quels risques pour votre santé ? Comment vous protégez ?

Bulletin du Carneau club Français n°207, Octobre 2017, p 5-6.

Bulletin n°101 du Club Français du Pigeon Gier, Octobre 2017, p 14-16.

Revue Colombiculture n°232, Novembre-Décembre 2017, ISSN 0241-1431

Communications scientifiques

- *Communications orales*

Gabriel REBOUX, Adeline ROUZET. Pneumopathies d'hypersensibilité d'origines microbiennes et maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux : Co-expositions, communauté antigénique, limites et

spécificités du diagnostic sérologique, Séminaire de microbiologie et maladies infectieuses 2013-2014, 19 février 2014, Bruxelles (Belgique).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Sandrine ROUSSEL. Identification des protéines antigéniques impliquées dans la maladie du Poumon d'éleveur d'oiseaux. Séminaire des doctorants Chrono-Environnement, 12 décembre 2014, Besançon, (France).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Identification of antigenic proteins in Bird Fancier's Lung, 4th International Congress on Analytical Proteomics, 7 septembre 2015, Lisbonne (Portugal).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Protéines d'intérêt pour le diagnostic sérologique de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux, Société de médecine de Franche-Comté, Séance de Pneumologie, 8 octobre 2015, Besançon (France).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Identification des protéines antigéniques impliquées dans la maladie du Poumon d'éleveur d'oiseaux. Société de Biologie de Besançon, 10 décembre 2015, Besançon, (France).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Identification et spécificité d'espèce des protéines d'intérêt dans le diagnostic sérologique de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux, Congrès de pneumologie de la langue Française, 29-31 janvier 2016, Lille, (France).

- *Diffusion auprès du grand public*

Adeline ROUZET, La maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux, Journée technique nationale du Lynx de Pologne, 9 septembre 2017, Saint-Vit, (France).

- *Communications affichées*

Gabriel REBOUX, Adeline ROUZET, Bénédicte ROGNON, Coralie BARRERA, Paul DE-VUYST, Jean-Charles DALPHIN, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Species Specificity of Immunogenic Proteins in Bird Fancier's Lung*. American Thoracic Society congress, 16-22 Mai 2014, San Diego (USA).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Identification des protéines antigéniques impliquées dans la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux*, Forum des jeunes chercheurs, 18 juin 2015, Dijon (France).

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. *Identification de protéines d'intérêt dans le diagnostic sérologique de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux*, Journée de recherche respiratoire, 9-10 octobre 2015, Dijon (France).

Distinctions scientifiques

Prix Excellent shotgun presentation :

Adeline ROUZET, Gabriel REBOUX, Coralie BARRERA, Bénédicte ROGNON, Jean-Charles DALPHIN, Paul DE-VUYST, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Identification of antigenic proteins in Bird Fancier's Lung, 4th International Congress on Analytical Proteomics, 7 septembre 2015, Lisbonne (Portugal).

1^{er} Prix ex-aecquo :

Bourse délivrée par l'Association Française des Femmes Diplômées des Universités 2015.

Introduction

1. Contexte

Les maladies allergiques constituent une part importante des préoccupations de santé publique. Parmi elles, les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) sont des maladies pulmonaires consécutives à l'inhalation répétée de substances organiques (bactéries, champignons, protéines aviaires...). Il existe diverses dénominations des PHS selon l'environnement et la substance antigénique impliquée. La maladie du « Poumon d'éleveur d'oiseaux » (PEO) est l'une des formes de PHS les plus fréquentes à travers le monde (Okamoto et al., 2013a; Selman et al., 2010). Les personnes peuvent être exposées aux antigènes aviaires dans le cadre de leur activité professionnelle, au cours de leur loisir ou à leur domicile (oreiller en plumes, oiseaux). Dans la plupart des cas, le développement de la maladie fait suite à une exposition aux oiseaux appartenant à l'ordre des Colombiformes (pigeons, colombes, tourterelles) et des Psittaciformes (perruches, perroquets). A l'inverse, les cas liés aux poules sont très rares (Choy et al., 1995).

Les substances responsables de la maladie sont localisées dans les fientes, les plumes, les squames (poudre blanchâtre située à l'insertion des plumes) et le sérum des oiseaux (McSharry et al., 2000). Plusieurs études se sont intéressées à l'implication potentielle des micro-organismes présents dans les volières (moisissures, bactéries, virus) dans le développement du PEO, (Fink et al., 1968; Scribner et al., 1980) et n'ont pas établi de lien entre la présence d'anticorps contre ces micro-organismes et la maladie.

Actuellement, on connaît peu de choses sur la nature des antigènes. Certaines protéines ont été suspectées dans la littérature : il s'agit principalement des immunoglobulines aviaires, de la mucine intestinale, d'enzymes sériques et de l'albumine (McSharry et al., 2000). Toutefois, aucune étude n'a encore permis d'identifier clairement les protéines à l'origine de la maladie. Le génome de *Columba livia*, l'espèce la plus fréquemment impliquée dans cette maladie, est disponible depuis septembre 2013 offrant ainsi de nouvelles opportunités pour identifier les protéines antigéniques (Shapiro et al., 2013). Au manque de données sur la nature exacte des protéines à l'origine de la pathologie, s'ajoute le manque de connaissances sur la spécificité des protéines selon les espèces et selon l'origine géographique de l'oiseau. Les résultats des analyses sérologiques montrent que les anticorps de patients acquis par contact avec une espèce d'oiseau reconnaissent des protéines d'autres espèces. Ainsi, lorsque l'on recherche les anticorps sériques spécifiques avec des extraits de fientes d'oiseaux auxquels le patient n'est pas exposé, on observe une réaction antigène-anticorps. Ces réactions croisées soulèvent plusieurs questions aujourd'hui non résolues sur la spécificité des antigènes aviaires.

La maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux est invalidante, mais en principe non létale si le patient réduit suffisamment tôt son exposition antigénique (Bourke et al., 2001; Chan et al., 2012). Le diagnostic

repose sur un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques et fonctionnels parmi lesquels la sérologie occupe une place importante. Les antigènes utilisés pour les analyses sérologiques sont des « broyats » purifiés de fientes, et de sérum d'oiseaux dont la qualité est très dépendante du processus de fabrication. Ainsi il existe d'importantes variations de performance d'un fournisseur à l'autre et, pour un même fournisseur selon les lots commercialisés. Par ailleurs, notre laboratoire teste régulièrement les micro-organismes issus de prélèvements aviaires pour le diagnostic sérologique du PEO, afin de répondre aux demandes des cliniciens, mais l'utilité de ces analyses n'a encore jamais été évaluée. Les analyses d'immunoprécipitation (Double diffusion et immunoélectrophorèse) sont couramment employées dans les laboratoires d'analyse médicale pour le diagnostic du PEO (Rodrigo et al., 2010). Ces techniques sont performantes, mais leurs réalisations manquent de standardisation, notamment en raison de la qualité des antigènes.

Ce problème pourrait être levé par l'utilisation d'antigènes recombinants. Le principe est d'utiliser une protéine antigénique d'intérêt fabriquée par génie génétique. Un test sérologique standardisé et performant utilisant des antigènes recombinants pourrait intéresser des fournisseurs car la sérologie PEO est un examen de biologie médicale courant dans la plupart des laboratoires (Données Biolam - Régime Général - Hors sections locales mutualistes : 5178 demandes en 2015 sur le territoire français). Au 1er novembre 2020, l'ensemble des laboratoires de biologie médicale français devront disposer d'une accréditation (Cofrac ISO 15189) portant sur la totalité de leur activité. L'objectif est de garantir la fiabilité des examens réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par le laboratoire. Ainsi, le remplacement des techniques classiques d'immunoprécipitation par la réalisation de tests plus standardisés tels que les tests immuno-enzymatiques (ELISA) basés sur l'utilisation d'antigènes recombinants faciliterait l'accréditation de cet examen. De plus, l'amélioration des performances des analyses sérologiques pourrait permettre de pallier l'utilisation du lavage broncho-alvéolaire (éprouvant), de la biopsie pulmonaire et du test de provocation par inhalation (dangereux).

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'UMR Chrono-Environnement a acquis un savoir-faire dans la recherche de protéines d'intérêt pour les sérologies des maladies allergiques et dans la fabrication d'antigènes recombinants. Ainsi, les travaux de l'équipe ont permis d'identifier des protéines utiles pour le diagnostic sérologique de deux PHS d'origine professionnelles : le poumon de fermier (PDF) et le poumon de mécanicien (PDM) (Barrera et al., 2014; Millon et al., 2012; Rognon et al., 2016; Roussel et al., 2011). Ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche d'amélioration du diagnostic sérologique de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux.

2. Objectifs

L'objectif principal de ce travail est de mieux connaître la nature antigénique des matrices aviaires pour améliorer et standardiser le diagnostic sérologique de la maladie du PEO. Cet objectif principal s'articule en objectifs secondaires décrits ci-dessous et présentés dans la **figure 1**.

1. Evaluation de l'efficacité de différents panels antigéniques pour le diagnostic sérologique du PEO.

L'objectif de ce premier chapitre consiste à comparer l'efficacité des antigènes produits à partir des fientes auxquelles les patients sont exposés avec ceux du panel antigénique standard et, d'autre part d'évaluer la sensibilisation des patients contre les micro-organismes des fientes.

2. Protéines antigéniques spécifiques aux fientes de pigeon, perruche et poule.

L'objectif est d'évaluer la spécificité des protéines antigéniques entre différentes races d'une même espèce d'oiseau, et entre différentes espèces.

3. Identification et production de protéines antigéniques de pigeon performantes pour le diagnostic sérologique du PEO

Les objectifs de ce chapitre consistent à identifier les protéines antigéniques à partir des fientes de pigeon, puis de rechercher leurs présences dans les squames et le sérum de pigeon. Les protéines antigéniques sont produites par génie génétique en protéines recombinantes. Les performances diagnostiques de ces protéines sont évaluées et comparées à celles du diagnostic sérologique actuel. Afin d'évaluer l'efficacité de notre test à l'international nous nous sommes intéressés à la spécificité géographique des protéines antigéniques identifiées.

4. Identification des protéines communes aux fientes de pigeon, perruche et poule

L'objectif de ce dernier chapitre est d'identifier, puis de comparer les protéines des fientes de pigeon, perruche et de poule. Ensuite, il s'agit d'apporter des arguments afin de mieux comprendre les réactions antigéniques croisées mises en évidence dans les analyses sérologiques. Nous avons également essayé de comprendre pourquoi l'exposition aux poules est rarement en cause dans cette maladie.

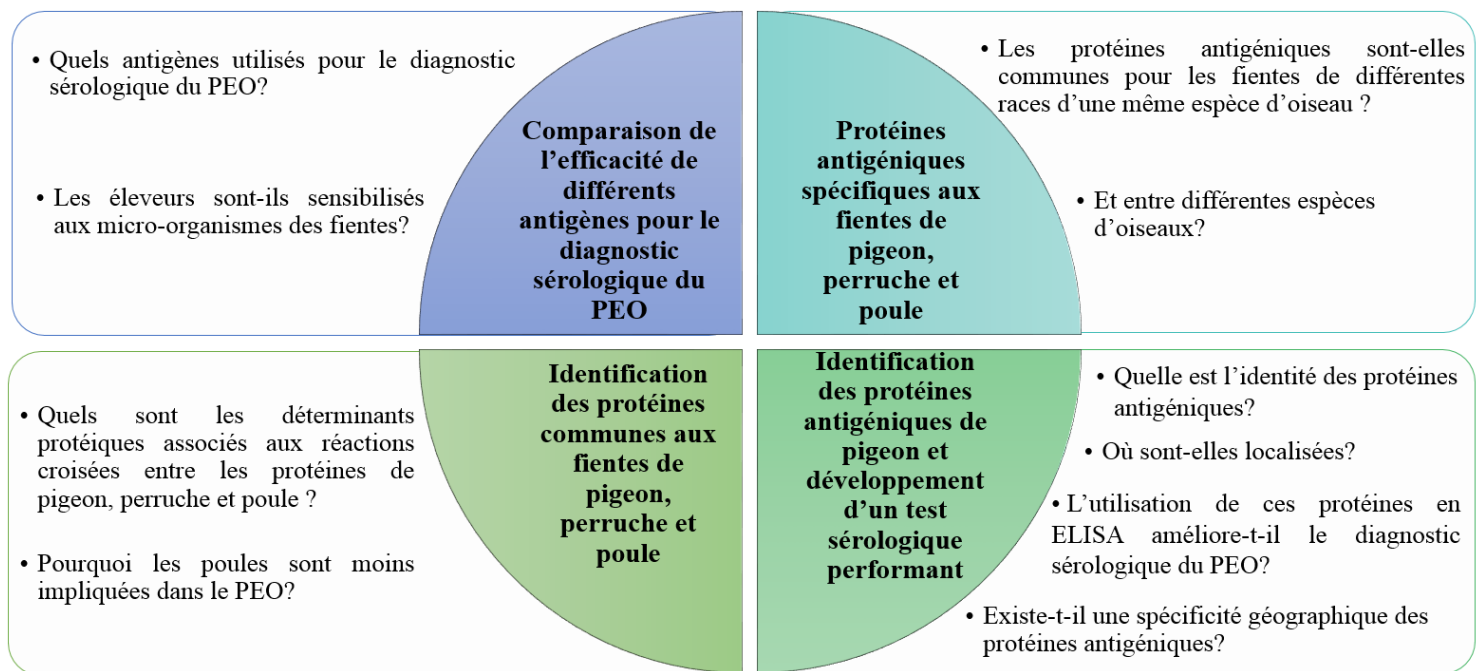


Figure 1: Objectifs de thèse.

Synthèse bibliographique

1. Définition et généralités sur les PHS

Les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) représentent un groupe de maladies pulmonaires lié à l'inhalation de certaines substances organiques et chimiques. Il n'y a pas de définition universellement acceptée des PHS (Fink et al., 2005; Lacasse et al., 2003). Cependant, il existe un consensus sur les principales caractéristiques de ces maladies : 1) les PHS sont des maladies pulmonaires accompagnées ou non de manifestations systémiques (fièvre, perte de poids) ; 2) elles sont causées par l'inhalation répétée d'un antigène auquel l'individu est sensibilisé et présente une hyperréactivité, et 3) les PHS sont définies par une exposition à un antigène donné, une sensibilisation à cet antigène et par la présence de symptômes cliniques associés (Lacasse et al., 2012). La maladie est caractérisée par l'accumulation de lymphocytes au niveau alvéolaire, la formation de granulomes se traduisant par le développement d'une fibrose ou d'un emphysème pulmonaire (Selman et al., 2010; Yoshizawa et al., 1995). Les symptômes s'apparentent à un état pseudo grippal accompagné de toux et de difficultés respiratoires (Lacasse et al., 2012).

De nombreuses personnes exposées développent une réponse immunitaire spécifique, qui se traduit par la présence d'anticorps sériques de type IgG et un nombre accru de lymphocytes dans le poumon (Cormier et al., 1984), mais ne développent jamais la maladie (Cormier et al., 2004). En effet, les PHS surviennent seulement chez une faible proportion d'individus exposés aux substances antigéniques, ce qui suggère la mise en jeu d'interactions complexes entre des cofacteurs environnementaux et génétiques (Fink et al., 2005). Les facteurs environnementaux tels que la concentration en antigènes, la fréquence d'exposition et la nature des antigènes (taille, solubilité) influencent la durée de la maladie et sa sévérité (Bourke et al., 2001). Ces pathologies sont très invalidantes et peuvent évoluer vers une insuffisance respiratoire chronique et entraîner prématurément le décès du patient.

Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace et la meilleure option thérapeutique demeure l'éviction antigénique. Des corticostéroïdes systémiques peuvent accélérer la disparition des manifestations cliniques de la maladie. Toutefois, leur utilisation ne semble pas changer l'évolution à long terme de la maladie (Kokkarinen et al., 1992).

1.1 Antigènes

Les antigènes impliqués dans les PHS possèdent des caractéristiques qui les distinguent de ceux impliqués dans d'autres pathologies pulmonaires telles que l'asthme (**tableau 1**). Ils doivent être « respirables » (pour rejoindre les alvéoles pulmonaires), ne pas dépasser 3 µm de diamètre, être résistants à l'épuration mucociliaire, être capables de fixer le complément et d'agir comme adjuvant pour induire la réponse immunologique par la production d'IgG (Dalphin, 2001).

Tableau 1: Caractéristiques des antigènes impliqués dans les PHS et dans l'Asthme inspiré de Bourke et al., 2001.

	Antigènes PHS	Antigènes Asthme
Taille (diamètre)	Inférieure à 3 µm	~ 30 µm
Localisation	Arbre bronchique distal et alvéoles pulmonaires	Voies aériennes proximales
Réponse immunitaire	Réponse anticorps IgG	Réponse anticorps IgE

Plus de 300 antigènes sont rapportés comme pouvant être impliqués dans la survenue d'une PHS incluant des bactéries (actinomycètes thermophiles), des moisissures (*Aspergillus*, *Candida*, *Saccharopolyspora*), des protéines animales (oiseaux, rat, insectes) et des composés chimiques (diisocyanates) (Rutt, 2012). En raison de cette grande variabilité antigénique, les personnes peuvent être exposées au cours de leur activité professionnelle, à leur domicile ou encore au moment de leur loisir. Le poumon d'éleveur d'oiseaux et le poumon de fermier sont les PHS les plus fréquentes respectivement dues à l'inhalation de protéines aviaires et de spores d'actinomycètes thermophiles et/ou de moisissures. Les formes de PHS les mieux décrites sont listées dans le **tableau 2**.

D'une manière générale, de nouveaux agents étiologiques sont continuellement découverts. Récemment, un cas de PHS a été décrit chez une esthéticienne en raison de la contamination de son appareil à vapeur (vapozone) par *Pseudomonas sp* (Soumagne et al., 2016). En août 2016, un cas mortel de PHS a fait la Une des médias internationaux « Royaume-Uni : un joueur de cornemuse s'empoisonne avec son instrument ». Il s'agit du premier cas déclenché chez un musicien de cornemuse (King et al., 2017).

Tableau 2 : Formes de PHS les plus connues et antigènes associés, inspiré de Morell et al., 2016.

Dénomination de la PHS (sources antigéniques)	Antigènes
PHS d'origine professionnelles	
Poumon de fermier (foin, fourrage, paille)	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Lichtheimia corymbifera</i> , <i>Eurotium amstelodami</i>
Poumon de compost (compost)	<i>T. vulgaris</i> , <i>Aspergillus sp</i>
Suberose (moisissure du liège)	<i>Penicillium frequentans</i> , <i>Aspergillus sp</i>
Bagassose (canne à sucre)	<i>T.vulgaris</i> , <i>T.sacchari</i>
Maladie des champignonnistes (champignons, et compost des champignons)	<i>Penicillium sp</i> , <i>Aspergillus sp</i>
Alvéolites liées au travail du bois (sciure)	<i>Penicillium sp</i>
Alvéolites aux saucissons (saucissons)	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>
Maladie des fromagers (fromages)	<i>Penicillium casei</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Acarus siro</i>
Alvéolites des ouvriers de l'industrie chimique (laques, vernis, peintures)	Isocyanates et anhydrides
Maladie des climatiseurs ou des humidificateurs (climatiseurs, humidificateurs)	<i>T. candidus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Aureobasidium pullulans</i> ; <i>Naegleria gruberi</i> , <i>Acanthamoeba polyhaga</i> , <i>Acanthamoeba Castellani</i>
Poumon des mécaniciens (fluides de coupe)	<i>Mycobacterium immunogenum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus</i>
PHS d'origine domestiques et apparentées aux loisirs	
Poumon d'éleveur d'oiseaux/alvéolites aux plumes d'oies (fientes, plumes, squames)	Protéines aviaires (albumine sériques, immunoglobulines, mucine intestinale)
Poumon de Jacuzzi ou de sauna (vapeur d'eau)	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Cladosporium</i>
Maladie des climatiseurs / humidificateurs	<i>Cephalosporium acremonium</i> , <i>Candida albicans</i>
Fièvre d'été (Japon) (logements)	<i>Trichosporon cutaneum</i>
Poumon de domestique (logements)	moisissures domestiques
Alvéolite liée à l'utilisation de bois (copeaux, granulés)	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Alternaria sp</i>
Maladie des joueurs de saxophone (instruments)	<i>Ulocladium botrytis</i> and <i>U.Phoma</i>

1.2 Epidémiologie

La prévalence des PHS est difficile à appréhender car elle varie selon les critères retenus pour le diagnostic et les méthodes utilisées pour l'enquête épidémiologique. Par ailleurs, les variables géographiques incluant les conditions climatiques, les pratiques industrielles et agricoles, les coutumes locales et les habitudes tabagiques ont une incidence sur la survenue des PHS (Bourke et al., 2001). Par exemple, les cas de poumon de fermier sont plus fréquents à la fin de l'hiver (foin stocké pour nourrir les bovins), dans les régions à forte pluviométrie et aux conditions hivernales sévères (Roussel et al., 2004; Terho et al., 1986).

Les études épidémiologiques indiquent une prévalence de 5 à 15% parmi les individus exposés aux antigènes impliqués dans ces maladies (Lopez and Salvaggio, 1987). Des études menées aux Etats-Unis (Wisconsin), en Finlande et en France estiment qu'entre 1% et 19% des agriculteurs exposés aux foin moisiss sont susceptibles de développer le poumon de fermier (PDF) (Depierre et al., 1988; Gruchow et al., 1981; Terho et al., 1986). Par ailleurs, la prévalence du PEO est estimée entre 6-20% des éleveurs de pigeons en Espagne (de Castro et al., 1993b) et entre 0,5-7,5% des éleveurs de perruche au Royaume-Unis (Hendrick et al., 1978).

Selon les données issues du registre des maladies pulmonaires interstitielles de 3 pays européens (Belgique, Allemagne et Italie), les PHS représentent 4% à 15% d'entre elles (Thomeer et al., 2001). Au Nouveau-Mexique, l'incidence annuelle (1988-1990) des maladies pulmonaires interstitielles est de 30/100 000 habitants, et les PHS représentent moins de 2% des cas (Coultais et al., 1994). Les PHS représentent respectivement au Brésil et au Danemark la 2^{ème} (15%) et 3^{ème} (7%) cause de maladies pulmonaires interstitielles (Pereira et al., 2016).

Les études épidémiologiques montrent que ces maladies sont plus fréquentes chez les hommes d'âge moyen (50 ans) (Bourke et al., 2001) et que le tabagisme est moins répandu chez les patients atteints de PHS que dans une population témoin de non-fumeurs (Depierre et al., 1988). Cependant, les PHS sont diagnostiquées chez les patients de tout âge, incluant les enfants et les nourrissons (Bourke et al., 2001). Le taux de mortalité est trois fois supérieur chez les patients atteints de PHS par rapport à la population générale, ce qui démontre que, bien que les symptômes soient souvent réversibles, certains patients souffrant de formes chroniques décèdent prématurément (Solaymani-Dodaran et al., 2007).

Les susceptibilités individuelles, principalement attribuées aux prédispositions génétiques, peuvent expliquer la faible survenue de la maladie parmi les individus exposés. Plusieurs études ont suggéré des liens entre certains types de HLA (Human Leucocyte Antigen) et les PHS, avec une surreprésentation du type HLA-DR7 chez les éleveurs de pigeons mexicains (Selman et al., 1987), HLA-B8 chez les sujets de type caucasiens atteints de poumon de fermier et/ou de poumon d'éleveur d'oiseaux et le type HLA-DQw3 pour les sujets atteints par la fièvre d'été au Japon (Bourke et al., 2001).

D'autres facteurs génétiques ont été suggéré mais n'ont pas été évalués sur des cohortes « cas-témoins » suffisamment nombreuses pour être établis avec certitude (Selman et al., 2012). Par ailleurs, une étude japonaise montre un regroupement familial chez 17,5% des patients atteints de PHS chronique (Okamoto et al., 2013b).

2. Maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux

2.1 Introduction

Une description typique de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux (PEO) avait été réalisée en 1897 parmi les « gaveurs de pigeon » sur les marchés parisiens (McSharry et al., 2000). Elle fut décrite pour la première fois en 1965 par Reed, Sosman et Barbee chez un éleveur de pigeons hospitalisé à plusieurs reprises et présentant des signes et des symptômes compatibles avec une pneumonie (Reed et al., 1965).

Depuis, le PEO est reconnu comme la forme de PHS la plus commune et fait partie des principales menaces aviaires pour la santé respiratoire humaine, hors zoonoses (Harris, 1991; Sharma, 2013). De nombreuses espèces d'oiseaux sont impliquées dans cette maladie, mais les cas les plus fréquents font suite à une exposition aux Columbiformes (pigeons, colombes, tourterelles) et aux Psittaciformes (perruches, perroquets). Toutefois, certains cas sont rapportés suite à une exposition aux canaris, aigles, chouettes, dindes, canards, oies et faisans (Chan et al., 2012; Choy et al., 1995; Kokkarinen et al., 1994; Partridge et al., 2004). L'exposition aux pigeons est la plus étudiée dans la maladie du PEO.

2.2 Multi-exposition aviaire

L'exposition aux protéines aviaires peut être multiple. La plupart du temps, la maladie survient chez des éleveurs d'oiseaux, dans ce cas l'agent étiologique est rapidement identifié. Les oiseaux peuvent partager le domicile de l'éleveur (perruches, canaris...) ou vivre à l'extérieur du domicile dans des volières aménagées (pigeons). Cependant, l'exposition peut être plus insidieuse lorsqu'elle concerne un oreiller en plumes, une couette en duvet ou encore des objets décoratifs en plumes. Un cas mortel est décrit chez une femme suite au nettoyage régulier de son balcon souillé par les fientes et les plumes des pigeons de ville (du Marchie Sarvaas et al., 2000).

Les professionnels exposés aux oiseaux ou à des matériaux dérivés (élevage, zoo, animalerie, fabricants d'oreillers, compostage...) sont également susceptibles de développer le PEO. Une institutrice a développé la maladie suite à la colonisation de l'école par des pigeons sauvages (Curtis et al., 2002). Au cours de leur loisir, les passionnés d'oiseaux s'exposent quotidiennement et ce, parfois dans des environnements confinés comme par exemple pour se rendre aux compétitions (voitures). Le développement de la maladie peut aussi faire suite à une exposition quotidienne aux antigènes aviaires dans l'environnement extérieur. En effet, un cas de PEO a été diagnostiqué chez une patiente qui fréquentait quotidiennement un parc public peuplé d'étourneau pour se rendre au travail (Borderías et al., 2010).

L'exposition aux oiseaux peut avoir lieu au domicile, sur le lieu de travail, durant les loisirs ou sur tout autre site régulièrement fréquenté par des individus sensibilisés. Le développement de la maladie n'est pas systématiquement associé à l'élevage d'oiseaux.

2.3 Physiopathologie

Les PHS mettent en jeu des mécanismes immuno-allergiques dont l'évènement initial est la sensibilisation à un antigène inhalé. Après cette première étape, les expositions suivantes à cet antigène génèreront les signes et les symptômes de la maladie, par la mise en jeu de mécanismes humoraux et cellulaires participant au développement des lésions tissulaires. Les étapes principales sont présentées dans la **figure 2**.

Les réactions d'hypersensibilité (HS) ont été classées par Gell et Coombs en fonction de la vitesse de la réaction et du mécanisme impliqué (Gell and Coombs, 1963). Selon cette classification, ces réactions sont classées en 4 grands types : les types I (HS immédiate, dépendante des IgE), II (HS par cytotoxicité liée aux IgM et/ou IgG), III (HS semi-retardée, par complexes immuns à IgM et/ou IgG), et IV (HS retardée, liée au recrutement et l'activation de lymphocytes T spécifiques). Les PHS sont considérées comme une pathologie combinant une réaction immune de type III et IV.

- Le mécanisme menant aux réactions d'hypersensibilité de type III est initié par l'inhalation répétée d'antigènes conduisant 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 épithélioïdes, et fusionnent pour former des cellules géantes.

Après reconnaissance d'un antigène donné, les cellules inflammatoires s'accumulent dans les poumons des patients (Lacasse et al., 2004). Le contact avec l'agent étiologique produit initialement un recrutement de polynucléaires neutrophiles au niveau alvéolaire (Ismail et al., 2006). Ces derniers libèrent de l'IFN γ (impliqué dans la formation du granulome), de l'élastase (impliqué dans l'altération de l'élasticité des fibres et développement de l'emphysème), et des radicaux libres oxydants (qui altèrent

les tissus et font le lit de la fibrose) à l'origine des lésions retrouvées dans les formes chroniques de la maladie (Girard et al., 2009). Les lymphocytes sont aussi retrouvés en grand nombre et apparaissent 24h environ après le contact antigénique. Ce sont les cellules les plus nombreuses dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des patients (Lacasse et al., 2004). La lymphocytose alvéolaire est une caractéristique majeure de la maladie.

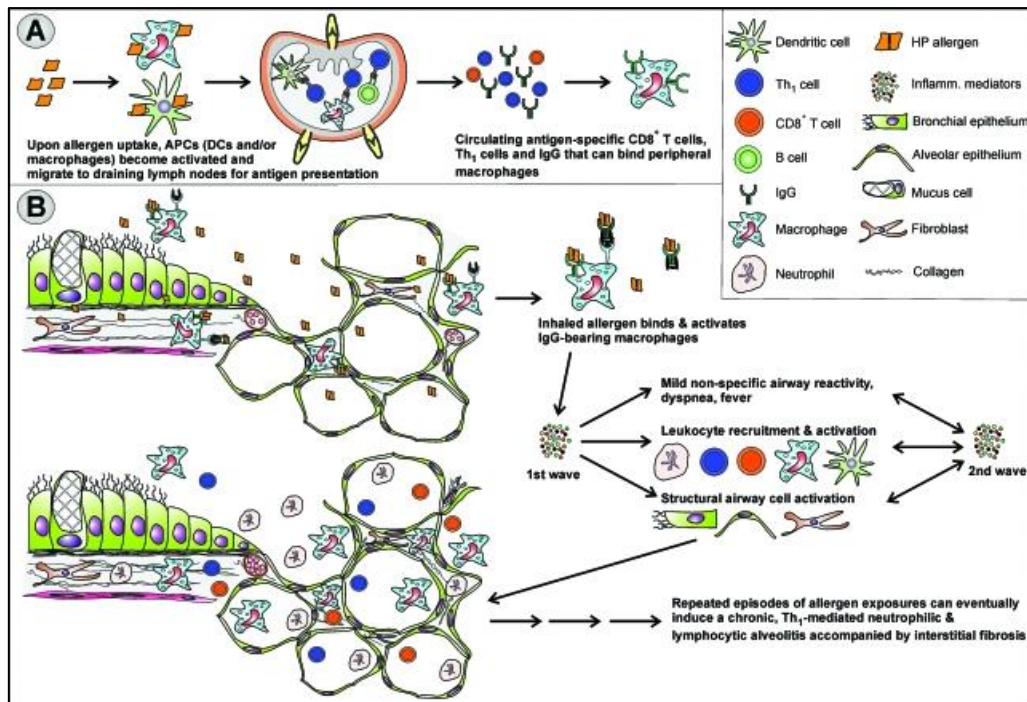


Figure 2 : Physiopathologie de la maladie, source : (Bogaert et al., 2009).

A) Exposition primaire à l'allergène : les cellules présentatrice de l'antigène (APCs) vont prendre en charge l'antigène, être activées, et migrer vers les ganglions lymphatiques. La présentation de ces antigènes va entraîner la production de cellules T activées (Th1 et CD8+) et d'IgG, pouvant se lier aux macrophages.

B) L'inflammation des voies aériennes supérieures est initiée lors des expositions antigéniques suivantes. Les complexes immuns (antigène-IgG) activent la cascade du complément et les macrophages alvéolaires, ce qui génère la production de radicaux libres oxygénés et la libération de médiateurs inflammatoires dont le TNF α et l'IL-12. Les cellules Th1 et CD8+ seront alors activées, recrutées et vont être à l'origine de l'infiltrat cellulaire de polynucléaires neutrophiles, caractéristiques des pneumopathies d'hypersensibilité.

2.4 Critères diagnostiques

Les PHS sont connues et étudiées depuis de nombreuses années, et pourtant il subsiste un manque de connaissances, notamment dans l'épidémiologie, la pathogénèse, les facteurs de susceptibilité génétique, le diagnostic, la classification, le traitement et le suivi (Vasakova et al., 2017). Le délai du diagnostic est un aspect crucial pour l'évolution et le pronostic de la maladie (Morell et al., 2008)

Plusieurs recommandations de critères diagnostiques sont publiées pour les PHS (Cormier and Lacasse, 1996; Richerson et al., 1989; Schuyler and Cormier, 1997; Terho, 1986), mais leurs capacités diagnostiques ne sont pas validées. En 1989, Richerson et ses collègues suggèrent d'établir le diagnostic pour les patients (1) exposés à un antigène impliqué dans la maladie (2) ayant des anticorps dirigés contre cet antigène, (3) avec un examen clinique (4), des tests de la fonction pulmonaire et une imagerie compatibles avec une maladie pulmonaire interstitielle (5). En 1997, Schuyler et Cormier proposent l'association d'au moins 4 critères majeurs et 2 critères mineurs définis dans le **tableau 3**, ainsi que l'exclusion d'autres maladies présentant des symptômes similaires pour établir le diagnostic.

Tableau 3: Critères diagnostiques proposés par Schuyler et Cormier en 1997.

Critères majeurs	Critères mineurs
Symptômes compatibles avec PHS	Râles crépitants
Exposition antigène connu : recherche d'anticorps sériques ou dans le LBA	Diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO)
Imagerie compatible	Hypoxémie artérielle au repos ou durant l'exercice
Lymphocytose au LBA (si LBA réalisé)	
Histologie compatible avec PHS (si biopsie réalisée)	
Symptômes lors d'une exposition à l'antigène	

En 2003, Lacasse et al., simplifient le diagnostic et proposent six critères simples permettant de suspecter une PHS de forme aiguë, subaiguë ou chronique avec une bonne valeur prédictive, sans avoir recours à des explorations invasives (Lacasse et al., 2003). Cette étude multicentrique internationale de type cas-témoin, portait sur une cohorte de 400 patients et les critères retenus ont été validés sur une cohorte de 261 autres patients. Un patient présentant les 6 critères listés dans le **tableau 4** a une probabilité de 0,98 d'avoir une PHS. Les résultats de cette étude peuvent facilement être utilisés en clinique. Un score de probabilité diagnostique est calculé selon le poids respectif de chaque critère et au-delà de 0,9, le diagnostic peut être confirmé. Dans le cas du PEO, une probabilité de 75% peut suffire à établir le diagnostic puisque l'agent causal (l'oiseau) est souvent bien identifié. En effet, le critère « Exposition à un antigène potentiel » est le facteur prédictif le plus important dans le diagnostic clinique de la maladie. 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).

Tableau 4: Six critères prédictifs du diagnostic des PHS proposés par Lacasse et al. 2003.

Critères prédictifs pour le diagnostic des PHS
Exposition à un antigène potentiel
Présence d'anticorps spécifiques contre ce même antigène
Episodes récidivants de symptômes respiratoires ou systémiques évoquant la maladie
Râles crépitants à l'auscultation pulmonaire
Symptômes survenant 4-8 heures après l'exposition à l'antigène
Perte de poids

Récemment, Vasakova et al., proposent de nouveaux critères diagnostiques et une nouvelle classification des PHS en se basant sur les données disponibles et sur leur expérience personnelle (Vasakova et al., 2017). Les résultats des examens permettent de classer le diagnostic selon les 4 catégories suivantes : PHS certaine, PHS probable, PHS possible, PHS improbable.

Le diagnostic est basé sur la combinaison des résultats des examens suivants : une évaluation approfondie de l'histoire du patient, un examen physique (râles crépitants), une tomodensitométrie haute résolution (opacités en verre dépoli, micronodules), la recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum pour confirmer l'exposition ou pour le dépistage, et le lavage broncho-alvéolaire (> 20% lymphocytes). La réalisation d'une biopsie pulmonaire (confirmation histopathologique) ou d'un test de provocation par inhalation le cas échéant, est suggérée pour les patients dont le diagnostic est incertain. Toutefois, ces critères doivent être validés afin d'être utilisés comme recommandations pour le diagnostic des PHS.

Les approches utilisées pour diagnostiquer et classer les PHS ont évolué au fil des années. À l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus international pour les critères diagnostiques et ceux-ci manquent souvent d'homogénéité entre les études. Ces maladies sont parfois difficiles à distinguer d'autres maladies pulmonaires, et il n'existe pas de test de laboratoire ou de biomarqueurs permettant d'établir le diagnostic de manière standardisée et efficace. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir recours à une approche multidisciplinaire incluant des critères cliniques, radiologiques, fonctionnels et biologiques nécessitant parfois la réalisation de tests invasifs pour le patient.

2.5 Aspects cliniques, radiologiques, fonctionnels et biologiques

2.5.1 Aspects cliniques : Symptômes

Les manifestations cliniques des PHS ont jusqu'à présent été décrites au moyen de la classification en 3 formes de Richerson (Richerson et al., 1989) détaillée ci-dessous :

- **La forme aiguë** est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, frissons, sueurs, courbatures, céphalées et asthénie apparaissant 4-8h après l'exposition aviaire (maximum 24h). 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 peuvent durer de quelques heures à quelques jours.
- **La forme subaiguë**, apparaît progressivement en quelques semaines. La dyspnée, la toux et l'altération de l'état général du patient sont au premier plan. La relation avec l'exposition est moins prononcée que dans la forme aiguë, mais les signes s'aggravent souvent au contact antigénique. Les râles crépitants sont constants. La maladie peut évoluer en quelques semaines vers une insuffisance respiratoire grave nécessitant une hospitalisation en urgence.
- **La forme chronique** s'installe de manière insidieuse sur plusieurs mois ou années. Les symptômes associés sont la toux, la dyspnée, l'asthénie et une perte de poids. Elle peut aboutir en quelques années à une insuffisance respiratoire chronique.

A côté de ce modèle « évolutif », on distingue aujourd'hui 2 formes en partie étiologiques (Lacasse et al., 2009).

- **La forme 1** présente des symptômes essentiellement pseudo-grippaux, semi-retardés et récidivants, le cliché thoracique est fréquemment normal et la fonction respiratoire est peu altérée. Le plus souvent, l'étiologie est microbienne et concerne la maladie du poumon de fermier. La plupart du temps, une exposition massive et intermittente aux microorganismes (mais pas seulement) induit une forme de type 1 et peut conduire à une obstruction bronchique chronique avec emphysème.
- **La forme 2**, la plus répandue, avec la présence de râles crépitants, une altération de la fonction respiratoire (restriction, hypoxie, diminution de la DLCO) et des opacités réticulaires fréquentes à l'imagerie, est généralement d'étiologie aviaire. L'exposition chronique aux antigènes aviaires engendre principalement une forme de type 2 et peut causer un syndrome restrictif et une fibrose.

Cette classification ne recouvre pas celle de Richerson, puisque la forme 1 est diagnostiquée pour la moitié des cas en forme aiguë et l'autre moitié en forme subaiguë ou chronique. La forme chronique est diagnostiquée pour 80% des cas dans la forme 2 (Gondouin et al., 2013).

2.5.2 Aspects radiologiques

Une étude réalisée sur une cohorte de 86 patients atteints du PEO a montré que 12% d'entre eux présentent un cliché thoracique normal avec des techniques de radiographie standard contre seulement 2% après utilisation de la tomodensitométrie haute résolution (Morell et al., 2008). Les aspects radiologiques découlent des atteintes histopathologiques, et sont mieux analysés sur une tomodensitométrie (TDM) thoracique avec coupes millimétriques et expiratoires (Gondouin et al., 2013) (**Figure 3**).

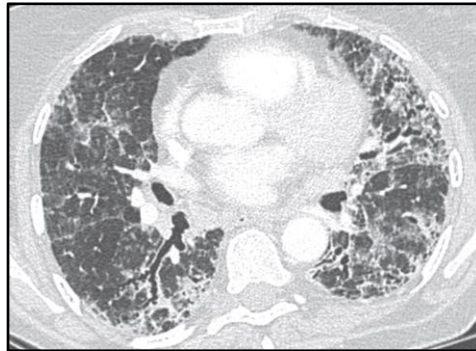


Figure 3: Coupe de tomodensitométrie thoracique chez un patient PEO. Aspect de fibrose pulmonaire (Source : Gondouin, 2013).

La TDM fournit des informations beaucoup plus précises sur l'état du parenchyme pulmonaire et des voies respiratoires que la radiographie. Des caractéristiques de chaque phase sont mises en évidence.

- **La phase aiguë** est caractérisée par la présence d'opacités en verre dépoli bilatérales et de micronodules centrolobulaires mal définis (Tateishi et al., 2011).
- **La phase subaiguë** révèle un aspect en mosaïque, la présence d'opacités en verre dépoli, de nodules centrolobulaires et un trappage aérique (Morell et al., 2008).
- **La phase chronique** se manifeste par la visualisation d'opacités en verre dépoli couvrant une surface inférieure à celle détectée pour la phase aiguë, la présence de nodules centrolobulaires, et notamment par la mise en évidence d'un alvéolage (honeycombing) qui peut occuper jusqu'à 7,3% du tissu pulmonaire total. Globalement, la bronchiectasie (dilatation des bronches) de traction, l'épaississement du septum interlobulaire et les opacités réticulaires intralobulaires sont associés de manière significative à la phase chronique de la maladie (Tateishi et al., 2011)

2.5.3 Aspects fonctionnels respiratoires

Les épreuves fonctionnelles respiratoires mettent en évidence un trouble ventilatoire restrictif chez 77% des patients atteints de PEO (Morais et al., 2004) et une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) qui prédit une désaturation en oxygène à l'effort (Morell et al., 2008). La DLCO semble être un indicateur plus sensible que la capacité vitale forcée, car elle est plus fréquemment diminuée (86% des cas versus 76% des cas) (Morell et al., 2008). Notons que les anomalies des volumes et des débits sont réversibles de quelques semaines à un mois, alors que la DLCO reste altérée en moyenne 1 an, ce qui permet d'effectuer des diagnostics tardifs (Gondouin et al., 2013).

2.5.4 Aspects biologiques

2.5.4.1 *Prélèvements histologiques*

La biopsie pulmonaire chirurgicale est rarement requise pour le diagnostic de la maladie, elle est réservée aux cas les plus difficiles qui défient les critères diagnostiques habituels. Dans la phase aiguë, l'histopathologie montre des lésions pulmonaires, le dépôt de fibrine péri-broncho-vasculaire et l'accumulation interstitielle de neutrophiles, lymphocytes, de cellules plasmatiques et de macrophages (Spagnolo et al., 2014).

Les modifications histologiques de la phase subaiguë sont localisées au niveau des bronchioles et des alvéoles terminales. La « triade histologique » est caractéristique de la forme subaiguë, elle comprend une infiltration interstitielle principalement lymphocytaire, une bronchiolite cellulaire et des granulomes non nécrosants mal formés (Magee et al., 2016). L'histopathologie de la forme chronique présente systématiquement une bronchiolite chronique avec des degrés variables de fibrose et de manière non systématique des granulomes mal formés.

Néanmoins, la biopsie pulmonaire n'est pas sans risques pour le patient et cet acte chirurgical n'est pas recommandé pour le diagnostic (Morell et al., 2016). Une méta-analyse réalisée sur 2 148 patients évalue le taux de mortalité post-opératoire à 3,6% (Han et al., 2015).

2.5.4.2 *Le lavage broncho-alvéolaire*

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est un élément important dans le diagnostic du PEO. Les sujets malades présentent une alvéolite lymphocytaire avec une prédominance des lymphocytes T. La lymphocytose mise en évidence à partir du LBA, représente généralement entre 20 et 30% du nombre total de cellules, bien qu'une fraction de lymphocytes supérieure à 50% ne soit pas rare. Une lymphocytose (>20%) est mise en évidence chez 83% des patients PEO, mais elle peut aussi être

détectée chez des individus exposés asymptomatiques (Morell et al., 2008). Il faut cependant retenir qu'en l'absence de lymphocytose, la maladie est peu probable (Ismail et al., 2006). Cependant, ce critère n'est pas spécifique puisqu'il est retrouvé dans d'autres maladies (Dalphin and Gondouin, 2015). La formule peut varier selon le moment de la réalisation du LBA. En effet si le LBA est réalisé dans les 24h suivant l'exposition antigénique, une importante accumulation de polynucléaires neutrophiles est détectée dans l'espace alvéolaire. La réalisation du LBA une semaine après l'exposition, montre un retour à la normale du pourcentage de polynucléaires neutrophiles avec une prédominance de lymphocytes (Fournier et al., 1985).

Le rapport CD4/CD8 est souvent diminué (<1), mais ce critère n'est pas validé pour la pratique clinique puisqu'il varie selon le type et la quantité d'antigène inhalé, l'exposition à la fumée de tabac et selon le stade de la maladie (Molyneaux et al., 2016). Une étude multicentrique française a évalué la valeur diagnostic du LBA chez 139 cas de PHS (PDF principalement) et seulement 34% des patients avaient un ratio CD4/CD8 < 1 (M Caillaud et al., 2012). De même, une équipe japonaise rapporte des valeurs moyennes de ce ratio de 4,4 pour des patients PDF (Ando et al., 1991). Les raisons de ces différences ne sont pas claires dans la littérature. Plusieurs explications sont possibles incluant la forme de la maladie (aiguë/chronique) (Costabel et al., 2012). Le ratio CD4/CD8 est plus élevé dans les 24h suivant l'exposition antigénique et il est au plus bas entre 7 et 30 jours après la dernière exposition (Drent et al., 1993).

Par conséquent, l'étude des sous-populations lymphocytaires pour le diagnostic est controversée. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire contient des anticorps spécifiques de type IgG dirigés contre les antigènes inhalés et peut également être utilisé dans les analyses sérologiques (Yoshizawa et al., 1995)

L'analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire est d'un grand apport pour le diagnostic de la maladie, toutefois il s'agit d'une méthode d'exploration invasive et l'examen est souvent éprouvant pour le patient.

2.5.4.3 Recherche de précipitines et d'anticorps spécifiques

La présence de précipitines sériques fait partie des critères qui permettent d'orienter le diagnostic du PEO (Lacasse et al., 2003). Une récente étude montre une relation significative entre la positivité des analyses sérologiques aviaires et le diagnostic du PEO (Woge et al., 2017). Ces analyses jouent également un rôle important dans l'identification de l'antigène en cause dans la maladie et participent à la découverte de nouvelles étiologies (Vasakova et al., 2017). La présence de précipitines sériques et/ou d'anticorps circulants dirigés contre les antigènes des fientes, du sérum et des plumes de pigeon est mise

en évidence dès la découverte de la maladie (Reed et al., 1965). Elle est le reflet de l'interaction antigène-anticorps localisée au niveau des alvéoles pulmonaires (Yoshizawa et al., 1995).

La plupart des anticorps impliqués dans cette réaction sont de la classe des IgG (Patterson et al., 1976; Yang and Purtilo, 1975). Baldwin et al., montrent une diminution du taux d'anticorps IgG dans la formule sanguine des éleveurs de pigeons fumeurs par comparaison avec les anciens et les non-fumeurs (Baldwin et al., 1997). Par ailleurs, il est noté une fluctuation annuelle de ce taux d'anticorps chez les éleveurs avec un maximum atteint en automne lors de la mue et de la perte des plumes des pigeons (McSharry et al., 1983).

Cependant, la valeur diagnostique des analyses sérologiques reste très discutée et fait l'objet d'une abondante littérature. Des résultats positifs sont montrés chez des témoins exposés asymptomatiques. Cette proportion varie de 5,6 à 50% selon les cohortes de patients, les techniques immunologiques et les antigènes utilisés (Morell et al., 2008; Reynaud et al., 1990). Ainsi, pour certains auteurs, la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène incriminé serait une preuve de l'exposition mais pas de la maladie (Patel et al., 2001).

Plusieurs méthodes sont décrites pour la recherche des précipitines (double diffusion, immunoélectrophorèse) et des anticorps spécifiques de type IgG (enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), ImmunoCAP). Les principaux antigènes utilisés pour le diagnostic de la maladie sont les fientes, les plumes et le sérum des oiseaux.

▪ Les tests d'immunoprécipitations

Les principales techniques d'immunoprécipitations utilisées pour le diagnostic regroupent la double diffusion en gel d'agarose (DD) et l'immunoélectrophorèse (IEP). Ces deux analyses permettent la détection des complexes immuns (antigène-anticorps) précipitants appelés précipitines. Des exemples de DD et d'IEP sont présentés dans la **figure 4**.

- La DD est réalisée dans un gel d'agarose coulé sur une lame de verre. Le sérum est positionné dans le puits central, il est entouré par des puits de plus petites dimensions contenant les différents antigènes à tester. Les anticorps et les antigènes diffusent de façon passive à partir de chaque puits et forment un ou plusieurs arcs de précipitation, résultats de la formation d'un complexe antigène-anticorps.
- L'IEP combine une électrophorèse de l'antigène en gel d'agarose, effectuée dans un premier temps, à une diffusion passive des anticorps sériques placés perpendiculairement dans une rigole centrale, dans un second temps (Reboux and Dalphin, 2003).

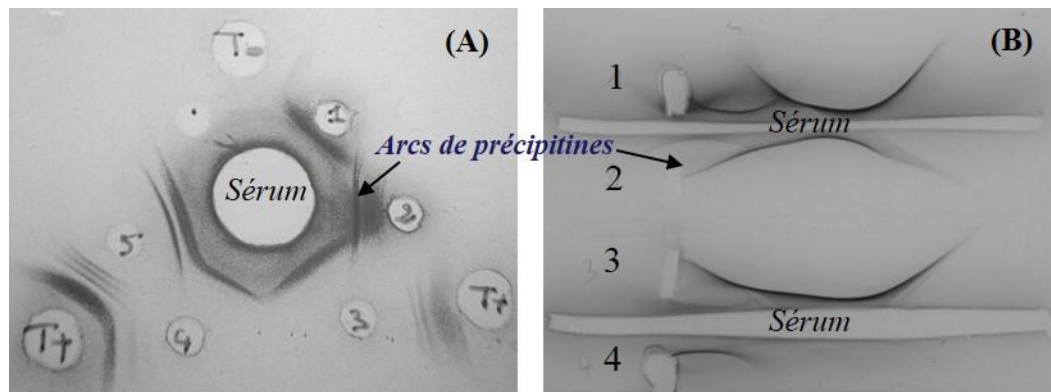


Figure 4: Exemples de lames de double diffusion (A) et d'immunoélectrophorèse (B) positives. Les antigènes sont déposés en positions 1 à 5 pour la technique de DD et en positions 1 à 4 pour l'IEP.

D'une manière générale, ces deux techniques sont simples d'utilisation et peu coûteuses. Cependant, la durée totale de ces analyses est de 5 jours et elles requièrent des volumes de sérums importants, respectivement 50 μ L et 100 μ L pour la DD et l'IEP. Par ailleurs, les seuils de positivité sont établis pour chaque antigène produit en utilisant une cohorte de patients et de témoins exposés asymptomatiques dans chaque laboratoire. Étant donné la variabilité des antigènes, les seuils sont difficilement transposables d'un laboratoire à l'autre. Ces analyses sont encore utilisées en routine pour le diagnostic de la maladie. La sensibilité de la technique de DD est évaluée à 80% en utilisant les fientes de pigeon comme source antigénique (Simpson et al., 1992). L'IEP présente de meilleures performances diagnostiques avec une sensibilité estimée à 86% et une spécificité de 93% en utilisant les antigènes présents dans le sérum de différentes espèces d'oiseaux (Reynaud et al., 1990).

Le laboratoire Microgen Bioproducts propose le kit Avian immunodiffusion system FSK4 (Avian Allergens, Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, UK) pour la recherche de précipitines dans le sérum des patients avec les techniques d'immunoprécipitation. Il comprend les antigènes purifiés de fientes de pigeon, perruche et de volaille, ainsi que le sérum de pigeon et de perruche. Les performances du kit ont été évaluées par le fournisseur, en comparant les résultats des analyses obtenues pour 750 prélèvements sanguins en utilisant la technique de double diffusion et la technique ELISA (IgG). Les valeurs de sensibilité et de spécificité sont respectivement évaluées à 80% et 98%. Cependant, ces performances sont estimées à partir des corrélations positives entre les 2 techniques et nous ne disposons pas d'informations sur le statut des patients (PEO, TEA).

Les techniques d'immunoprécipitation sont qualitatives et l'interprétation des résultats nécessite une lecture en double aveugle réalisée par du personnels expérimentés.

▪ Les tests immuno-enzymatiques

Les tests immuno-enzymatiques regroupent différentes techniques permettant la détection/quantification d'un antigène ou d'un anticorps par un anticorps secondaire. Les techniques les plus utilisées dans le diagnostic de la maladie sont l'ELISA et l'immunoCAP décrites ci-dessous.

• ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps, grâce à une réaction colorée produite par l'action sur le substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Le principe de ce test est résumé dans la **figure 5**.

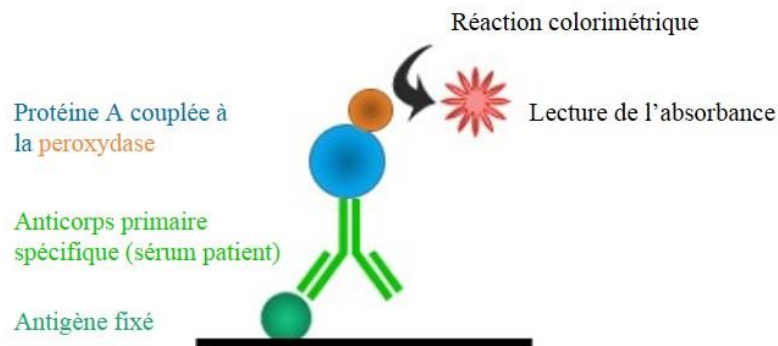


Figure 5: Schéma du principe du test ELISA
(Source : www.dreamstime.com).

Le test ELISA est utilisé depuis le début des années 90 afin de remplacer les tests d'immunoprécipitation pour le diagnostic de routine de la maladie. Les anticorps sont principalement recherchés dans le sérum des patients (de Castro et al., 1993a; Rodrigo et al., 2000; Simpson et al., 1992), mais le liquide de lavage broncho-alvéolaire est aussi utilisé (Ohtani et al., 2003; Suhara et al., 2014; Yoshizawa et al., 1995). Les antigènes des fientes et du sérum des oiseaux sont les plus communément utilisés pour le diagnostic du PEO, les squames et la mucine intestinale sont également employées à titre plus anecdotique. Les antigènes des plumes sont utilisés majoritairement pour le diagnostic de la maladie des oreillers en plumes (Koschel et al., 2010).

Une récente étude évalue ces performances en fonction de la forme de PEO, en recherchant les anticorps dans le sérum et le LBA des patients dirigés contre les antigènes des fientes de pigeon (Suhara et al., 2014). Les valeurs de sensibilité et de spécificité associées à la recherche d'anticorps sérique de type IgG sont évaluées respectivement à 90% et 100% pour la phase aiguë et 34% et 87% pour la phase

chronique (Suhara et al., 2014). L'utilisation des anticorps du LBA pour cette analyse fournit respectivement les valeurs de sensibilité et de spécificité suivantes : 100% et 92% pour la phase aigüe et 79% et 72% pour la forme chronique (Suhara et al., 2014). La forme chronique du PEO est plus difficile à diagnostiquer à partir des analyses sérologiques que la forme aigüe.

Il a été suggéré que les niveaux sériques des différentes classes d'IgG ainsi que leur affinités fonctionnelles pour les antigènes aviaires pouvaient avoir une influence sur les propriétés des complexes immuns et par conséquent sur le développement de la maladie (Baldwin et al., 2000). Nademi et al., ont comparé la réponse des anticorps de type IgG1 et IgG2 dirigés contre les antigènes aviaires par ELISA chez des éleveurs symptomatiques et asymptomatiques (Nademi et al., 2013). L'avidité (force de liaison antigène-anticorps) des IgG1 et IgG2 vis-à-vis des antigènes a été évaluée par un test ELISA indirect modifié, dans lequel un réactif chaotropique (isothiocyanate) est utilisé pour dissocier les complexes antigènes-anticorps, ainsi que par une titration calorimétrique isotherme. De manière surprenante, ces travaux montrent que le niveau d'IgG1 et d'IgG2 est plus élevé chez les éleveurs exposés asymptomatiques. Cependant, l'avidité de ces anticorps est plus importante chez les patients. Les auteurs concluent que l'indice d'avidité pourrait être un marqueur utile pour discriminer les patients des témoins lors des analyses sérologiques.

Rodrigo et al., montrent que le test ELISA a une spécificité de 100% en recherchant les anticorps de type IgG dirigés contre le sérum et les squames de pigeon. Les résultats montrent également que 45% et 54% des individus exposés asymptomatiques ont des valeurs supérieures au seuil respectivement pour le sérum et les squames de pigeon (Rodrigo et al., 2000). Une étude comparative montre que la technique ELISA est plus sensible (100%) que la double diffusion (80%) pour la recherche d'anticorps IgG spécifiques dirigés contre les fientes de pigeon (Simpson et al., 1992). Les résultats de cette étude montrent également une corrélation positive entre ces 2 techniques. Par conséquent, la technique ELISA est de plus en plus souvent utilisée pour la recherche d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes aviaires (Baldwin et al., 1999; McSharry et al., 2006; Morell et al., 2008; Ohtani et al., 2003; Rodrigo et al., 2000; Suhara et al., 2014; Yoshizawa et al., 1995).

La technique ELISA est très répandue, rapide (1/2 journée) et peut être entièrement automatisée ce qui favorise la standardisation et la reproductibilité des analyses. Par ailleurs, elle permet une mesure de la réponse antigène-anticorps avec un suivi possible de la maladie au cours du temps (McSharry et al., 2006). Bien que la réaction soit réalisée en duplicat ou en triplicat, cette analyse est peu consommatrice en sérum (5 μ L maximum pour un antigène), ce qui est un avantage sur les techniques d'immunoprécipitation.

- **ImmunoCAP**

La technique ImmunoCAP est fondée sur une capacité de liaison extrêmement élevée entre l'antigène et la phase solide du support. Le principe même du test est identique à celui décrit précédemment pour les analyses ELISA. Cette technique est entièrement automatisée et des antigènes commerciaux sont disponibles pour le diagnostic du PEO depuis le début des années 2000.

Le groupe Phadia® a mis sur le marché des antigènes de fientes, de plumes et de sérum d'oiseaux utilisables avec le système immunoCAP pour le diagnostic sérologique de la maladie. Le panel antigénique disponible est relativement large (**tableau 5**). Les antigènes à la base de ces tests sont des « broyats » purifiés de fientes, de duvet et de sérum d'oiseaux dont la qualité est très dépendante du processus de fabrication.

Tableau 5 : Panel antigénique proposé par Phadia pour la recherche d'anticorps spécifiques IgG pour le diagnostic sérologique du PEO (Source : catalogue ThermoFisher scientific 2017).

Description produits	Codes
Fientes, plumes, protéines sériques de perruche Calopsittes	e197, e196, e198
Fientes, plumes, de perruche ondulée	e77, e78
Plumes de pigeon	e215
Plumes de pinson	e214
Plumes de perroquet	e213
Plumes de canard	e86
Fientes, plumes de canari	e200, e201
Plumes d'oies	e70
Plumes de dinde	e89
Fientes de poulet, plumes de poule	e218, e87

Selon les résultats des 2 dernières évaluations externes de la qualité UK NEQAS (juin et août 2017), cette technique est utilisée par 80% des laboratoires participants. L'antigène majoritairement utilisé pour le diagnostic de la maladie (60%) correspond à un mélange de fientes, de plumes et de sérum d'oiseau. Une étude évalue les capacités de diagnostic de ce test en utilisant un mélange antigénique issu du pigeon (Ge91 : fientes, sérum, plumes). Les résultats montrent que le système ne permet pas de discriminer les patients PEO, des individus exposés atteints d'une autre pathologie pulmonaire (Van Hoeyveld et al., 2006). Sterclova et al., utilisent le même antigène et aboutissent à une conclusion identique. Par ailleurs, parmi les six antigènes testés par immunoCAP (mélanges plumes : ex71, ex72, ex73, mélange perruche : Ge90, mélange pigeon Ge91, mélange perroquet : Ge92), trois seulement (ex72, Ge90, Ge92) permettent de discriminer les patients PEO, des individus exposés atteints d'une autre pathologie pulmonaire (Sterclova et al., 2011). Cependant, le panel antigénique propose uniquement les antigènes des oiseaux les plus souvent impliqués dans la maladie. Les performances diagnostiques de ce système sont

nettement améliorées lorsque les analyses sont réalisées avec l'antigène auquel le patient est directement exposé. En effet, des antigènes artisanaux peuvent être préparés (biotinylation, couplage streptavidine) et utilisés en immunoCAP. La recherche d'anticorps sériques spécifiques de type IgG dirigés contre le sérum de canaris met en évidence une sensibilité de 100% et une spécificité de 91,76% (Rodrigo et al., 2010). Cette méthode permet de différencier avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 97% les anticorps IgG spécifiques de la maladie liés aux oreillers en plumes de ceux spécifiques du PEO (Koschel et al., 2010). Des corrélations positives de 70% (Van Hoeyveld et al., 2006) et 91,6% (Lopata and Schinkel, 2004) ont été montrées entre les concentrations en IgG obtenues en immunoCAP avec des antigènes commerciaux et les arcs de précipitines obtenus par la technique de DD. De même, une forte corrélation ($R^2=0,98$) est mise en évidence entre les résultats des tests ELISA et le système immunoCAP (Rodrigo et al., 2010).

Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, et bénéficie de la disponibilité d'antigènes commerciaux contribuant à l'amélioration de la standardisation des analyses sérologiques (Aberer et al., 2001).

■ Conclusion

Les principaux avantages et inconvénients des différentes techniques d'analyses sérologiques utilisées pour le diagnostic sérologique sont résumés dans le **tableau 6** ci-dessous.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des différentes techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic du PEO.

	Avantages	Inconvénients
Double diffusion	Simple à mettre en œuvre (Reboux and Dalphin, 2003), Aucun appareillage spécifique nécessaire.	Longue (5 jours) (Rodrigo et al., 2010), Méthode qualitative, Lecture visuelle des résultats par un personnel expérimenté (Rodrigo et al., 2000), Nécessite un volume important de sérum (50 µL) (Reboux and Dalphin, 2003).
Immunoélectrophorèse	Simple à mettre en œuvre (Reboux and Dalphin, 2003), Aucun appareillage spécifique nécessaire.	Longue (5 jours) (Rodrigo et al., 2010), Méthode qualitative, Lecture visuelle des résultats par un personnel expérimenté (Rodrigo et al., 2000), Nécessite un volume important de sérum (100 µL) (Reboux and Dalphin, 2003).
ELISA	Rapide (1/2 journée), Méthode quantitative (Rodrigo et al., 2000), Automatisation de la technique.	Nécessite des antigènes purifiés (Kumar et al., 2009), Réaction enzymatique dépendante de la température, du pH et de la lumière (Kumar et al., 2009).
ImmunoCAP	Rapide (1/2 journée), Méthode quantitative, Automatisation de la technique, Capacité de liaison élevée de l'antigène au support (Rodrigo et al., 2010).	Utilisation d'antigènes artisanaux possible mais réalisation difficile (protocole complexe) (Sander et al., 2005), Réaction enzymatique dépendante de la température, du pH et de la lumière, Automate spécifique requis : coûteux.

L'automatisation des analyses sérologiques est une première marche en avant vers la standardisation du diagnostic mais n'est pas suffisante. Les performances de ces tests dépendent principalement de la qualité des antigènes utilisés. D'importants travaux sont à réaliser pour permettre de standardiser la production des antigènes afin d'optimiser le diagnostic du PEO.

2.5.5 Test de provocation par inhalation

Depuis ces dix dernières années, les tests de provocation par inhalation de sérum et de fientes de pigeon sont de plus en plus utilisés pour le diagnostic du PEO, notamment par les équipes espagnoles et japonaises (Baur et al., 2015; Morell et al., 2013; Muñoz et al., 2014; Ohtani et al., 2000; Ojanguren et al., 2016; Okamoto et al., 2015; Tateishi et al., 2011).

Plusieurs études ont évaluées les performances de ce test pour le diagnostic de la maladie. En effet, dans une récente étude, Muñoz et al., rapportent des valeurs de sensibilité et de spécificité de 73% et 84% respectivement en utilisant une cohorte de 113 patients atteints de PHS présumées (43 patients avec diagnostic final de PEO) (Muñoz et al., 2014). La méthode utilisée consistait à administrer un extrait de l'antigène suspecté à l'aide d'un nébuliseur. L'antigène initialement liquide est alors transformé en un nuage de particules extrêmement fines (brouillard), inhalé par le patient. Dans le contexte des PHS d'origine aviaire, Ramirez-Venegas et al., étudient 17 patients atteints de forme chronique de PEO et 17 patients atteints d'autres maladies pulmonaires interstitielles. Une diminution de la capacité vitale forcée (CVF) ainsi qu'une augmentation de la température corporelle de 0,5°C de manière consécutive au test sont les deux variables prédictives du PEO. Les modifications de la CVF et de la température corporelle suite au test de provocation, montrent des valeurs de sensibilité respectivement de 76% et 100% et des valeurs de spécificité de 86% et 82% (Ramirez-Venegas et al., 1998).

Toutefois, les protocoles, les antigènes, ainsi que les critères de positivité utilisés pour ces analyses manquent de standardisation (Lacasse et al., 2012; Selman et al., 2012). Le principal risque associé à cette technique est l'exacerbation (essoufflement, toux, expectorations). Les symptômes les plus fréquents sont le déclin de la fonction respiratoire (toux, dyspnée), ainsi que de la fièvre (Ohtani et al., 2000). La société française d'allergologie et d'immunologie recommande que ces tests soient réalisés dans une structure hospitalière dotée d'un personnel médical et paramédical expérimenté, et l'unité doit être géographiquement proche d'une unité de réanimation (Bousquet et al., 2007). L'ampleur des risques associés à ce test étant imprévisible, les patients doivent bénéficier d'une surveillance rapprochée durant les 24h suivant l'examen (Selman et al., 2012).

2.6 Traitement

Le traitement de la maladie repose sur l'éviction antigénique ou la réduction de l'exposition et la corticothérapie. Évidemment, le traitement est plus efficace si le diagnostic est établi avant l'apparition de dommages pulmonaires irréversibles (Sforza and Marinou, 2017).

- Éviction antigénique et méthodes préventives

La détection de l'antigène, puis son retrait de l'environnement du patient, ont des implications dans le pronostic et le traitement de toutes les formes de PHS (Pereira et al., 2016). Cependant, ces mesures ne sont pas toujours applicables pour les raisons suivantes : (1) l'antigène en cause n'est pas identifié, (2) les patients refusent la mise en place de l'éviction antigénique. L'identification de l'agent étiologique est cruciale pour la prise en charge des patients. La moyenne de survie est abaissée de 8,75 à 4,88 ans lorsque l'antigène n'est pas identifié (Pérez et al., 2013). L'éviction antigénique implique des changements majeurs dans la profession, les loisirs ou dans l'environnement domestique du patient (Pereira et al., 2016). Dans les pays en voie de développement, tels que l'Inde ou le Mexique, les pigeons cohabitent avec les hommes et l'éviction antigénique est difficile à mettre en place (Girard et al., 2009; Kumar and Singh, 2015). Les dispositifs de protection peuvent être efficaces lorsque l'élimination complète des antigènes est impossible. Le port de masques de protection adaptés (normes de filtration AFNOR FFP2) améliore les symptômes de la maladie en diminuant l'accès des antigènes aux voies respiratoires (Hendrick et al., 1981). L'augmentation des niveaux de ventilation dans le pigeonnier est également une mesure efficace (Miyazaki et al., 2016). Par ailleurs, le port d'une tenue spécifique à la volière minimise le transport des antigènes et par conséquent diminue la continuité du contact antigénique (Chan et al., 2012).

Craig et al., ont effectué des prélèvements de poussière aux domiciles d'éleveurs après la mise en place de l'éviction antigénique, et ont testé ces échantillons par des analyses ELISA indirect (anticorps polyclonaux anti-fientes) (Craig et al., 1992). Ils ont constaté que les antigènes aviaires pouvaient persister dans les logements pendant 18 mois après le retrait de l'oiseau. Ainsi, ils recommandent le relogement temporaire des patients jusqu'à ce que leur domicile soit exempt d'antigènes aviaires mesurables afin d'assurer une éviction antigénique complète.

- Corticothérapie

La corticothérapie est efficace pour soulager les symptômes de la maladie mais elle ne semble avoir aucun effet sur le pronostic de la maladie à long terme (Kokkarinen et al., 1992). Cependant, la dose de stéroïde et la durée de la thérapie ne sont pas clairement établies et doivent être adaptées pour chaque patient (Chan et al., 2012). Dans les cas de PEO de forme chronique, des immunosuppresseurs peuvent être ajoutés aux corticostéroïdes, mais aucun essai contrôlé n'est encore disponible pour étayer cette stratégie (Pereira et al., 2016). Durant les 5 dernières années, plusieurs études rapportent que la greffe pulmonaire devrait être une option envisagée pour les patients atteints de fibrose pulmonaire, ne répondant pas favorablement au traitement (Kern et al., 2015; Selman et al., 2012; Sforza and Marinou, 2017; Spagnolo et al., 2014). Le pourcentage de survie à 1, 3 et 5 ans après la greffe chez 31 patients atteints de PHS est respectivement évaluée à 96%, 89% et 67% (Kern et al., 2015).

En bénéficiant d'un traitement approprié, la plupart des patients finissent par récupérer entièrement leurs fonctions respiratoires. Sans une gestion adéquate, la maladie évolue naturellement vers une fibrose pulmonaire et une greffe peut être envisagée.

2.7 Suivi de l'évolution de la maladie

L'évolution de la maladie peut être effectuée par le suivi de la concentration sérique des glycoprotéines suivantes : KL-6 (Krebs Von den Lungen-6) et de SP-D (Surfactant Protein D). Elles sont exprimées par les pneumocytes de type II et sont désignées comme étant des biomarqueurs potentiels pour le suivi de la maladie (Janssen et al., 2005).

Dans un suivi à long terme, les niveaux de KL-6 et de SP-D sont revenus respectivement à la normale en 18 et 8 mois, après mise en place de l'éviction antigénique chez un patient PEO, tandis que la DLCO s'est améliorée lentement en parallèle (Takao et al., 2009). Par ailleurs, Janssen et al., rapportent une diminution significative des niveaux de ces deux biomarqueurs après 1 mois d'éviction antigénique chez des patients atteints du PEO (Janssen et al., 2005). La diminution du titre en anticorps sérique de type IgG confirme également l'éviction antigénique avec une demi-vie estimée à 95 jours (McSharry et al., 2006). Yoshizawa et al., effectuent un suivi des réponses immunitaires humorales et cellulaires chez 5 patients PEO durant les 5 années suivant l'éviction antigénique (Yoshizawa et al., 1995). Ils montrent que les anticorps de type IgG recherchés dans le sérum et dans le liquide du LBA, diminuent seulement 3 ans après l'élimination du contact avec la source antigénique. Dans cette étude, tous les patients montrent une diminution progressive du nombre de lymphocytes (en particulier lymphocytes T) dans le liquide du LBA et un retour à des valeurs presque normales dans les 5 ans suivant l'éviction antigénique.

2.8 Epidémiologie

2.8.1 Prévalence de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux

La prévalence du PEO varie largement entre les pays. En effet, le climat, les coutumes locales, les habitudes tabagiques, la disponibilité des soins médicaux, les facteurs génétiques, ainsi que l'intensité et la durée de l'exposition aviaire sont autant de facteurs influençant la survenue de la maladie (Chan et al., 2012). Le PEO est la forme de PHS la plus courante au Mexique (Selman et al., 2010). Parmi les PHS chroniques, le PEO est également la plus fréquente en Turquie et en Chine (Okamoto et al., 2013a). L'évaluation de la prévalence est difficile car les approches utilisées pour définir et diagnostiquer la maladie ne sont pas consensuelles et ont évolué dans le temps (Bourke et al., 2001).

La plupart des enquêtes épidémiologiques repose sur l'utilisation de questionnaires (concernant des données d'exposition et les symptômes) et la mesure des anticorps précipitants, mais ces méthodes sont insuffisantes pour établir le diagnostic avec certitude (Bourke et al., 2001). D'autres investigations complémentaires sont parfois réalisées (tests des fonctions respiratoires, tests cutanés, radiographie thoracique, tests de provocation) (Christensen et al., 1975; Hendrick et al., 1978). Les principales études épidémiologiques sont résumées dans le **tableau 7**, on peut noter que la prévalence du PEO varie entre 0,5% et 31% des sujets exposés. Par ailleurs, une étude rétrospective danoise, réalisée avec une cohorte de 6920 éleveurs de pigeons, montre que le risque de développer une PHS est 14 fois plus élevé chez les éleveurs que pour le reste de la population (Cramer et al., 2016).

Tableau 7: Etudes de prévalence de la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux.

Etudes	Pays	Nombre de sujets	Méthodes épidémiologique	Prévalence (%)
(Christensen et al., 1975)	Etats-Unis (Salt Lake City)	53	Questionnaire, analyses sérologiques, tests respiratoires, tests cutanés, radiographie thoracique	21
(Hendrick et al., 1978)	Grande-Bretagne	247	Questionnaire, analyses sérologiques, test de provocation par inhalation	0,5-7,5
(McSharry et al., 1984)	Ecosse	507	Questionnaire, analyses sérologiques	20
(Banham et al., 1986)	Ecosse	277	Questionnaire, analyses sérologiques	10,4
(Bourke et al., 1989)	Ecosse	258	Questionnaire, analyses sérologiques, tests respiratoires	31
(Carrillo et al., 1991)	Espagne	160	Questionnaire, analyses sérologiques	15
(de Castro et al., 1993b)	Îles Canaries	343	Questionnaire, analyses sérologiques	6-20
(Baldwin et al., 1998)	Royaume-Uni	250	Questionnaire, analyses sérologiques	19
(Uzun et al., 2011)	Turquie	185	Questionnaire	1,6

2.8.2 Facteurs individuels

- Age, sexe

L'âge ne semble pas être un facteur de risque dans le PEO puisque des cas ont été diagnostiqués chez des patients de toutes tranches d'âge. Toutefois, les résultats des études épidémiologiques montrent que la plupart du temps, la maladie se développe chez des patients âgés de 40 à 50 ans (Baldwin et al., 1998; Christensen et al., 1975; Morell et al., 2008; Selman et al., 2010).

La proportion d'hommes et de femmes atteinte par la maladie diffèrent entre les études, et semble être liée au type d'exposition aviaire, ainsi qu'aux différences socio-économiques et culturelles entre les pays. D'une manière générale, les hommes atteints du PEO prédominent aux Etats-Unis et en Europe, et les femmes au Mexique (Sansores et al., 1992). Les éleveurs de pigeons sont principalement des hommes, alors que les femmes sont plutôt exposées de manière continue aux oiseaux domestiques (Morell et al., 2008).

- Facteurs génétiques

Des formes familiales ont été décrites (du Marchie Sarvaas et al., 2000; Makinodan et al., 2005). Plusieurs travaux ont suggéré des liens entre les haplotypes HLA et le développement des PHS, avec une surreprésentation d'HLA DR7 chez les éleveurs de pigeons dans une population mexicaine (Selman et al., 1987). De même, il est observé chez les patients atteints de PEO une augmentation des allèles HLA-DRB1*1305 et HLA-DQB1*0501 et une diminution significative de l'allèle HLA-DRB1*0802 par rapport aux témoins. Une étude menée chez des patients atteints de PEO démontre que le polymorphisme génétique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) contribuait au développement de la maladie. En effet, une augmentation du polymorphisme de l'allèle TNF-2 (région 308) du gène du facteur de nécrose tumoral (TNF) est observée chez de jeunes patients (34 à 44 ans) atteints de PEO (Chan et al., 2012). Les gènes codant pour le protéasome à faible poids moléculaire (nommé PSMB), un complexe enzymatique multimérique qui dégrade les protéines en peptide afin de les présenter dans la voie de classe I du CMH, sont impliqués dans les susceptibilités génétiques de la maladie. Par ailleurs, les génotypes PSMB8 KQ pourraient être impliqués dans le développement de la maladie alors que PSMB8 QQ aurait un rôle protecteur (Camarena et al., 2010).

■ Tabagisme

Le PEO prédomine chez les non-fumeurs (Carrillo et al., 1991; McSharry et al., 1985; Reynolds et al., 1991). L'étude d'une série de 86 cas montre que 14% des patients sont fumeurs (Morell et al., 2008). De même, une étude réalisée à partir de 132 cas de patients PEO rapporte 17% de fumeurs (Selman et al., 2010). L'effet « protecteur » du tabac est attribué à l'altération des fonctions des macrophages et des lymphocytes causée par la nicotine (Quirce et al., 2016). En effet, Blanchet et al., constatent que la nicotine diminue la fonction des macrophages chez le rat. Les auteurs montrent également que la nicotine réduit l'expression de plusieurs cytokines (TNF, IL-10, ARNm de l'IFN- γ) (Blanchet et al., 2004). Par ailleurs, les fumeurs ont des titres d'anticorps de type IgG dirigés contre l'antigène plus faible que les ex-fumeurs et les non-fumeurs (Baldwin et al., 1997). Toutefois, il apparaît que le pronostic vital est plus sévère pour les patients fumeurs que pour les non-fumeurs (Rutt, 2012).

2.8.3 Facteur environnementaux

Les facteurs environnementaux, et en particulier les facteurs d'exposition jouent un rôle primordial dans la survenue du PEO. La quantité de poussière ainsi que la concentration d'antigène en suspension dans l'air varient selon l'activité au sein de la volière et selon les saisons. Lors du nettoyage de la volière, il est mesuré une quantité de poussière inhalable de 12,11 mg/m³ d'air (Morris et al., 1994). Ces résultats ne sont pas corrélés avec le nombre de pigeon. Une étude montre également que les témoins peuvent posséder un nombre moyen d'oiseaux (n=91) supérieur à celui des patients (n=16) (Morell et al., 2008). Ainsi, le nombre d'oiseaux ne semble pas influencer le développement de la maladie (Morell et al., 2008). Toutefois, l'exposition prolongée à un faible nombre d'oiseaux semble favoriser le développement de la forme chronique. Ce modèle est décrit principalement chez les femmes, au Mexique et au Royaume-Uni où l'exposition aux oiseaux domestiques est importante et évolue souvent vers une fibrose pulmonaire (Hargreave et al., 1966; Pérez-Padilla et al., 1993). En revanche, l'exposition intermittente mais à intensité élevée, fréquente chez les éleveurs de pigeons favorise le développement de la forme aiguë (Calvert et al., 1999). La teneur en antigène dans la poussière mesurée par ELISA, varie de 0 à 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (médiane de 0,55 $\mu\text{g} / \text{mL}$), et représente en moyenne 0,8% de la poussière totale (Morris et al., 1994). Cette information confirme l'exposition des éleveurs à des quantités considérables de poussière et d'antigènes dans les volières, en particulier lors de la mue d'automne des pigeons (Lopata and Schinkel, 2004). Il existe deux modes de gestion des volières qui influent sur la quantité de poussière respirable. Le système de « litière profonde » correspond à l'utilisation d'une litière (foin, copeaux ou sciure de bois) sur laquelle vient s'accumuler les fientes qui une fois desséchées, participent à l'absorption des fientes fraîches (Edwards et al., 1991). Ce système peut générer une poussière importante, il est minoritaire en pratique. La plupart du temps, les fientes sont nettoyées chaque jour par l'éleveur, et ne constituent donc pas une source majoritaire de poussière.

Dans ce cas, les particules respirables sont considérablement diminuées (Edwards et al., 1991). Une étude montre également que l'antigène est présent dans la volière même en l'absence de poussière apparente (Morris et al., 1994).

L'une des rares études évaluant l'exposition aux antigènes aviaires dans l'environnement intérieur, montre que le niveau d'antigènes de fientes de pigeon est le plus élevé dans la volière, et étonnamment dans une école colonisée par les pigeons et dans une moindre mesure dans les hôpitaux et dans les maisons avoisinant les élevages (Curtis et al., 2002). Une étude récente montre une corrélation entre le niveau d'exposition aux antigènes aviaires et l'évolution de la maladie vers une forme chronique avec un mauvais pronostic vital (Tsutsui et al., 2015).

La durée de l'exposition aux antigènes semble également être un facteur important dans l'amélioration des symptômes faisant suite à l'éviction antigénique. Les éleveurs de pigeons passent en moyenne 20h par semaine dans le pigeonnier avec un taux d'occupation moyen de 60 pigeons (McSharry et al., 2000). Une étude montre que 100% des patients (12/12) exposés depuis moins de 2 ans aux antigènes aviaires récupéraient la totalité de leurs fonctions pulmonaires, contre 60% (6/10) des patients exposés depuis plus longtemps (De Gracia et al., 1989).

2.8.4 Pronostic

Avec un traitement rapide et adéquat couplé à l'éviction antigénique, les patients atteints de forme aiguë présentant des symptômes depuis moins de 6 mois ont un excellent pronostic vital. (De Gracia et al., 1989). La mortalité des patients atteints de la forme aiguë au Mexique est estimée à moins de 1% (Bourke et al., 1989). A l'inverse, les patients souffrant des formes subaiguës ou chroniques peuvent évoluer vers une fibrose pulmonaire et décéder quelques années après le diagnostic (Selman et al., 2012). Une étude réalisée au Mexique montre que 25% des patients atteints de la forme chronique ayant refusé l'éviction antigénique meurent dans les 5 ans suivant le diagnostic (Pérez-Padilla et al., 1993). A l'inverse, les agriculteurs souffrant de la forme chronique du poumon de fermier développent le plus souvent un emphysème et ont un taux de survie significativement supérieur à 5 ans (Molyneaux et al., 2016).

2.9 Le poumon d'éleveur d'oiseaux : une forme particulière de PHS ?

Depuis sa découverte en 1965, le PEO a été associé à la grande famille des pneumopathies d'hypersensibilité sur la base des symptômes consécutifs à l'inhalation des antigènes. Toutefois, cette maladie se démarque des autres formes de PHS. Une comparaison est établie entre le PEO et le PDF, les deux formes les plus fréquemment diagnostiquées (Dalphin and Gondouin, 2015) et les principales différences sont présentées dans le **tableau 8**. La nature des antigènes et le type d'exposition induisent des modifications cliniques importantes qui engendrent un pronostic vital plus sévère pour les éleveurs d'oiseaux malades.

Tableau 8 : Comparaison des caractéristiques cliniques, physiologiques, radiologiques, histologique et du pronostic de la maladie du poumon de fermier et du poumon d'éleveur d'oiseaux.
(Source : Dalphin et al., 2015)

	Poumon de fermier	Poumon d'éleveur d'oiseaux
Exposition antigénique	Massive et intermittente Microorganismes	Chronique insidieuse Faible quantité d'antigènes aviaires
Symptômes cliniques	<u>Forme aiguë / subaiguë :</u> Fièvre et épisodes récurrents fréquents. Asthénie. Symptômes systémique (frissons, courbatures) récurrents.	<u>PEO récurrent :</u> toux et dyspnée d'effort légère, fièvre légère. <u>PEO insidieux :</u> dyspnée progressive
Tests de fonctions pulmonaires	Des anomalies restrictives légères, Obstruction des voies aériennes observée dans une forme chronique.	Modèle restrictif, Hypoxémie au repos ou durant un exercice physique.
Imagerie pulmonaire	Radiographie thoracique: souvent normale TDM : opacités en verre dépoli prédominantes dans les lobes inférieurs, nodules centrolobulaires. Séquelles à long terme : emphysème léger épargnant les parties supérieures du poumon.	Radiographie thoracique: souvent anormale TDM : opacités réticulaires irrégulières, bronchiectasie de traction et alvéolage.
LBA et précipitines	Non spécifiques pour différencier les deux types	
Biopsie pulmonaire	Petits granulomes, mal formés près des bronchioles. <u>Voies aériennes périphériques:</u> Bronchiolite oblitérante proliférative	Granulomes mal formés, difficile à identifier. <u>Voies aériennes périphériques:</u> Bronchiolite constrictive
Pronostic	Favorable Exposition chronique peut évoluer en bronchite chronique ou en emphysème	Pauvre Progression fréquente en fibrose.

2.10 Conclusion

Les PHS ne sont pas des maladies uniformes, mais plutôt un syndrome clinique dynamique et complexe qui varie dans sa présentation initiale et qui évolue au fil du temps (Bourke et al., 2001). Une présentation schématique de l'évolution de la maladie du PEO est présentée dans la **figure 6**.

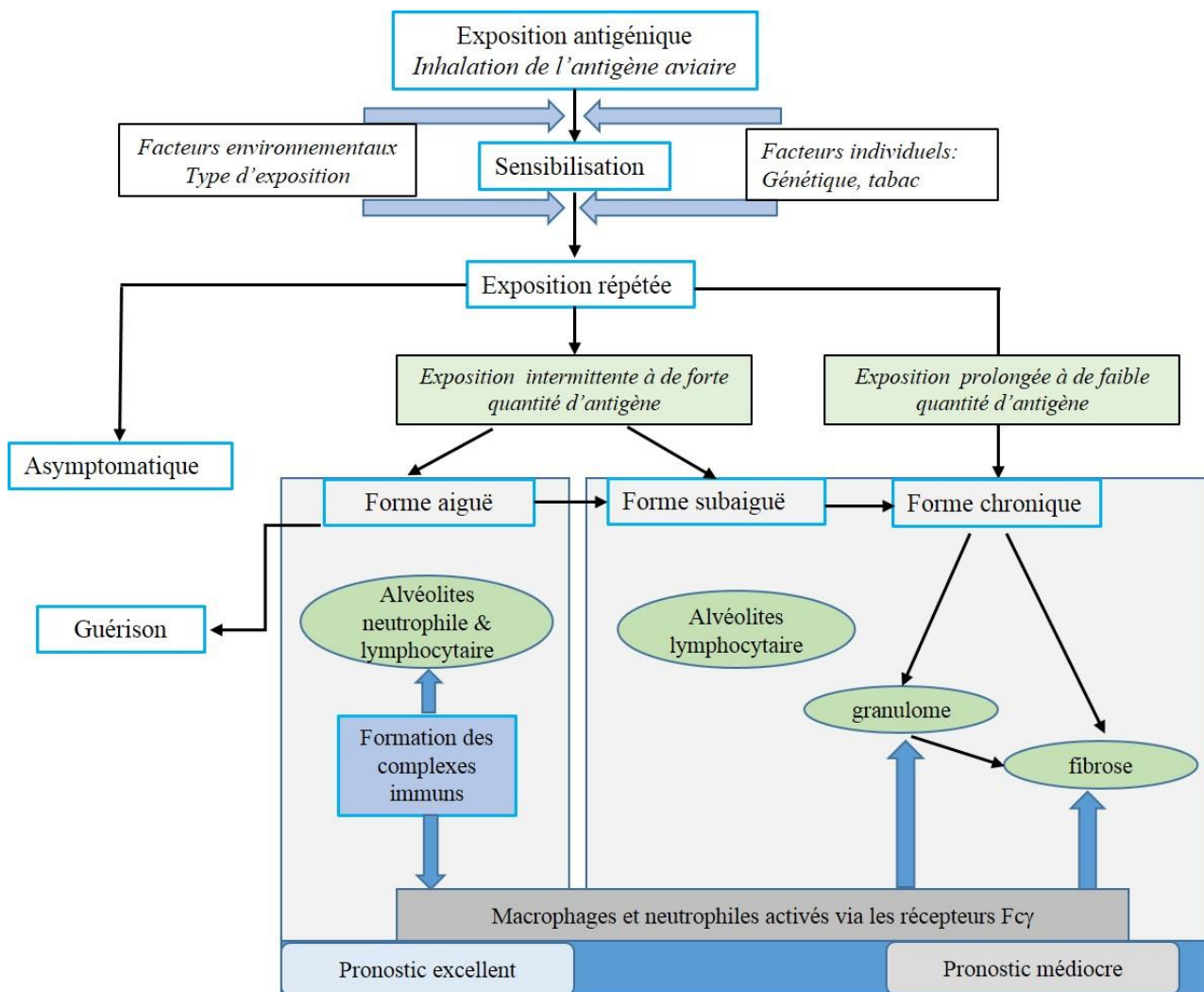


Figure 6 : Schéma de la dynamique et de l'évolution possible de la maladie du PEO.
Inspiré de (Agache and Rogozea, 2013)

3. Recherche de biomarqueurs pour le diagnostic sérologique du PEO

En raison de la nécessité d'améliorer les stratégies de détection, de gestion et de prévention des PHS, l'Institut national du cœur, des poumons et du sang, en collaboration avec le centre des maladies rares des instituts nationaux de la santé, a convoqué un groupe de scientifiques experts afin d'identifier les avancées possibles dans ce domaine. Ce groupe s'est réuni à Bethesda (Maryland), en mai 2004, pour examiner l'état actuel des recherches et fournir des recommandations et des directives afin d'améliorer le diagnostic des PHS (Fink et al., 2005). La caractérisation moléculaire des antigènes, ainsi que leur production en protéines recombinantes faisaient partie des recommandations principales de ce groupe de travail.

3.1 Description des matrices antigéniques

Les protéines antigéniques sont décrites à partir des fientes, du sérum, des plumes et des squames d'oiseaux (de Beer et al., 1990; Edwards et al., 1970; Goudswaard et al., 1978) (**figure 7**) par la mise en évidence de réactions positives en sérologie ou lors des tests de provocation.



Figure 7 : Illustration des matrices d'exposition : fientes, plumes et squames de pigeon. (Photo personnelle).

Les fientes de pigeon sont décrites comme étant la matrice la plus « complète » en antigènes (Edwards et al., 1970). Elles sont disponibles en grande quantité et le prélèvement est indolore pour les oiseaux. La composition chimique des fientes (1,9% azote, 28% glucide) est décrite (Berrens and Maesen, 1972) mais sa composition protéique est peu connue.

Le caractère antigénique des plumes est largement démontré dans les cas de PHS liées aux oreillers en plumes (Cooper et al., 2014; Koschel et al., 2010). Cette forme de la maladie met en évidence la résistance des antigènes aviaires. En effet, les protéines antigéniques résistent à des conditions de lavage et de séchage à hautes températures (125°C) (Kilpiö et al., 1998).

Les squames sont des petites particules de kératine situées à l'insertion des plumes. Elles sont produites en grande quantité en automne lors de la mue des pigeons. La nature lipidique de ces particules leur confèrent un rôle d'imperméabilisant pour les plumes (Bergman, 2003). Très volatiles, elles se déposent facilement sur les vêtements et /ou les cheveux et participent à la dissémination des antigènes au-delà de la volière. De taille compatible avec l'accès aux alvéoles pulmonaires, ces particules jouent le rôle de transporteurs d'antigènes solubles mais pourraient aussi servir d'adjuvant (Lopata and Schinkel, 2004). Les oiseaux tels que les pigeons, les perruches et les perroquets produisent des quantités particulièrement importantes de squames, tandis que les volailles en produisent très peu (Gorman et al., 2009).

Le sérum est une matrice fréquemment utilisée pour les analyses sérologiques. Les éleveurs ne sont pas directement exposés au sérum des oiseaux, mais certaines protéines antigéniques sont retrouvées dans cette matrice. En effet, il a été montré que les échantillons de fientes de pigeon possédaient des déterminants antigéniques communs avec la fraction gammaglobulines du sérum (Edwards et al., 1970; Tebo et al., 1977).

Les analyses sérologiques sont réalisées à partir d'extraits totaux où purifiés de fientes, de plumes et de sérum d'oiseaux. Des réactions antigéniques croisées sont mises en évidence pour une même espèce entre différentes matrices antigéniques (Longbottom, 1989), mais aussi entre différentes espèces d'oiseaux (Kokkarinen et al., 1994; Koschel et al., 2010; Sennekamp et al., 1981). L'expérience du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Besançon montre que la plupart du temps, un patient exposé uniquement aux pigeons possède également des anticorps dirigés contre les fientes de perruche. L'albumine et les globulines sériques aviaires sont décrites comme potentiellement impliquées dans ces réactions antigéniques croisées (Sennekamp et al., 1981). Ces résultats suggèrent l'existence d'une communauté antigénique entre les oiseaux pouvant refléter le degré de proximité phylogénétique (Tauer-Reich et al., 1994). Ces réactions sont souvent mises en évidence dans la littérature mais elles restent très mal caractérisées.

De nombreux organismes sont détectés dans les pigeonniers et leur pathogénicité pour l'homme n'est pas toujours connue. En effet, plusieurs micro-organismes se développent dans les fientes de pigeon incluant *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* (Afrique, Amérique, Papouasie), *Cryptococcus neoformans* et *Influenza* (McSharry et al., 2000). L'implication des micro-organismes est suspectée depuis de nombreuses années dans le développement du PEO (Scribner et al., 1980). Il est suggéré que ces microorganismes soient à l'origine des réactions sérologiques positives chez des éleveurs de pigeons asymptomatiques (Faux et al., 1970). Par ailleurs l'exposition aux endotoxines (lipopolysaccharide) (McSharry et al., 2000) et mycotoxines ((1,3) β -D-glucane) (Rylander et al., 1994) produites par ces micro-organismes pourraient aussi avoir des effets immunomodulateurs et modifier la réponse antigénique (McSharry et al., 2002).

Ces réactions sont principalement décrites pour les infections virales associées au poumon de fermier. Des expérimentations sur des modèles murins ont montré que le virus respiratoire syncytial (Gudmundsson et al., 1999) et le virus Parainfluenza 1 (Cormier and Israël-Assayag, 2000) étaient favorables au développement des PHS. En effet, les souris infectées par le virus Parainfluenza 1 et simultanément sensibilisées aux antigènes de *Saccharopolyspora rectivirgula* (agent étiologique du PDF) développent une réponse à l'antigène supérieure (mesure nombre cellules, TNF- α et IL-1 α dans le LBA) à celles uniquement sensibilisées aux antigènes ou au virus. Les infections virales sont des modulateurs connus de la réponse immunitaire (Hogg, 1999; Matsuse et al., 1992). Les virus augmentent la capacité de présentation des antigènes des macrophages alvéolaires, diminuent la phagocytose, induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires et favorisent la prolifération des lymphocytes T Th1 (cellules associées à HP) (Cormier and Israël-Assayag, 2000). Par ailleurs, des antigènes viraux ont été retrouvés dans les cellules de lavage et le tissu pulmonaire des patients atteints de PHS (Dakhama et al., 1999). Ainsi, les virus pourraient être des cofacteurs nécessaires pour sensibiliser les patients aux antigènes environnementaux.

Les fientes, les plumes et le sérum des oiseaux sont fréquemment utilisées pour le diagnostic sérologique de la maladie. Actuellement, on connaît peu de choses sur la composition protéique de ces différentes matrices. Elles sont décrites comme un mélange hétérogène complexe et leur efficacité pour le diagnostic est limitée (Tebo et al., 1977).

3.2 Caractérisation des protéines antigéniques

Les protéines antigéniques sont investiguées depuis de nombreuses années en utilisant des techniques de biologie moléculaire et des analyses sérologiques. Les principales études ayant permis la description de protéines antigéniques sont présentées dans le **tableau 9**.

Durant les années 60-70, les immunoglobulines aviaires (Edwards et al., 1970) (en particulier l'IgA (Goudswaard et al., 1978)), l'albumine sérique ainsi qu'une enzyme ayant des caractéristiques proches de la trypsine (Berrens and Maesen, 1972) sont décrites en utilisant des techniques biochimiques (dialyse, analyses enzymatique, chromatographie) et des tests sérologiques (double diffusion et immunoélectrophorèse).

L'utilisation de nouvelles techniques telles que l'isoélectrofocalisation électrique, les techniques d'électrophorèse et de western blotting bidimensionnelles (Hisauichi-Kojima et al., 1999) permettent de mieux caractériser les immunoglobulines (Boyd et al., 1982; Longbottom, 1989) ainsi que les enzymes protéolytiques (McCormick et al., 1982; McCormick et al., 1984). La mucine intestinale de pigeon (Todd et al., 1991) et d'autres protéines caractérisées selon leur poids moléculaire et leur point isoélectrique sont décrites (Calvanico, 1986; de Beer et al., 1990).

A la fin des années 2000, les protéines suspectées dans la littérature sont principalement les immunoglobulines, l'albumine sérique, la mucine intestinale, des enzymes protéolytiques et d'autres protéines caractérisées uniquement sur la base de leurs caractéristiques physico-chimique.

L'évolution récente des techniques de biologie moléculaire et l'émergence de nouvelles données dans le domaine de la Génomique et de la Protéomique permettent l'identification précise et la production de protéines « biomarqueurs » de la maladie. L'identification des protéines par spectrométrie de masse est possible seulement depuis le séquençage du génome de *Columba livia* (septembre 2013) (Shapiro et al., 2013).

En parallèle à ce travail de thèse, Shirai et al., ont détecté par western blot 1 D une protéine antigénique de 26 kDa révélées spécifiquement à partir des anticorps des patients PEO (7/8). Cette protéine est retrouvée à la fois dans le sérum, les fientes et le contenu intestinal de pigeon. Ils réalisent ensuite des gels 2D et des western blot 2D en utilisant le sérum et les fientes de pigeon et identifient par spectrométrie de masse les spots protéiques immuno-réactifs ayant un poids moléculaire de 26 kDa. La protéine immunoglobulin-lambda like-polypeptide -1 (IGLL1) a été identifiée dans cette étude comme biomarqueur de la maladie (Shirai et al., 2017).

Tableau 9 : Liste des publications ayant décrit des antigènes impliqués dans la maladie du PEO.

Auteurs (années)	Espèces aviaires	Matrices aviaires	Source anticorps	Techniques d'étude	Caractéristiques des antigènes
(Edwards et al., 1970)	Pigeon	Sérum, fientes, urine, blanc d'œuf, contenu intestinal, salive, lait de jabot, plumes, fluide lacrymal	9 sérums patients PEO Anticorps anti- γ -globuline; Anticorps anti-X- γ -globuline (antigène montrant des réactions croisées avec la γ -globuline), Anticorps anti- β -globuline, Anticorps anti-albumine (lapins immunisés)	IEP	Les protéines suivantes sont antigéniques et toutes localisées dans les fientes fraîches, le contenu intestinal et le blanc d'œuf : - γ -globuline, - X- γ -globuline, - β -globuline, - Albumine sérique
(Berrens and Maesen, 1972)	Pigeon	Fientes	Non renseigné	Analyses enzymatiques, chromatographie d'affinité, DD	Chymotrypsine
(Tebo et al., 1977)	Pigeon	Fientes F1 : fraction purifiée des fientes.	5 sérums patients PEO, 5 sérums TEA, sérums volontaires sains	DD, IEP	Précipitines/fientes : sérums des patients PEO, TEA et volontaires sains. Précipitines/fraction F1 : patients PEO et TEA
(Goudswaard et al., 1978)	Pigeon	Squames, lait de jabot	13 sérums PEO; 2 sérums de TEA Anticorps anti-sérum de pigeon et anti-IgA de pigeon (lapins immunisés)	Chromatographie d'affinité, DD, IEP	IgA : protéine antigénique retrouvée dans les squames
(Fredricks, 1978)	Pigeon	Fientes	14 sérums PEO Anticorps anti-fientes de pigeon	DD, IEP, Chromatographie par filtration sur gel, Analyse spectres d'absorption	Fraction F1: glycoprotéine, PM = 200 kDa = anticorps anti-X- γ -globuline (Edwards et al. 1970) = Cette protéine pourrait correspondre à l'IgA de pigeon Fraction 3: Acide mucopolysaccharide, PM =16 kDa ; Il s'agit de la mucine. Fraction B: glycoprotéine, PM = 42 kDa = fragment Fragment F _{ab} ou F _c de l'IgA.
(McCormick et al., 1982)	Pigeon	Fientes, Sérums, Fraction 1, Fraction 3, Fraction B	8 sérums de patients PEO, 4 sérums TEA Anticorps anti-fientes, anti-fraction-1, anti-fraction-3, anti-fraction-B (lapins immunisés)	Chromatographie par filtration sur gel, Isoélectrofocalisation (IEF), IEP	Fraction1 : pH isoélectrique = 3,8 Fraction 3: pH isoélectrique = 4,6 Fraction B: pH isoélectrique (pHi) = 6,1
(McCormick et al., 1984)	Pigeon	Fientes	Sérums de patients PEO et TEA	Chromatographies échangeuse d'ions; d'affinité, par filtration sur gel, Immunoélectrophorèse croisée (XIE), Analyses enzymatiques; Electrophorèse SDS-Page	Trypsine: PM = 27,5 kDa ; Collagénases: glycoprotéines de PM = 37,1 kDa et 12,3 kDa, Estérase: PM = 51,2 kDa; Elastase : PM = 22 kDa, Phospholipase : PM = 99 kDa

Auteurs (années)	Espèces aviaires	Matrices aviaires	Source anticorps	Techniques d'étude	Caractéristiques des antigènes
(Calvanico, 1986)	Pigeon	Fientes	13 sérums de patients PEO; 22 sérums TEA	IEF	Polypeptide, PM = 50 kDa, 3,5 < pH isoélectrique < 5
(Longbottom, 1989)	Pigeon	Squames, sérum, fientes, IgG, IgA pigeon	5 sérums de patients PEO Anticorps anti-sérum de pigeon (lapin immunisé)	Immunoélectrophorèse croisée (XIE) Electrophorèse SDS-PAGE Chromatographie d'affinité sur colonne	Protéine commune fientes-squame: IgA dégradée (PM = 28 kDa), traces d'albumine sérique
(de Beer et al., 1990)	Pigeon	Sérum	9 sérums de patients PEO ; 7 sérums TEA	Western blotting	Protéines suivantes = 220 kDa (9/16), 98 kDa (8/16), 86 kDa (8/16): anticorps dans sérum patients PEO et TEA Protéine de 29-32 kDa: spécifique des patients
(Todd et al., 1991)	Pigeon	Intestin de pigeon	15 sérums de patients PEO ; 20 sérums TEA; 40 sérums de volontaires sains	DD, ELISA	Mucine intestinale de pigeon : Anticorps dirigés contre la mucine chez les patients PEO et TEA
(Todd et al., 1993)	Pigeon	Mucus intestinal, (IgA et mucine)	32 sérums de patients PEO ; 27 sérums éleveurs d'oiseaux autres pathologies pulmonaires, 23 sérums TEA, 30 sérums de volontaires sains	ELISA	Réactivité spécifique des IgG2 et IgG3 du sérum des patients PEO à la mucine intestinale de pigeon.
(Hisauichi-Kojima et al., 1999)	Pigeon	Fientes	Source en anticorps : liquide lavage broncho-alvéolaire (LBA) 10 LBA de patients PEO; 1 LBA de TEA; 5 LBA patients avec fièvre d'été japonaise (PHS)	Electrophorèse et western blotting 1D, Electrophorèse 2D, western blotting 2D	Anticorps dans le sérum des patients PEO et TEA dirigés contre les protéines de PM suivantes: 199, 140, 110, 87, 60, 55, 44,40. Anticorps dirigés contre la protéine de 21 kDa et de pH isoélectrique : 5, uniquement retrouvés dans le sérum des patients PEO.
(Rouzet et al., 2014)	Pigeon Perruche Poule	Fientes	4 sérums de patients PEO, 2 sérums de témoins non exposés	Electrophorèse et western blotting 1D	Protéine de 68 kDa : commune pigeon et perruche Protéines spécifiques pigeon: 140 et 35 kDa Protéines spécifiques perruche: 175 kDa Protéines spécifiques poule: 200 et 100 kDa
(Shirai et al., 2017)	Pigeon	Fientes, sérums, Section d'intestins	8 sérums de patients PEO, 4 sérums patients autre PHS 3 sérums de volontaires sains	Western blotting 1D, IEF, Electrophorèse 2D, Spectrométrie de masse	Protéine de 26 kDa -> Immunoglobuline lambda like polypeptide 1 : IGLL1

Abréviations : PEO : poumon d'éleveur d'oiseaux ; TEA : témoins exposés asymptomatiques ; PHS : pneumopathie d'hypersensibilité ; PM : Poids Moléculaire, Ig : immunoglobuline ; IEF : immunoélectrophorèse ; DD : double diffusion ; LBA : lavage broncho-alvéolaire

En dépit de toutes ces recherches, le diagnostic sérologique actuel de la maladie repose sur la recherche de précipitines / anticorps IgG, dirigés contre les extraits totaux de fientes, de sérums et de plumes d'oiseaux. La plupart du temps ces antigènes sont confectionnés de manière artisanale dans les laboratoires d'analyses médicales. Les antigènes utilisés pour les analyses sérologiques (artisanaux ou commerciaux) manquent de standardisation. Ce problème pourrait être levé par l'utilisation d'antigènes recombinants. Cette stratégie de recherche de biomarqueurs s'inscrit dans une approche immuno-protéomique décrite dans la partie suivante.

3.3 Approche immunoprotéomique pour la détection de protéines biomarqueurs pour le diagnostic sérologique des PHS

Le service de Parasitologie-Mycologie a acquis un savoir-faire dans la recherche de protéines d'intérêt pour les sérologies des maladies allergiques et dans la fabrication d'antigènes recombinants. Ainsi, les travaux de l'équipe ont permis d'identifier des biomarqueurs pour le diagnostic de deux PHS d'origine professionnelles : Le poumon de fermier et le poumon de mécanicien (Barrera et al., 2014; Millon et al., 2012; Rognon et al., 2016; Roussel et al., 2011). Ces études portaient sur des micro-organismes localisés respectivement dans les fourrages et les fluides de coupe.

Plusieurs travaux de l'équipe ont permis l'identification et la production de protéines utiles pour le diagnostic du poumon de fermier (PDF). Ces études ont montré que l'utilisation de 2 protéines recombinantes d'*Aspergillus* (glucose-6-phosphate isomérase et glutamate/leucine/phénylalanine/valine déshydrogénase) (Millon et al., 2012), d'une protéine de *Lichteimia corymbifera* (dihydrolipoyl deshydrogenase) (Rognon et al., 2016) ainsi que la combinaison de 3 protéines de *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR1FA, SR17 et SR22) (Barrera et al., 2014) améliorerait le diagnostic sérologique du PDF.

Pour le poumon de mécanicien, l'utilisation d'une seule protéine recombinante issue de *Mycobacterium immunogenum* (Acyl-CoA déshydrogénase) est suffisante pour discriminer les patients et les témoins (Roussel et al., 2011).

Cette approche a permis la détection et la production de protéines efficaces pour le diagnostic du PDF et du PDM mais elle n'a pas encore été utilisée pour le PEO.

Les grandes étapes de l'approche adoptée pour l'identification, la production et la validation de ces protéines candidates pour le diagnostic sérologique sont résumées dans la **figure 8**. Les fientes de pigeon sont utilisées comme source antigénique pour ce travail de thèse. Etant donné la nature complexe de cet échantillon, de nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires afin d'obtenir des échantillons protéiques de qualités suffisantes pour une identification par spectrométrie de masse.

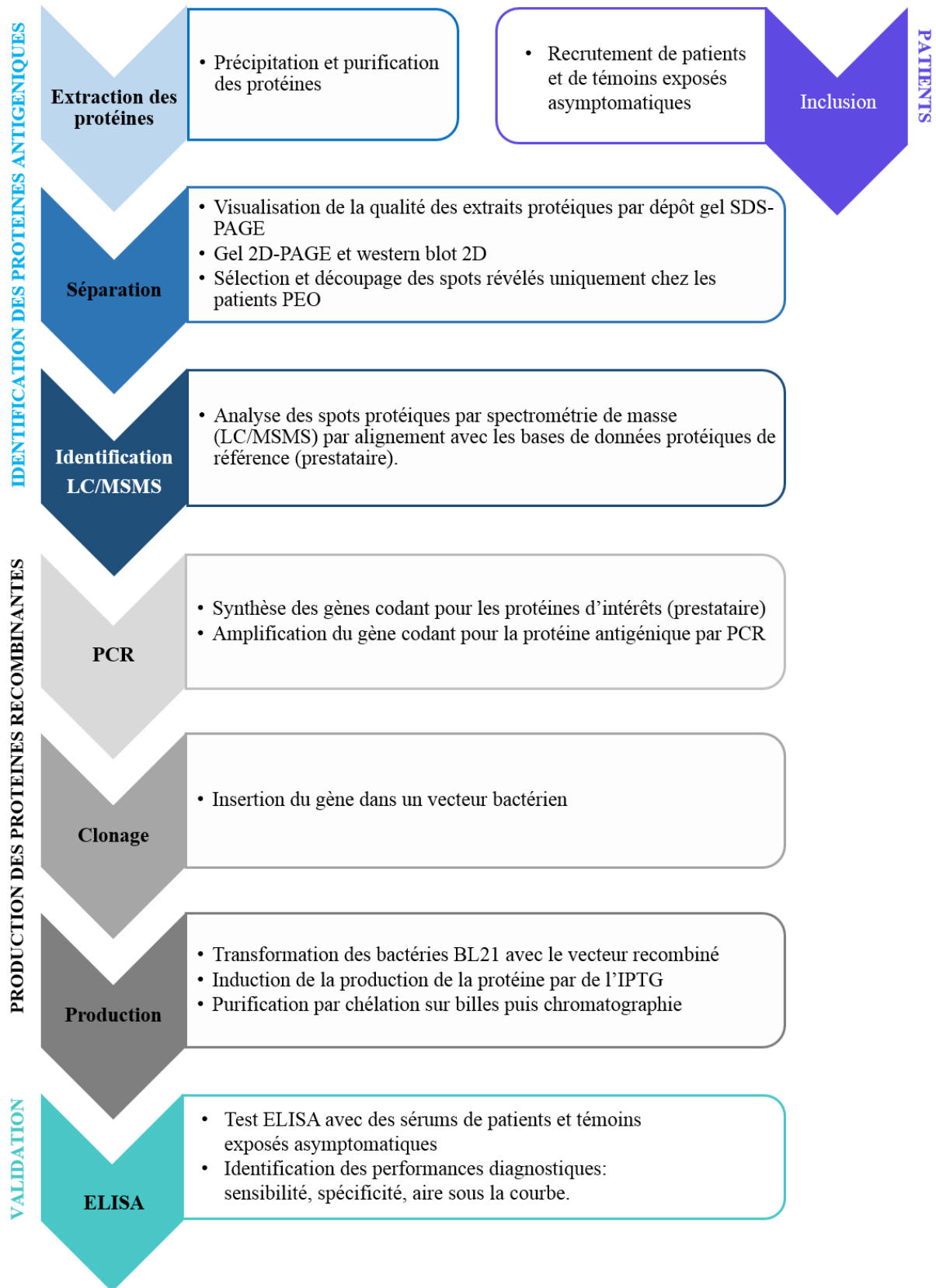


Figure 8 : Description de l'approche utilisée pour l'identification, la production et la validation des protéines utiles pour le diagnostic sérologique des PHS.

Chapitre 1 : Comparaison de l'efficacité de différents panels antigéniques pour le diagnostic sérologique du PEO

1. Contexte

La sérologie occupe une place importante dans le diagnostic de la maladie quel que soient les critères retenus (cf synthèse bibliographique § 2.4). Les techniques d'immunoprécipitation (DD et IEP) sont couramment employées pour le diagnostic de routine. Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Besançon, les techniques de double diffusion et d'immunoélectrophorèse sont utilisées respectivement pour le dépistage et la confirmation du diagnostic sérologique du PEO. Le panel antigénique standard comprend des antigènes de fientes de pigeon, perruche, canaris, poule et canard, produits au sein du laboratoire. De toute évidence, ce panel ne couvre pas l'ensemble des expositions aviaires. Par conséquent, lorsque le patient est exposé à une espèce d'oiseau plus rare, le médecin demande au laboratoire de produire et de tester en sérologie des antigènes issus directement de l'environnement du patient (fientes, plumes, nids...). Cette procédure de production d'antigènes *à la carte* peut également être retenue lorsque les analyses sérologiques sont négatives avec le panel standard, mais que les autres critères diagnostiques (cliniques, radiologiques) sont en faveur de la maladie. Une étude de cas a montré l'efficacité de cette stratégie pour le diagnostic d'un patient atteint du PEO (Funke and Fellrath, 2008).

La plupart du temps, la recherche de précipitines dirigées contre les micro-organismes isolés à partir des prélèvements environnementaux du patient est associée à cette demande. En effet, l'implication des micro-organismes dans la survenue de la maladie est suspectée depuis de nombreuses années. Plusieurs types de micro-organismes sont identifiés dans les pigeonniers incluant des moisissures, des bactéries, des virus et des parasites. Ils peuvent être directement associés aux pigeons, ou se développer dans les graines alimentaires (McSharry et al., 2000). Plusieurs études mettent en évidence le transport et la dispersion de champignons opportunistes et notamment de *Cryptococcus neoformans* par les pigeons et leur impact sur les personnes immunodéprimées (Castanon-Olivares and Lopez-Martinez, 1994; Costa et al., 2010; Currie et al., 1994; Khosravi, 1997). La cryptococcose est une infection fongique se présentant principalement sous la forme d'une méningoencéphalite disséminée, mais l'infection peut également être localisée dans les poumons ou au niveau de lésions cutanées (Dromer and Lortholary, 2004). Des anticorps dirigés contre *C.neoformans* ont été retrouvés dans les sérums de patients PEO et d'éleveurs sains, par conséquent cette espèce n'est pas en cause dans l'étiologie de la maladie (Fink et al., 1968).

Par ailleurs, une étude met en évidence une sensibilisation de 18% des éleveurs de pigeons dont le diagnostic est en faveur du PEO vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus* (Scribner et al., 1980). Certaines moisissures identifiées à partir des fientes de pigeon sont impliquées dans d'autres formes de PHS telles que *A.fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Saccharopolyspora rectivirgula* pour le poumon de

fermier. Ce constat est probablement l'une des raisons pour lesquelles l'inhalation de ces micro-organismes est suspectée dans le développement du PEO.

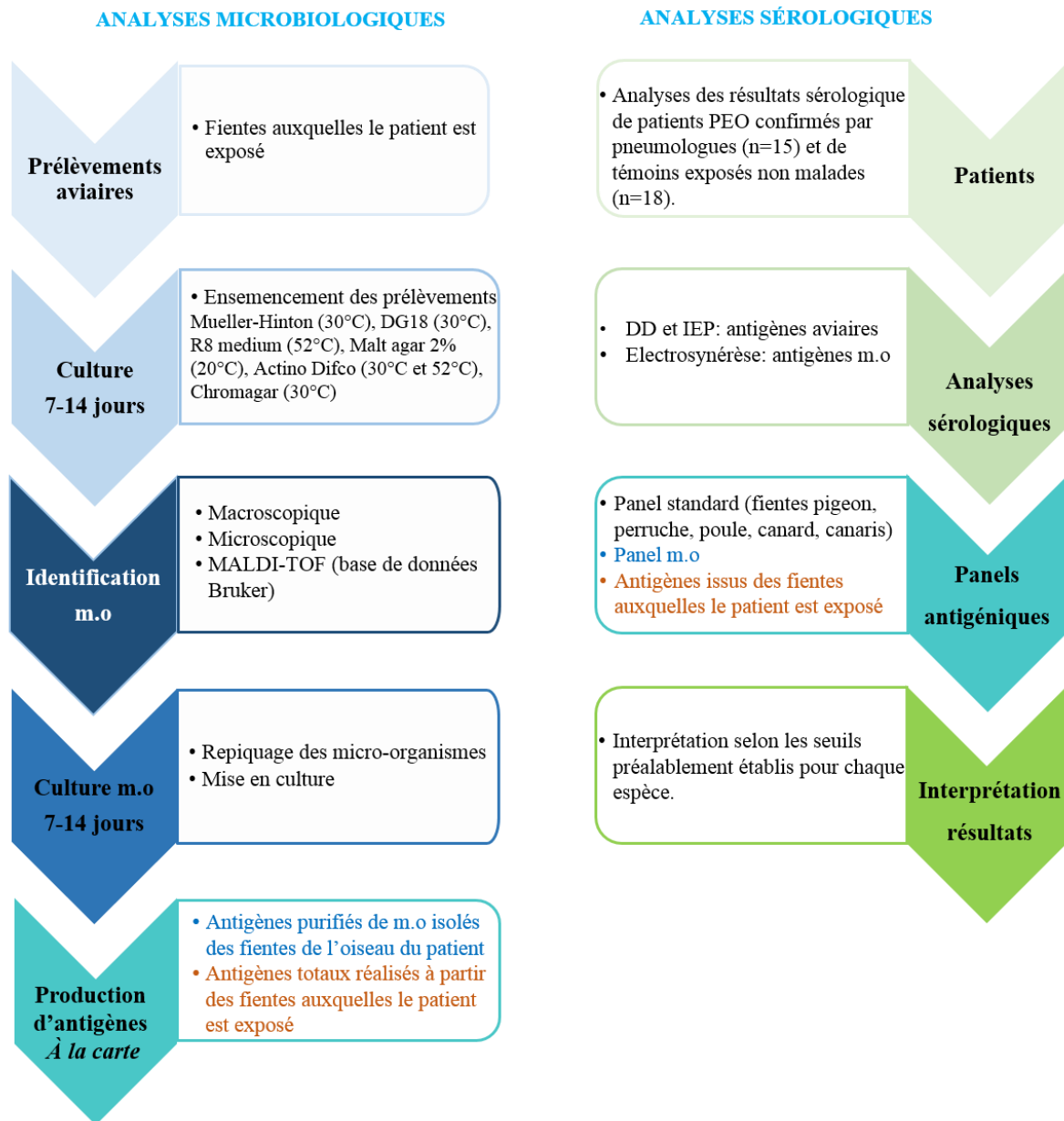
L'inhalation régulière de protéines aviaires est reconnue dans le développement de la maladie par l'ensemble de la communauté scientifique. Toutefois, les cliniciens demandent fréquemment la fabrication d'antigènes correspondant aux micro-organismes issus des fientes d'oiseaux auxquelles le patient est exposé pour le diagnostic sérologique du PEO.

2. Objectifs

L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité des antigènes *à la carte* incluant les fientes des oiseaux auxquelles les patients sont exposés et les micro-organismes isolés à partir de celles-ci avec les antigènes du panel antigénique standard.

3. Matériel et méthodes

Pour les besoins de l'étude, nous avons utilisé les résultats des analyses sérologiques de 15 patients PEO et de 18 témoins exposés asymptomatiques. Les principales étapes méthodologiques associées à cette étude sont décrites dans la **figure 9**.



Abréviations: m.o : micro-organismes

Figure 9 : Méthodologie appliquée pour comparer l'efficacité de différents panels antigéniques.

4. Principaux résultats

Les arguments sérologiques sont en accord avec le diagnostic retenu par les cliniciens dans 87% des cas en utilisant les antigènes *à la carte* issus des fientes des oiseaux du patient contre seulement 20% avec le panel standard. Par ailleurs, les résultats montrent que 93% (14/15) des patients PEO ont des résultats négatifs en sérologie pour les micro-organismes isolés à partir des fientes auxquelles ils sont exposés. Un seul patient présente une réaction sérologique positive à *Enterobacter sakasakii*, une bactérie Gram négative associée à certains cas de septicémie et de méningite mais non rapportés dans les PHS. Les tests de précipitines sont négatifs pour les témoins exposés asymptomatiques (18/18) quel que soit l'antigène utilisé.

5. Article Journal of Medical Microbiology 2017

Titre: Usefulness of *a la carte* antigens for bird fancier's lung serodiagnosis: total dropping extract and/or dropping's microflora antigens

Auteurs : Adeline Rouzet, Gabriel Reboux, Jean-Charles Dalphin, Paul De-Vuyst, Audrey Laboissière, Benoit Valot, Laurence Millon, Sandrine Roussel.

Journal: Journal of Medical Microbiology

Accepté le 25 août 2017, doi: [10.1099/jmm.0.000586](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000586)

Usefulness of à la carte antigens for bird fancier's lung serodiagnosis: total dropping extract and/or dropping's microflora antigens

Adeline Rouzet,¹ Gabriel Reboux,^{1,2,*} Jean-Charles Dalphin,^{1,3} Paul De Vuyst,⁴ Audrey Laboissière,^{1,2} Benoit Valot,¹ Laurence Millon^{1,2} and Sandrine Roussel^{1,5}

Abstract

Bird fancier's lung (BFL) is a pulmonary disease caused by inhalation of avian proteins. The involvement of the microorganisms of droppings has been assumed in the past and this idea still persists today. Our study aimed to compare by immunoprecipitation assay the detection of antibodies against both droppings and microorganisms in the sera of patients ($n=15$) and asymptomatic exposed controls ($n=18$). We found that 14/15 BFL patients had negative serological results for isolated microorganisms of the droppings, only one positive against *Enterobacter sakasaki*. Serological arguments were in accordance with diagnosis in 87 % of cases by testing à la carte antigens from each bird dropping versus 20 % using the standard antigenic panel. Otherwise, the microorganisms antigens issued from dropping flora were negative in 93 % of cases. Consequently, it's preferable to use the total extract from the patient's bird droppings to establish the serodiagnosis of the disease.

Bird fancier's lung (BFL) is one of the most common forms of hypersensitivity pneumonitis (HP) caused by the inhalation of avian proteins located in droppings, blooms and feathers. Produced by feathers, blooms consist of an abundant fine white powder resembling talcum powder[1].

Pigeons, budgerigars and parrots are the largest producers of blooms as opposed to poultry and singing birds. These differences may explain why the most frequent cases occurred after contact with Columbidae and Psittacidae[2]. The main antigenic substances described as antigenic in the disease were immunoglobulins, serum albumin and intestinal mucin from birds [3].

Various bacteria (*Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Streptomyces bovis*, *Pasteurella Chlamydia*, *Mycoplasma*), fungi (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Mucor*) and viruses (*Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Myxovirus influenzae*) have been identified in the dust of pigeon lofts [3]. The involvement of these microorganisms in BFL has been suspected in the past [4] and this is still the case today. As part of the routine BFL serodiagnosis, our

laboratory regularly tests the microorganisms of bird droppings to meet the demands of clinicians.

The aim of this study was to compare by immunoprecipitation assay the detection of antibodies in the sera of patients with BFL ($n=15$) and asymptomatic exposed controls (AEC, $n=18$). Total extracts of droppings (standard panel and à la carte dropping extract from each bird) and microorganisms (isolated from dropping) were used as antigens.

All the recruited patients were diagnosed at the University Hospital of Besançon (France) and the ULB Erasme Hospital of Brussels (Belgium) according to criteria proposed by Schuyler *et al.* [5]. BFL patients and AEC were exposed to varied and even atypical species of birds. The standard antigen panel used for routine serological diagnosis included house-made pigeon, budgerigar, canary, hen and duck droppings extracts. This panel did not cover all species of birds, so we developed antigens called à la carte made from bird droppings of each breeder. The standard and à la carte antigens are made within our laboratory as part of the routine diagnosis as previously described[6].

Received 20 July 2017; Accepted 25 August 2017

Author affiliations: ¹UMR 6249 Chrono-Environnement, University of Bourgogne-Franche-Comté, Besançon, France; ²Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France; ³Pneumology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France; ⁴Pneumology Department, ULB Erasme Hospital, Brussels, Belgium; ⁵Biomedical Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France.

*Correspondence: Gabriel Reboux, gabriel.reboux@univ-fcomte.fr

Keywords: microorganisms; bird fancier's lung; serology; diagnosis; antigens; droppings.

Abbreviations: AEC, Asymptomatic exposed control; BFL, Bird fancier's lung; DD, Double diffusion; ES, Electrosyneresis; HP, Hypersensitivity pneumonitis; IEP, Immunoelectrophoresis; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight.

Briefly, 1 g of the droppings was diluted in 40 ml of 0.1 % (v/v) Tween 80 solution, and 100 µl were plated onto the following culture media to obtain the best, but not exhaustive representativeness of the microorganisms (bacteria, fungi, actinomycetes): Mueller-Hinton (30 °C), DG18 (30 °C), R8 medium (52 °C), Malt extract agar 2 % (20 °C), Actino Difco (30 and 52 °C), and Chromagar (30 °C). Cultures were checked after seven days of incubation. Microorganisms were identified by macroscopic and microscopic examination. The matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer Micro Flex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was also used to identify the isolate at the species level according to the manufacturer's recommendations.

The sample of droppings was then mixed with Coca's solution for seven days. The solution was then filtered and freeze-dried. The lyophilisate obtained was suspended in sterile water and used at a final concentration of 1 mg ml⁻¹. The microorganisms isolated from the dropping culture were produced as antigenic extracts[7] and were used in the serological analyses at the same concentration.

Double diffusion (DD) was performed as a screening test, and immunoelectrophoresis (IEP) and electrosyneresis on cellulose acetate (ES) were respectively used as confirmation tests with crude antigens from droppings and microorganisms[8]. The results of the serological tests could be interpreted by comparison with an existing threshold. Thresholds are previously determined for each antigen to discriminate patients (clinically proven) from AEC groups.

IEP was performed if at least 2 arcs were obtained with DD. IEP results with 3 arcs for all avian antigens were considered as positive, except for the hen for which 4 arcs were needed as a threshold. The positivity thresholds for ES were different according to the microorganism used. They were previously established by comparing patient and control groups [7]. The positivity thresholds for ES were defined at 4 arcs for the most frequent ubiquitous microorganisms in the environment. The thresholds were lower for *Eurotium amstelodami* (3 arcs), *Lichtheimia corymbifera* (2 arcs), *Saccharomonospora viridis* (3 arcs) and *Saccharopolyspora rectivirgula* (2 arcs)[7]. The results of precipitin arcs obtained for BFL patients and AEC are reported in Table 1.

The results of the serological tests allowed the classification of patients according to the following 4 groups: precipitins for BFL patients were positive to droppings and negative to microorganisms in 12 cases. In the other three cases, precipitins were negative to both droppings and microorganisms in the first two and positive in the second one. For AEC patients, precipitin reactions to both droppings and microorganisms were always negative.

The à la carte IEP tests against the patients' bird droppings were positive in 13 patients versus only 3 patients using standard panel antigens. These findings highlight the importance of searching for precipitins directly against antigens extracted from the patient's environment[9]. The

existence of cross-antigenic reactions is well known but such reactions have thus far been very poorly characterized for avian antigens. Therefore, if a serological test performed with the standard panel is negative, we advise clinicians to provide us with a sample of their patients' bird droppings to test antigens à la carte.

The droppings were a complex mixture of avian and microorganism proteins. The following microorganisms isolated from the dropping cultures were identified at the genus or species level, according to morphological characteristics and/or MALDI-TOF using Bruker database: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Eurotium amstelodami*, *Penicillium* spp., *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces hanseinii*, *Rhodotorula rubra*, *Candida* spp., *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus* sp., *Mucor racemosus*, *Mucor* sp., *Fusarium*, *Thermoactinomyces vulgaris*, thermophilic *Actinomyces* sp., *Sacharomonospora viridis*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, mesophilic *Streptomyces* sp., *Streptomyces griseoflavus*, *Bacillus licheniformis* and *Enterobacter sakasakii*.

Some of these microorganisms were involved in HP, such as *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *T. vulgaris*, and *Saccharopolyspora rectivirgula* for farmer's lung disease, *Penicillium* sp. for stipitosis or *Aureobasidium pullulans* for sequoiosis. These fungi are able to reach the alveoli and initiate immune responses. However, only the BFL15 patient showed a positive serological reaction against *Enterobacter sakasakii*. This Gram-negative bacterium was mainly associated with cases of septicemia and meningitis but was not reported in HP disease. For the control group ($n=18$), the precipitin tests were negative for both the droppings and the associated microorganisms. Exposed control subjects have precipitin arcs below the thresholds resulting from exposure but without compatible symptoms.

Fungi identified from bird droppings consisted of conidia (spores) with dry or wet cell walls. Some of them were composed of very wide hyphae (Mucorales), whereas others had very small spores (0.8 µm) such as actinomycetes, or even very broad macroconidia (>25 µm) like *Fusarium*. Finally, the morphology or aerolitic behavior of fungal or actinomycetes spores did not seem to influence the level of sensitization of BFL and AEC (Table 1).

The microorganisms cultivated from the droppings were tested separately by serological tests and the results were below the positivity threshold for 14/15 patients. Conversely, 87 % of proved BFL cases were positive against à la carte dropping extracts from the patients' own birds. Therefore, we observed that the microorganisms of the droppings didn't induce the production of specific antibodies at a sufficiently high level useful to discriminate patients from controls. However, we can't rule out the possibility that these microorganisms could participate in disease processes by acting as cofactors with avian proteins.

Table 1. Serological results using antigen extracts from bird droppings (standard antigenic panel and antigens à la carte) and from microorganisms isolated from bird droppings

	Patients	Real avian exposure	Droppings				Microorganisms	
			IEP results (arcs)				ES results (arc means)	
			Standard panel	bird (1)	bird (2)	bird (3)	Arc means	No. of antigens teste
BFL patients with serological results: droppings+microorganisms -	BFL1	Pigeon (1)	1	3			0.6	5
	BFL2	Pigeon (1)	1	3			0.6	3
	BFL3	Pigeon (1) , turtledove (2)	1	3	0		1.8	6
	BFL4	Pigeon (1) , budgerigar (2)	2	5	2		1.6	5
	BFL5	Dove (1) , turtledove(2) , budgerigar(3)	3	5	4	2	0	1
	BFL6	Budgerigar (1)	0	3			0	3
	BFL7	Budgerigar (1)	0	3			0.75	4
	BFL8	Parrot (1) , budgerigar (2)	3	3	2		2	2
	BFL9	budgerigar (1)	1	3			1.3	3
	BFL10	turtledove(1) , goose (2), peacock (3)	1	3	0	0	0.75	4
	BFL11	Duck (1)	0	4			1.5	2
	BFL12	Hen (1)	0	5			0.6	3
	BFL13	Budgerigar (1)	0	0			0.75	4
	BFL14	Gerfalcon (1) , parrot (2), falcon (3),	0	1	Scr0	Scr0	1.2	9
BFL patient with serological results: droppings +microorganisms+	BFL15	Budgerigar (1) , parrot (2)	5	5	2		1.1*	7
AEC patients with serological results: droppings - microorganisms -	AEC1	Pigeon(1)	1	1			0	1
	AEC2	Pigeon(1), hen (2)	Scr0	Scr0	Scr0		0.16	6
	AEC3	Pigeon (1), hen (2)	Scr0	Scr0	Scr0		2	1
	AEC4	Pigeon (1), hen (2), pheasant(3)	2	Scr0	Scr0	Scr0	0.4	5
	AEC5	Budgerigar(1)	Scr0	1			1.5	2
	AEC6	Budgerigar(1)	0	Scr0			0	2
	AEC7	Budgerigar(1)	1	Scr0			0.5	2
	AEC8	Parrot (1)	Scr0	Scr0			0.25	4
	AEC9	Budgerigar(1), parrot (2)	1	2	1		0.4	5
	AEC10	Canaries (1)	0	Scr0			0.2	5
	AEC11	Canaries (1), mandarins (2), Gould Australian(3)	0	Scr0	1	Scr0	0.6	3
	AEC12	Canaries (1), goldfinch (2), Bullfinch (3)	0	Scr0	Scr0	Scr0	0.6	3
	AEC13	Mandarins (1)	Scr0	2			0.25	4
	AEC14	Mandarins (1)	1	1			0	1
	AEC15	Hen (1), duck (2)	0	Scr0	Scr0		0	4
	AEC16	Hen (1), duck (2)	1	Scr0	Scr0		0.5	6
	AEC17	Pheasant (1)	0	1			1	3
	AEC18	Owl(1), swallow (2)	Scr0	Scr0	Scr0		0.16	6

*Patient with 4 arcs against *Enterobacter sakasakii*.

'Scr0' (negative screening) in the table means that the results of DD analysis were lower than two arcs and Immunoelectrophoresis (IEP) was not performed. The IEP positivity threshold was set at 3 arcs for bird droppings, except in the case of hen droppings for which it was set at 4 arcs. The bird etiology of BFL retained for each patient and the corresponding number of arcs are written in bold. The positivity thresholds for electrosyneresis (ES) were defined at 4 arcs for the most frequent ubiquist microorganisms of the environment. The thresholds were lower for *Eurotium amstelodami* (3 arcs), *Lichtheimia corymbifera* (2 arcs), *Saccharomonospora viridis* (3 arcs) and *Saccharopolyspora rectivirgula* (2 arcs).

The proteins involved in BFL were mainly described as avian immunoglobulins found in bird droppings, blooms and sera [10, 11].

This research showed that making à la carte antigens for different species or varieties of birds is more useful for BFL diagnosis than using à la carte microorganisms isolated

from droppings. In this new series, serological arguments were in accordance with BFL diagnosis in 87 % of cases by testing à la carte antigens from bird droppings but with only 20 % using the standard antigenic panel.

To conclude, immunological tests can be obtained using a standard panel of 5 antigens often requested by clinicians. However, if the results of these tests prove to be negative and if the breeder is exposed to rare species of birds, it is advisable to ask him to provide samples of bird droppings in order to prepare à la carte antigens. Therefore, tests based on the use of these microorganisms are not necessary to establish the serological diagnosis of the disease.

Funding information

The authors received no specific grant from any funding agency.

Acknowledgements

The authors are grateful to Pamela Albert for her editorial assistance.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

This is a retrospective case study followed with a routine protocol within the laboratory and no further examination was performed for the purposes of the study.

References

1. Tauer-Reich I, Fruhmhann G, Czuppon AB, Baur X. Allergens causing bird fancier's asthma. *Allergy* 1994;49:448–453.
2. Gorman J, Cook A, Ferguson C, Van Buynder P, Fenwick S et al. Pet birds and risks of respiratory disease in Australia: a review. *Aust N Z J Public Health* 2009;33:167–172.
3. McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1221–1229.
4. Scribner GH, Barboriak JJ, Fink JN. Prevalence of precipitins in groups at risk of developing hypersensitivity pneumonitis. *Clin Allergy* 1980;10:91–95.
5. Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1997;111:534–536.
6. Rouzet A, Reboux G, Rognon B, Barrera C, De Vuyst P et al. Immunogenic proteins specific to different bird species in bird fancier's lung. *J Toxicol Environ Health A* 2014;77:724–730.
7. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L et al. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1534–1539.
8. Reboux G, Piarroux R, Roussel S, Millon L, Bardonnet K et al. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J Med Microbiol* 2007;56:1317–1321.
9. Funke M, Fellrath JM. Hypersensitivity pneumonitis secondary to lovebirds: a new cause of bird fancier's disease. *Eur Respir J* 2008;32:517–521.
10. Banham SW, McKenzie H, McSharry C, Lynch PP, Boyd G. Antibody against a pigeon bloom-extract: a further antigen in pigeon fanciers' lung. *Clin Allergy* 1982;12:173–178.
11. Shirai T, Furusawa H, Furukawa A, Ishige Y, Uchida K et al. Protein antigen of bird-related hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping. *Respir Res* 2017;18:65.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

6. Conclusion

Les résultats de cette étude permettent d'apporter des connaissances sur l'efficacité des analyses sérologiques en fonction des antigènes utilisés. Elles permettent également de mieux caractériser l'exposition des éleveurs de pigeons aux micro-organismes.

Tout d'abord, l'utilisation d'antigènes *à la carte*, fabriqués directement à partir des fientes de l'oiseau du patient est plus efficace pour le diagnostic sérologique du PEO que l'utilisation du panel antigénique standard. Cette différence d'efficacité peut être attribuée à la présence d'antigènes spécifiques dans les fientes de l'oiseau auxquelles le patient est exposé. Dans cette étude, les analyses sérologiques sont réalisées à partir de la même espèce d'oiseaux, qu'il s'agisse du panel antigénique standard ou à la carte, pour 11/15 sérums de patients PEO testés. L'utilisation des antigènes *à la carte* permet la visualisation d'un nombre d'arc plus élevé dans 9/11 cas. Ces résultats soulèvent des questions non résolues sur la spécificité des protéines antigéniques impliquées dans la maladie. En effet, la spécificité des protéines antigéniques entre différentes races d'une même espèce d'oiseaux et entre différentes espèces d'oiseaux n'a pas encore été étudiée.

Néanmoins, la qualité de l'antigène peut aussi contribuer à expliquer ces résultats. En effet, l'antigène *à la carte* est utilisé de manière extemporanée contrairement aux antigènes du panel standard, utilisés quotidiennement pour le diagnostic de routine.

Par ailleurs, les résultats montrent que les personnes exposées aux oiseaux, qu'ils s'agissent des patients ou des TEA, ont des analyses sérologiques négatives en utilisant les micro-organismes isolés à partir des fientes de leurs oiseaux. Certains micro-organismes identifiés sont associés à d'autres formes de PHS et notamment au poumon de fermier (PDF). Ces derniers apportent des arguments pour le diagnostic du PDF mais les analyses sérologiques sont négatives pour les patients PEO. Par conséquent, ces analyses ne sont plus utiles pour le diagnostic sérologique du PEO.

Pour mieux comprendre l'efficacité des antigènes à la carte, nous avons évalué l'éventuelle spécificité d'espèce des protéines antigéniques impliquées dans le développement de la maladie.

Chapitre 2 : Spécificité des protéines antigéniques des fientes de pigeon, perruche et poule.

1. Contexte

La présence de précipitines / d'anticorps spécifiques de type IgG dirigés contre les antigènes aviaires occupe une place importante pour le diagnostic de la maladie (Lacasse et al., 2003).

Les résultats de ces analyses montrent que les patients ne réagissent pas positivement aux antigènes de l'ensemble des oiseaux testés dans le panel antigénique standard (pigeon, perruche, poule, canard et canaris) (Funke and Fellrath, 2008). Ainsi, on peut supposer qu'il existe une différenciation des protéines antigéniques impliquées dans la pathologie selon les espèces aviaires, comme si les protéines s'étaient spécialisées au cours du temps pour chacune des espèces.

Les protéines spécifiques d'espèce ont été peu étudiées. A notre connaissance, une seule étude menée en 1971, par Faux et al., montre que les éleveurs de pigeons réagissent de manière spécifique à la macroglobuline et à la γ globuline sérique de pigeon (Faux et al., 1971). Toutefois, les protéines antigéniques n'ont pas encore été caractérisées entre plusieurs races d'une même espèce d'oiseaux. Ainsi, on ne sait pas si les antigènes d'une race de pigeon donnée sont suffisamment proches pour permettre de diagnostiquer des patients exposés à une autre race.

2. Objectifs

L'objectif de cette étude est de comparer les protéines antigéniques issues des fientes de 2 races de pigeon, 2 races de perruche et 2 races de poule.

3. Matériel et méthodes

Les prélèvements de fientes d'oiseaux proviennent de différents éleveurs d'oiseaux et professionnels de la région de Franche-Comté. Notre intérêt s'est porté sur le pigeon et la perruche puisqu'il s'agit des deux espèces les plus impliquées dans la maladie et à l'inverse, sur la poule puisque les cas de PEO liés à cette espèce sont très rares, malgré une exposition fréquente de la population. Les sérums de 4 patients notés A, B, C et D et de 2 témoins non exposés aux oiseaux ont été utilisés pour mettre en évidence les protéines antigéniques. L'approche immuno-protéomique descriptive utilisée dans cette étude est décrite dans la **figure 10**.

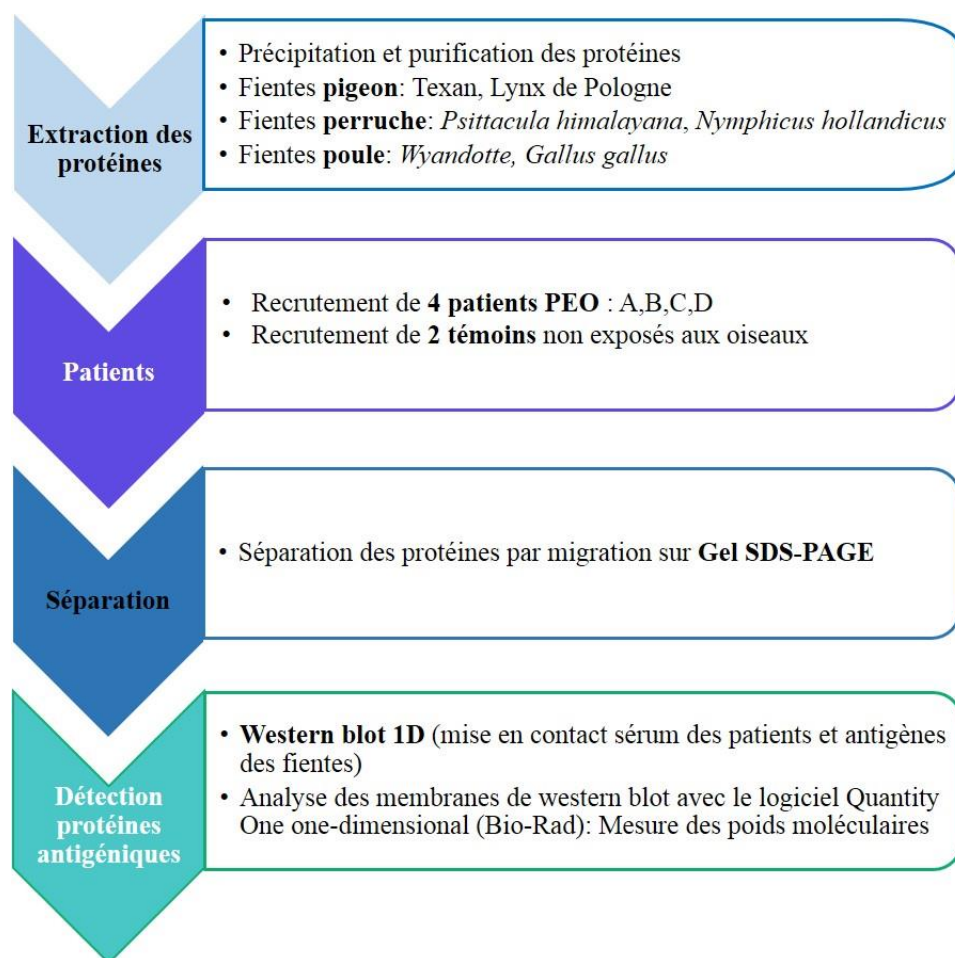


Figure 10 : Méthodologie associée à la description des protéines antigéniques spécifiques d'espèce.

Les antigènes des fientes des 3 espèces d'oiseaux (2 races différentes par espèce) extraits et purifiés sont séparés sur gel SDS-PAGE. Cette analyse permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Après coloration du gel au bleu de Coomassie, les profils protéiques des fientes des oiseaux étudiées ont été comparés.

Les protéines antigéniques ont été analysées en utilisant la technique du western blot. Les extraits protéiques sont séparés sur gel SDS-PAGE, puis les protéines contenues dans le gel sont transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec les sérums de patients et de témoins pour permettre la fixation des anticorps spécifiques aux protéines des fientes. Les complexes antigènes-anticorps sont ensuite révélés par un anticorps secondaire.

4. Principaux résultats

Les profils protéiques des fientes des 2 races de pigeon sont très proches avec 80% de protéines de même poids moléculaire et de même aspect (épaisseur et intensité de coloration sur le gel). Les deux races de poule possèdent environ 50% de protéines communes et les deux races de perruche diffèrent davantage avec moins de 30% de protéines communes. Aucune protéine n'a été mise en évidence à partir des anticorps des témoins non exposés aux oiseaux.

Par ailleurs, plusieurs protéines antigéniques spécifiques à une espèce d'oiseau donnée ont été décrites. Les protéines de 140 et 35 kDa sont spécifiques des fientes de pigeon, la protéine de 175 kDa est spécifique des fientes de perruche et les protéines de 200 et 100 kDa semblent spécifiques aux fientes de poule. Les 2 races de pigeon, perruche et poule possèdent respectivement 67%, 22% et 40% de protéines communes. Une protéine antigénique de 68 kDa est commune aux extraits de fientes des 2 races de pigeon et de perruche. De même, les protéines de 75 kDa et 32 kDa sont révélées par western blotting pour les 4 patients PEO en utilisant les antigènes des fientes des deux races de pigeon et de *Psittacula himalayana*.

5. Article Journal of Toxicology and Environmental Health 2014

Titre: Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung

Auteurs : Adeline Rouzet, Gabriel Reboux, Bénédicte Rognon, Coralie Barrera, Paul De-Vuyst,

Jean-Charles Dalphin, Laurence Millon, Sandrine Roussel

Journal: Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2014;77(12):724-30



Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/uteh20>

Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung

Adeline Rouzet^{ab}, Gabriel Reboux^{ab}, Bénédicte Rognon^{ab}, Coralie Barrera^{ab}, Paul De Vuyst^c, Jean-Charles Dalphin^{bd}, Laurence Millon^{ab} & Sandrine Roussel^{ab}

^a Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

^b Research Team UMR/CNRS 6249 Chrono-environnement, University of Franche-Comté, Besançon, France

^c Pneumology Department, ULB Erasme Hospital, Brussels, Belgium

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

Published online: 01 May 2014.

To cite this article: Adeline Rouzet, Gabriel Reboux, Bénédicte Rognon, Coralie Barrera, Paul De Vuyst, Jean-Charles Dalphin, Laurence Millon & Sandrine Roussel (2014) Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, 77:12, 724-730, DOI: [10.1080/15287394.2014.889616](https://doi.org/10.1080/15287394.2014.889616)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2014.889616>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

IMMUNOGENIC PROTEINS SPECIFIC TO DIFFERENT BIRD SPECIES IN BIRD FANCIER'S LUNG

Adeline Rouzet^{1,2}, Gabriel Reboux^{1,2}, Bénédicte Rognon^{1,2}, Coralie Barrera^{1,2}, Paul De Vuyst³, Jean-Charles Dalphin^{2,4}, Laurence Millon^{1,2}, Sandrine Roussel^{1,2}

¹Parasitology-Mycology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

²Research Team UMR/CNRS 6249 Chrono-environnement, University of Franche-Comté, Besançon, France

³Pneumology Department, ULB Erasme Hospital, Brussels, Belgium

⁴Pneumology Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

Bird fancier's lung (BFL) is a disease produced by exposure to avian proteins present in droppings, blooms, and serum of a variety of birds. Although serological test results are currently used to confirm clinical diagnosis of the disease, bird species specificity is poorly understood. This study aimed to contribute to a better understanding of the specificity of immunogenic proteins revealed from the droppings of three bird species. Sera from four patients with BFL and two controls without exposure were analyzed by Western blotting with antigens from droppings of two pigeon and budgerigar strains and two hen species. When the antigens from the droppings of the three bird species were compared, the profile of immunogenic proteins was different and there were similarities between strains of the same species. Only one 68-kD protein was common to pigeon and budgerigar droppings, while proteins of 200, 175, 140, 100, and 35 kD were detected as specific in one bird species. These results provide insight to further characterize these proteins, and to design new serological tests specific to different bird species. These tests may help to refine strategies of antigenic exclusion and also to allow a patient compensation in case of BFL of occupational origin.

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is an inflammatory interstitial lung disease resulting from repeated exposure to organic dust from environmental sources. Bird fancier's lung (BFL), produced by bird-derived proteins, is one of the most common forms of HP globally (Selman et al., 2010). Prevalence, closely linked to exposure, was estimated at 0.5–7.5% of exposed subjects (Nademi et al., 2013; Judson and Sahn, 2004). In most cases, BFL is reported by exposure to Columbiforms (pigeons and doves) and Psittaciforms, including budgerigars and parrots. Nevertheless, some cases have been recorded attributed to contact with Galliforms (chicken, turkey, and hens), Ansiforms (ducks and geese),

Passeriforms (canaries), Accipitriforms (eagles), and Strigiforms (owls) (Chan et al., 2012; Choy et al., 1995; Kokkarinen et al., 1994). Further, inhalation of antigens from goose or duck feathers in duvets or pillows may induce a type of hypersensitivity pneumonitis termed feather duvet lung, considered as a rare subgroup of BFL (Chan et al., 2012; Koschel et al., 2010; Morell et al., 2013).

Bird fanciers are exposed to antigenic particles especially from the droppings, feathers, blooms (a waxy powder that coats the feathers), and sera (Selman, 2004) but also from crop fluid, and both egg yolks and egg whites (McSharry et al., 2000). Currently, there is little information available regarding the

Received 25 January 2014; accepted 28 January 2014.

Address correspondence to Dr. Gabriel Reboux, University of Franche-Comté, Research Team, UMR/CNRS 6249, Chrono-Environnement, Haut de Chazal, Besançon, FR 25030, France. E-mail: gabriel.reboux@univ-fcomte.fr

nature of the antigens involved in the disease. Two antigenic substances found in bird droppings and blooms (Nademi et al., 2013; Morell et al., 2008) have already been suspected, including immunoglobulins (in particular pigeon immunoglobulin [Ig] A and IgG), (Morell et al., 2008) and intestinal mucin, a large glycoprotein (Hisauchi-Kojima et al., 1999).

The presence of serum precipitating antibodies or immunoglobulin G against the offending antigen plays a role in the clinical diagnosis of BFL (Lacasse et al., 2003). Standard serological techniques include the following: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Ouchterlony double diffusion, electrosyneresis on cellulose acetate, and immunoelectrophoresis using commercial or in-house antigenic extracts. Therefore, the analytical specificity of serological results is poorly characterized. Cross-reactions were observed between bird species (Koschel et al., 2010) and make interpretation challenging. The aim of this study was to compare the immunogenic proteins from bird droppings for two strains of pigeons and hens and two species of budgerigars. The knowledge gained from this study may aid better understanding of species specificities in the serological diagnosis of BFL.

MATERIAL AND METHODS

Human Sera

Sera samples obtained from the collection of the Parasitology–Mycology Lab of the Besançon University Hospital belonged to two subjects with no history of allergic or pulmonary disease and no significant contact with birds, and four patients (labeled A, B, C, and D) with clinical and pathological diagnosis of BFL. Patient A was exposed to a parrot for about 15 years, patient B to budgerigars, patient C to parrots, and patient D had been in contact with doves for 5 years and budgerigars for 3 years. Criteria used for clinical diagnosis were exposure to birds, positive precipitating antibodies to the offending antigen, inspiratory crackles on physical examination, a lymphocytic

alveolitis on bronchoalveolar lavage (predominance of CD8 T cells), and a consistent high-resolution computed tomography scan (ground glass opacities, mosaic pattern, and/or fine centrilobular nodules) (Lacasse et al., 2003). Healthy subjects and BFL disease patients were all nonsmokers.

Antigen

Fresh droppings of two strains of *Columba livia* (Texan and Polish Lynx pigeons), two species from the Psittacidae family (*Psittacula himalayana* and *Nymphicus hollandicus*), and of two strains of *Gallus gallus* (*domesticus* and Wyandotte chicks) were collected from different breeders of France and Belgium. Each breeder specialized in one species, and droppings were collected in lofts from different individuals of the same strain using clean equipment. Bird droppings were frozen at -20°C until the protein extraction process.

Droppings for each strain were subsequently mixed with Coca's solution (0.07 M NaCl, 0.03 M Na HCO₃, and 0.4% (v/v) of liquid phenol) for 7 d. The solution was passed through filter paper and then freeze-dried. The resulting extract was purified with the GE Healthcare kit (PlusOne SDS-PAGE Clean-Up Kit, GE Healthcare, Piscataway, NJ) and used at a concentration of about 2 mg/ml.

SDS-PAGE

Antigenic extracts were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 0.75-mm gels: a stacking gel of 5% acrylamide and bis-acrylamide and a running gel of 10% in the electrophoresis buffer, pH 8.3 (25 mM Tris; 192 mM glycine; 0.1% [v/w] SDS). The extract was mixed with sample buffer (95% loading buffer [SDS PAGE Sample Buffer, Amsterdam Biosciences, Orsay, France], 5% [v/v] β -mercapto-ethanol) at a ratio of 1:1. Antigens were incubated at 95°C for 3 min before application, and 10 μg of samples was loaded onto a 7-cm-wide gel. Electrophoresis was performed at 100 V for 20 min and at

120 V for 45 min. Then proteins were revealed after staining with Coomassie blue (Bio-Safe Coomassie G-250 Stain, Bio-Rad, USA) or transferred to visualize immunogenic proteins (Western blotting).

Western Blotting

After SDS-PAGE electrophoresis, proteins were transferred for 2 h at a constant voltage of 80 V in a transfer buffer (25 mM Tris; 192 mM Glycine; 20%) onto 0.45- μ m nitrocellulose membrane (7 $\times$ 9 cm, Whatman, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA), using the Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). In this study, nitrocellulose membranes were not cut into strips; each membrane was hybridized with the serum of one patient. Thus, it was possible to jointly analyze the proteins revealed for each species without any deformation. Western blotting analysis was performed as described by Reboux et al. (2007). Sera and goat anti-human IgG alkaline phosphatase conjugates (Sigma, St. Louis, MO) used to reveal the immunogenic protein were respectively diluted 1:5000 and 1:4000 in 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]). After 3 washing steps with TBS-Tween-BSA, the bands were visualized after an 8-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-indolylphosphate (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany). The reaction was stopped by multiple washing steps with distilled water. Image acquisition was carried out with a GS-800 calibrated densitometer (Molecular Imager GS-800 USB calibrated densitometer, Bio-Rad), and protein molecular mass was measured using quantity one one-dimensional (1-D) analysis software (Bio-Rad). To ensure the repeatability of the results, the analyses were performed twice for each serum.

RESULTS

Visualization to SDS-PAGE gel, colored with Coomassie blue, showed multiple protein bands in bird dropping extracts (Figure 1). The protein profiles of the two pigeon strains (lanes 1 and 2, Figure 1) were relatively close, with 80% of their proteins having the same molecular mass and aspect (intensity of coloration and thickness). In the same way, 50% of similar proteins were visualized within the 2 hen strains (lanes 5 and 6, Figure 1), although the intensity of the bands was lower in extract number 5. Comparisons of proteins from the two species of the Psittacidae family (lanes 3 and 4, Figure 1) displayed the largest differences, with less than 30% of common proteins. In addition, the appearance of the protein bands on the gel differed significantly. None of the protein bands seemed to be clearly related to the others. Data demonstrated that protein composition of the two dropping extracts from two strains of the same species is quite similar and that protein composition differs from one species to another. Protein-specific antibodies were then identified by Western blot performed twice with sera from two unexposed controls and four affected patients.

None of the sera from control subjects presented specific antibodies against proteins from pigeon, budgerigar and hen dropping extracts. Specific antibodies against dropping extracts were detected in serum for 4 patients (Table 1). Concerning pigeons, six proteins of nine visualized (67%) were revealed by Western blotting for all sera and both strains. Molecular masses of these proteins were 140, 75, 68, 45, 35, and 32 kD. Although the profile for immunogenic proteins was similar for the two strains, patient exposure was different. In the budgerigar extracts, 2 proteins of 175 and 68 kD were revealed for all sera and both species among the 9 proteins visualized (22% of common proteins). Concerning the hen dropping extract, only 2 patients (C and D) reacted with high-molecular-mass proteins, and 2 proteins of 200 and 100 kD were revealed among 5 proteins visualized (40% of proteins in common). One 68-kD protein was common in

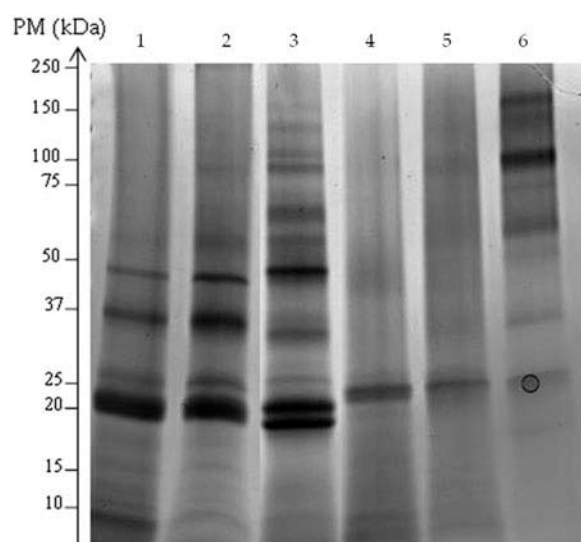


FIGURE 1. SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) patterns of bird dropping extracts stained with Coomassie blue. Lane 1, Texan pigeon; lane 2, Polish Lynx pigeon; lane 3, *Psittacula himalayana*; lane 4, *Nymphicus hollandicus*; lane 5, *Gallus gallus domesticus*; lane 6, Wyandotte hen.

pigeon and budgerigar dropping extracts. Two proteins of 75 and 32 kD were revealed by Western blotting for all sera with both strains of *Columba livia* and *Psittacula Himalayana*.

DISCUSSION

Data demonstrated that protein composition of dropping extracts is more similar between two strains of the same bird species than between different species. Moreover, there are at least 40% common immunogenic proteins in the droppings of the two strains of the same bird species (pigeons and hens), as opposed to only 22% in droppings of the two species of the *Psittacidae* family. Although no proteins were found common to all extracts, cross-reactions to avian antigens from the three species of bird were observed. It is noteworthy that all patients presented specific IgG antibodies against pigeon dropping extracts but none of them was in contact with this bird species. In this study, bird dropping extracts were used as an antigenic source, because inhaled particles are usually derived from dry droppings and contain all causative antigens characterized by Baldwin et al. (1998). In addition, droppings

are present in abundance in aviaries and collecting them is harmless for birds. However, the use of bird droppings requires the development of a protocol to overcome any problem of standardization related to the nature of these samples (McSharry et al., 2000). First, a method was validated to extract proteins from bird droppings that functions for SDS-PAGE and Western blot analysis. This extraction method may be used to perform other serological tests in BFL diagnosis. Protein extracts of each bird species were loaded next to each other on the same SDS-PAGE gel, and the entire membrane was hybridized with the serum of one patient. Therefore, molecular masses of immunogenic proteins identified by Western blotting for the same serum are highly comparable between the different bird species. Previous studies enabled investigators to identify the molecular mass of some immunogenic proteins involved in pigeon breeder disease. Both De Beer et al. (1990) and Mendoza et al. (1996) used pigeon serum as an antigenic source and concluded that 29-, 32-, and 220-kD proteins reacted specifically with patient sera. Calvanico (1986) used pigeon droppings and found a disease-specific polypeptide with a molecular mass of about 50 kD and an isoelectric point between 3.5 and 5.1. Hisauchi-Kojima et al. (1999) identified a 21-kD protein by Western blotting using pigeon droppings as an antigenic source and bronchoalveolar lavage fluid as an antibody source. However, it is difficult to compare the molecular masses of immunogenic proteins between different studies, because identifying the molecular mass of a protein depends on the avian material used, the extraction process, and the chosen detection tools.

There are several recommended diagnostic criteria for HP, and a positive antigen-specific IgG antibody is one significant predictor for clinical diagnosis (Lacasse et al., 2003). Labs regularly receive requests for serological diagnosis of BFL. The analyzed sera originate from patients presenting compatible symptoms with the disease and a known exposure to one or several species of birds. To establish the serological diagnosis, labs use either antigens from a commercial kit or in-house antigens

TABLE 1. Schematic Representation of Proteins of Bird Droppings (Texan Strain, Polish Strain, *Psittacula himalaya*, *Nymphicus hollandicus*, domestic strain, and Wyandotte strain) recognized by antibodies in sera A, B, C, and D

Molecular mass (kD)	<i>Columba livia</i>								Psittacidae								<i>Gallus gallus</i>							
	Texan strain				Polish strain				<i>Psittacula himalayana</i>				<i>Nymphicus hollandicus</i>				Domestic strain				Wyandotte strain			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
250																								
200																								
175																								
140																								
110																								
100																								
80																								
75																								
68																								
50																								
45																								
37																								
35																								
32																								
28																								
25																								
22																								

Note. The presence of an immunogenic protein is represented by a gray box.

made from the patient's birds. In order to correctly interpret the results, further information is needed regarding species specificity to the reaction. Commercial antigens used are derived from the droppings and/or serum and/or feathers from various bird species: pigeon, budgerigar, parakeet, parrot, canary, finch, hen, chicken, duck, turkey, and goose (ImmunoCAP Allergen [Phadia, Uppsala, Sweden]; FSK4 Avian Immunodiffusion System [Microgen Bioproducts, Camberley, England]). However, bird breeders are constantly in search

of a native bird around the world and new cases of BFL appear (Hasegawa and Sugawara, 2013). Labs then prepare in-house antigens to make serodiagnoses, without actually knowing the real usefulness of these antigens. Therefore, patients may be exposed to different bird species and they need to wait for a species-specific test that will allow them to implement appropriate individual protection measures.

Koschel et al. (2010) detected cross-reactions between avian antigens by ELISA. Krasnick et al. (1996) showed that serological

tests using commercial antigens is not always performed with the appropriate antigen, which may yield erroneous results. Our own experience has confirmed the usefulness of in-house-synthesized antigens. Indeed, in 2003, a bird breeder consulted the pneumology department at Besançon University Hospital for a chronic cough that he had been suffering from for 5 years. This patient was exposed to antigens of 17 bird species (lovebirds, parrots, canary, etc.). Serological tests using commercial antigens confirmed the diagnosis of BFL but did not allow us to precisely target the bird species involved. The production of antigens directly from the bird droppings of one of our patients revealed that her illness was not produced by her parrot. The patient was thus able to keep her pet, to which she was particularly attached, and her health improved considerably. This clinical case shows the importance of directly testing antigens to which patients are exposed and the limits of using commercial antigens (Reboux et al., 2008). The results of our study demonstrated cross-reactivity between droppings of bird species. Indeed, patient A was not exposed to pigeons but nonetheless presented an antigen-antibody reaction to droppings of this species. Patient D, who was exposed to a bird of the Columbidae family, did not allow the identification of more bands than other patients who were not exposed, as if there were no relationship between exposure to a given bird species and immunological response. McSharry et al. (2006) also reported that antigens from pigeon serum were able to recognize antibodies in subjects exposed to the most common avian pets. In spite of this cross-reactivity, few proteins were common to different species. In fact, only one common immunogenic protein was identified from pigeon and budgerigar droppings derived from the four patients' sera. It is hoped that these results will contribute to development of avian antigens specific to different bird species.

CONCLUSION

Evidence indicates it is necessary to better understand species specificity of proteins

involved in the diagnosis of BFL in order to improve our interpretation of serological tests. Data suggest that immunogenic proteins are similar in droppings of different strains of the same species, but differ between species. These results show why it is necessary to identify immunogenic proteins and develop recombinant antigens to further enhance serological tests in BFL.

FUNDING

This work was supported by the Besançon University Hospital through a project entitled APICHU (Appel à Projet Interne de recherche clinique ou biologique du Centre Hospitalier Universitaire). The authors thank breeders in the Franche-Comté region for their collaboration in this study. The authors are grateful to Pamela Albert for her editorial assistance.

REFERENCES

- Baldwin, C. I., Stevens, B., Connors, S., Todd, A., Bourke, S. J., Calvert, J. E., and Allen, A. 1998. Pigeon fanciers' lung: The mucin antigen is present in pigeon droppings and pigeon bloom. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117: 187–193.
- Calvanico, N. J. 1986. A component of pigeon dropping extract that reacts specifically with sera of individuals with pigeon breeder's disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77: 80–86.
- Chan, A. L., Juarez, M. M., Leslie, K. O., Ismail, H. A., and Albertson, T. E. 2012. Bird fancier's lung: A state-of-the-art review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 43: 69–83.
- Choy, A. C., Patterson, R., Ray, A. H., and Roberts, M. 1995. Hypersensitivity pneumonitis in a raptor handler and a wild bird fancier. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74: 437–441.
- de Beer, P. M., Bouic, P. J., and Joubert, J. R. 1990. Identification of a 'disease-associated' antigen in pigeon breeder's disease by Western blotting. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91: 343–347.

- Hasegawa, Y., and Sugawara, M. 2013. Bird fancier's lung caused by diamond dove. *Allergol. Int.* 62: 389–390.
- Hisauchi-Kojima, K., Sumi, Y., Miyashita, Y., Miyake, S., Toyoda, H., Kurup, V. P., and Yoshizawa, Y. 1999. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 1158–1165.
- Judson, M. A., and Sahn, S. A. 2004. Bird-years as well as pack-years. *Chest* 125: 353–354.
- Kokkarinen, J., Tukiainen, H., Seppa, A., and Terho, E. O. 1994. Hypersensitivity pneumonitis due to native birds in a bird ringer. *Chest* 106: 1269–1271.
- Koschel, D., Lützkendorf, L., Wiedemann, B., and Höffken, G. 2010. Antigen-specific IgG antibodies in feather duvet lung. *Eur. J. Clin. Invest.* 40: 797–802.
- Krasnick, J., Meuwissen, H. J., Nakao, M. A., Yeldandi, A., and Patterson, R. 1996. Hypersensitivity pneumonitis: Problems in diagnosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 1027–1030.
- 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., and HP Study Group. 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 952–958.
- McCormick, D. J., Fredricks, W. W., Tebo, T. H., and Calvanico, N. J. 1982. The antigens of pigeon breeder's disease. VII. Isoelectric focusing studies on unfractionated pigeon dropping extract. *J. Immunol.* 129: 1493–1498.
- McSharry, C., Anderson, K., and Boyd, G. 2000. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1221–1229.
- McSharry, C., Dye, G. M., Ismail, T., Anderson, K., Spiers, E. M., and Boyd, G. 2006. Quantifying serum antibody in bird fanciers' hypersensitivity pneumonitis. *BMC Pulmon. Med.* 6: 16.
- Mendoza, F., Melendro, E. I., Baltazares, M., Bañales, J. L., Ximénez, C., Chapela, R., and Selman, M. 1996. Cellular immune response to fractionated avian antigens by peripheral blood mononuclear cells from patients with pigeon breeder's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 127: 23–28.
- Morell, F., Roger, A., Reyes, L., Cruz, M. J., Murio, C., and Munoz, X. 2008. Bird fancier's lung: A series of 86 patients. *Medicine (Baltimore)* 87: 110–130.
- Morell, F., Villar, A., Montero, M. A., Muñoz, X., Colby, T. V., Pipvath, S., Cruz, M. J., and Raghu, G. 2013. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: A prospective case-cohort study. *Lancet Respir. Med.* 1: 685–694.
- Nademi, Z., Todryk, S., and Baldwin, C. 2013. Characteristics of antibody responses in pigeon fanciers' lung. *Mol. Immunol.* 54: 227–232.
- Reboux, G., Piarroux, R., Roussel, S., Millon, L., Bardonnnet, K., and Dalphin, J. C. 2007. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J. Med. Microbiol.* 56: 1317–1321.
- Reboux, G., Roussel, S., and Dalphin, J. C. 2008. Personal communication: Intérêt des antigènes à la carte dans le diagnostic de poumon d'éleveur d'oiseaux. Congrès National Asthme et Allergie. Paris, Institut Pasteur, 18–20 June.
- Selman, M. 2004. Hypersensitivity pneumonitis: A multifaceted deceiving disorder. *Clin. Chest Med.* 25: 531–547.
- Selman, M., Lacasse, Y., Pardo, A., and Cormier, Y. 2010. Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7: 229–236.

6. Conclusion

Cette étude a permis d'établir une comparaison entre les profils protéiques des fientes de pigeon, de perruche et de poule. D'une manière générale, les protéines des fientes sont plus proches pour une même espèce d'oiseaux qu'entre espèces différentes. Le concept de spécificité d'espèce des protéines antigéniques a été mis en évidence. En effet, nous avons caractérisé des protéines antigéniques spécifiques de chacune des espèces étudiées, sur la base de leurs poids moléculaires.

Les résultats des analyses sérologiques montrent également que les protéines antigéniques sont proches entre les fientes d'une même espèce d'oiseaux et diffèrent davantage entre espèces. Les profils antigéniques des 2 races de pigeon possèdent 67% de protéines en commun. Par conséquent, lorsqu'un patient est exposé à une race de pigeon donnée, les antigènes des fientes d'une autre race peuvent être utilisés pour les analyses sérologiques. En ce qui concerne les perruches, les résultats montrent seulement 22% de protéines antigéniques communes. Il semblerait que la variabilité antigénique soit plus importante au sein de la famille des Psittacidae. En ce sens, si les analyses sont négatives en utilisant le panel antigénique standard, il faut être vigilant et demander à tester directement les antigènes issus des fientes auxquelles les patients sont exposés. Toutefois, le délai de rendu des résultats sérologiques est plus long (environ 1 mois et demi) lorsque les analyses sont réalisées à partir d'antigènes *à la carte* au lieu du panel standard (3 semaines).

Les fientes de poule semblent contenir moins de protéines et les profils antigéniques se distinguent par la présence de protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 75 kDa) qui ne sont révélées que pour la moitié des sérums de patients.

L'identification puis l'utilisation de ces protéines spécifiques d'espèces permettrait de cibler l'espèce en cause dans la maladie en cas de multi-exposition aviaire. Par ailleurs, les résultats de cette étude mettent en évidence des réactions antigéniques croisées entre ces 3 espèces d'oiseaux mais plus particulièrement entre les fientes de pigeon et de perruche. Nous avons étudié ces réactions antigéniques croisées dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

Les connaissances apportées par cette étude peuvent aider à l'interprétation des analyses sérologiques. Cette première approche descriptive a permis de caractériser des protéines sur la base de leurs poids moléculaires. Toutefois, nous disposons actuellement de nouvelles approches de protéomique permettant une identification des protéines par spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons utilisé une approche immuno-protéomique pour identifier précisément les protéines antigéniques de fientes de pigeon impliquées dans la maladie.

Chapitre 3 : Identification des protéines antigéniques et description des matrices aviaires

1. Contexte

De nombreuses études ont été menées depuis le début des années 1970 pour tenter d'isoler les antigènes en cause dans la maladie et les utiliser à des fins diagnostiques. Toutefois, les antigènes actuellement utilisés pour le diagnostic sont des broyats purifiés de fientes, plumes ou du sérum d'oiseaux dont la production manque de standardisation.

La valeur du diagnostic sérologique est souvent discutée, notamment en raison du nombre de faux-positifs mis en évidence dans la littérature. Ces éléments ont amenés certains auteurs à considérer la positivité des tests sérologiques comme simple témoin de l'exposition antigénique et non de la maladie (Patel et al., 2001).

En l'absence de critères diagnostiques validés par l'ensemble de la communauté scientifique, les critères d'inclusion des patients et des témoins varient selon les études et peuvent être un biais dans les résultats des analyses sérologiques. De plus, la qualité de l'antigène conditionne l'efficacité des tests (Chan et al., 2012). L'utilisation d'antigènes non adaptés est un facteur permettant d'expliquer la faible spécificité attribuée aux tests sérologiques dans certaines études.

Au moment de la conception de cette étude, aucune protéine antigénique aviaire n'avait encore été identifiée par spectrométrie de masse afin d'être produite et utilisée dans les tests sanguins. La disponibilité récente du génome du *Columba livia* en septembre 2013 offre cette possibilité. En effet, les séquences peptidiques délivrées par le spectromètre de masse peuvent ainsi être alignées avec des séquences peptidiques connues du génome de *Columba livia* permettant l'identification de la protéine.

Par ailleurs, la composition protéique des fientes, des plumes, des squames et du sérum de pigeon n'est pas connue. Ces données permettraient, une fois les protéines antigéniques identifiées, de connaître leur localisation et ainsi de pouvoir caractériser le potentiel antigénique de ces différentes matrices.

2. Objectifs

Les objectifs de cette étude consistent à identifier, localiser, produire et évaluer les performances diagnostiques d'antigènes recombinants utiles pour le diagnostic sérologique des patients exposés aux pigeons.

3. Matériel et méthodes

Cette étude a été possible grâce à l'implication des services de pneumologie du CHRU de Besançon, de l'hôpital Erasme en Belgique et à la collaboration des éleveurs de pigeon de la région de Franche-Comté.

3.1 Description de l'étude HYPERSENS

L'étude HYPERSENS vise au recrutement de patients PEO et de témoins asymptomatiques exposés aux oiseaux de l'ordre des Columbiformes, Psittaciformes et Passeriformes.

Une demande a été déposée auprès du Comité de protection des personnes et de l'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé afin d'obtenir l'autorisation de réaliser des examens et d'utiliser les prélèvements sanguins des personnes recrutées. Il s'agit d'une étude monocentrique : tous les patients de l'étude sont inclus au CHRU de Besançon. Le projet est enregistré dans la base de données ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT03056404.

Pour les besoins de ce travail de thèse, le recrutement a porté principalement sur des éleveurs de Columbiformes.

Les patients atteints du PEO ont été inclus sur dossier après vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion avec le pneumologue investigateur. Les témoins exposés asymptomatiques (TEA) sont des éleveurs d'oiseaux ne présentant pas de symptômes compatibles avec la maladie. Ces personnes sont accueillies dans le service de pneumologie pour réaliser des examens cliniques (prise de sang, test de marche, test de spirométrie). Selon les résultats des tests et de l'entretien individuel, le pneumologue inclut (ou non) les témoins au moment de la consultation. Les critères d'inclusion des patients et des témoins sont présentés dans le **tableau 10**. L'inclusion des éleveurs est aussi un moment propice aux échanges concernant leur passion et leur ressenti par rapport à la maladie.

Tableau 10 : Critères d'inclusion des patients et des témoins exposés asymptomatiques dans la cohorte Hypersens.

	Critères d'inclusion patients	Critères d'inclusion TEA
Exposition connue aux Columbiformes	X	X
Hommes/ femmes âgés de 18-80 ans	X	X
Affiliation à un régime de sécurité sociale française ou bénéficiaire d'un tel régime	X	X
Non-fumeurs	X	X
Non-immunodéprimés	X	X
Renseignements cliniques suffisants pour confirmer le diagnostic	X	
Volume de sérum > 500 µL	X	
Non-opposition du patient	X	
Absence de symptômes compatibles avec la maladie		X
Recueil du consentement éclairé signé du témoin		X

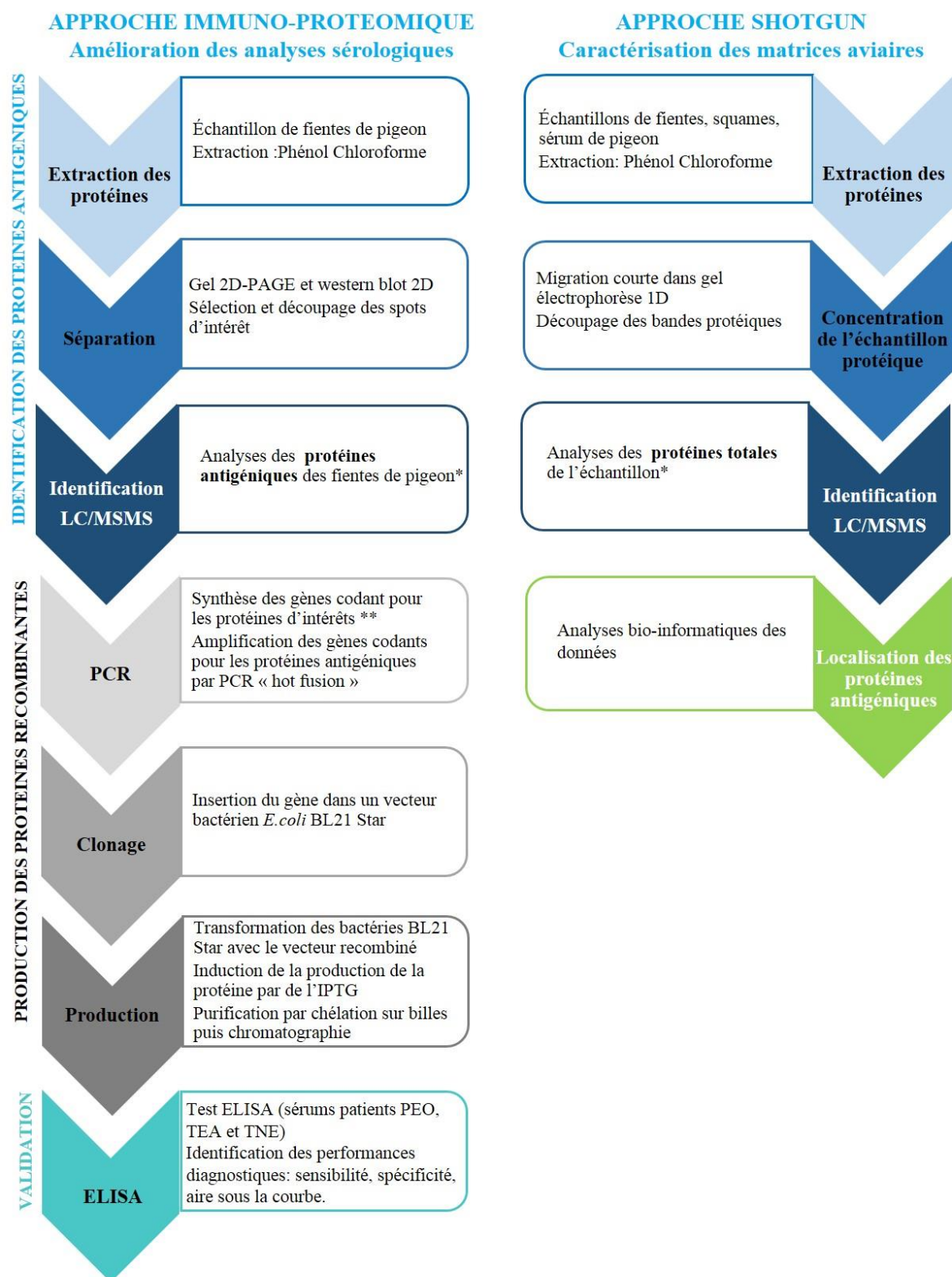
Actuellement, 7 patients et 6 TEA exposés aux Colombiformes sont inclus dans ce protocole. Aucune opposition n'a été formulée de la part des patients et nous disposons des consentements éclairés des témoins.

- **Autres sérums**

Dans le cadre de l'étude Evadia, une collaboration est établie avec le service de Pneumologie du CHRU Erasme de Bruxelles (Belgique). Ainsi, les demandes de sérologie provenant de ce centre sont accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et d'exposition du patient complétée par les cliniciens (Annexe 1). Ces sérums de patients sont principalement utilisés pour évaluer l'efficacité des protéines d'intérêt dans les analyses ELISA. Des sérums de témoins non exposés (TNE) aux oiseaux provenant du Centre de l'Etablissement Français du Sang ont également été utilisés.

3.2 Description de l'approche immuno-protéomique

Les grandes étapes méthodologiques de cette approche sont présentées dans la **figure 11**.



*Les étapes de spectrométrie de masse sont sous-traitées à la Plateforme d'Analyse Protéomique Paris Sud Ouest (PAPPSO)

** La synthèse des gènes codants pour les protéines d'intérêts est sous-traitée à la société Genecust (Luxembourg)

Figure 11 : Approche méthodologique associée à l'étude.

- **Extraction protéique**

La qualité de l'extraction protéique est un point majeur de toute analyse protéomique. L'extraction a pour but de solubiliser le plus grand nombre de protéines en éliminant les liaisons entre elles (liaisons ioniques, hydrogènes, hydrophobes et ponts disulfures) ou avec d'autres molécules biologiques (lipides, acides nucléiques). L'extraction phénolique suivie d'une précipitation des protéines par une solution de méthanol/acétate d'ammonium a été retenue pour cette étude. Cette méthode permet d'éliminer les acides nucléiques qui interagissent avec les protéines et perturbent les analyses bidimensionnelles (Faurobert et al., 2007). Les protéines des fientes et des squames de pigeon ont été extraites selon ce protocole. Des essais ont été réalisés à partir des plumes de pigeon, les résultats du gel SDS-PAGE montrent un profil très pauvre en protéine. Par conséquent, nous avons fait le choix de ne pas travailler avec cette matrice.

- **De l'extrait protéique aux spots protéiques**

Dans un premier temps, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique à travers un gradient de pH lors de l'isoélectrofocalisation (ou IEF), puis selon leur poids moléculaire (SDS-PAGE). Les protéines sont séparées lors de la première dimension dans un gel présenté sous la forme d'une bandelette, à gradient de pH immobilisé (IPG). La commercialisation des IPG strips ainsi que des gels pré-coulés permet de standardiser ce protocole et d'accroître sa reproductibilité. Afin d'obtenir une bonne résolution, des IPG strips (pH : 4-7) et des gels pré-coulés de 11 cm ont été utilisés. La dernière étape de l'électrophorèse 2D consiste à détecter les spots protéiques par coloration des gels au bleu de Coomassie. En parallèle, afin de visualiser les protéines antigéniques, les protéines contenues dans le gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis mises en contact avec les anticorps présents dans le sérum des patients. Le principe du western blot 2D est le même que pour le western blot 1D, décrit dans le chapitre 2 du manuscrit.

- **Sélection des protéines antigéniques à identifier par spectrométrie de masse**

Les spots protéiques visibles à la fois sur le gel coloré au bleu de Coomassie et sur les membranes de western blot des patients ont été découpés et envoyés à la plateforme PAPPSO pour une identification par spectrométrie de masse. Ainsi, les spots protéiques ont été classés dans les 3 groupes suivants selon leur fréquence de détection par western blot chez les patients PEO et chez les TEA.

- **Protéine associées à la maladie** : révélées chez tous les patients et aucun TEA.
- **Protéines d'intérêt** : révélées chez 6/7 patients et au maximum chez 1/ 6 TEA.
- **Protéines associées à l'exposition aux pigeons** : révélées aussi bien chez patients PEO et TEA.

- Identification des protéines totales : Approche « Shotgun »

L'approche dite « shotgun » désigne l'analyse directe (sans séparation préalable sur gel) de mélanges protéiques complexes pour identifier l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique. L'extrait protéique est déposé dans un gel d'électrophorèse 1D (SDS-PAGE), suivi d'une courte migration électrophorétique. Ce passage sur gel permet notamment de purifier et de concentrer l'extrait. Les bandes protéiques (une bande= un extrait) sont découpées sur le gel coloré au bleu de Coomassie, et sont transmises à la plateforme PAPPSON pour une identification par spectrométrie de masse.

- Spectrométrie de masse

La technique utilisée pour l'identification des protéines est la LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry). Les protéines contenues dans le spot sont tout d'abord digérées par l'action de la trypsine afin d'obtenir un mélange de peptides. Ces peptides sont séparés par une chromatographie liquide avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules, en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire (m) en analysant le rapport de leur masse sur leur charge (z), noté m/z . Ce rapport m/z des ions formés à partir de l'échantillon est mesuré par un spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse en tandem combine deux analyseurs (**figure 12**), ce qui permet d'étudier les caractéristiques de fragmentation d'un peptide et ainsi d'accéder à des informations de séquence. Le principe général est simple : les ions formés dans l'ionisateur entrent dans le premier analyseur (MS1) permettant ainsi d'avoir accès aux masses moléculaires de tous les ions. Un ion de rapport m/z donné (ion précurseur) est sélectionné pour sortir de l'analyseur 1 (rôle de filtrage des ions). Il pénètre alors dans une cellule de collision où il est bombardé par des molécules de gaz (classiquement de l'azote ou de l'argon). Les collisions des peptides ionisés avec ces molécules vont conduire à leur fragmentation, principalement au niveau des liaisons peptidiques. Le rapport m/z de ces fragments est alors déterminé à l'aide du second analyseur (MS2). Le spectre de masse obtenu permet de déduire la séquence partielle du peptide sur une dizaine d'acides aminés (**figure 13**). Les spectres de masse fournis par l'appareil seront comparés à des spectres théoriques. Ces derniers sont obtenus en simulant *in silico* le comportement de l'enzyme utilisée expérimentalement sur une banque de protéines. Ainsi, pour chacun des peptides de la banque, un spectre théorique sera calculé. La comparaison de la similarité entre les spectres expérimentaux et théoriques permet d'identifier la protéine.

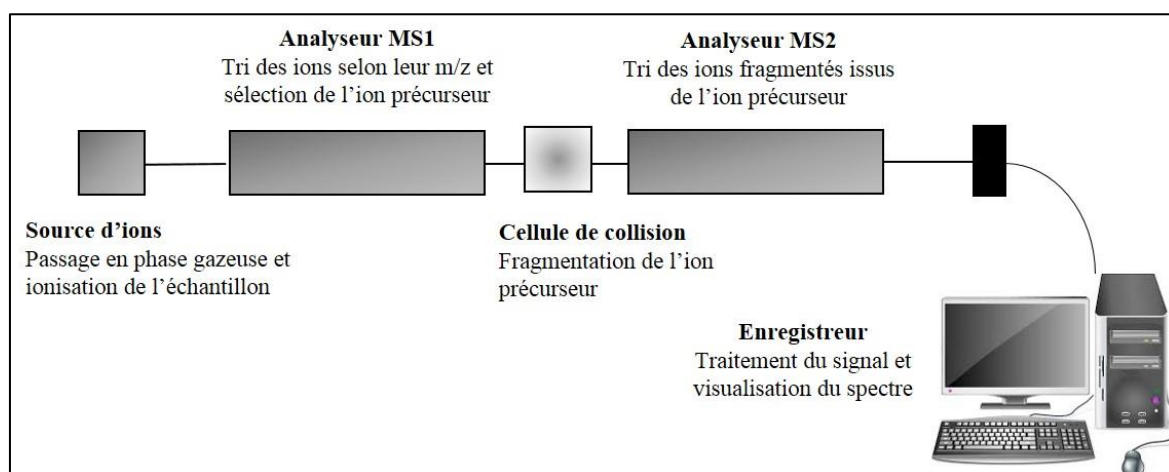


Figure 12 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS).

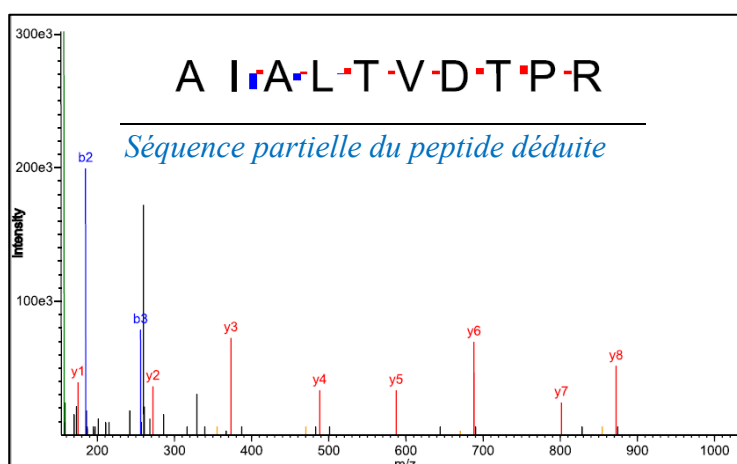


Figure 13 : Exemple de spectre de masse identifié.

• Production de protéines recombinantes

A partir des protéines identifiées par spectrométrie de masse, on peut retrouver les gènes correspondants, et avoir accès à leurs séquences nucléotidiques. Les protéines recombinantes produites correspondent aux protéines décrites comme étant associées à la maladie. Les séquences nucléotidiques codantes pour ces protéines ont été débarrassées de leur peptide signal afin d'optimiser la technique de production. La synthèse de ces gènes dans le plasmide pUC57 a ensuite été sous-traitée à la plateforme Genecust (Ellange, Luxembourg). Dans un premier temps, les séquences nucléotidiques (insert) sont amplifiées par PCR (*Polymérase Chain Reaction*), les amorces utilisées comportent une séquence complémentaire à celle de l'ORF en 3', et complémentaire à celle du plasmide pET151/D-TOPO digéré en 5' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Après découpage sur gel d'agarose (séparation plasmide puc57 et de l'insert), l'insert est purifié, puis intégré dans le plasmide pET151/D-TOPO en utilisant la technique Hot Fusion décrite par Fu et al (Fu et al., 2014) et présentée dans la **figure 14** ci-dessous.

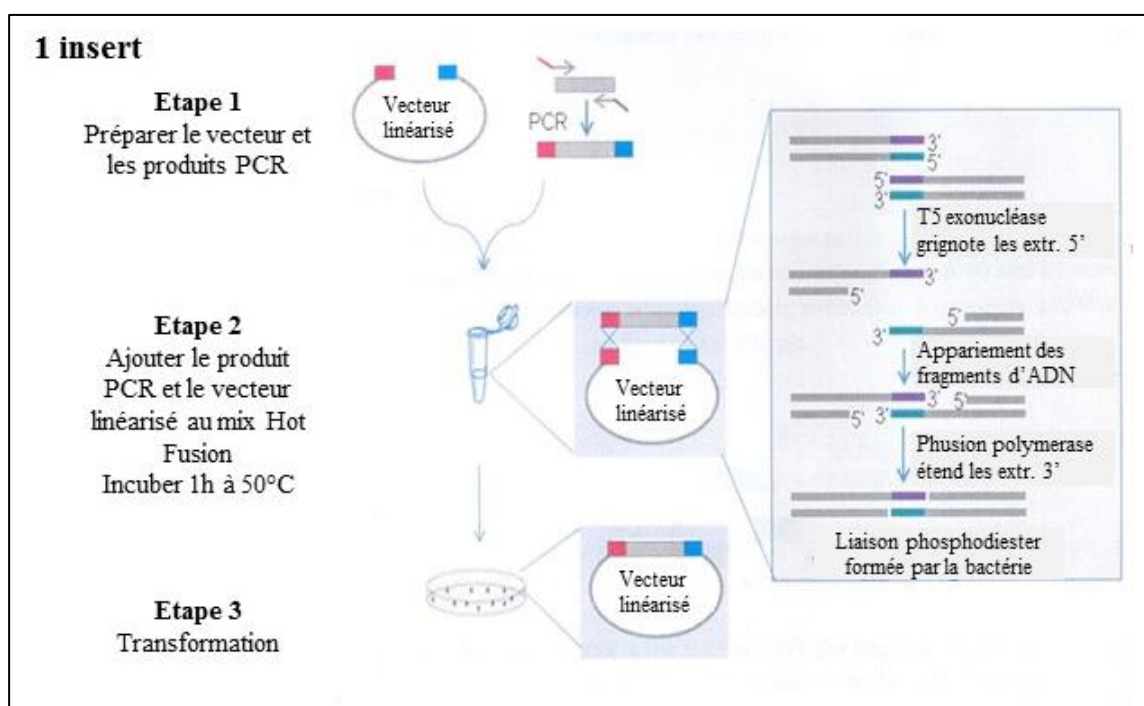


Figure 14 : Procédure Hot Fusion pour le clonage de l'insert dans le plasmide Pet151/D-TOPO.
(source : Fu et al., 2014)

Ce vecteur d'expression comporte un gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur *Lac O* permettant l'induction de la protéine recombinante par l'IPTG, et une répétition de 6 histidines (6-His-Tag) à l'extrémité N-terminale des antigènes recombinants produits permettant leur purification.

Les bactéries compétentes d'E. Coli BL21 sont transformées avec les plasmides, puis sélectionnées sur milieux sélectifs. Après induction de l'expression des protéines antigéniques, les protéines sont extraites, puis purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Un gel SDS-PAGE est ensuite réalisé afin de visualiser la taille et la pureté des protéines recombinantes produites.

4. Principaux résultats

L'approche immuno-protéomique a permis l'identification de 14 protéines antigéniques différentes, classées selon leur fréquence de détection par western blot chez les patients PEO et les TEA (**tableau 11**). Ces protéines sont impliquées dans le système digestif et immunitaire des pigeons et sont principalement localisées au niveau des fientes et des squames. Les protéines Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1) et Proprotéinase E (Pro E) sont les seules protéines associées à la maladie.

Tableau 11 : Classification des protéines antigéniques identifiées selon leur fréquence de détection dans les analyses western blot.

Protéines associées au PEO	Protéines d'intérêt	Protéines associées à l'exposition aux pigeons
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	Ig lambda chain V1	Ig heavy chain V-III
Proproteinase E	Chymotrypsin C	IgG Fc-binding protein-like
	Chymotrypsinogen 2	Serum albumin
	Pancreatic lipase	Meprin A
	Polymeric Ig receptor	pancreatic alpha-amylase
	uncharacterized protein	Carboxypeptidase A1

L'utilisation des protéines recombinantes IGLL1 et ProE dans les analyses ELISA montrent respectivement la meilleure spécificité (100%) et sensibilité (84%). Par ailleurs, les analyses ELISA réalisées à partir de ces 2 protéines recombinantes montrent des performances diagnostiques supérieures aux analyses d'immunoprécipitation réalisées à partir des fientes d'oiseaux (sensibilité : 60%, spécificité : 93%).

5. Article Journal of Immunological Methods 2017

Titre: An immunoproteomic approach revealed antigenic proteins enhancing serodiagnosis performance of Bird fancier's lung.

Auteurs : Adeline Rouzet, Gabriel Reboux, Jean-Charles Dalphin, Anne Gondouin, Paul De-Vuyst, Thierry Balliau, Laurence Millon, Benoit Valot, Sandrine Roussel.

Journal: Journal of Immunological methods.

Accepté le 25 juillet 2017: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.012>



Research paper

An immunoproteomic approach revealed antigenic proteins enhancing serodiagnosis performance of bird fancier's lung



Adeline Rouzet^{a,*}, Gabriel Reboux^{a,b}, Jean-Charles Dalphin^{a,c}, Anne Gondouin^c, Paul De Vuyst^d, Thierry Balliau^e, Laurence Millon^{a,b}, Benoit Valot^a, Sandrine Roussel^{a,f}

^a UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement, University of Bourgogne Franche-Comté, UFR Sciences médicales et pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25030 Besançon, France

^b Department of Parasitology-Myology, University Hospital, 2Bd Fleming, 25030 Besançon, France

^c Department of Pneumology, University Hospital, 2Bd Fleming, 25030 Besançon, France

^d Department of Pneumology, ULB Erasme Hospital, route de Lennik 808, 1070 Bruxelles, Belgique

^e PAPPISO, GQE-Le Moulon, INRA, University Paris-Sud, CNRS, AgroParisTech, University Paris-Saclay, 91190 Gif sur Yvette, France

^f Biomedical Department, University Hospital, 2Bd Fleming, 25030 Besançon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Bird fancier's lung
Hypersensitivity pneumonitis
Serodiagnosis
Recombinant antigens
2D electrophoresis
ELISA

ABSTRACT

Background: Bird fancier's lung (BFL) caused by repeated inhalation of avian proteins is the most common form of hypersensitivity pneumonitis. However, the exact identification of proteins involved is unknown, and serological test use for diagnosis need to be standardized. The objectives of this study were (i) to identify antigenic proteins from pigeon droppings (ii) to provide information about their location in avian matrices and (iii) to produce them in recombinant proteins to evaluate their diagnostic performances.

Method: Antigenic proteins of pigeon dropping extracts were investigated using 2-dimensional immunoblotting with sera from patients with BFL, asymptomatic exposed controls and healthy volunteers. We investigated the origin of these antigenic proteins by analyzing droppings, blooms and sera using a shotgun proteomic analysis. BFL-associated proteins were produced as recombinant antigens in *E. coli* and were assessed in ELISA with sera from patients ($n = 25$) and subject exposed controls ($n = 30$). These diagnostic performances were compared with those obtained by precipitin techniques (agar gel double diffusion, immunoelectrophoresis).

Results: We identified 14 antigenic proteins mainly located in droppings and blooms. These proteins were involved in either the digestive or immune systems of pigeons.

Using the recombinant BFL-associated proteins: Immunoglobulin lambda-like polypeptide-1 (IGLL1: sensitivity: 76%; specificity: 100%; AUC: 0.93) and Proproteinase E (ProE: sensitivity: 84%; specificity: 80%; AUC: 0.85), the ELISA test showed better performance than precipitin assays with pigeon dropping extracts (sensitivity: 60%; specificity: 93.3%; AUC: 0.76).

Conclusion: IGLL1 and ProE were identified as the biomarkers of the disease. The use of these highly standardized antigens discriminates BFL cases from exposed subjects in serological assays. The results of this study offer new possibilities for the serological diagnosis of the disease.

Clinical trial registration: [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov); Identifier NCT03056404.

1. Introduction

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a group of inflammatory interstitial lung diseases caused by an exaggerated immune response to the inhalation of antigenic particles from environmental sources (Costabel et al., 2012). More than 300 agents have been reported to be

involved in HP including bacteria, fungi, animal proteins and chemical compounds (Dalphin and Gondouin, 2015). These antigenic substances can be found in various locations including the home, recreational sites or the workplace. First described by Reed et al. in 1965 (Reed et al., 1965), bird fancier's lung (BFL) is the most common form of HP worldwide with a prevalence ranging from 6% to 20% of exposed

Abbreviations: BFL, bird fancier's lung; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; HP, hypersensitivity pneumonitis; AECs, asymptomatic exposed controls; DD, agar gel double diffusion; IEP, immunoelectrophoresis; HVs, Healthy volunteers; PDE, Pigeon Dropping Extract; 2-DE, 2 Dimensional-Electrophoresis; IGLL1, immunoglobulin lambda-like polypeptide 1; ProE, Proproteinase E

* Corresponding author at: UMR 6249 Chrono-Environnement, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France.

E-mail address: adeline.rouzet@univ-fcomte.fr (A. Rouzet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.012>

Received 13 June 2017; Received in revised form 25 July 2017; Accepted 25 July 2017

Available online 29 July 2017

0022-1759/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

pigeon breeders (Costabel et al., 2012).

Regular exposure to avian proteins from droppings, feathers and blooms (white powder that coats the feathers) may cause the disease in sensitized individuals. Following inhalation of antigens, immune complexes are formed in the alveolar and bronchiolar walls leading to tissue damage, fibrosis or emphysema. Evidence is supported by the presence of high titers of specific IgG antibodies to the offending antigens in both the circulation and bronchoalveolar lavage fluids (BAL) (Yoshizawa et al., 1995). The immunologic mechanisms involved in the disease have been described as a combination of type III (immune-complex-mediated reaction) and IV reaction (granuloma formation) with activation of alveolar macrophages and T lymphocytes (Costabel et al., 2012).

The diagnostic procedure of this pathology is complex and requires a combination of clinical, radiological, functional and biological criteria, including the finding of circulating antibodies against the offending antigen. For serological tests, several methods to determine precipitins (immunodiffusion and immunoelectrophoresis) (Grech et al., 2000; Funke and Fellrath, 2008; McSharry et al., 2006) or total IgG antibodies (enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and ImmunoCAP technique) (Lopata et al., 2004) have been routinely used in analytical laboratories. Some of these techniques were very time-consuming to implement, and the antigens used often lacked standardization.

The efficacy of these tests can be improved by a standardized ELISA using recombinant antigens instead of crude extracts. To move forward in this field, the National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases Workshop in Bethesda (Maryland) recommended the validation of biomarkers (exposure and disease) and the development of a battery of standardized antigens that should be available to clinicians for use in diagnosis (Fink et al., 2005). Indeed, there is a lack of knowledge about the precise identity of the antigenic proteins in BFL as well as their location in avian matrices. However, these data are very important both to better understand the disease and to provide breeders with targeted preventive measures. Novel emerging data in Genomics such as the whole genome sequencing of *Columba livia* (since September 2013) and in Proteomics (LC-MS/MS) now make it possible to characterize new candidate biomarkers for BFL.

Our strategy was to identify by LC-MS/MS all the antigenic proteins revealed by 2D-immunoblotting and also detected on the 2-DE Coomassie blue gel. These proteins were localized by analyzing pigeon droppings, blooms and sera using a shotgun proteomic approach. The antigenic proteins which reacted by immunoblotting with sera from all patients (7/7) and not with sera from control breeders (0/6) were defined as “BFL-associated”. These proteins were produced as recombinant antigens and their diagnostic performances were assessed by ELISA and compared with those of precipitin techniques.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The protocol was approved by the local ethics committee (CPP-Est II 15/496). Patients with BFL (n = 25) were diagnosed in the Pneumology Unit at the University hospital of Besançon (France) and ULB Erasme Hospital of Brussels (Belgium). All patients were given a diagnosis according to the following criteria (Dalphin and Gondouin, 2015): (i) Exposure to offending antigens, (ii) Symptoms and HRCT compatible with HP and basal crepitant rales, (iii) BAL lymphocytosis, and (iv) Decreased DLCO during exercise. The clinical data of patients are shown in Table 1.

The control group consisted of 30 patients exposed to birds and classified as follows: 20 patients were diagnosed with other pulmonary diseases (interstitial lung disease (n = 13), pulmonary infection (n = 3), severe asthma (n = 3) and lung cancer (n = 1)) and 10 asymptomatic exposed controls (AECs) with no pulmonary disease.

Table 1
Clinical data of BFL patients.

	BFL patients (n = 25)
Mean age, yr (range)	65,5 (42–80)
Gender: male/female	10/15
Symptoms n (%): dyspnea; cough; basal crepitant rales	24 (96%); 20 (80%); 25 (100%)
BAL lymphocytosis ($\geq 20\%$): data not obtained for 6 patients	17/19 (90%)
Radiologic data n (%): ground glass opacities; micronodular pattern; fibrosis	23 (92%); 20 (80%); 10 (40%)
Bird exposure	Pigeon (n = 14); budgerigar (n = 7), canaries (n = 2); poultry (n = 2)

Spirometry, a six-minute walk test, serology, a physical exam and standardized medical questionnaires were performed to rule out the diagnosis for AECs.

The serological screening test was carried out using agar gel double diffusion (DD) with a detection threshold of 2 precipitin arcs, and immunoelectrophoresis (IEP) was used to confirm the diagnosis with a positivity threshold of 3 precipitin arcs. The antigens used for these techniques correspond to the bird droppings to which breeders were exposed. Precipitin techniques were performed as previously described (Reboux et al., 2009) with sera from patients (n = 25) and controls exposed to birds but not BFL (n = 30).

Healthy volunteers (HVs; n = 5) were recruited during blood donation. A questionnaire was used to check that they were not exposed to a farming environment or birds.

2.2. Protein extract preparation

Droppings, blooms and sera were collected from pigeons in breeding farms located in the Franche-Comté region. The proteins contained in 1 g of pigeon droppings and blooms were extracted as described by Bestel-Corre et al. (2002). The pellet was suspended in 50 μ L of 2-dimensional lysis buffer (ReadyPrep 2D Starter Kit Rehydration Sample Buffer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and the protein concentrations were measured with the 2D Quant kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the supplier's instructions.

2.3. 2-DE gel, immunoblotting

Proteins of pigeon dropping extracts (PDE) (100 μ g for 2-DE gels; 50 μ g for immunoblot) were suspended in a 2-dimensional lysis buffer (ReadyPrep 2-D Rehydration/Sample Buffer, Bio-Rad). IEF using immobilized pH gradient strips (IPG strip, pH 4–7, 11 cm, Bio-Rad) was carried out on the Protean i12 IEF system (Bio-Rad), with a total focusing of 20,000 Vh. IPG strips were then equilibrated and loaded onto a Criterion TGX Stain-Free gel (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's manual. After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie blue or blotted to a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad) according to the supplier's recommendations. Immunoblotting was performed as previously described with a few changes (Rouzet et al., 2014). Sera and goat anti-human IgG alkaline phosphatase conjugates (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were diluted 1:10,000 and 1:4000 respectively in TBSTween-BSA. The sera used were those of 7 BFL patients and 6 AECs exclusively exposed to pigeons and 5 HVs. All image acquisition was carried out with a GS-800 calibrated densitometer (Molecular Imager GS-800 USB calibrated densitometer, Bio-Rad). The intensity of the antigenic spots on membranes was evaluated using PDQuest 2D software (Bio-Rad). A BFL-associated spot was defined as only detected by antibodies of the 7 BFL patients and not from the sera of the 6 AECs. Spots detected by both groups were associated with exposure to

pigeons. The comparison of spot intensity between the two groups (BFL and AECs) was performed using the Mann-Whitney test. The relative abundance of each protein was estimated using the protein abundance index (PAI) (Rappsilber et al., 2002) which is the number of spectra observed divided by the number of peptides expected. The spots detected in both the 2-DE gel and 2D-immunoblotting were excised from the gel and analyzed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

2.4. Shotgun proteomics analysis of pigeon matrices

To investigate the localization of antigenic proteins, 40 µg of proteins from pigeon droppings, blooms and sera were mixed with a loading buffer (95% of Laemmli sample buffer (Bio-Rad) supplemented with 5% [v/v] β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)) at a ratio of 1/1. The samples were incubated 3 min at 95 °C and loaded on a 10% polyacrylamide gel. After a short migration in the running gel and Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) staining, a single band containing all proteins was excised for mass spectrometry identification by LC-MS/MS.

2.5. LC-MS/MS analysis

All mass spectrometry analyses were carried out using PAPPISO platform facilities (<http://pappiso.inra.fr>). The In-gel digestion of bands and 2D spots was performed with the Progest system (Digilab, Proteomic Solutions) according to a standard trypsin protocol (Nguyen-Kim et al., 2015). Peptides were analyzed on an ultimate 3000 RSLC nano HPLC (Thermo Fisher Scientific) coupled with a LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) for shotgun analysis and on a Nano LC-Ultra system (Eksigent) coupled with a LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific) for the 2-DE spot analysis. Proteins were identified with X!Tandem software (version 2015.04.01.1 (Craig and Beavis, 2004)) using the following protein databases: *Columba livia* proteins (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8932>[Organism:noexp], 33,297 entries, Oct 2015), human proteome (<http://www.uniprot.org>, 70,071 entries, Oct 2015) and standard contaminants (trypsin, keratins...). Results were filtered using the X Tandem Pipeline (Langella et al., 2016) with the following settings: peptide E-Value < 0.03, protein E-Value < 0.0001 and at least two different peptides per protein.

2.6. Development of recombinant antigens

The nucleotide coding sequences removed from the peptide signal for immunoglobulin lambda like polypeptide 1 (IGLL1; XM_005503866.1, nt 66 to 722) and proproteinase E (ProE; XM_005514511.1, nt 41 to 700) cDNA were synthesized and cloned into the puc57 using the GeneCust platform facilities (Genecust, Ellange, Luxembourg). Pairs of forward/reverse primers for amplifying the proteins of interest are shown in Table E1 in supplemental materials. The DNA sequences were amplified by PCR from 60 ng of plasmid with a high-performance polymerase (Q5 High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), with a final primer concentration of 50 µmol/L. PCR was performed as follows: initial denaturation for 3 min at 98 °C, followed by 30 cycles of 20 s at 58 °C, 30 s at 72 °C and a final elongation step at 72 °C for 3 min. The PCR products were purified in gel with the NucleoSpin®gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Purified PCR products were cloned into the His-tag expression vector pET151/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), using the Hot Fusion technique as described by Fu et al. (2014). The resultant plasmids were transferred into *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described by the supplier's recommendations. His-tag recombinant protein production was induced with IPTG, and proteins were then purified using Protino Ni-IDA 150 packed column

(Macherey-Nagel). To control the production of proteins, 1 µg of purified protein extract was deposited on SDS PAGE on a 4–20% Mini protean TGX Stain Free gel and stained by Bio Safe Coomassie (BioRad). The molecular weights of the two recombinant proteins produced are close to 27 kDa.

2.7. ELISA test: pigeon dropping extract (PDE), IGLL1 and ProE

The wells of 96-well plates (PolySorp Immunomodule, Nalge Nunc Rochester) were coated by incubation with 100 µL of 5 µg/mL of PDE and IGLL1 and with 10 µg/mL of ProE in PBS (Sigma-Aldrich) at 4 °C overnight. After three washing steps (TBS, 25% Tween 20 (Sigma-Aldrich)), ELISA plates were blocked with 200 µL of 50 mmol/L NaH₂PO₄, containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 60 g/L sorbitol for 1 h at 37 °C. Serum samples from patients (n = 25) and controls (n = 30) were diluted at 1/100 in a dilution buffer (PBS, pH 7.4, 0.1% BSA, 0.1% Tween 20), deposited in triplicate and incubated 1 h at 37 °C. After washing, plates were incubated for 1 h at 37 °C with 100 µL of protein A peroxidase conjugates (ClniSciences, Nanterre, France) diluted at 1/6000. Plates were then washed (4 times) and incubated with 100 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (TMB One-Step Substrate system; RD Biotech) for 10 min at room temperature. The wells were read spectrophotometrically at 450 nm on a Synergy H1 Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). A sample consisting of a pool of four sera from BFL patients was used as a reference sample to calculate an ELISA index. Each plate included the reference sample deposit in triplicate. The three optical density values (OD) 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. An index was calculated as follows: index = mean OD of the blank-corrected replicates / mean OD of the reference sample.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R 3.3.2 software, and p-value < 0.05 was considered to be significant. The diagnostic performance of ELISA and precipitin assays was assessed by analyzing the Receiver Operating Characteristics (ROC) curve (pROC package). ROC curve analyses were performed by separating sera from patients with BFL (n = 25) and sera from control breeders (n = 30).

Performances were assessed using the Area under the curve (AUC), sensitivity and specificity. The threshold best discriminating patients from controls was determined with the best combination of sensitivity and specificity. For each of the serological analyses (ELISA, precipitin techniques), the Mann-Whitney test was used to compare the values obtained for patients and controls. Diagnostic performances of ELISA and precipitin tests were assessed by comparing AUC values using the roc.test. The sensitivities and specificities of each antigen (pigeon dropping extract, IGLL1, ProE) in ELISA were compared to those obtained with precipitin techniques using the McNemar test.

3. Results

3.1. Detection of antigenic proteins by 2D PAGE and immunoblotting

The proteins of droppings were subjected to 2-DE and immunoblotting. The membranes were probed with sera from 7 BFL patients and 6 AECs exclusively exposed to pigeons and 5 HVs to identify BFL-associated spots. First of all, sera from HVs failed to react with any of the proteins (data not shown). The representative 2D-immunoblotting using AECs (Fig. 1A) and BFL (Fig. 1B) sera is shown in Fig. 1. At first sight, the spots displayed on the membrane of the AECs were fewer and less well defined than those of the patient. The differences in intensity between the patient and control groups were evaluated for each protein using the Mann and Whitney test (Table 2, column 8). The

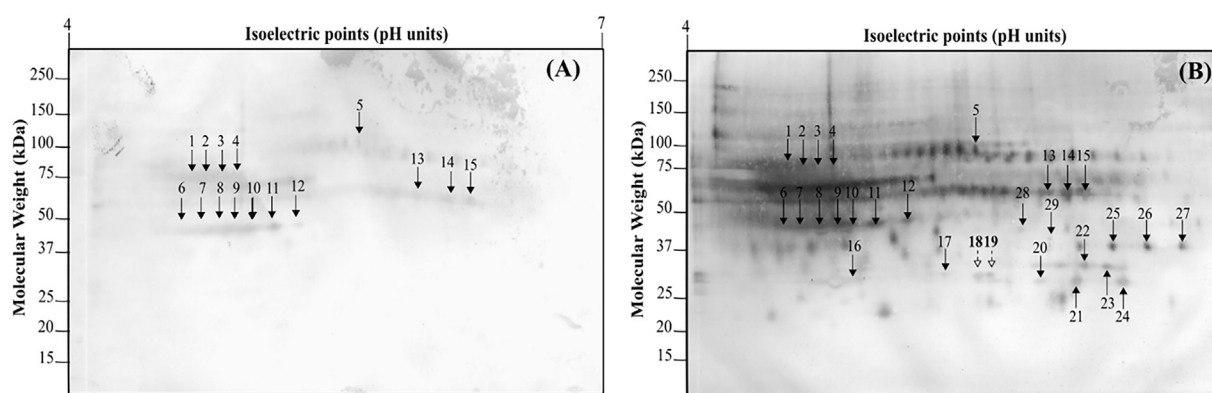


Fig. 1. 2D-immunoblot membranes of pigeon dropping extracts (50 µg) with sera from AECs (A) and from BFL patients (B) exposed to pigeons. The white arrows and the numbers in bold are BFL-associated spots (Spots 18, 19) while the others are associated with exposure to pigeons. The 29 antigenic spots detected with sera from BFL patients were excised from the gel for MS analysis.

intensity of the spot was on average five times higher in patients. Approximately 70 spots could be seen on the gel (Fig. 2), as well as on the immunoblot membrane of BFL patients. Thus, only the 29 spots, detected in both the 2-DE gel and 2D-immunoblotting, were excised from the gel and analyzed by mass spectrometry. In total, 14 different proteins were identified by searching in the *Columba livia* proteome. The characteristics of these antigenic spots are given in Table 2 (the data of the identification by LC-MS/MS in Table E2 in this article's Online Supplement). As shown in Table 2, some protein could be present in several spots (for example: IGLL1 in spot 17, 18, 19, 20 and 24). We classified the proteins identified by mass spectrometry into 3 groups: (i) Proteins which were revealed indifferently in BFL patients and controls: Ig heavy chain V-III, IgG Fc-binding protein-like, Serum albumin, Meprin A and pancreatic alpha-amylase. (ii) Proteins which were revealed in 6/7 patients and a maximum of 1/7 of controls with significantly higher spot intensity in patients (p -value < 0.05: Ig lambda chain V1, Chymotrypsin C, Chymotrypsinogen 2, Pancreatic lipase, Polymeric Ig receptor and one uncharacterized protein. (iii) Proteins identified in all patients but in no controls: Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1; XP_005503923) and Proproteinase E (ProE; XP_005514568) identified in both spots 18 and 19. These two proteins were abundant in pigeon droppings (Fig. 2) and cause a moderate but specific immunological reaction in BFL patients (Fig. 1B).

3.2. Localization of antigenic proteins

To better characterize these antigenic proteins, the shotgun approach was performed to identify their localization in droppings, blooms and sera. A total of 270 proteins were identified by LC-MS/MS. The complete list of these proteins is shown in Table E3 (see article supplement). Protein localization is presented in the last column in Table 2. Most antigenic proteins were identified in both droppings and blooms (6/14), some were specific to droppings (5/14) and others were common to all 3 antigenic sources (3/14).

Among the 10 most abundant proteins of each matrix, 9 were found to be antigenic for droppings (Chymotrypsin C, IGLL1 (2 isoforms), Pancreatic alpha-amylase, Ig heavy chain V-III, Ig lambda chain V1, Carboxypeptidase, ProE and one uncharacterized protein), 5 for blooms (IGLL1 (2 isoforms, Ig heavy chain V-III, Chymotrypsin C, serum albumin) and only one for sera (serum albumin).

3.3. Development of an ELISA test for BFL diagnosis and comparison with precipitin assays

The 2 BFL-associated proteins (IGLL1 and ProE) were produced as recombinant antigens in an *E.coli* expression system. The quality and purity of the antigenic extracts is shown in Fig. E1 (supplemental data).

Recombinant proteins as well as pigeon dropping extracts (PDE) were assessed to determine their ability to discriminate between patients and controls by ELISA. ELISA was performed using sera from 25 BFL and 30 controls. The characteristics (sensitivity, sensibility and area under the curve) of the tests were assessed by ROC curve analysis (Table 3). First of all, patients had significantly higher IgG levels than controls for the three antigens (p -value < 0.05). The ability to differentiate between patients with BFL and controls by using ELISAs with PDE was evaluated by ROC analysis and revealed the following: sensitivity, 72%, specificity, 93% and area under the curve (AUC) 0.88. As indicated by areas under the curve of 0.93, the most efficient antigen for serodiagnosis was IGLL1 with a sensitivity of 76% and a specificity of 100%. ELISA detection of anti-IGLL1 was associated with the disease and was not only related to exposure to birds because all controls exposed to birds were correctly classified. Using ProE as a recombinant antigen, the ELISA test showed a sensitivity of 84%, specificity of 80% and an AUC of 0.85. The performance of serological analyses provided at the time of diagnosis showed that precipitin techniques were highly specific (96.3%) but provided low sensitivity (60%) and an AUC of 0.76 (Table 3). The use of pigeon droppings as an antigen yielded better results using ELISA (AUC: 0.88) than precipitation techniques (roc.test p -value < 0.05). The McNemar test showed that the use of ProE by ELISA significantly improved the sensitivity of serological analyses (p -value < 0.05). Moreover, using IGLL1 with the ELISA test provided higher specificity (100%) than the use of droppings with precipitin techniques (93.3%).

4. Discussion

Using an optimal immunoproteomic approach, we have identified by mass spectrometry antigenic proteins which are both related to pigeon exposure and disease-associated. These proteins were involved in either the digestive or immune systems of birds and have been characterized as abundant proteins in droppings and blooms. The IGLL1 and ProE proteins that only reacted with antibodies in all BFL patients and no controls were defined as “BFL-associated” proteins. ProE was the most effective recombinant antigen for discriminating BFL patients from controls exposed to birds by ELISA with very good sensitivity (84%) and specificity (80%). The use of IGLL1 showed optimal specificity (100%), which proved that it was a BFL-associated protein and not simply a protein due to bird exposure. These 2 recombinant antigens were more complementary and efficient for serodiagnosis than precipitin techniques using crude bird droppings (sensitivity: 60%; specificity: 93.3%).

In this study, droppings were used as an antigenic source because: (i) breeders were directly exposed to them in the aviary, (ii) they were defined as a complete antigenic source (Edwards et al., 1970) (iii) they were available in large quantities and their sampling was painless for

Table 2Characteristics of the 29 antigenic spots from *Columba livia* droppings identified by mass spectrometry and location of associated proteins (shotgun analysis data).

Spot no ^a	Accession number ^b	Protein identification	Theoretical molecular weight (kDa)	Number of spectra	Frequency of protein detection patients (n = 7)	Frequency of protein detection AECs (n = 6)	Mann-Whitney Test p-value	Location in avian matrices
1	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81138)	11.1	4	6/7	3/6	0.022*	PDE, PB, PS
	XP_013226161	IgGFC-binding protein-like, partial	263.6	7				PDE
2	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81138)	11.1	9	7/7	4/6	0.073	PDE, PB, PS
	XP_013226161	IgGFC-binding protein-like, partial	263.6	7				PDE
3	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81138)	11.1	10	7/7	2/6	0.004*	PDE, PB, PS
	XP_013226161	IgGFC-binding protein-like, partial	263.6	6				PDE
4	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	7	7/7	2/6	0.004*	PDE, PB, PS
5	EMC80533	Meprin A subunit alpha	80.4	18	7/7	5/6	0.137	PDE
6	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	12	6/7	5/6	0.101	PDE, PB, PS
7	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	14	6/7	5/6	0.034*	PDE, PB, PS
8	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	18	7/7	5/6	0.101	PDE, PB, PS
9	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	11	7/7	5/6	0.137	PDE, PB, PS
10	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81136; EMC81138)	11.6	12	7/7	5/6	0.051	PDE, PB, PS
11	EMC81137	Ig heavy chain V-III region VH26, partial (EMC81138)	11.6	9	7/7	2/6	0.180	PDE, PB, PS
12		Unidentified			5/7	2/6	0.022*	–
13	EMC78994	Pancreatic alpha-amylase (XP_005498835)	57.2	20	7/7	2/6	0.101	PDE, PB
	EMC85061	Serum albumin	68.8	4				PDE, PB, PS
14	EMC78994	Pancreatic alpha-amylase (XP_005498835)	57.2	29	7/7	4/6	0.034*	PDE, PB
	EMC85061	Serum albumin	68.8	10				PDE, PB, PS
15	EMC78994	Pancreatic alpha-amylase (XP_005498835)	57.2	44	7/7	4/6	0.002*	PDE, PB
16	XP_005508006	Chymotrypsin-C	28.79	21	6/7	0/6	0.008*	PDE, PB
17	EMC77563	Proteinase E, partial (XP_005514568)	20.5	16	6/7	1/6	0.101	PDE, PB
	XP_005503923	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503924)	24.5	3				PDE, PB, PS
	EMC89394.1	Chymotrypsinogen 2	27.5	2				PDE
18	XP_005514568	Proteinase E, partial	20.5	37	7/7	0/6	0.001*	PDE, PB
	XP_005503921	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503922; XP_005503923; XP_005503924; XP_005503925)	24.5	8				PDE, PB, PS
19	XP_005514568	Proteinase E, partial	20.5	5	7/7	0/6	0.008*	PDE, PB
	XP_005503921	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503922; XP_005503923; XP_005503924; XP_005503925)	24.5	2				PDE, PB, PS
20	EMC88596	Ig lambda chain V-1 region, partial (EMC88595; EMC88597)	7.4	8	6/7	0/6	0.004*	PDE, PB
	XP_005503923	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503922; XP_005503924)	24.5	19				PDE, PB, PS
	EMC84847	Pancreatic lipase-related protein 1 (XP_005508223)	52.29	2				PDE
21	EMC89394	Chymotrypsinogen 2 (XP_005504834)	27.5	58	6/7	1/6	0.008*	PDE
	EMC84847	Pancreatic lipase-related protein 1 (XP_005508223)	52.29	4				PDE
22		Unidentified			6/7	1/6	0.013*	–
23	EMC89479	Carboxypeptidase A1 (XP_005504386)	47.2	14	5/7	1/6	0.051	PDE, PB
24	XP_005503923	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503921; XP_005503922; XP_005503925)	24.5	29	7/7	1/6	0.002*	PDE, PB, PS
	EMC88596	Ig lambda chain V-1 region, partial (EMC88593; EMC88595)	7.4	8				PDE, PB
	XP_013222889	Uncharacterized protein LOC102085269	22.7	8				PDE
	EMC84847	Pancreatic lipase-related protein 1 (XP_005508223)	52.29	3				PDE
25	XP_005510447	Polymeric immunoglobulin receptor	77.8	19	6/7	1/6	0.022*	PDE
26	XP_005510447	Polymeric immunoglobulin receptor	77.8	13	6/7	1/6	0.0180*	PDE
27	XP_005510447	Polymeric immunoglobulin receptor	77.8	13	6/7	1/6	0.008*	PDE
28		Unidentified			6/7	1/6	0.004*	–
29		Unidentified			7/7	1/6	0.022*	–

^aSpot numbers (a) correspond to those shown on blot and 2-DE gel in Fig. 1 and Fig. 2. The Genbank accession numbers^b indicated correspond to those of the most reliable protein. The accession numbers noted in parentheses were related to isoforms of the protein identified.

The gray boxes correspond to the BFL-associated spot. The data of the shotgun analyses allowed us to locate the antigenic proteins in pigeon dropping extracts (PDE), pigeon blooms (PB) and pigeon serum (PS).

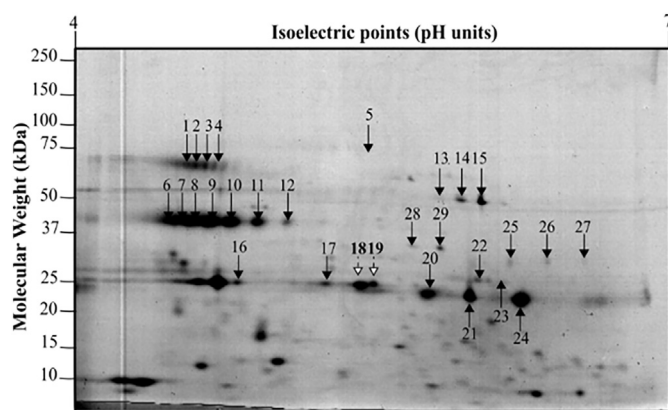


Fig. 2. 2-DE gel of pigeon dropping extracts (100 µg) stained with Coomassie blue. Spot numbers (1 to 29) correspond to those shown on nitrocellulose membranes in Fig. 1. The spots with numbers written in boldface with a white arrow are defined as associated with BFL.

birds. Most of the antigenic proteins identified were abundant proteins from droppings and blooms. The antigenicity of blooms has been previously demonstrated (Longbottom, 1989; Rodrigo et al., 2000). Produced by special feathers called pulviplumes, blooms were defined as granular particles of inert keratin of 1 µm in diameter (McSharry et al., 2000), highly volatile and small enough to reach the alveoli to initiate immune responses. We have identified pancreatic enzymes and immunoglobulins from the blooms that probably originate from droppings.

Over the last forty years, the antigenic components associated with the development of BFL have been described using biochemical analyses and immunoassays (Edwards et al., 1970; Longbottom, 1989; Boyd et al., 1982; Todd et al., 1991; Calvanico, 1986; Hisauchi-Kojima et al., 1999). The main antigenic substances suspected were immunoglobulins, serum albumin, and intestinal mucin, from droppings, blooms and pigeon sera (Edwards et al., 1970; Longbottom, 1989; Boyd et al., 1982; Todd et al., 1991; Fredricks, 1978; Goudswaard et al., 1978; de Beer et al., 1990). The immunoglobulins (Igs) produced by birds are of three types: IgA, IgM and IgY consisted of two identical light chains and two identical heavy chains (Benčina et al., 2014). From these elements, McSharry et al. suggested that the pigeon immunoglobulin light chain may be a common antigen of droppings, blooms and sera (McSharry et al., 2000). Following this suggestion, we identified IGLL1 as a BFL-associated protein found in these three matrices.

Using a “focusing approach” on the 26 kDa protein detected by 1-DE immunoblot, Shirai et al. identified IGLL1 as a disease-specific protein in sera and pigeon droppings using sera from patients with BFL, with other HP disease and HVs (Shirai et al., 2017). The results confirmed

that IGLL1 provoked both disease-specific humoral (ELISA) and cell-mediated responses (peripheral blood mononuclear cells proliferation test). At the same time, we used a “global approach” by identifying all proteins detected in both the 2-DE gel and 2D-immunoblot of pigeon droppings using sera from patients with BFL, AECs and HVs. Unlike Shirai et al. we used AECs sera in addition to Hvs sera to discriminate antigenic proteins related to exposure and those related to the disease (2-DE immunoblot). The ELISA tests showed that recombinant protein of both IGLL1 and ProE was able to discriminate between patients and exposure controls. Using different cohorts of patients, independent teams succeeded in identifying the same antigenic protein (same accession number), which reinforces the validity of these results.

In addition, our results showed that not all the identified immunoglobulins would be good candidates for serodiagnosis since they are revealed by the antibodies of the patients but also by those of the controls. For example, this is the case for Ig heavy chain V-III and were IgGfC-binding protein-like. Serum albumin previously described as a major antigen (Edwards et al., 1970) was found in droppings, sera and blooms but defined as associated with exposure to pigeons. Pigeon intestinal mucin described as the causative antigen has been identified in droppings but surprisingly was not isolated as antigenic (Todd et al., 1991).

Antibody activity against other proteins such as proteolytic enzymes has also been suggested as potent antigens that could cause respiratory disease (Berrens and Maesen, 1972). The possible involvement of certain extracellular “Chymotrypsin-like” enzymes has also been discussed in farmer’s lung disease (Nicole et al., 1977). In agreement with these studies, Chymotrypsin C has been identified as a protein of potential interest for BFL serodiagnosis, with a high abundance in droppings and blooms. Another avian protein called “pancreatic lipase” which plays a role in fat digestion showed a higher antibody level in BFL patients compared to controls and could be a useful protein for diagnosis. ProE, defined as a BFL-associated protein, has not yet been very well studied in birds. In humans, this protein is involved in intestinal transport and metabolism of cholesterol (Rinderknecht, 1993). Identified in the pancreatic juice of ruminants, ProE was found in ternary complex with chymotrypsinogen C and procarboxypeptidase A (Zhou and Sahin-Tóth, 2011). One hypothesis about the biological function of this complex was that it protects procarboxypeptidase A from being inactivated by acidic gastric juice (Gomis-Rüth et al., 1995).

Many studies have challenged the usefulness of serological tests for diagnosis (Lopata et al., 2004; Rodrigo et al., 2000; Simpson et al., 1992; Suhara et al., 2015; Morell et al., 2008). The results have varied depending on the serological techniques and the antigenic sources (droppings, blooms, sera). Serological tests are still performed routinely using crude extract antigens from bird droppings, feathers and sera.

Simpson et al., used immunodiffusion and ELISA tests to compare precipitins and IgG antibodies directed against pigeon droppings. These antibodies were found respectively by immunodiffusion and ELISA in

Table 3

Sensitivity, specificity and ROC values for ELISA results with the following antigens: PDE (pigeon dropping extract), IGLL1 (immunoglobulin lambda-like polypeptide-1) and ProE (Proproteinase E) and for immunodiffusion assays (agar double diffusion (DD) and immunoelectrophoresis (IEP)) result with crude antigen droppings.

	Antigens	AUC [95% CI]	Sensitivity (% [95% CI])	Specificity (% [95% CI])	Threshold Index value $\pm$ 1 SD	Mann-Whitney Test p-value
ELISA	PDE	0.88* [0.79–0.96]	72% [56–88]	93% [83–100]	0.489 [0.439–0.538]	10^{-7} *
	IGLL1	0.93* [0.85–0.98]	76% [60–92]	100% [100–100]	0.196 [0.156–0.236]	10^{-8} *
	ProE	0.85 [0.73–0.94]	84%* [68–96]	80% [63–93]	0.435 [0.395–0.475]	10^{-5} *
	Precipitin techniques (DD + IEP)	0.76 [0.65–0.86]	60% [40–80]	93.3% [83.3–100]	DD ($\geq$ 2 arcs) IEP ($\geq$ 3 arcs)	10^{-5} *

* AUC: area under the curve. Statistical analyses were performed with R 3.3.2 software and a p-value of < 0.05 was considered significant. The roc.test was used to compare the AUC values between ELISA and precipitin techniques. The McNemar test was used to compare the sensitivities and specificities of these analyses. Comparisons of serum IgG OD values and precipitin arcs between the two groups were performed using the Mann-Whitney test.

80% and 100% of patients with BFL. Antibodies were not detected by either method in patients with other respiratory diseases or in healthy donors (Simpson et al., 1992). ELISA was usually described as the preferred method. According to this study, we have shown using the same cohort of patients that ELISA (sensitivity: 72%, specificity: 93%, AUC: 0.88) was more efficient than precipitin assays (sensitivity: 60%, specificity: 93.3%, AUC: 0.76) in detecting antibodies to pigeon droppings.

Our experimental approach led to the production of IGLL1 and ProE as recombinant antigens in the *E. coli* expression system. Using these two recombinant proteins with the ELISA tests yielded the following results: IGLL1 and ProE respectively gave the best specificity (100%) and sensitivity (84%).

The IGLL1 pigeon was helpful for the BFL diagnosis of patients exposed to pigeons (12/14), budgerigars (5/7) and poultry (2/2) with high sensitivity for these three species of birds. However, we are aware that IGLL1 should be tested with more patients exposed to these species of birds and also to other species in order to better delineate the range of efficacy of this antigen.

In this study, regardless of avian exposure, an amount of antibody below the IGLL1 threshold allowed us to rule out BFL disease.

A high level of anti-IGLL1 antibody was not related to exposure to birds because none of the subjects exposed to birds with or without another lung disease ($n = 30$) were sensitized to this antigen.

These results suggest that a high antibody level may reflect specific inflammation of the lungs.

The sensitivity of ProE was significantly higher (p -value < 0.05) than that obtained with precipitin tests. Moreover, we attest to the high performance of these antigens for discriminating between patients and controls in serological analyses (Minimum AUC value: 0.85).

Lacasse et al. identified serum precipitins as a predictor of HP, but there is currently no standard for serological testing (Lacasse et al., 2003). We propose an automated and standardized method based on the use of recombinant antigens that clearly improve serological diagnosis of BFL.

Using IGLL1 and ProE as antigens makes it possible to overcome the inter-lot variability related to the production of antigens from matrices such as bird droppings, blooms and feathers.

The fact that in a short time two studies identified the IGLL1 protein as associated with the disease reinforces the level of evidence of its involvement (Shirai et al., 2017). This research addressed some of the NHLBI/ORD workshop recommendations (Fink et al., 2005). An expert consensus statement is needed to define the most effective biomarkers for serological diagnosis of the disease.

Quantifying antibodies by ELISA was a rapid and standardized technique (automated) which provided better diagnostic performance than precipitin tests. Moreover, this methodology makes it possible to monitor the antibody level of patients over time to assess the progression and prognosis of the disease.

5. Conclusion

In pigeon droppings, we found a mixture of antigenic proteins associated with both exposure and the disease. IGLL1 and ProE were BFL-associated proteins located in pigeon droppings and blooms. Using these recombinant antigens in ELISA for routine analysis would provide a more efficient, standardized, reliable and rapid diagnosis than precipitin techniques. This study was part of a continuous effort to improve BFL diagnosis in order to reduce the suffering and stress experienced by patients following invasive tests such as BAL, inhalation provocation tests and surgical lung biopsy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.012>.

Acknowledgments

The authors thank the bird breeders in the Franche-Comté region for their participation, Audrey Laboissière from the Mycology Department of Besancon University Hospital for her excellent technical support, and Dr Ghali Boubaker from the Parasitology institute of Bern University for her scientific and technical support. The authors are grateful to Pamela Albert for her editorial assistance.

Funding sources

This work was supported by the Besancon University Hospital (N°2015-A01803-46) [API3A (Appel à Projet Interne « 3 axes »), HYPERSENS].

Conflicts of interest

None.

References

- de Beer, P.M., Bouic, P.J., Joubert, J.R., 1990. Identification of a 'disease-associated' antigen in pigeon breeder's disease by western blotting. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91 (4), 343–347.
- Benčina, M., Cizelj, I., Berčič, R.L., Narat, M., Benčina, D., Dovč, P., 2014. Shared epitopes of avian immunoglobulin light chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 158 (3), 175–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.003>.
- Berrens, L., Maesen, F., 1972. An enzyme in pigeon droppings, of possible relevance to pigeon breeder's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 10 (2), 383.
- Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinot, V., Dieu, M., Dierick, J.F., Tuinen, D.V., et al., 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 23 (1), 122–137. [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683\(200201\)23:1<122::AID-ELPS122>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200201)23:1<122::AID-ELPS122>3.0.CO;2-4).
- Boyd, G., McSharry, C., Banham, S., Lynch, P., 1982. A current view of pigeon fancier's lung. A model for pulmonary extrinsic allergic alveolitis. *Clin. Allergy* 12, 53.
- Calvanico, N.J., 1986. A component of pigeon dropping extract that reacts specifically with sera of individuals with pigeon breeder's disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77 (1), 80–86. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749\(86\)90327-1](http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749(86)90327-1).
- Costabel, U., Bonella, F., Guzman, J., 2012. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Chest Med.* 33 (1), 151–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2011.12.004>.
- Craig, R., Beavis, R.C., 2004. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20 (9), 1466–1467. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth092>.
- Dalphin, J.-C., Gondouin, A., 2015. Rare Causes and the Spectrum of Hypersensitivity Pneumonitis. *Orphan J. R. Dis.* Springerpp. 457–472.
- Edwards, J.H., Barboriak, J.J., Fink, J.N., 1970. Antigens in pigeon breeders' disease. *Immunology* 19 (5), 729.
- Fink, J.N., Ortega, H.G., Reynolds, H.Y., Cormier, Y.F., Fan, L.L., Franks, T.J., et al., 2005. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (7), 792–798. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200409-1205WS>.
- Fredricks, W., 1978. Antigens in pigeon dropping extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61 (4), 221–223. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749\(78\)90186-0](http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749(78)90186-0).
- Fu, C., Donovan, W.P., Shikapwashya-Hasser, O., Ye, X., Cole, R.H., 2014. Hot fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PLoS One* 9 (12), e115318. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115318>.
- Funk, M., Fellrath, J.M., 2008. Hypersensitivity pneumonitis secondary to lovebirds: a new cause of bird fancier's disease. *Eur. Respir. J.* 32 (2), 517–521. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00108507>.
- Gomis-Rüth, F.X., Gómez, M., Bode, W., Huber, R., Avilés, F., 1995. The three-dimensional structure of the native ternary complex of bovine pancreatic procarboxypeptidase A with proproteinase E and chymotrypsinogen C. *EMBO J.* 14 (18), 4387.
- Goudswaard, J., Noordzij, A., Stam, J., 1978. Pigeon IgA: a major antigen in pigeon breeder's disease. *Immunol. Commun.* 7 (6), 661–668. <http://dx.doi.org/10.3109/08820137809068726>.
- Grech, V., Vella, C., Lenicker, H., 2000. Pigeon breeder's lung in childhood. *Pediatr. Pulmonol.* 30, 145–148.
- Hisauchi-Kojima, K., Sumi, Y., Miyashita, Y., Miyake, S., Toyoda, H., Kurup, V.P., et al., 1999. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (6), 1158–1165. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70193-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70193-4).
- Lacasse, Y., Selman, M., Costabel, U., Dalphin, J.-C., Ando, M., Morell, F., et al., 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168 (8), 952–958. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200301-1370C>.
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., Zivy, M., 2016. X! TandemPipeline: a tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *J. Proteome Res.* <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>.
- Longbottom, J.L., 1989. Pigeon breeders' disease: quantitative immunoelectrophoretic

- studies of pigeon bloom antigen. *Clin. Exp. Allergy* 19 (6), 619–624. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.1989.tb02756.x>.
- Lopata, A.L., Schinkel, M., Potter, P.C., Jeebhay, M.F., Hashemi, C., Johansson, S., et al., 2004. Qualitative and quantitative evaluation of bird-specific IgG antibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134 (2), 173–178. <http://dx.doi.org/10.1159/000078651>.
- McSharry, C., Anderson, K., Boyd, G., 2000. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin. Exp. Allergy* 30 (9), 1221–1229. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00810.x>.
- McSharry, C., Dye, G.M., Ismail, T., Anderson, K., Spiers, E.M., Boyd, G., 2006. Quantifying serum antibody in bird fanciers' hypersensitivity pneumonitis. *BMC Pulm. Med.* 6 (1), 16. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-6-16>.
- Morell, F., Roger, A., Reyes, L., Cruz, M.J., Murio, C., Munoz, X., 2008. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. *Medicine* 87 (2), 110–130. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e31816d1dda>.
- Nguyen-Kim, H., Clemente, H.S., Balliau, T., Zivy, M., Dunand, C., Albenne, C., et al., 2015. *Arabidopsis thaliana* root cell wall proteomics: increasing the proteome coverage using a combinatorial peptide ligand library and description of unexpected Hyp in peroxidase amino acid sequences. *Proteomics*. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.2015001>.
- Nicolet, J., Bannerman, E., De Haller, R., Wanner, M., 1977. Farmer's lung: immunological response to a group of extracellular enzymes of *Micropolyspora faeni*. An experimental and field study. *Clin. Exp. Immunol.* 27 (3), 401.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., Mann, M., 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12 (8), 1231–1245. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.473902>.
- Reboux, G., Roussel, S., Rognon, B., Bellanger, A.P., Grenouillet, F., Dalphin, J.C., et al., 2009. Quoi de neuf dans le diagnostic immunologique des pneumopathies d'hypersensibilité? *Rev. Fr. Allergol.* 49 (6), 477–480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2009.02.014>.
- Reed, C.E., Sosman, A., Barbee, R.A., 1965. Pigeon-breeders' lung: a newly observed interstitial pulmonary disease. *JAMA* 193 (4), 261–265.
- Rinderknecht, H., 1993. Pancreatic Secretory Enzymes. *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*. pp. 219–251.
- Rodrigo, M.J., Benavent, M.I., Cruz, M.J., Rosell, M., Murio, C., Pascual, C., et al., 2000. Detection of specific antibodies to pigeon serum and bloom antigens by enzyme linked immunosorbent assay in pigeon breeder's disease. *Occup. Environ. Med.* 57 (3), 159–164.
- Rouzet, A., Reboux, G., Rognon, B., Barrera, C., De Vuyst, P., Dalphin, J.-C., et al., 2014. Immunogenic proteins specific to different bird species in bird Fancier's lung. *J. Toxic. Environ. Health A* 77 (12), 724–730. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2014.889616>.
- Shirai, T., Furusawa, H., Furukawa, A., Ishige, Y., Uchida, K., Miyazaki, Y., et al., 2017. Protein antigen of bird-related hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping. *Respir. Res.* 18 (1), 65. <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-017-0555-4>.
- Simpson, C., Shirodaria, P.V., Evans, J.P., Simpson, D.I., Stanford, C.F., 1992. Comparison of immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay in the detection of abnormal antibodies in pigeon breeder's disease. *J. Clin. Pathol.* 45 (6), 490–493. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.45.6.490>.
- Suhara, K., Miyazaki, Y., Okamoto, T., Yasui, M., Tsuchiya, K., Inase, N., 2015. Utility of immunological tests for bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Investigation* 53 (1), 13–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resinv.2014.08.001>.
- Todd, A., Coan, R.M., Allen, A., 1991. Pigeon breeders' lung: pigeon intestinal mucin, an antigen distinct from pigeon IgA. *Clin. Exp. Immunol.* 85 (3), 453–458.
- Yoshizawa, Y., Miyake, S., Sumi, Y., Hisauchi, K., Sato, T., Kurup, V.P., et al., 1995. A follow-up study of pulmonary function tests, bronchoalveolar lavage cells, and humoral and cellular immunity in bird fancier's lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96 (1), 122–129. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(95\)70041-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(95)70041-2).
- Zhou, J., Sahin-Tóth, M., 2011. Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 (8), 1238–1246. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06791.x>.

Supplemental table and figure

TABLE E1: Primers pairs used for amplification of IGLL1 and ProE gene sequences^a.

IGLL1 Forward	5' <i>GAAAACCTGTATTTTCAGGGAGTCCAGGCAGCGC</i> 3'
IGLL1 Reverse	5' <i>GAAATCAGTTTCTGTTCTAGTTAGGAGGAGCACTCG</i> 3'
ProE Forward	5' <i>GAAAACCTGTATTTTCAGGGAAGGGGCTGCAGGG</i> 3'
ProE Reverse	5' <i>GAAATCAGTTTCTGTTCTAGTCAGTTCTGGCTTATGATCTCG</i> 3'

^a These primers were designed based on nucleotide sequence information available in GenBank immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1; XM_005503866.1, nt 66 to 722) and Proproteinase E (ProE; XM_005514511.1, nt 41 to 700) The sequences of nucleotides in italics are complementary to plasmid pet151D and have been added to perform cloning by the Hot Fusion technique.

Supplemental figure

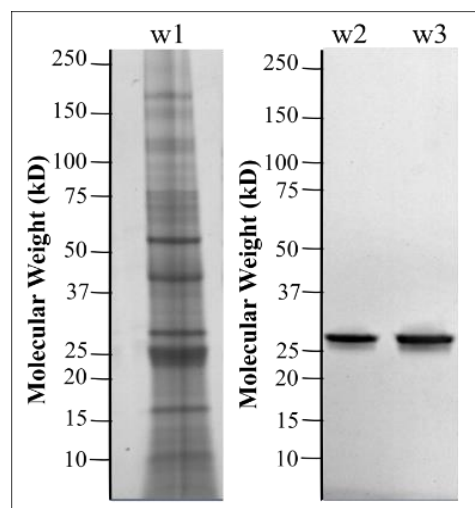


Figure E1: SDS-PAGE (4-20% Mini protean TGX Stain Free gel, BioRad) Coomassie stain illustrating: w1: crude extract of pigeon droppings; and recombinant proteins: w2: IGLL1: 27 kDa; w3: ProE: 27 kDa. (Single fitting image).

6. Expérience complémentaire : Spécificité géographique des protéines antigéniques

En parallèle de l'identification des protéines antigéniques de pigeon, nous nous sommes intéressés à leurs éventuelles spécificités géographiques. Pour une même espèce d'oiseau, il s'agit de savoir si les protéines antigéniques sont identiques ou non selon sa provenance géographique. En effet, on peut émettre l'hypothèse que les protéines antigéniques aient évoluées selon différents facteurs, tels que le climat et/ou l'alimentation des oiseaux. Pour cela, nous avons établi une collaboration avec le Pr Selman (expert dans le domaine des PHS) au Mexique. Les protéines des fientes ont été extraites en utilisant la technique d'extraction phénolique. Puis les échantillons ont été déposés sur gel afin de visualiser les profils protéiques (**figure 15**). Les fientes de pigeon français et mexicain présentent des profils protéiques très proches avec 14/16 protéines de poids moléculaire identiques. Toutefois, on peut relever quelques différences entre ces 2 extraits : les protéines de 9 kDa et 149 kDa sont respectivement spécifiques des fientes de pigeons mexicains et français.

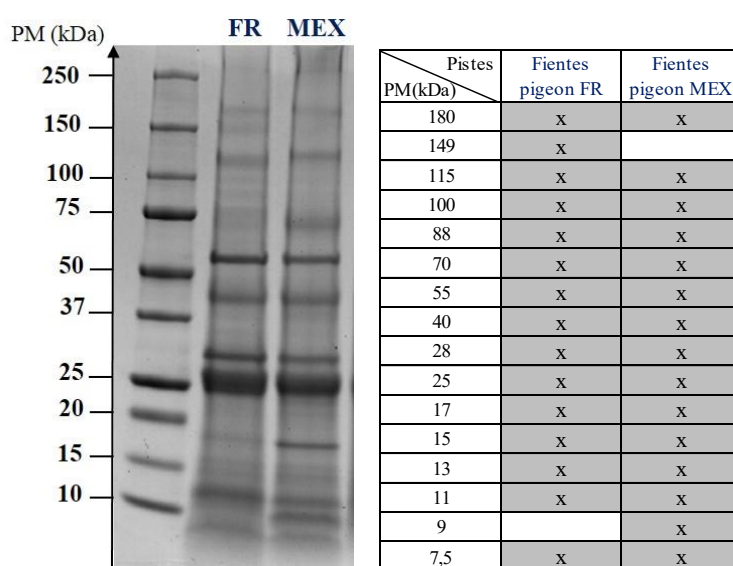


Figure 15 : Gel SDS-PAGE .

Visualisation des profils protéiques des fientes de pigeons français (FR), mexicains (MEX) par dépôt de 15µg d'extrait dans chaque puits d'un gel SDS-PAGE à gradient 4-20% (Biorad), coloré au bleu de Coomassie. Les cases grisées du tableau matérialisent la présence d'une protéine sur le gel.

La méthode shotgun a été employée pour identifier les protéines totales de ces 2 échantillons, et pouvoir ensuite établir une comparaison. Les résultats de cette étude sont présentés dans le diagramme de Venn ci-dessous (**figure 16**).

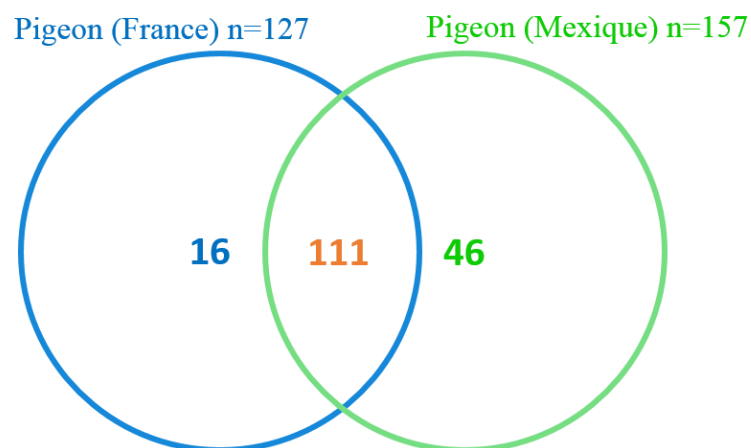


Figure 16 : Diagramme de Venn illustrant les protéines spécifiques et communes aux fientes de pigeons français et mexicains.

La comparaison des protéines identifiées entre ces 2 extraits est en cohérence avec la visualisation de leurs profils protéiques sur gel SDS-PAGE. En effet, les profils protéiques des fientes de pigeon possèdent au moins 70% de protéines communes (111 protéines). Par ailleurs, les fientes de pigeons français et mexicains présentent respectivement 13% et 30% de protéines spécifiques. Les protéines identifiées jouent un rôle dans la composition du cytosquelette, dans le système immunitaire et dans le métabolisme (lipide, glucide, protéine) des pigeons.

Toutefois, les 14 protéines antigéniques identifiées à partir des fientes de pigeons français sont retrouvées dans les fientes de pigeons mexicains. Par conséquent les contraintes environnementales (climat, alimentation) ne modifient pas les protéines antigéniques des fientes de pigeon. Les résultats de cette étude ne mettent pas en évidence de spécificité géographique des protéines antigéniques majeures entre les pigeons français et mexicains.

De plus, les résultats de cette étude montrent que les éleveurs de pigeons mexicains sont également exposés aux protéines IGLL1 et ProE. Il a été démontré récemment que la protéine IGLL1 était efficace pour le diagnostic sérologique des patients japonais (Shirai et al., 2017). Ainsi, le test sérologique basé sur l'utilisation de ces 2 protéines recombinantes pourrait permettre le diagnostic des éleveurs de pigeons de manière indépendante de leur localisation géographique. Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire d'établir une collaboration avec des scientifiques de différents pays afin de tester ces protéines avec les sérums de leurs patients. Cette étude préliminaire propose une comparaison restreinte à 2 pays seulement. Toutefois, les démarches administratives auprès de la douane liées à l'importation et à l'exportation d'échantillons biologiques de catégorie B (matériel biologique à risques infectieux) représentent une contrainte pour la mise en place de cette collaboration.

7. Conclusion

Les études développées dans ce chapitre ont permis l'identification de 14 protéines antigéniques impliquées dans le système digestif et immunitaire des pigeons. Ces protéines sont également identifiées à partir des fientes de pigeon mexicain. Par conséquent, ces résultats suggèrent l'absence de spécificité géographique des protéines antigéniques. Ces protéines sont principalement localisées au niveau des fientes et des squames. Toutefois, étant donné la nature et la fonctionnalité des squames, les enzymes pancréatiques identifiées proviennent probablement d'une contamination par les fientes. Du fait de leurs caractéristiques morphologiques, les squames peuvent facilement être inhalées et transportées, contribuant ainsi à renforcer la continuité de l'exposition antigénique.

En l'absence de « gold standard » pour les analyses sérologiques, nous proposons une méthode performante, automatisée et standardisée basée sur l'utilisation des protéines recombinantes IGLL1 et ProE pour le diagnostic sérologique du PEO. En effet, l'utilisation des protéines recombinantes IGLL1 et ProE dans les analyses ELISA montre respectivement une spécificité de 100% et une sensibilité de 84%. Ces performances sont supérieures à celles des techniques utilisées actuellement.

En parallèle à cette étude, Shirai et al., ont également identifiés IGLL1 comme protéine biomarqueur de la maladie (Shirai et al., 2017). Le fait que, dans un court laps de temps, deux équipes indépendantes aient identifiée la même protéine candidate pour le diagnostic conforte son implication dans la maladie. La protéine IGLL1 est utile pour le diagnostic des patients français et japonais. De plus, la présence d'IGLL1 et de ProE dans les fientes de pigeon mexicain suggèrent que les éleveurs mexicains y sont aussi exposés et que l'efficacité de ces protéines pourrait avoir une portée internationale.

Les résultats de cette étude montrent qu'IGLL1 est utile pour le diagnostic de patients exposés aux pigeons, aux perruches et aux volailles. Cependant, ces résultats doivent être validés sur une cohorte plus large de patients exposés à différentes espèces d'oiseaux, pour délimiter la gamme d'efficacité de ces antigènes. Toutefois, ces résultats démontrent une nouvelle fois, l'existence d'une communauté antigénique commune entre les fientes d'oiseaux pouvant participer aux réactions croisées. Cette communauté antigénique sera analysée dans le prochain chapitre.

Chapitre 4 : Protéines communes aux fientes de pigeon, perruche et poule

1. Contexte

L'exposition à de nombreuses espèces d'oiseaux peut être à l'origine de la maladie. Les cas les plus fréquents font suite à une exposition aux pigeons et aux perruches mais des cas isolés liés à des espèces plus atypiques telles que le hibou (Kokkarinen et al., 1994) ou le faisan (Partridge et al., 2004) ont été rapportés. A l'inverse, les cas liés à un contact aux poules sont très rares (Andersen and Schönheyder, 1984; Elman et al., 1968). Depuis quelques années, les particuliers, les établissements publics ou encore les collectivités, sont de plus en plus nombreux à souhaiter acquérir des poules et pourtant, les cas de PEO liés à cette espèce sont quasi-inexistants. En effet, les poules semblent être moins antigéniques que les autres espèces d'oiseaux mais la raison reste inconnue.

Les résultats des analyses sérologiques montrent fréquemment que les patients exposés aux pigeons réagissent positivement à la fois aux antigènes de pigeon et de perruche (Mashio et al., 2013). Ainsi, les anticorps des patients reconnaissent des antigènes d'oiseaux auxquels ils ne sont pas exposés, cela atteste de l'existence de réactions antigéniques croisées. Ces réactions suggèrent la présence de protéines ou d'épitopes communs entre les oiseaux à l'origine de la maladie. Elles sont souvent citées dans la littérature mais sont encore très mal caractérisées (Funke and Fellrath, 2008; Koschel et al., 2010; McCluskey et al., 2002; Partridge et al., 2004; Shirai et al., 2017; Tauer-Reich et al., 1994). Par ailleurs, il est suggéré qu'elles pourraient être le reflet du degré de proximité phylogénétique entre les oiseaux (Tauer-Reich et al., 1994). Dans les années 1970-1980, des études ont montré que l'albumine sérique, les globulines (α et β) et les antigènes intestinaux étaient responsables de ces réactions (Faux et al., 1978; Sennekamp et al., 1981). Cependant, aucune étude récente n'a été menée pour identifier les protéines impliquées dans ces réactions.

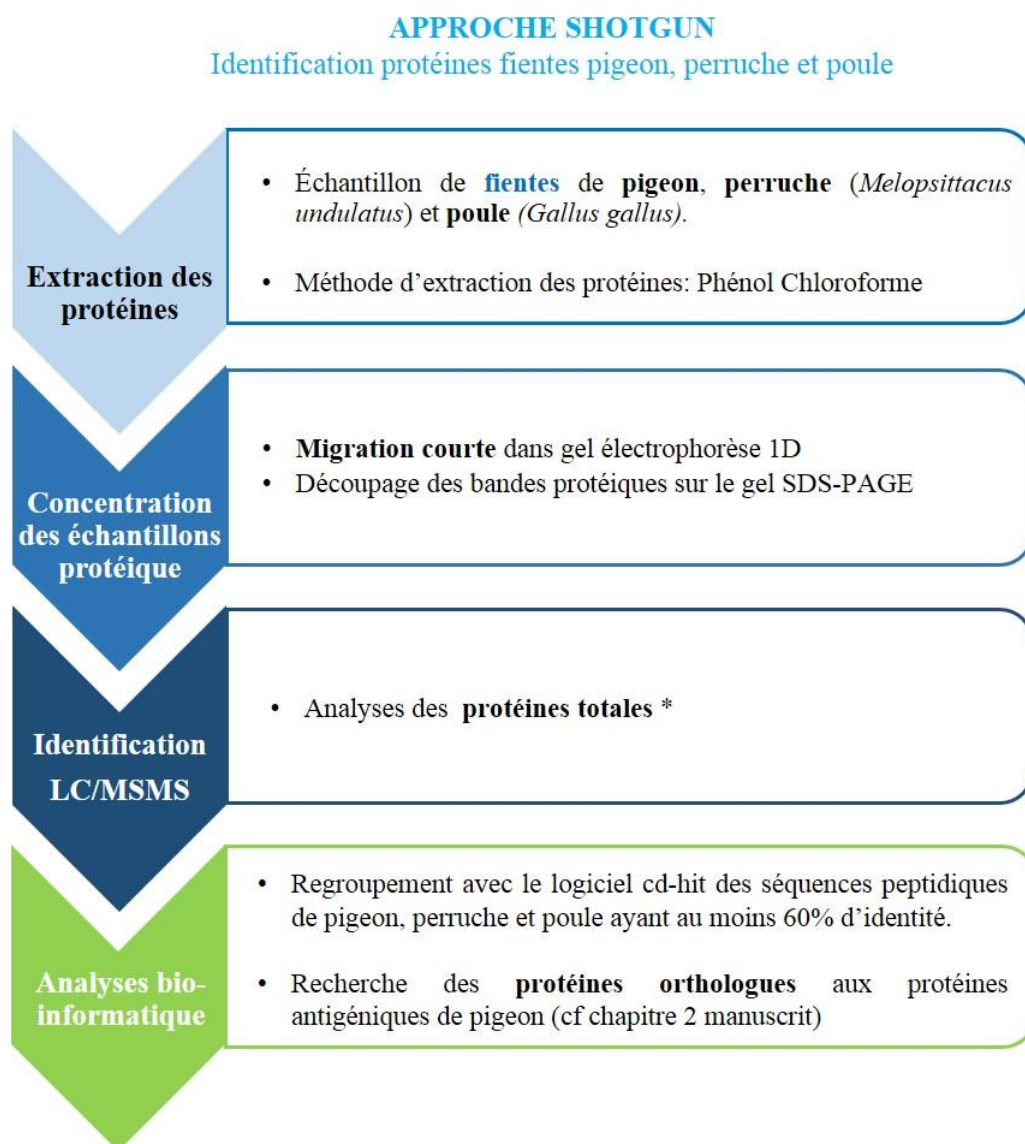
Les expériences sont réalisées en utilisant les fientes de pigeon et de perruche pour mieux comprendre les réactions antigéniques croisées et avec les fientes de poule pour tenter d'apporter des explications sur la faible implication de cette espèce dans le PEO.

2. Objectifs

Les objectifs de cette étude consistent à comparer la composition protéique des fientes de pigeon, perruche et de poule et d'identifier les protéines qui peuvent être impliquées dans les réactions croisées par analogie avec les protéines antigéniques de pigeon.

3. Matériel et méthodes

Les principales étapes méthodologiques sont résumées dans la **figure 17**.



*Les étapes de spectrométrie de masse sont sous-traitées à la Plateforme d'Analyse Protéomique Paris Sud Ouest (PAPPSO)

Figure 17 : Méthodologie pour l'identification des protéines communes aux fientes de pigeon, perruche et poule et pour la recherche de protéines impliquées dans les réactions antigéniques croisées.

L'extraction des protéines des fientes de pigeon, perruche et poule ainsi que leur identification par la méthode shotgun ont été réalisées telle que décrit dans le chapitre précédent (chapitre 3, §3.2). Chaque extrait protéique a été déposé sur gel en triplicat, découpé, puis envoyé à la plateforme pour une identification par spectrométrie de masse.

Les résultats fournis par la plateforme comportent la liste des protéines identifiées pour chaque échantillon analysé. L'annotation des génomes étant variable d'une espèce à l'autre, nous avons utilisé le logiciel *cd-hit* pour regrouper les protéines des fientes de pigeon, perruche et poule ayant au moins 60% d'identité. Nous avons ensuite recherché parmi ces protéines, les protéines orthologues aux protéines antigéniques de pigeon. Les séquences peptidiques de ces protéines ont été comparées en utilisant l'outil *BLASTp* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. Principaux résultats

Les résultats de spectrométrie de masse montrent que 38% des protéines identifiées sont spécifiques à une espèce d'oiseau contre 24% communes aux fientes des 3 espèces. Les fientes de pigeon et de perruche possèdent 52,5% de protéines communes. Par ailleurs, les fientes de poule possèdent respectivement 38% et 34% de protéines communes avec les fientes de pigeon et de perruche.

Parmi les 31 protéines communes aux fientes des 3 espèces d'oiseaux, nous avons détecté 10 protéines orthologues aux protéines antigéniques de pigeon. Les alignements des séquences peptidiques de ces protéines montrent qu'elles sont relativement conservées d'une espèce à l'autre. Les fientes de poule possèdent 13/14 protéines orthologues aux protéines antigéniques identifiées à partir des fientes de pigeon. Les protéines antigéniques Meprin A, Albumine sérique et l'Alpha-amylase pancréatique sont les plus conservées entre les 3 espèces d'oiseaux (% identité > 80% ; % recouvrement >97%).

5. Article Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology

Titre: An immunoproteomic approach to identify common proteins of bird droppings in Bird Fancier's Lung

Auteurs: Adeline Rouzet, Benoit Valot, Gabriel Reboux, Laurence Millon, Sandrine Roussel

Journal: Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.

En révision depuis le 29 septembre 2017

PRACTITIONER'S CORNER

Common proteins located in pigeon, budgerigar and hen droppings related to Bird Fancier's Lung.

Adeline Rouzet*,¹ Benoit Valot,¹ Gabriel Reboux,^{1,2} Laurence Millon,^{1,2} Sandrine Roussel,^{1,3}

Author affiliations:

¹ UMR 6249 Chrono-Environnement, University of Bourgogne-Franche-Comté, Besancon, France

² Parasitology-Myecology Department, University Hospital of Besancon, Besancon, France

³ Biomedical Department, University Hospital of Besancon, Besancon, France

Keywords: Bird fancier's lung, cross reactions, shotgun, mass spectrometry, bird droppings

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is an immunologically induced lung disease that develops after inhalation of various environmental antigens in sensitized subjects. Bird fancier's lung (BFL) is one of the most common forms of HP caused by exposure to avian antigens located in droppings, feathers and blooms (white powder that coats the feathers) (1). The diagnostic procedure requires a combination of clinical, radiological, functional and biological criteria, including the presence of serum antibodies against the causative antigens (2). Standard serological techniques were performed using crude or purified antigens (commercial or in-house) from bird droppings, feathers and sera.

Cross-reactions were frequently observed between different kinds of birds in serological analyses (3, 4). Most of the time, patients exposed to pigeons also react positively to budgerigar antigens (5). However, the proteins involved in these reactions have rarely been investigated and are therefore poorly characterized. The aim of this study was (i) to compare proteins from pigeon, budgerigar and hen droppings and (ii) to investigate the antigenic community of proteins involved in cross-reactions.

Droppings were collected in breeding farms located in the Franche-Comté region. A shotgun proteomic approach was used to identify by mass spectrometry (LC-MS/MS) the major proteins from pigeon, budgerigar and hen droppings as previously described (6). Proteins were identified with X!Tandem Pipeline (version 2015.04.01.1 (7)) using the following protein databases: *Columba livia* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8932\[Organism:noexp\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8932[Organism:noexp])), *Melopsittacus undulatus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Melopsittacus%20undulatus>) and *Gallus Gallus* proteome (<http://www.uniprot.org>).

The shotgun approach allowed the identification of 156 proteins from pigeon droppings, 119 from budgerigar droppings and 86 from hen droppings. The clustering of orthologous proteins with at least 60% identity (cd-hit, (8)) allowed the constitution of 128 protein groups with different functions.

Specific proteins from the droppings of each species represented 38.3% of the total proteins compared to 61.7% of proteins common to at least 2 birds. The results showed that more proteins were common to the droppings of different species of birds, than specific to the droppings of one bird species. More specifically, 24% (23/97) of the proteins of pigeon droppings were specific, 21% (18/86) for the budgerigar and 15% (8/55) for the hen. Overall, these proteins were involved in either the immune system, the cytoskeleton or in the metabolism of birds (lipid, carbohydrate and protein).

The pigeon and budgerigar droppings had a more similar protein composition with 52.5% of common protein functions. Hen droppings had respectively 38% and 34% of common proteins with pigeon and budgerigar droppings.

The results of these analyses showed the presence of a group of 31 proteins common to the droppings of the three bird species (24% of the total proteins). These proteins had functions of immunoglobulin, carboxypeptidase, annexin, chymotrypsin, serum albumin, mucin, meprin A, pancreatic lipase, pancreatic alpha amylase, peptidase, endonuclease and actin.

In a previous study we identified 14 antigenic proteins from pigeon droppings involved in BFL disease (6). Among the 31 proteins common to the droppings of the three species of birds, we detected 10 proteins orthologous to these antigenic proteins of pigeons involved in BFL. Most of these antigenic proteins were abundant proteins from pigeon droppings (6). Three others were only detected in pigeon and hen droppings. These last three proteins were the Ig heavy chain VIII region VH26, chymotrypsinogen 2 and proproteinase E. Local alignments between the amino acid sequences of these proteins were achieved using BLASTp tools. The results of these analyses are shown in Table 1.

The 33 alignments indicated a minimum coverage of 73%, a percentage of identity that varies from 62 to 89% and a similarity percentage varying from 76 to 95%. Meprin A, pancreatic alpha-amylase and serum albumin were the most conserved proteins among the droppings of these three species with both identity and coverage percentages respectively above 80% and 95%. The alignment of the amino acid sequences of these proteins showed that they were relatively conserved from one species to another. Consistent with these results, chicken, duck and turkey serum albumins have been shown to have high sequence identities (79.6-84.2%) and similarities (85-90.2%) relative to pigeon serum albumin (9).

These conserved amino acid regions may correspond to sequential antibody binding sites. Furthermore, we have previously shown that the pigeon immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1) protein was involved in cross-antigenic reactions. In fact, this protein common to pigeon, budgerigar and hen droppings, makes it possible to diagnose patients exposed to pigeon, budgerigar and poultry. The recombinant IGLL1 protein was produced under denaturing conditions, therefore the IgG-antibodies of the BFL patients recognize sequential epitopes of this protein.

Thus, these results may be useful to increase our understanding of the cross-antigenic reactions detected from the serological analyses for BFL diagnosis. In accordance with our study, Sennekamp et al. showed that serum albumin, globulins and avian intestinal antigens were responsible for cross-antigen reactions in 60% of the breeders (4). Previously, we used antigens from pigeon, budgerigar and hen droppings to detect the specific immunogenic proteins of each species (10). Only one 68 kDa immunogenic protein was visualized in both pigeon and budgerigar droppings, while proteins of 200,175,140,100 and 35kDa were detected as specific in one bird species. Although only one common immunoreactive protein was detected with western blotting assays, our molecular approach has shown the existence of several antigenic pigeon proteins found in budgerigar and hen droppings.

In conclusion, this study has allowed us to provide a list of several proteins common to the three bird species. In order to further investigate this approach, these proteins should be produced by genetic engineering (recombinant antigens) for each bird species to validate their cross-antigenicity by ELISA IgG test using a cohort of BFL patients, asymptomatic exposed breeders and non-exposed subjects. These proteins were valuable to improve and simplify BFL serodiagnosis because they are effective for avian exposure to pigeons, budgerigars and hens. This step will contribute to increasing our knowledge and understanding of the mechanisms of the disease that are still not fully known. Additional studies on the inflammatory and immune mechanisms carried out in vivo in animal models will be necessary to identify which of these common proteins are capable of generating a pulmonary granuloma and which ones are useful exclusively as biomarkers to detect the disease.

Table 1: Alignment of amino acid sequences of budgerigar, hen and pigeon proteins of droppings.

Local alignment of amino acid sequences of budgerigar and hen orthologous proteins to those previously identified as antigenic in the pigeon droppings. Alignments were conducted using BLASTp tools freely available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. The identity of the protein and its accession number are mentioned in the table. Alignment results delivered with percent identity (ID) marked in bold, similarity (SIM) and the percentage of coverage noted in brackets are also shown in the table.

Antigenic proteins of pigeon droppings (accession number)	Identity of orthologous proteins in the budgerigar droppings Alignment budgerigar/pigeon	Identity of orthologous proteins in the hen droppings Alignment hen / pigeon	Alignment budgerigar / hen
IgGfC-binding protein-like, partial (XP_013226161)	IgGfC-binding protein-like (XP_005141227) ID: 84% , SIM: 88% (99%)	Uncharacterized protein FCGBP (XP_015146991) ID: 79% , SIM: 85% (97%)	ID: 70% , SIM: 79% (94%)
Ig heavy chain V-III region VH26,partial (EMC81137)	No orthologous proteins	Immunoglobulin Y heavy chain variable region, partial (ADF29959) ID: 75% , SIM: 82% (93%)	No orthologous proteins in budgerigar
Meprin A subunit alpha (EMC80533)	Meprin A subunit alpha (XP_012983842) ID : 85% , SIM : 92% (99%)	Meprin A subunit alpha precursor (NP_001264650) ID : 83% , SIM : 90 % (97%)	ID: 81% , SIM: 89% (97%)
Pancreatic alpha-amylase (EMC78994)	Pancreatic alpha-amylase (XP_005141024) ID: 89% , SIM: 95% (100%)	Pancreatic alpha-amylase precursor (NP_001001473) ID: 88% , SIM: 94% (100%)	ID: 89% , SIM: 94% (100%)
Carboxypeptidase A1 (EMC89479)	Carboxypeptidase A1-like (XP_012985652) ID: 66% , SIM: 82% (88%)	Carboxypeptidase A1 preproprotein (NP_989915) ID: 80% , SIM: 90% (96%)	ID: 65% , SIM: 79% (98%)
Serum albumin (EMC85061)	serum albumin (XP_005144193) ID: 84%, SIM: 92% (99%)	Serum albumin (NP_990592) ID: 81% , SIM: 88% (100%)	ID: 81% , SIM: 90% (99%)
Chymotrypsin-C (XP_005508006)	Chymotrypsin-C (XP_005145536) ID: 78% , SIM: 87% (98%)	Chymotrypsin-C (NP_001264846) ID: 78% , SIM: 87% (100%)	ID: 74% , SIM: 84 % (95%)
Ig lambda chain V-1 region, partial (EMC88596)	Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 3-like (XP_012984140) ID: 73% , SIM: 77% (73%)	Immunoglobulin lambda light chain, partial (BAB71871) ID: 81% , SIM: 87% (100%)	ID: 76 % , SIM: 78 % (90%)
Pancreatic lipase-related protein 1 (EMC84847)	Pancreatic triacylglycerol lipase-like (XP_012985881) ID: 76% , SIM: 88% (100%)	Pancreatic triacylglycerol lipase precursor (NP_001264311) ID: 72% , SIM: 84% (100%)	ID: 78% , SIM: 86% (100%)
Chymotrypsinogen 2 (EMC89394)	No orthologous proteins	Chymotrypsinogen 2-like (NP_001264565) ID: 79% , SIM: 85% (95%)	No orthologous proteins in budgerigar
Polymeric immunoglobulin receptor (XP_005510447)	Polymeric immunoglobulin receptor (XP_005143290) ID: 75% , SIM: 84% (88%)	Polymeric immunoglobulin receptor (NP_001038109) ID: 62% , SIM: 78% (100%)	ID: 62% , SIM: 76 % (100%)
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_005503921)	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (XP_012984154) ID: 63% , SIM: 76% (94%)	Ig light chain (AAA48918) ID: 68% , SIM: 78% (99%)	ID: 65% , SIM: 76 % (99%)
Proproteinase E (XP_005514568)	No orthologous proteins	Chymotrypsin-like elastase family member 3B (XP_015152723) ID: 73% , SIM: 80% (95%)	No orthologous proteins in budgerigar

REFERENCES

1. McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000; 30(9):1221-9.
2. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin J-C, Ando M, Morell F, et al. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003; 168(8):952-8.
3. Kokkarinen J, Tukiainen H, Seppa A, Terho EO. Hypersensitivity pneumonitis due to native birds in a bird ringer. *Chest*. 1994; 106(4):1269-71.
4. Sennekamp J, Lange G, Nerger K, Berdel D, Meier-Sydow J. Human antibodies against antigens of the sparrow, blackbird, weaver finch, canary, budgerigar, pigeon and hen using the indirect immunofluorescent technique. *Clinical & Experimental Allergy*. 1981; 11(4):375-84.
5. Mashio K, Fukushima Y, Oomi F, Umetsu T, Yoshida N, Ikeda N, et al. Involvement of Bird-related IgG Antibodies in Interstitial Pneumonia. *Dokkyo journal of medical sciences*. 2013; 40(1):39-46.
6. Rouzet A, Reboux G, Dalphin J-C, Gondouin A, De Vuyst P, Balliau T, et al. An immunoproteomic approach revealed antigenic proteins enhancing serodiagnosis performance of bird fancier's lung. *Journal of Immunological Methods*. 2017.
7. Langella O, Valot B, Balliau T, Blein-Nicolas M, Bonhomme L, Zivy M. X! TandemPipeline: a tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *Journal of Proteome Research*. 2016.
8. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006; 22(13):1658-9.
9. Chruszcz M, Mikolajczak K, Mank N, Majorek KA, Porebski PJ, Minor W. Serum albumins—Unusual allergens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013; 1830(12):5375-81.
10. Rouzet A, Reboux G, Rognon B, Barrera C, De Vuyst P, Dalphin J-C, et al. Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2014; 77(12):724-30.

Données supplémentaires

Tableau 12 : Comparaison des protéines des fientes de pigeon, perruche et poule réalisée avec l'application Venn diagram generator.

Ces données correspondent à celles représentées dans la figure 1 de l'article. Les protéines antigéniques des fientes de pigeon apparaissent en gras et sont surlignées en bleu.

Protéines spécifiques pigeon (n=23)	Protéines spécifiques perruche (n=18)	Protéines spécifiques poule (n=8)	Protéines spécifiques Perruche-pigeon (n=32)	Protéines spécifiques pigeon-poule (n=11)	protéines spécifiques perruche-poule (n=5)	Protéines communes pige-on-perruche-poule (n=31)
Bactericidal permeability increasing protein	GP1 transamidase component PIG-S	Protein MRP-126	ADP/ATP translocase 3	Chymotrypsinogen 2	cathepsin D	CUB and zona pellucida-like-domain-containing protein 1
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	Ribonuclease	ATP synthase subunit alpha	Ferritin heavy chain	cationic trypsin-like	Creatine kinase
Carbonic anhydrase 4	alpha-1-acid glycoprotein 2	acidic mammalian chitinase-precursor	ATP synthase subunit beta	Ig heavy chain V-III region-VH26	chymotrypsin-like protease CTRL-1	Endonuclease domain-containing-1 protein
Carboxypeptidase O	alpha-1-antiproteinase 2-like	alpha-1-antitrypsin precursor	Class II histocompatibility antigen, B-L beta chain	Lysozyme C	leukocyte elastase inhibitor	IgGfc-binding protein-like
Cubilin, partial	alpha-2-HS-glycoprotein	carboxypeptidase A5 precursor	Cu/Zn superoxide dismutase	Phospholipase A	pepsin A-like	Ig lambda chain V-1 region
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	angiotensinogen	complement C3 precursor	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	Proproteinase E		Immunoglobulin J chain
Filamin-B	antithrombin-III	epithelial chloride channel-protein-like	Lipocalin	Selenium-binding protein 1		L-lactate dehydrogenase A chain
Ig mu chain C region	apolipoprotein A-IV	plasma protease C1 inhibitor	Thy-1 membrane glycoprotein	carboxypeptidase A2		Pancreatic lipase-related protein 1
Ovalbumin-related protein Y	cathepsin B		aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	dipeptidase 1		Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
Protocadherin-16	cysteine-rich secretory protein 2		alpha-enolase isoform X1	fibrinogen-like protein 1-like protein		actin, cytoplasmic type 5 isoform X1
Protocadherin-24	haptoglobin-like		angiotensin-converting enzyme, partial	mucin-4-like		aminopeptidase
Transketolase	heat shock protein HSP 90-alpha		angiotensin-converting enzyme 2			annexin A1
cadherin-17	kininogen-1		aspartate aminotransferase, mitochondrial			annexin A2
cathepsin D	lumican		bile salt-activated lipase			annexin A4
dynactin-associated protein	multiple inositol polyphosphate phosphatase 1		cadherin-1-like			carboxypeptidase A1-like
enteropeptidase	protein AMBP		deleted in malignant brain tumors 1-protein			carboxypeptidase B
olfactomedin-4	serine protease inhibitor Kazal-type 5		dipeptidyl peptidase 4			chymotrypsin-C
ovalbumin	sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1		elongation factor 1-alpha			chymotrypsin-like elastase family member 1
putative neutral ceramidase C			ezrin			epithelial cell adhesion molecule
transthyretin			glutamyl aminopeptidase			glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
triosephosphate isomerase			heat shock cognate 71 kDa-protein isoform X1			immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
xaa-Pro dipeptidase			malate dehydrogenase, mitochondrial			intestinal-type alkaline phosphatase
zonadhesin-like			mucin-13			meprin A subunit alpha
			neprilysin			mucin-2
			pyruvate kinase			myeloid protein 1
			serotransferrin			pancreatic alpha-amylase
			sodium/glucose cotransporter 1 isoform X1			pantetheinase
			trypsin			polymeric immunoglobulin receptor
			ubiquitin C			serpin B6 isoform X2
			villin-1			serum albumin
			xaa-Pro aminopeptidase			sucrase-isomaltase, intestinal
			78 kDa glucose-regulated protein			

6. Conclusion

L'utilisation de la méthode shotgun nous a permis de comparer les protéines des fientes de pigeon, perruche et de poule. Les fientes de pigeon et de perruche possèdent plus de protéines en commun que les fientes de poule. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Les connaissances acquises sur l'identité des protéines de pigeon impliquées dans la maladie constituent le pilier principal de cette étude. Près d'un tiers des protéines communes aux fientes de ces 3 espèces d'oiseaux sont représentées par des protéines orthologues à celles précédemment identifiées à partir des fientes de pigeon. Ces protéines possèdent des séquences en acides aminés proches d'une espèce à l'autre permettant la mise en évidence d'une communauté antigénique entre les espèces d'oiseaux étudiées. Les régions en acides aminés conservées entre ces espèces peuvent correspondre à des sites de liaison des anticorps et participer aux réactions antigéniques croisées. La production d'antigènes recombinants communs aux fientes de plusieurs espèces d'oiseaux permettrait de standardiser et de simplifier le diagnostic sérologique du PEO.

Par ailleurs, les fientes de poule possèdent plus de protéines orthologues aux protéines antigéniques de pigeon (13/14) que les fientes de perruche (10/14). L'analyse des séquences en acides aminés des protéines de poule ne montre aucune délétion ou modification de séquences pouvant expliquer que cette espèce soit moins impliquée dans la maladie. Ainsi, nous n'avons pas d'explication sur ce risque extrêmement faible de développer le PEO suite à une exposition à une espèce domestique aussi répandue.

Discussion générale

Les protéines antigéniques sont recherchées depuis plus de 40 ans afin d'améliorer le diagnostic et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le déclenchement de la maladie. L'objectif principal de ce travail de thèse était de mieux connaître la nature antigénique des matrices aviaires afin d'améliorer et de standardiser le diagnostic sérologique de la maladie du PEO.

Protéines antigéniques de pigeon associées au PEO

Les critères diagnostiques ont évolué depuis les 30 dernières années. Bien que souvent critiquée, la recherche d'anticorps sériques dirigés contre l'agent étiologique est un critère important pour le diagnostic des PHS (Lacasse et al., 2003; Richerson et al., 1989; Vasakova et al., 2017) et plusieurs études récentes ont confirmé leur utilité pour le diagnostic de la maladie (Suhara et al., 2014; Woge et al., 2017). Le taux important de faux-positif a amené certains auteurs à considérer les précipitines/anticorps IgG circulants dirigés contre les antigènes, comme de simples témoins de l'exposition aviaire et non de la maladie (Molyneaux et al., 2016; Patel et al., 2001). Ces résultats soulèvent la question de la qualité et du choix des antigènes utilisés pour les analyses.

Il a été démontré que des déterminants antigéniques communs étaient retrouvés dans les fientes, les squames et le sérum de pigeon (Longbottom, 1989; McSharry, 1984; Shirai et al., 2017). Nos travaux ont permis l'identification de 14 protéines antigéniques impliquées dans le système immunitaire et digestif des pigeons. Ces protéines ont été classées en 3 catégories : (i) protéines liées à l'exposition (n=6), (ii) protéines d'intérêt (n=6), (iii) protéines associées au développement de la maladie (n=2). Finalement, l'albumine sérique, la chaîne lourde VIII de l'immunoglobuline, et IGLL1 sont les 3 protéines antigéniques communes aux fientes, squames et au sérum de pigeon. Il s'agit également des seules protéines antigéniques retrouvées dans le sérum de pigeon. La caractérisation des protéines issues des fientes, des squames et du sérum de pigeon apporte des arguments sur l'antigénicité respective de chacune des matrices et permet de mieux comprendre le transport des particules antigéniques.

McSharry et al., affirment que le sérum de pigeon est un antigène suffisant pour diagnostiquer les patients quelles que soient leurs expositions aviaires (McSharry et al., 2006). Néanmoins, nos résultats montrent que la diversité antigénique du sérum est plus faible que celle des fientes et des squames. Bien que les squames possèdent des quantités de protéines plus faibles que les autres matrices, elles présentent de nombreuses protéines antigéniques (9/14) provenant probablement d'un contact avec les fientes. Cette matrice présente une taille adaptée pour rejoindre les alvéoles pulmonaires, sédimenter et induire une réponse immunitaire. La kératine est une protéine des squames hydrophobe, très résistante à la dégradation enzymatique et pourrait agir comme un stimulus inflammatoire ou un adjuvant lorsqu'elle est inhalée (McSharry, 1984). De plus, cette résistance à la protéolyse pourrait aussi être à l'origine de la formation du granulome dans les poumons (McSharry, 1984). De même, il a été montré que les

particules épidermiques de vaches étaient à l'origine de rhinite allergique chez 20% des agriculteurs finlandais. (Terho et al., 1985). Par ailleurs, des études ont montré que l'infection par des virus respiratoires (syncytial et Parainfluenza 1) étaient favorables au développement des PHS (Cormier and Israël-Assayag, 2000; Gudmundsson et al., 1999). Des antigènes viraux ont été retrouvés dans les cellules de lavage broncho-alvéolaire et dans le tissu pulmonaire de patient atteints de PHS. Par conséquent, les virus pourraient être des cofacteurs nécessaires à la sensibilisation des patients aux antigènes de l'environnement.

Les protéines identifiées dans nos travaux confirment l'implication des immunoglobulines et de la chymotrypsine précédemment définies comme associées à la maladie (Berrens and Maesen, 1972; Boyd et al., 1982; Edwards et al., 1970; Goudswaard et al., 1978; Longbottom, 1989). Toutefois, il est important de préciser que toutes les immunoglobulines identifiées ne sont pas utiles pour le diagnostic sérologique, puisque certaines entraînent également une réponse immunitaire chez les témoins. Par ailleurs, nos résultats montrent que la présence d'anticorps dirigés contre l'albumine confirme l'exposition aux pigeons mais n'est pas un marqueur de la maladie. La mucine intestinale de pigeon, souvent citée comme un antigène majeur dans le PEO a été identifié à partir des fientes, mais son caractère antigénique n'a pas été démontré dans notre étude (Todd et al., 1991).

Les protéines IGLL1 et ProE spécifiquement reconnues par les anticorps des malades, sont relativement abondantes dans les fientes de pigeon. Toutefois, ces protéines entraînent des réactions immunitaires modérées chez les patients. La comparaison du gel 2D-PAGE et des membranes de western blot 2D montre qu'il n'y a pas nécessairement de lien entre l'abondance d'une protéine dans les fientes et son antigénicité. Néanmoins, la simple exposition aux pigeons suffit à entraîner la production d'anticorps de type IgG chez les patients et les témoins. Le niveau d'anticorps dirigés contre les protéines associées à l'exposition aux pigeons est plus élevé que celui dirigés contre les protéines impliquées dans la maladie. Par conséquent, les fientes représentent une matrice constituée de (i) protéines impliquées dans la maladie et (ii) d'autres entraînant la production d'anticorps chez les éleveurs du simple fait de leur exposition. Ces résultats peuvent expliquer le nombre de faux-positifs observé dans les analyses sérologiques. Dans cette étude, l'utilisation des fientes dans les tests ELISA montre davantage de faux-négatifs (6/25), que de faux-positifs (2/30). En effet, certains patients montrent une réaction négative vis-à-vis des fientes alors qu'ils présentent une réaction positive avec les protéines recombinantes.

L'approche immuno-protéomique utilisée, basée sur une analyse des protéines sur gel 2D-PAGE se heurte aux limitations associées à la séparation des protéines sur gel. D'une part, les protéines faiblement ou moyennement exprimées sont rarement détectées en raison de leur concentration se situant aux limites de détection des colorations (Gygi et al., 2000). D'autre part, elles sont souvent masquées par des protéines plus fortement exprimées. En effet, certaines protéines antigéniques détectées sur les

membranes de western blot 2D ne sont pas visibles sur le gel 2D-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Par conséquent, ces protéines antigéniques n'ont pas pu être identifiées dans cette étude.

Analyses sérologiques dans le PEO

La plupart du temps, la recherche de précipitines dirigées contre les micro-organismes isolés à partir des fientes est associée à la recherche de précipitines dirigées contre les fientes de l'oiseau du patient. La technique de production des antigènes est relativement chronophage, ainsi nous avons souhaité comparer l'efficacité des antigènes produits spécifiquement pour un patient, avec ceux du panel standard. Les résultats de cette étude montrent que les éleveurs d'oiseaux ne sont pas sensibilisés vis-à-vis des micro-organismes isolés à partir des fientes de leur oiseau. Ainsi, ces analyses n'apportent aucun argument utile pour le diagnostic du PEO, et ne devraient plus être réalisées. Ces résultats n'excluent nullement la possibilité que les micro-organismes jouent un rôle dans le développement de la maladie. En effet, les fientes d'oiseaux contiennent des endotoxines et du (1,3) β -D-glucane, à des niveaux susceptibles d'augmenter le risque de PHS (Rylander et al., 1994). Ces 2 agents inflammatoires sont issus respectivement de la membrane de certaines bactéries (endotoxine) et de la paroi fongique ((1,3) β -D-glucane) de la plupart des champignons. Par ailleurs, nous avons montré que les antigènes produits à partir des fientes de l'oiseau du patient étaient plus efficaces que l'utilisation des antigènes du panel standard. En effet, le panel antigénique standard est composé des antigènes des 5 espèces d'oiseaux suivantes : pigeon, perruche, canaris, poule et canard. Nos résultats montrent que dans la majorité des cas (9/11), en utilisant les antigènes d'une même espèce d'oiseau, ceux issus des fientes de l'oiseau auxquelles le patient est exposé sont plus réactifs que ceux du panel standard.

Nous avons développé un test sérologique de type ELISA basé sur l'utilisation des protéines IGLL1 et ProE, qui améliore les performances du diagnostic sérologique actuel de la maladie. La faible cohorte de patients et de témoins utilisée pour valider les performances diagnostiques des protéines recombinantes constitue une limite à cette étude. Une équipe japonaise a détecté par western blot 1D une bande protéique antigénique de 26 kDa spécifique des patients PEO, commune aux fientes, sérum et au contenu intestinal de pigeon (Shirai et al., 2017). Ils ont ensuite utilisé les techniques d'électrophorèse et de western blot 2D et les antigènes du sérum et des fientes de pigeon pour séparer les protéines contenues dans cette bande protéique. En utilisant une approche « ciblée », cette équipe est parvenue à identifier IGLL1 comme étant une protéine spécifique du PEO, de manière contemporaine à notre étude. Le fait que 2 équipes indépendantes identifient la même protéine conforte son implication dans la maladie.

Protéines antigéniques communes entre les différentes espèces d'oiseaux

Nos travaux ont permis de mettre en évidence, par une approche descriptive une spécificité d'espèce des protéines antigéniques. Nous avons analysé les protéines antigéniques des fientes de pigeon, de perruche et de poule. Nous avons ainsi démontré que les protéines antigéniques étaient très proches pour les fientes de différentes races de pigeon. Bien que présentant des phénotypes très différents, les différentes races de pigeon sont toutes dérivées d'un seul ancêtre commun, le pigeon biset (*Columba livia*) (Harlin and Wade, 2009). A l'inverse, la variabilité génétique est plus importante dans la famille des Psittacidae (perruche, perroquet). Cette famille est constituée d'environ 370 espèces d'oiseaux auxquelles s'applique le nom vernaculaire de « Perruche » (Collar, 1997). Selon la répartition géographique de ces oiseaux, la famille des Psittacidae est subdivisée dans les 3 groupes suivants : (i) inséparables (genre *Agapornis*) en Afrique, (ii) perruches (genre *Melopsittacus*) en Océanie et (iii) Aras (genre *Ara*) en Amérique du Sud (Sibley and Ahlquist, 1990). Cette répartition géographique a certainement eu une influence sur l'histoire évolutive de ces oiseaux, sur leur distance phylogénétique actuelle et par conséquent sur les différences observées dans les analyses sérologiques (Funke and Fellrath, 2008). Funke et al. décrivent le cas clinique d'un patient exposé à des inséparables, celui-ci montre une réaction sérologique positive vis-à-vis des fientes de cette espèce, mais pas de réaction contre le sérum de perruche et de perroquet (même famille) (Funke and Fellrath, 2008). Les résultats de nos travaux montrent également que les protéines antigéniques diffèrent davantage entre les fientes de deux espèces appartenant à la famille des Psittacidae.

L'identification des protéines spécifiques d'espèce est un enjeu important puisque leur utilisation dans les tests sérologiques permettrait de cibler l'espèce d'oiseau en cause en cas de multi-exposition aviaire. Par ailleurs, ce test pourrait également être un argument pour confirmer certains cas de PEO d'origine professionnel.

A côté des protéines spécifiques d'espèces, les résultats montrent que les patients ont des anticorps dirigés contre des antigènes aviaires auxquels ils ne sont pas exposés. Ces réactions sont fréquemment mises en évidence dans les études, elles sont appelées réactions antigéniques croisées. La disponibilité des génomes de perruche (*Melopsittacus undulatus*) et de poule (*Gallus gallus*) ainsi que la maîtrise de la méthode shotgun nous ont permis d'identifier par spectrométrie de masse, les protéines des fientes de ces oiseaux et de les comparer aux protéines de pigeon. Les protéines des fientes de pigeon, perruche et poule, présentant plus de 60% d'identité ont été regroupées en 128 protéines de fonctions différentes. Ces protéines sont impliquées dans le système immunitaire, le cytosquelette, ou dans le métabolisme des lipides, des glucides ou des protéines. La comparaison des protéines des fientes de ces 3 espèces montre que les fientes de pigeon et de perruche possèdent 52,5% de protéines communes alors que les

fientes de poule montrent respectivement 38% et 34% de protéines communes avec celles de pigeon et de perruche.

Bénéficiant de l'identité des protéines antigéniques de pigeon, nous avons recherché leurs orthologues dans les fientes de perruche et de poule. Parmi les 31 protéines communes aux fientes des oiseaux étudiées, nous avons retrouvé 10 protéines orthologues aux protéines antigéniques de pigeon. Nos résultats montrent que ces protéines possèdent des séquences en acides aminés relativement conservées entre les 3 espèces étudiées. Il a été démontré que les immunoglobulines des oiseaux étaient codées par un nombre de gènes limités et que les séquences en acides aminés étaient plus conservées que pour d'autres organismes (Martinez et al., 2003). En effet, les oiseaux possèdent un système immunitaire adaptatif, caractérisé par l'utilisation de la bourse de Fabricius, site de différenciation des lymphocytes (Tizard, 2002). Les oiseaux produisent 3 classes d'immunoglobulines : IgA, IgY et IgM. Ces immunoglobulines sont composées de 2 chaînes légères et de 2 chaînes lourdes identiques. Alors que les mammifères possèdent 2 isotypes de la chaîne légère (kappa et lambda), les oiseaux possèdent uniquement l'isotype lambda. Une étude montre que des anticorps secondaires anti-IgG de poule commercialisés reconnaissent les immunoglobulines de plusieurs autres espèces d'oiseaux (Faucon, Mésange bleue, Chevêche d'Athéna, Pie-grièche) (Martinez et al., 2003). Ces réactions ont été mises en évidence entre les antigènes de pigeon et de perruche (Mashio et al., 2013). Eade et al., recommandent d'utiliser uniquement les antigènes de pigeon et de perruche pour le diagnostic sérologique, quelle que soit l'exposition aviaire du patient (Eade et al., 1978). Cependant, les connaissances actuelles ne sont pas suffisantes pour pouvoir anticiper les réactions antigéniques croisées entre différentes espèces d'oiseaux (Sennekamp et al., 1981).

Nos résultats permettent de fournir une liste, non exhaustive, de différentes protéines potentiellement impliquées dans les réactions antigéniques croisées. Nous avons démontré que la protéine IGLL1 de pigeon permettait également de diagnostiquer les patients exposés aux perruches et aux volailles. Ce résultat permet de valider l'approche expérimentale adoptée pour l'étude.

Une des pistes testées mais qui n'a pas pu aboutir et qui peut manquer à ce travail concerne l'évaluation de l'antigénicité des protéines orthologues identifiées. Un important travail de mise au point a été réalisée afin d'utiliser la technique d'immunoprécipitation, couplée à la spectrométrie de masse pour identifier ces protéines antigéniques. Le principe de cette méthode repose sur la purification par affinité d'antigènes reconnus par les anticorps IgG des patients, fixés préalablement à un anticorps spécifique (protéine G) immobilisé sur des particules magnétiques. Après élution, les complexes antigènes-anticorps IgG des patients sont dissociés du support solide, puis ils sont analysés par la méthode shotgun. Toutefois, des liaisons non-spécifiques ont été mises en évidence entre les immunoglobulines des fientes et la protéine G empêchant ainsi l'interprétation des résultats. La proximité des immunoglobulines entre

espèces engendre des difficultés à prendre en considération dans les analyses immunologiques. Par ailleurs, l'absence de patients exposés aux poules est aussi une limite à ce travail.

Le cas particulier de la poule

Malgré le fait que l'Homme soit exposé aux poules depuis de nombreuses années, et que l'élevage domestique rencontre actuellement un regain d'intérêt, le nombre de cas de PEO liés à cette espèce est faible voire inexistant. La présence de précipitines dirigés contre le sérum de poule a été mise en évidence chez des professionnels, mais aucun cas de PEO n'a été dépisté (Andersen and Schönheyder, 1984; Elman et al., 1968). Ce constat a suscité notre intérêt et nous avons émis l'hypothèse suivante : « Les poules ne possèdent pas, ou ont perdu le caractère antigénique de certaines protéines au cours de l'évolution ». Nos résultats montrent que les fientes de poule semblent contenir moins de protéines et les protéines antigéniques révélées sont caractérisées par un poids moléculaire supérieurs à 75 kDa. Les protéines des fientes de poule sont plus difficiles à extraire que celles des autres espèces d'oiseaux étudiées. Contrairement aux pigeons et aux perruches, la poule présente un régime alimentaire de type omnivore. Ainsi, nous pouvons supposer que les aliments digérés influent sur la composition des fientes. Nous avons été surpris d'identifier un nombre plus important de protéines orthologues aux protéines antigéniques de pigeon dans les fientes de poule (13/14) par rapport aux perruches (10/14). Notre hypothèse n'est pas confirmée, et nos résultats ne permettent pas d'apporter d'explication sur le cas particulier de la poule dans la maladie. Toutefois, il serait intéressant de comparer l'abondance des protéines antigéniques entre dans les fientes de pigeon, de perruche et de poule. En effet, on peut supposer que les protéines antigéniques soient présentes en quantité insuffisante chez la poule, pour initier une réponse immunitaire. De plus, cette espèce possède très peu de squames (Tauer-Reich et al., 1994), contrairement aux pigeons ou aux perruches. Ainsi, il en résulte une diminution de l'intensité de l'exposition des éleveurs aux protéines antigéniques. La volaille étant sans doute la nourriture carnée la plus répandue et la plus ancienne, on pourrait explorer la piste d'une tolérance acquise par l'Homme vis-à-vis des protéines de poules au cours de l'évolution.

Les éleveurs et la maladie

Les prélèvements d'échantillons dans les élevages, ont ainsi été une occasion privilégiée de bénéficier du « ressenti » des éleveurs par rapport à la maladie. D'une manière générale, ils craignent cette pathologie notamment en raison du décès de 2 dirigeants de leurs associations atteints du PEO. Les principales sources antigéniques ne sont pas systématiquement connues par ces passionnés. D'après eux, ce sont les squames qui les incommode le plus au cours de leurs pratiques. Les éleveurs affirment que les pigeons sont de grands producteurs de poussière et que ce phénomène est d'autant plus visible au moment des compétitions (endroit confiné). Ils accordent une importance toute particulière à

l'aménagement de leur volière afin de favoriser la circulation de l'air et d'éviter l'accumulation de poussière. La compétence et l'expérience des éleveurs résultent d'un investissement important dans le temps passé avec leurs oiseaux. Bien plus qu'un loisir, il s'agit d'un mode de vie impliquant un véritable engagement social, économique et affectif. Des actions de prévention ont été menées durant ces 3 années de thèse avec pour objectifs de présenter la maladie, mais surtout de proposer des moyens de protection efficaces pour réduire l'exposition des éleveurs aux particules antigéniques. Une plaquette préventive a été rédigée (annexe 2) et diffusée auprès des éleveurs de la région afin de les sensibiliser aux risques associés à leur passion.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse permet d'améliorer le diagnostic du PEO, grâce au développement d'un test sérologique innovant et standardisé, basé sur l'utilisation de 2 antigènes recombinants de pigeon. La protéine recombinante IGLL1 est efficace pour le diagnostic des patients exposés aux pigeons, aux perruches et aux volailles. Les protéines des fientes, des squames et du sérum de pigeon ont été identifiées, et les protéines antigéniques ont été localisées à l'intérieur de ces matrices. Ces résultats ont permis d'apporter des informations sur le transport des protéines antigéniques et ainsi de renforcer les mesures préventives auprès des éleveurs. Ce travail fournit également l'identité de plusieurs protéines issues des fientes de pigeon, perruche et de poule, potentiellement impliquées dans les réactions antigéniques croisées. Ces réactions sont liées à la présence d'épitopes communs entre différentes espèces d'oiseaux. Par ailleurs, nous avons montré que les éleveurs n'étaient pas sensibilisés aux micro-organismes des fientes de leurs oiseaux. A l'inverse, l'utilisation des antigènes auxquels le patient est directement exposé dans les analyses sérologiques est plus efficace que les antigènes du panel standard.

Le test sérologique développé dans ce travail de thèse sera évalué en routine hospitalière au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Besançon dès le mois de novembre en parallèle aux analyses sérologiques actuelles. Pour la mise en place de cette étude prospective, des lapins ont été immunisés contre les protéines IGLL1 et ProE afin d'obtenir des anticorps polyclonaux qui seront utilisés comme témoins positifs dans les tests ELISA. De plus, la technique ELISA présente l'avantage de permettre le suivi du taux d'anticorps sérique au cours de la maladie et d'évaluer l'efficacité de l'éviction antigénique. Selon les résultats de l'étude prospective, on peut envisager que ce test sérologique puisse remplacer le lavage broncho-alvéolaire, le test d'inhalation par provocation et la biopsie pulmonaire. Ces examens sont éprouvants pour le patient et les risques associés ne sont pas négligeables. En effet, le taux de mortalité post-opératoire associé à la biopsie pulmonaire est évalué à 3,6% (Han et al., 2015).

L'éviction antigénique occupe une place importante dans l'amélioration de l'état de santé des patients. Une équipe japonaise a mis au point un protocole efficace (extraction des antigènes issus de la poussière de l'environnement) pour quantifier les antigènes présents au domicile des patients afin d'assurer une éviction antigénique complète (Tsutsui et al., 2015). Ils ont établi une corrélation positive entre la sévérité du pronostic et la quantité d'antigène mesurée chez les patients. En effet, il a été démontré que ceux-ci pouvaient perdurer au domicile des patients pendant une durée de 18 mois après le retrait de l'oiseau (Craig et al., 1992). Nous avons développé un dispositif de capture des antigènes en suspension dans l'air, via une plaque ELISA préalablement imbibée d'une substance grasseuse (Diméthylsulfoxyde), et placée dans une volière pour une durée d'une semaine. Ce dispositif présente l'originalité de capturer directement les antigènes dans l'air et ne nécessite aucune étape d'extraction des protéines. Des anticorps polyclonaux IGLL1 et ProE pourront être utilisés pour permettre une quantification de ces protéines antigéniques dans l'environnement de l'éleveur. De nombreuses étapes de mises au point seront nécessaires afin de pouvoir adapter ce dispositif au domicile des patients.

Toutefois, l'évaluation du risque du retour à domicile des patients est un paramètre important à prendre en considération puisqu'il conditionne l'amélioration de leur état de santé.

Les protéines antigéniques identifiées à partir des fientes de pigeons français sont également retrouvées dans les fientes de pigeon mexicain. De plus, IGLL1 est efficace pour le diagnostic sérologique des patients japonais. Les résultats de nos travaux excluent l'hypothèse d'une spécificité géographique des protéines antigéniques majeures. Ainsi, le test sérologique basé sur l'utilisation d'IGLL1 et ProE pourrait permettre le diagnostic des éleveurs de pigeons, de manière indépendante de leur localisation géographique. Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire d'établir des collaborations avec des scientifiques d'autre pays afin de tester ces protéines avec le sérum de leurs patients. Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de ces protéines pour le diagnostic sérologique d'une forme de PHS : la maladie des oreillers en plumes.

Les protéines IGLL1 et ProE pourraient être testées sur des modèles animaux et cellulaires pour étudier les mécanismes initiaux et les voies cellulaires impliquées dans le déclenchement de la maladie. Ces expériences ont déjà été menées au laboratoire avec des extraits totaux de micro-organismes et des peptides impliqués dans le PDF (Bellanger et al., 2013; Bellanger et al., 2010; Bellanger et al., 2017). L'identification des agents responsables de la maladie ouvre un champ d'investigation important dans le domaine de la thérapeutique. De plus, la caractérisation de variants entre malades et non malades pourrait être envisagée afin de trouver des marqueurs de prédisposition génétique à la maladie. Cette approche est aujourd'hui possible grâce au développement des technologies de séquençage haut débit couplée à l'évolution des méthodes bio-informatiques et statistiques de traitement des données.

Les domaines d'investigations concernant l'amélioration du diagnostic sérologique, la compréhension des mécanismes immunologiques, génétiques et pathologiques ainsi que les enjeux de la prévention font de la maladie du PEO encore un vaste terrain d'études pour les années à venir.

Annexes

Annexe 1 : Fiche Evadia

Etude de Validation du Diagnostic des PHS
EVADIA-PHS



Questionnaire

Renseignements Patient

Nom.....	Prénom.....	H – F
Date de naissance...../...../.....		
Adresse complète (pour demande de non opposition)		

Habitudes tabagiques : Fumeur ☐ Ex fumeur* ☐ Non fumeur ☐

*arrêt du tabac depuis au moins 1 an

Le diagnostic de PHS a-t-il été confirmé ? oui ☐ non ☐

Si oui : Poumon de Fermier : ☐

Poumon d'éleveur d'oiseaux : ☐

Autres PHS, préciser :

Forme de la PHS : Chronique ☐ Aigüe ☐ Subaigüe ☐ / Type I ☐ Type II ☐

Si non, préciser :

Patient suivi depuis le/...../.....

Date du 1^{er} diagnostic/...../.....

Patient récidivant : oui ☐ non ☐

Symptômes respiratoires et généraux

Compatibles avec une PHS :

Oui ☐

Non ☐

Commentaires :

.....
.....

TDM thoracique

Compatibles avec une PHS :

Oui ☐

Non ☐

Commentaires :

.....
.....

Explorations fonctionnelles respiratoires

	Valeur absolue	% / théorique
VEMS/CV	_____	_____
DLCO/VA	_____	_____

Commentaires :

.....

.....

Lavage Broncho-Alvéolaire

Cellularité (nb cel/ml) _____

Lymphocytes (%) _____

CD4 / CD8 : _____

Commentaires :

.....

.....

Renseignements environnementaux

Pour les cas de Poumon de fermier

Agriculteur toujours en activité : **oui** ☐ **non** ☐

Si non, aide occasionnelle : **oui** ☐ **non** ☐

Nombre d'années d'exposition : _____

Nombre d'heures de contact par jour : _____

Pour les cas de PEO

Elevage d'oiseaux : professionnel - amateur

Localisation de la volière : Au domicile ☐ Pièces à vivre ☐ Autres ☐

A l'extérieur ☐

Bâtiment indépendant ☐

Autres cas, préciser :

Nombre d'années d'exposition aux oiseaux : _____

Nombres d'heures de contact par semaine : _____

Nombres d'oiseaux : _____

Espèces :

Pigeon ☐

Perruche ☐

Colombe ☐

Canari ☐

Poule ☐

Autre Volaille ☐

Autres ☐

Si connu, préciser la race :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Autres expositions, préciser (Exemples : Oreiller, édredon en plumes) :

.....

Signature:

Rempli par :

Fait à :

Le :/...../.....

Questionnaire à retourner à :

Dr Gabriel Reboux,
Service de Parasitologie Mycologie,
CHRU de Besançon,
3 Bd Fleming,
25030 BESANCON CEDEX

Pour toutes questions :

Dr Gabriel Reboux : 03.81.66.91.65
Dr Sandrine Roussel : 03.81.66.90.29

Annexe 2 : Plaquette préventive



QU'EST-CE QUE C'EST ?

Il s'agit d'une maladie pulmonaire liée à une réponse immunitaire exagérée (hypersensibilité) intervenant à la suite de l'inhalation répétée de protéines antigéniques contenues dans les fientes, les plumes et les squames des oiseaux.

Mais pas seulement : les oreillers, couettes en duvet, objets décoratifs en plumes peuvent aussi être à l'origine de la maladie.

Elle survient chez une faible proportion de personnes exposées. Il existe une sensibilité individuelle qui intervient dans le développement de la maladie.

De nombreuses espèces d'oiseaux sont impliquées : pigeons, tourterelles, colombes, perruches, canaris etc...



Les oiseaux à l'origine de cette maladie ne sont pas malades.

RESULTATS DES RECHERCHES

Nos recherches portent principalement sur les protéines antigéniques de pigeon.

Votre collaboration a permis:

- d'identifier les protéines en cause dans la maladie. Il s'agit d'immunoglobulines et d'enzymes pancréatiques aviaires.
- de localiser ces protéines : fientes, squames et sérum de pigeon.

Les protéines antigéniques ont été produites par génie-génétique et seront utilisées pour dépister les patients à partir de prélèvements sanguins.

Toute l'équipe du service de Parasitologie-Mycologie vous remercie pour votre collaboration à ce projet de recherche.

Pour tous renseignements complémentaires veuillez contacter :

Dr Gabriel REBOUX, Ingénieur Sanitaire, HDR

CHRU Besançon, Service Biomédical,
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
3 Bd Alexandre Fleming
25030 BESANCON

Tel : 03 70 63 23 56
mail: gabriel.reboux@univ-fcomte.fr



LA MALADIE DU POU MON D'ÉLEVEUR D'OISEAUX



QUAND LES ÉLEVEURS SONT-ILS EXPOSÉS ?

Au moment du nettoyage des cages, ou des volières, les éleveurs respirent de grande quantité de poussière issue des fientes, plumes et squames. L'exposition à un seul oiseau peut suffire à développer la maladie.



QUELS SONT LES SYMPTÔMES ?

- Etat pseudo-grippal
- Insuffisance respiratoire, toux
- Fièvre
- Fatigue générale

Ces symptômes apparaissent **4 à 8h** après une exposition.

La maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux est en principe non létale si elle est dépistée suffisamment tôt.

Le « traitement » le plus efficace est l'éviction antigénique c'est-à-dire ne plus être en contact avec les oiseaux. Il est donc important d'adopter des mesures préventives



PENSEZ À VOTRE SANTÉ ET À CELLE DE VOTRE ENTOURAGE : PROTÉGEZ-VOUS

Les particules antigéniques sont transportées depuis la volière jusqu'à votre domicile (vêtements, cheveux, peau). Ainsi, votre entourage se retrouve exposé de manière indirecte.

Pour limiter l'accès des particules aux voies respiratoires :

- Port de masque (FFP2)
- Port d'une tenue spécifique à l'intérieur de la volière
- Nettoyage humide des volières
- Aération de la volière



Références bibliographiques

- Aberer, W., Woltsche, M., Woltsche-Kahr, I., Kränke, B., 2001. IgG antibodies typical for extrinsic allergic alveolitis--an inter-laboratory quality assessment. *European journal of medical research* 6, 498-504.
- Agache, I.O., Rogozea, L., 2013. Management of hypersensitivity pneumonitis. *Clinical and translational allergy* 3, 5.
- Andersen, P., Schønheyder, H., 1984. Antibodies to hen and duck antigens in poultry workers. *Clinical & Experimental Allergy* 14, 421-428.
- Ando, M., Konishi, K., Yoneda, R., Tamura, M., 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. *Journal of allergy and clinical immunology* 87, 1002-1009.
- Baldwin, C.I., Calvert, J.E., Todd, A., Bourke, S., Allen, A., 1997. Smoking and immune responses in pigeon fancier's lung. Portland Press Limited.
- Baldwin, C.I., Calvert, J.E., Todd, A., Bourke, S., Allen, A., 2000. IgG subclass responses to pigeon intestinal mucin in pigeon Fanciers' lung. *European journal of medical research* 5, 128-128.
- Baldwin, C.I., Todd, A., Bourke, S.J., Allen, A., Calvert, J.E., 1998. IgG subclass responses to pigeon intestinal mucin are related to development of pigeon fanciers' lung. *Clin Exp Allergy* 28, 349-357.
- Baldwin, C.I., Todd, A., Bourke, S.J., Allen, A., Calvert, J.E., 1999. Pigeon fanciers' lung: identification of disease-associated carbohydrate epitopes on pigeon intestinal mucin. *Clinical and experimental immunology* 117, 230.
- Banham, S.W., Mcsharry, C., Lynch, P.P., Boyd, G., 1986. Relationships between avian exposure, humoral immune response, and pigeon breeders' disease among Scottish pigeon fanciers. *Thorax* 41, 274-278.
- Barrera, C., Millon, L., Rognon, B., Quadroni, M., Roussel, S., Dalphin, J.C., Court-Fortune, I., Caillaud, D., Jouneau, S., Fellrath, J.M., 2014. Immunoreactive proteins of *Saccharopolyspora rectivirgula* for farmer's lung serodiagnosis. *PROTEOMICS-Clinical Applications* 8, 971-981.
- Baur, X., Fischer, A., Budnik, L.T., 2015. Spotlight on the diagnosis of extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis). *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 10, 15.
- Bellanger, A.-P., Pallandre, J.-R., Borg, C., Loeffert, S., Gbaguidi-Haore, H., Millon, L., 2013. Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis induce a Th1-polarized immune response. *Clinical and Vaccine Immunology* 20, 1133-1142.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Botterel, F., Candido, C., Roussel, S., Rognon, B., Dalphin, J.-C., Bretagne, S., Millon, L., 2010. New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. *Medical mycology* 48, 981-987.
- Bellanger, A.P., Lignon, T., Godet, Y., Rognon, B., Reboux, G., Gbaguidi-Haore, H., Borg, C., Millon, L., 2017. Fungal peptides from pneumonitis hypersensitivity etiologic agents are able to induce specific cellular immune response. *J Immunol Methods* 440, 67-73.
- Bergman, J., 2003. The evolution of feathers: a major problem for Darwinism. *Journal of Creation* 17, 33-41.
- Berrens, L., Maesen, F., 1972. An enzyme in pigeon droppings, of possible relevance to pigeon breeder's disease. *Clinical and experimental immunology* 10, 383.
- Blanchet, M.-R., Israël-Assayag, E., Cormier, Y., 2004. Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169, 903-909.

- Bogaert, P., Tournoy, K.G., Naessens, T., Grooten, J., 2009. Where asthma and hypersensitivity pneumonitis meet and differ: noneosinophilic severe asthma. *Am J Pathol* 174, 3-13.
- Borderías, L., Morell, F., Vera, J., Briz, H., Muñoz, X., Cruz, M.J., 2010. Starling-induced hypersensitivity pneumonitis: minimal but persistent antigen exposure. *Archivos de Bronconeumología ((English Edition))* 46, 607-609.
- Bourke, S.J., Banham, S.W., Carter, R., Lynch, P., Boyd, G., 1989. Longitudinal course of extrinsic allergic alveolitis in pigeon breeders. *Thorax* 44, 415-418.
- Bourke, S.J., Dalphin, J.C., Boyd, G., McSharry, C., Baldwin, C.I., Calvert, J.E., 2001. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J Suppl* 32, 81s-92s.
- Bousquet, P.J., Rance, F., Deschildre, A., De Blay, F., Lefrant, J.Y., Demoly, P., 2007. Les conditions de sécurité pour la réalisation des tests de provocation en allergologie. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47, 323-332.
- Boyd, G., McSharry, C., Banham, S., Lynch, P., 1982. A current view of pigeon fancier's lung. A model for pulmonary extrinsic allergic alveolitis. *Clinical allergy* 12, 53.
- Calvanico, N.J., 1986. A component of pigeon dropping extract that reacts specifically with sera of individuals with pigeon breeder's disease. *Journal of allergy and clinical immunology* 77, 80-86.
- Calvert, J.E., Baldwin, C.I., Allen, A., Todd, A., Bourke, S.J., 1999. Pigeon fanciers' lung: a complex disease? *Clin Exp Allergy* 29, 166-175.
- Camarena, Á., Aquino-Galvez, A., Falfán-Valencia, R., Sánchez, G., Montaña, M., Ramos, C., Juárez, A., García-de-Alba, C., Granados, J., Selman, M., 2010. PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory medicine* 104, 889-894.
- Carrillo, T., Castro, F.R., Cuevas, M., Diaz, F., Cabrera, P., 1991. Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fanciers. *Allergy* 46, 241-244.
- Castanon-Olivares, L.R., Lopez-Martinez, R., 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* 37, 325-327.
- Chan, A.L., Juarez, M.M., Leslie, K.O., Ismail, H.A., Albertson, T.E., 2012. Bird fancier's lung: a state-of-the-art review. *Clinical reviews in allergy & immunology* 43, 69-83.
- Choy, A.C., Patterson, R., Ray, A.H., Roberts, M., 1995. Hypersensitivity pneumonitis in a raptor handler and a wild bird fancier. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 74, 437-441.
- Christensen, L.T., Schmidt, C.D., Robbins, L., 1975. Pigeon breeders' disease—a prevalence study and review. *Clinical & Experimental Allergy* 5, 417-430.
- Cooper, C.J., Teleb, M., Elhanafi, S., Ajmal, S., Hernandez, G.T., 2014. Bird fanciers' lung induced by exposure to duck and goose feathers. *The American journal of case reports* 15, 155.
- Cormier, Y., Belanger, J., Beaudoin, J., Laviolette, M., Beaudoin, R., Hebert, J., 1984. Abnormal Bronchoalveolar Lavage in Asymptomatic Dairy Farmers: Study of Lymphocytes 1–3. *American Review of Respiratory Disease* 130, 1046-1049.
- Cormier, Y., Israël-Assayag, E., 2000. The role of viruses in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Current opinion in pulmonary medicine* 6, 420-423.
- Cormier, Y., Lacasse, Y., 1996. Keys to the Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis: The Role of Serum Precipitins, Lung Biopsy, and High-Resolution Computed Tomography. *Clinical Pulmonary Medicine* 3, 77.
- Cormier, Y., Letourneau, L., Racine, G., 2004. Significance of precipitins and asymptomatic lymphocytic alveolitis: a 20-yr follow-up. *European Respiratory Journal* 23, 523-525.

- Costa, A.K.F., Sidrim, J.J.C., Cordeiro, R.A., Brilhante, R.S.N., Monteiro, A.J., Rocha, M.F.G., 2010. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia* 169, 207-213.
- Costabel, U., Bonella, F., Guzman, J., 2012. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clinics in chest medicine* 33, 151-163.
- Coultas, D.B., Zumwalt, R.E., Black, W.C., Sobonya, R.E., 1994. The epidemiology of interstitial lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 150, 967-972.
- Craig, T., Hershey, J., Engler, R., Davis, W., Carpenter, G., Salata, K., 1992. Bird antigen persistence in the home environment after removal of the bird. *Annals of allergy* 69, 510-512.
- Cramer, C., Schlünssen, V., Bendstrup, E., Stokholm, Z.A., Vestergaard, J.M., Frydenberg, M., Kolstad, H.A., 2016. O40-1 Risk of hypersensitivity pneumonitis and other interstitial lung diseases among pigeon breeders. *Occupational and Environmental Medicine* 73, A76-A77.
- Currie, B.P., Freundlich, L.F., Casadevall, A., 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *Journal of clinical microbiology* 32, 1188-1192.
- Curtis, L., Lee, B.S., Cai, D., Morozova, I., Fan, J.L., Scheff, P., Persky, V., Einoder, C., Diblee, S., 2002. Pigeon allergens in indoor environments: a preliminary study. *Allergy* 57, 627-631.
- Dakhama, A., Hegele, R.G., Laflamme, G., Israel-Assayag, E., Cormier, Y., 1999. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 159, 1316-1322.
- Dalphin, J.-C., Gondouin, A., 2015. Rare Causes and the Spectrum of Hypersensitivity Pneumonitis, Orphan Lung Diseases. Springer, pp. 457-472.
- Dalphin, J.C., 2001. La maladie du poumon de fermier. Nouveaux visages et concepts actuels. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 41, 245-252.
- de Beer, P.M., Bouic, P.J., Joubert, J.R., 1990. Identification of a 'disease-associated' antigen in pigeon breeder's disease by western blotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91, 343-347.
- de Castro, F.R., Carrillo, T., Castillo, R., Blanco, C., Diaz, F., Cuevas, M., 1993a. Relationships between characteristics of exposure to pigeon antigens: clinical manifestations and humoral immune response. *Chest* 103, 1059-1063.
- de Castro, F.R.Â., Carrillo, T., Castillo, R., Blanco, C., Âaz, F.D., Cuevas, M., 1993b. Relationships between characteristics of exposure to pigeon antigens. Clinical manifestations and humoral immune response. *CHEST Journal* 103, 1059-1063.
- De Gracia, J., Morell, F., Bofill, J.M., Curull, V., Orriols, R., 1989. Time of exposure as a prognostic factor in avian hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory medicine* 83, 139-143.
- Depierre, A., Dalphin, J.C., Pernet, D., Dubiez, A., Faucompre, C., Breton, J.L., 1988. Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the French Doubs province. *Thorax* 43, 429-435.
- Drent, M., Wagenaar, S., van Velzen-Blad, H., Mulder, P.G., Hoogsteden, H.C., Van den Bosch, J.M., 1993. Relationship between plasma cell levels and profile of bronchoalveolar lavage fluid in patients with subacute extrinsic allergic alveolitis. *Thorax* 48, 835-839.
- Dromer, F., Lortholary, O., 2004. *Cryptococcose*. EMC-Maladies infectieuses 1, 21-37.
- du Marchie Sarvaas, G.J., Merkus, P.J.F.M., de Jongste, J.C., 2000. A family with extrinsic allergic alveolitis caused by wild city pigeons: a case report. *Pediatrics* 105, e62-e62.
- Edwards, J.H., Barboriak, J.J., Fink, J.N., 1970. Antigens in pigeon breeders' disease. *Immunology* 19, 729.

- Edwards, J.H., Trotman, D.M., Mason, O.F., Davies, B.H., Jones, K.P., Alzubaidy, T.S., 1991. Pigeon breeders' lung—the effect of loft litter materials on airborne particles and antigens. *Clinical & Experimental Allergy* 21, 49-54.
- Elman, A.J., Tebo, T., Fink, J.N., Barboriak, J.J., 1968. Reactions of poultry farmers against chicken antigens. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 17, 98-100.
- Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaïb, J., 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 9-14.
- Faux, J., Wells, I., Pepys, J., 1971. Specificity of avian serum proteins in tests against the sera of bird fanciers. *Clinical & Experimental Allergy* 1, 159-170.
- Faux, J.A., Hendrick, D.J., Anand, B.S., 1978. Precipitins to different avian serum antigens in bird fancier's lung and coeliac disease. *Clinical & Experimental Allergy* 8, 101-108.
- Faux, J.A., Holford-Strevens, V., Wells, I.D., Pepys, J., 1970. False positive precipitation reactions to extracts of organic dusts due to a teichoic acid from *S. aureus*. *Clinical and experimental immunology* 7, 897.
- Fink, J.N., Barboriak, J.J., Kaufman, L., 1968. Cryptococcal antibodies in pigeon breeders' disease. *Journal of Allergy* 41, 297-301.
- Fink, J.N., Ortega, H.G., Reynolds, H.Y., Cormier, Y.F., Fan, L.L., Franks, T.J., Kreiss, K., Kunkel, S., Lynch, D., Quirce, S., 2005. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171, 792-798.
- Fournier, E., Tonnel, A.B., Gosset, P.H., Wattaert, B., Ameisen, J.C., Voisin, C., 1985. Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 88, 563-566.
- Fredricks, W., 1978. Antigens in pigeon dropping extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 61, 221-223.
- Fu, C., Donovan, W.P., Shikapwashya-Hasser, O., Ye, X., Cole, R.H., 2014. Hot fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PloS one* 9, e115318.
- Funke, M., Fellrath, J.M., 2008. Hypersensitivity pneumonitis secondary to lovebirds: a new cause of bird fancier's disease. *European Respiratory Journal* 32, 517-521.
- Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., 1963. Clinical aspects of immunology. *Clinical Aspects of Immunology*.
- Girard, M., Lacasse, Y., Cormier, Y., 2009. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 64, 322-334.
- Gondouin, A., Manzoni, P., Dalphin, J.C., 2013. Pneumopathies d'hypersensibilité: causes cachées. *La Lettre du pneumologue* 16, 8-14.
- Gorman, J., Cook, A., Ferguson, C., Van Buynder, P., Fenwick, S., Weinstein, P., 2009. Pet birds and risks of respiratory disease in Australia: A review. *Australian and New Zealand journal of public health* 33, 167-172.
- Goudswaard, J., Noordzij, A., Stam, J., 1978. Pigeon IgA: a major antigen in pigeon breeder's disease. *Immunological communications* 7, 661-668.
- Gruchow, H.W., Hoffmann, R.G., Marx Jr, J.J., Emanuel, D.A., Rimm, A.A., 1981. Precipitating Antibodies to Farmer's Lung Antigens in a Wisconsin Farming Population 1–3. *American Review of Respiratory Disease* 124, 411-415.
- Gudmundsson, G., Monick, M.M., Hunninghake, G.W., 1999. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *The Journal of Immunology* 162, 7397-7401.
- Han, Q., Luo, Q., Xie, J.-X., Wu, L.-L., Liao, L.-Y., Zhang, X.-X., Chen, R.-C., 2015. Diagnostic yield and postoperative mortality associated with surgical lung biopsy for evaluation of interstitial lung

- diseases: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 149, 1394-1401.
- Hargreave, F.E., Pepys, J., Longbottom, J.L., Wraith, D.G., 1966. Bird breeder's (fancier's) lung. *The Lancet* 287, 445-449.
- Harris, J.M., 1991. Zoonotic diseases of birds. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 21, 1289-1298.
- Hendrick, D.J., Faux, J.A., Marshall, R., 1978. Budgerigar-fancier's lung: the commonest variety of allergic alveolitis in Britain. *Br Med J* 2, 81-84.
- Hendrick, D.J., Marshall, R., Faux, J.A., Krall, J.M., 1981. Protective value of dust respirators in extrinsic allergic alveolitis: clinical assessment using inhalation provocation tests. *Thorax* 36, 917-921.
- Hisauchi-Kojima, K., Sumi, Y., Miyashita, Y., Miyake, S., Toyoda, H., Kurup, V.P., Yoshizawa, Y., 1999. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. *Journal of allergy and clinical immunology* 103, 1158-1165.
- Hogg, J.C., 1999. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 160, S26-S28.
- Ismail, T., McSharry, C., Boyd, G., 2006. Extrinsic allergic alveolitis. *Respirology* 11, 262-268.
- Janssen, R., Grutters, J.C., Sato, H., van Velzen-Blad, H., Zanen, P., Kohno, N., Welsh, K.I., du Bois, R.M., van den Bosch, J.M., 2005. Analysis of KL-6 and SP-D as disease markers in bird fancier's lung. Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG 22, 51-57.
- Kern, R.M., Singer, J.P., Koth, L., Mooney, J., Golden, J., Hays, S., Greenland, J., Wolters, P., Ghio, E., Jones, K.D., 2015. Lung transplantation for hypersensitivity pneumonitis. *CHEST Journal* 147, 1558-1565.
- Khosravi, A.R., 1997. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in northern Iran. *Mycopathologia* 139, 93-95.
- Kilpiö, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Haahtela, T., Hannuksela, M., 1998. Allergy to feathers. *Allergy* 53, 159-164.
- King, J., Richardson, M., Quinn, A.-M., Holme, J., Chaudhuri, N., 2017. Bagpipe lung; a new type of interstitial lung disease? *Thorax* 72, 380-382.
- Kokkarinen, J., Tukiainen, H., Seppä, A., Terho, E.O., 1994. Hypersensitivity pneumonitis due to native birds in a bird ringer. *Chest* 106, 1269-1271.
- Kokkarinen, J.I., Tukiainen, H.O., Terho, E.O., 1992. Effect of Corticosteroid Treatment on the Recovery of Pulmonary Function in Farmer's Lung 1-3. *Am Rev Respir Dis* 145, 3-5.
- Koschel, D., Lützkendorf, L., Wiedemann, B., Höffken, G., 2010. Antigen-specific IgG antibodies in feather duvet lung. *European journal of clinical investigation* 40, 797-802.
- Kumar, R., Singh, M., 2015. Bird fancier's lung: clinical-radiological presentation in 15 cases. *Pneumonol Alergol Pol* 83, 39-44.
- Kumar, Y., Bhatia, A., Minz, R.W., 2009. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic pathology* 4, 1.
- Lacasse, Y., Girard, M., Cormier, Y., 2012. Recent Advances in Hypersensitivity Pneumonitis. *CHEST Journal* 142, 208-217.
- Lacasse, Y., Israël, A.E., Laviolette, M., Cormier, Y., 2004. Clinical and immunopathological aspects of hypersensitivity pneumonitis. *Revue des maladies respiratoires* 21, 769-781.

- Lacasse, Y., Selman, M., Costabel, U., Dalphin, J.-C., Ando, M., Morell, F., Erkinjuntti-Pekkanen, R., ler, N., Colby, T.V., Schuyler, M., 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 168, 952-958.
- Lacasse, Y., Selman, M., Costabel, U., Dalphin, J.-C., Morell, F., Erkinjuntti-Pekkanen, R., Mueller, N.L., Colby, T.V., Schuyler, M., Jomphe, V., 2009. Classification of hypersensitivity pneumonitis. *International archives of allergy and immunology* 149, 161-166.
- Longbottom, J.L., 1989. Pigeon breeder's disease: quantitative immunoelectrophoretic studies of pigeon bloom antigen. *Clinical & Experimental Allergy* 19, 619-624.
- Lopata, A., Schinkel, M., 2004. Evaluating allergic responses to bird allergens. *Current Allergy and clinical immunology* 17, 87-90.
- Lopez, M., Salvaggio, J.E., 1987. Epidemiology of hypersensitivity pneumonitis/allergic alveolitis. *Monographs in allergy* 21, 70.
- M Caillaud, D., M Vergnon, J., Madroszyk, A., M Melloni, B., Murriss, M., C Dalphin, J., 2012. Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139 patients. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)* 11, 15-19.
- Magee, A.L., Montner, S.M., Husain, A., Adegunsoye, A., Vij, R., Chung, J.H., 2016. Imaging of Hypersensitivity Pneumonitis. *Radiologic Clinics of North America* 54, 1033-1046.
- Makinodan, K., Yoshikawa, M., Fukuoka, A., Yoshimoto, E., Tamaki, S., Tomoda, K., Hamada, K., Kimura, H., 2005. A familial case of summer-type hypersensitivity pneumonitis possibly associated with bird breeder's lung diagnosed by bronchoalveolar lavage fluid. *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi= the journal of the Japanese Respiratory Society* 43, 693-699.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., Roitt, I., 2007. *Immunologie*, Elsevier Masson ed, Paris.
- Mashio, K., Fukushima, Y., Oomi, F., Umetsu, T., Yoshida, N., Ikeda, N., Hirata, H., Sugiyama, K., Fukuda, T., 2013. Involvement of Bird-related IgG Antibodies in Interstitial Pneumonia. *Dokkyo journal of medical sciences* 40, 39-46.
- Matsuse, T., Hayashi, S., Kuwano, K., Keunecke, H., Jefferies, W.A., Hogg, J.C., 1992. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. *Am Rev Respir Dis* 146, 177-184.
- McCluskey, J.D., Haight, R.R., Brooks, S.M., 2002. Cockatiel-induced hypersensitivity pneumonitis. *Environmental health perspectives* 110, 735.
- McCormick, D.J., Fredricks, W.W., Tebo, T.H., Calvinico, N.J., 1982. The antigens of pigeon breeder's disease. VII. Isoelectric focusing studies on unfractionated pigeon dropping extract. *The Journal of Immunology* 129, 1493-1498.
- McCormick, D.J., Fredricks, W.W., Tebo, T.H., Calvinico, N.J., 1984. Enzyme antigens associated with pigeon breeder's disease. II. Isolation and characterization of acidic hydrolases. *Journal of protein chemistry* 3, 309-325.
- McSharry, C., Anderson, K., Bourke, S.J., Boyd, G., 2002. Takes your breath away—the immunology of allergic alveolitis. *Clinical & Experimental Immunology* 128, 3-9.
- McSharry, C., Anderson, K., Boyd, G., 2000. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clinical and Experimental Allergy* 30, 1221-1229.
- McSharry, C., Banham, S., Boyd, G., 1985. Effect of cigarette smoking on the antibody response to inhaled antigens and the prevalence of extrinsic allergic alveolitis among pigeon breeders. *Clinical & Experimental Allergy* 15, 487-494.
- McSharry, C., Banham, S.W., Lynch, P.P., Boyd, G., 1984. Antibody measurement in extrinsic allergic alveolitis. *European journal of respiratory diseases* 65, 259-265.

- McSharry, C., Dye, G.M., Ismail, T., Anderson, K., Spiers, E.M., Boyd, G., 2006. Quantifying serum antibody in bird fanciers' hypersensitivity pneumonitis. *BMC pulmonary medicine* 6, 16.
- McSharry, C., Lynch, P.P., Banham, S.W., Boyd, G., 1983. Seasonal variation of antibody levels among pigeon fanciers. *Clinical & Experimental Allergy* 13, 293-299.
- Millon, L., Roussel, S., Rognon, B., Quadroni, M., Salamin, K., Reboux, G., Barrera, C., Fellrath, J.-M., Aubert, J.D., Dalphin, J.-C., 2012. *Aspergillus* species recombinant antigens for serodiagnosis of farmer's lung disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130, 803-805.
- Miyazaki, Y., Tsutsui, T., Inase, N., 2016. Treatment and monitoring of hypersensitivity pneumonitis. *Expert review of clinical immunology* 12, 953-962.
- Molyneaux, P.L., Jacob, J., Chakrabarti, A., Devaraj, A., Chua, F., 2016. Hypersensitivity Pneumonitis. *Clinical Pulmonary Medicine* 23, 136-141.
- Morais, A., Winck, J.C., Delgado, I., Palmares, M.C., Fonseca, J., e Sá, J.M., Marques, J.A., 2004. Suberosis and bird fancier's disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles. *Journal of investigational allergology and clinical immunology* 14, 26-33.
- Morell, F., Roger, A., Reyes, L., Cruz, M.J., Murio, C., Munoz, X., 2008. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. *Medicine* 87, 110-130.
- Morell, F., Villar, A., Montero, M.-Á., Muñoz, X., Colby, T.V., Pipvath, S., Cruz, M.-J., Raghu, G., 2013. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective case-cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* 1, 685-694.
- Morell, F., Villar, A., Ojanguren, I., Muñoz, X., Cruz, M.-J., 2016. Hypersensitivity Pneumonitis: Challenges in Diagnosis and Management, Avoiding Surgical Lung Biopsy, *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers, pp. 395-405.
- Morris, G., Anderson, K., McSharry, C., Boyd, G., 1994. Gravimetric determination of dust and antigen exposure in pigeon breeders. *The Annals of Occupational Hygiene* 38, 919-922.
- Muñoz, X., Sánchez-Ortiz, M., Torres, F., Villar, A., Morell, F., Cruz, M.-J., 2014. Diagnostic yield of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *European Respiratory Journal* 44, 1658-1665.
- Nademi, Z., Todryk, S., Baldwin, C., 2013. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. *Molecular immunology* 54, 227-232.
- Ohtani, Y., Kojima, K., Sumi, Y., Sawada, M., Inase, N., Miyake, S., Yoshizawa, Y., 2000. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *CHEST Journal* 118, 1382-1389.
- Ohtani, Y., Saiki, S., Sumi, Y., Inase, N., Miyake, S., Costabel, U., Yoshizawa, Y., 2003. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 90, 604-610.
- Ojanguren, I., Cruz, M.J., Villar, A., Barrecheguren, M., Morell, F., Muñoz, X., 2016. Utility of Exhaled Nitric Oxide Fraction for the Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. *Lung* 194, 75-80.
- Okamoto, T., Fujii, M., Furusawa, H., Tsuchiya, K., Miyazaki, Y., Inase, N., 2015. The usefulness of KL-6 and SP-D for the diagnosis and management of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory medicine* 109, 1576-1581.
- Okamoto, T., Miyazaki, Y., Ogura, T., Chida, K., Kohno, N., Kohno, S., Taniguchi, H., Akagawa, S., Mochizuki, Y., Yamauchi, K., 2013a. A nationwide epidemiological survey of chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan. *Respiratory investigation* 51, 191-199.
- Okamoto, T., Miyazaki, Y., Tomita, M., Tamaoka, M., Inase, N., 2013b. A familial history of pulmonary fibrosis in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiration* 85, 384-390.

- Partridge, S.J., Pepperell, J.C., Forrester-Wood, C., Ibrahim, N.B., Raynal, A., Swinburn, C.R., 2004. Pheasant rearer's lung. *Occup Med (Lond)* 54, 500-503.
- Patel, A.M., Ryu, J.H., Reed, C.E., 2001. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *Journal of allergy and clinical immunology* 108, 661-670.
- Patterson, R., Schatz, M., Fink, J.N., DeSwarte, R.S., Roberts, M., Cugell, D., 1976. Pigeon breeders' disease: I. Serum immunoglobulin concentrations; IgG, IgM, IgA and IgE antibodies against pigeon serum. *The American journal of medicine* 60, 144-151.
- Pereira, C.A.C., Gimenez, A., Kuranishi, L., Storrer, K., 2016. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Journal of asthma and allergy* 9, 171.
- Pérez, E.R.F., Swigris, J.J., Forssén, A.V., Tourin, O., Solomon, J.J., Huie, T.J., Olson, A.L., Brown, K.K., 2013. Identifying an inciting antigen is associated with improved survival in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *CHEST Journal* 144, 1644-1651.
- Pérez-Padilla, R., Salas, J., Chapela, R., Sánchez, M., Carrillo, G., Pérez, R., Sansores, R., Gaxiola, M., Selman, M., 1993. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *American Review of Respiratory Disease* 148, 49-49.
- Quirce, S., Vandenplas, O., Campo, P., Cruz, M., Blay, F.d., Koschel, D., Moscato, G., Pala, G., Raulf, M., Sastre, J., 2016. Occupational hypersensitivity pneumonitis: an EAACI position paper. *Allergy* 71, 765-779.
- Ramirez-Venegas, A., Sansores, R.H., Perez-Padilla, R., Carrillo, G., Selman, M., 1998. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158, 862-869.
- Reboux, G., Dalphin, J.C., 2003. Précipitines dans les pneumopathies d'hypersensibilité: techniques, indications, limites. *Revue des maladies respiratoires* 20, 140-143.
- Reed, C.E., Sosman, A., Barbee, R.A., 1965. Pigeon-breeders' lung: a newly observed interstitial pulmonary disease. *Jama* 193, 261-265.
- Reynaud, C., Slosman, D.O., Polla, B.S., 1990. Precipitins in bird breeder's disease: how useful are they? *European Respiratory Journal* 3, 1155-1161.
- Reynolds, S.P., Edwards, J.H., Jones, K.P., Davies, B.H., 1991. Immunoglobulin and antibody levels in bronchoalveolar lavage fluid from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. *Clinical & Experimental Immunology* 86, 278-285.
- Richerson, H.B., Bernstein, I.L., Fink, J.N., Hunninghake, G.W., Novey, H.S., Reed, C.E., Salvaggio, J.E., Schuyler, M.R., Schwartz, H.J., Stechschulte, D.J., 1989. Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis: report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 84, 839-844.
- Rodrigo, M.J., Benavent, M.I., Cruz, M.J., Rosell, M., Murio, C., Pascual, C., Morell, F., 2000. Detection of specific antibodies to pigeon serum and bloom antigens by enzyme linked immunosorbent assay in pigeon breeder's disease. *Occupational and environmental medicine* 57, 159-164.
- Rodrigo, M.J., Postigo, I., Wangenstein, O., Guisantes, J.A., Martínez, J., 2010. A new application of Streptavidin ImmunoCAP® for measuring IgG antibodies against non-available commercial antigens. *Clinica Chimica Acta* 411, 1675-1678.
- Rognon, B., Barrera, C., Monod, M., Valot, B., Roussel, S., Quadroni, M., Jouneau, S., Caillaud, D., Fellrath, J.-M., Dalphin, J.-C., 2016. Identification of Antigenic Proteins from *Lichtheimia corymbifera* for Farmer's Lung Disease Diagnosis. *Plos one* 11, e0160888.
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.C., Bardonnnet, K., Millon, L., Piarroux, R., 2004. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occupational and environmental medicine* 61, e3-e3.

- Roussel, S., Rognon, B., Barrera, C., Reboux, G., Salamin, K., Grenouillet, F., Thaon, I., Dalphin, J.-C., Tillie-Leblond, I., Quadroni, M., 2011. Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 150-156.
- Rouzet, A., Reboux, G., Rognon, B., Barrera, C., De Vuyst, P., Dalphin, J.-C., Millon, L., Roussel, S., 2014. Immunogenic Proteins Specific to Different Bird Species in Bird Fancier's Lung. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77, 724-730.
- Rutt, A., 2012. Hypersensitivity Pneumonitis: An Occupational Hazard. *The Journal for Nurse Practitioners* 8, 399-405.
- Rylander, R., Goto, H., Yuasa, K., Fogelmark, B., Polla, B., 1994. Bird Droppings Contain Endotoxin and (1→3)-Beta-D-Glucan. *International archives of allergy and immunology* 103, 102-104.
- Sander, I., Kespohl, S., Merget, R., Goldscheid, N., Degens, P.O., Brüning, T., Raulf-Heimsoth, M., 2005. A new method to bind allergens for the measurement of specific IgE antibodies. *International archives of allergy and immunology* 136, 39-44.
- Sansores, R., Perez-Padilla, R., Selman, M., 1992. Exponential analysis of the lung pressure-volume curve in patients with chronic pigeon-breeder's lung. *CHEST Journal* 101, 1352-1356.
- Schuyler, M., Cormier, Y., 1997. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *CHEST Journal* 111, 534-536.
- Scribner, G.H., Barboriak, J.J., Fink, J.N., 1980. Prevalence of precipitins in groups at risk of developing hypersensitivity pneumonitis. *Clinical & Experimental Allergy* 10, 91-95.
- Selman, M., Lacasse, Y., Pardo, A., Cormier, Y., 2010. Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7, 229-236.
- Selman, M., Pardo, A., King Jr, T.E., 2012. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186, 314-324.
- Selman, M., Terán, L., Mendoza, A., Camarena, A., Martinez-Cordero, E., Lezama, M., Rubio, H.M., 1987. Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population. *Clinical immunology and immunopathology* 44, 63-70.
- Sennekamp, J., Lange, G., Nerger, K., Berdel, D., Meier-Sydow, J., 1981. Human antibodies against antigens of the sparrow, blackbird, weaver finch, canary, budgerigar, pigeon and hen using the indirect immunofluorescent technique. *Clinical & Experimental Allergy* 11, 375-384.
- Sforza, G.G.R., Marinou, A., 2017. Hypersensitivity pneumonitis: a complex lung disease. *Clinical and Molecular Allergy* 15, 6.
- Shapiro, M.D., Kronenberg, Z., Li, C., Domyan, E.T., Pan, H., Campbell, M., Tan, H., Huff, C.D., Hu, H., Vickrey, A.I., 2013. Genomic diversity and evolution of the head crest in the rock pigeon. *Science* 339, 1063-1067.
- Sharma, O.P., 2013. Hypersensitivity Pneumonitis, in: P, S.O. (Ed.). Jaypee Brothers. Medical Publishers, p. 177.
- Shirai, T., Furusawa, H., Furukawa, A., Ishige, Y., Uchida, K., Miyazaki, Y., Eishi, Y., Inase, N., 2017. Protein antigen of bird-related hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping. *Respiratory Research* 18, 65.
- Simpson, C., Shirodaria, P.V., Evans, J.P., Simpson, D.I., Stanford, C.F., 1992. Comparison of immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay in the detection of abnormal antibodies in pigeon breeder's disease. *Journal of clinical pathology* 45, 490-493.
- Solaymani-Dodaran, M., West, J., Smith, C., Hubbard, R., 2007. Extrinsic allergic alveolitis: incidence and mortality in the general population. *Qjm* 100, 233-237.

- Soumagne, T., Reboux, G., Degano, B., Dalphin, J.C., 2016. Hypersensitivity pneumonitis in a beautician. *American journal of industrial medicine* 59, 1041-1045.
- Spagnolo, P., Rossi, G., Cavazza, A., Bonifazi, M., Paladini, I., Bonella, F., Sverzellati, N., Costabel, U., 2014. Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 25, 237-250.
- Sterclova, M., Vasakova, M., Metlicka, M., 2011. Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: serological methods in EAA. *Revista portuguesa de pneumologia* 17, 253-259.
- Suhara, K., Miyazaki, Y., Okamoto, T., Yasui, M., Tsuchiya, K., Inase, N., 2014. Utility of immunological tests for bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Investigation*.
- Takao, T., Hanehira, T., Zenke, Y., Shikama, J., Igei, H., Inoue, E., Yoshizawa, Y., 2009. The sequential changes of the serum levels of KL-6, SP-D, and DLCO were followed for a long term in a case of acute bird fancier's lung. *Arerugi=[Allergy]* 58, 1433-1440.
- Tateishi, T., Ohtani, Y., Takemura, T., Akashi, T., Miyazaki, Y., Inase, N., Yoshizawa, Y., 2011. Serial high-resolution computed tomography findings of acute and chronic hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigen. *Journal of computer assisted tomography* 35, 272-279.
- Tauer-Reich, I., Fruhmman, G., Czuppon, A., Baur, X., 1994. Allergens causing bird fancier's asthma. *Allergy* 49, 448-453.
- Tebo, T.H., Moore, V.L., Fink, J.N., 1977. Antigens in pigeon breeder's disease: the use of pigeon dropping antigens in detecting antibody activity. *Clinical allergy* 7, 103-108.
- Terho, E., Heinonen, O., Lammi, S., Laukkanen, V., 1986. Incidence of clinically confirmed farmer's lung in Finland and its relation to meteorological factors. *European journal of respiratory diseases. Supplement* 152, 47-56.
- Terho, E.O., 1986. Diagnostic criteria for farmer's lung disease. *American Journal of Industrial Medicine* 10, 329-329.
- Terho, E.O., Husman, K., Vohlonen, I., Rautalahti, M., Tukiainen, H., 1985. Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers. *Allergy* 40, 23-26.
- Thomeer, M.J., Costabel, U., Rizzato, G., Poletti, V., Demedts, M., 2001. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. *European Respiratory Journal* 18, 114s-118s.
- Todd, A., Coan, R., Allen, A., 1993. Pigeon breeders' lung; IgG subclasses to pigeon intestinal mucin and IgA antigens. *Clinical & Experimental Immunology* 92, 494-499.
- Todd, A., Coan, R.M., Allen, A., 1991. Pigeon breeders' lung: pigeon intestinal mucin, an antigen distinct from pigeon IgA. *Clinical & Experimental Immunology* 85, 453-458.
- Tsutsui, T., Miyazaki, Y., Kuramochi, J., Uchida, K., Eishi, Y., Inase, N., 2015. The Amount of Avian Antigen in Household Dust Predicts the Prognosis of Chronic Bird-related Hypersensitivity Pneumonitis. *Annals of the American Thoracic Society* 12, 1013-1021.
- Uzun, O., Yilmaz, D.K., Sunter, A.T., Erkan, L., 2011. The Prevalence of "Pigeon Breeder's Disease" in a Turkish City and Review of the Literature. *Lung* 189, 243-250.
- Van Hoeyveld, E., Dupont, L., Bossuyt, X., 2006. Quantification of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* and pigeon antigens by ImmunoCAP technology: an alternative to the precipitation technique? *Clinical chemistry* 52, 1785-1793.
- Vasakova, M., Morell, F., Walsh, S., Leslie, K., Raghu, G., 2017. Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. *American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine*.

Woge, M.J., Ryu, J.H., Moua, T., 2017. Diagnostic implications of positive avian serology in suspected hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Medicine* 129, 173-178.

Yang, J.P.S., Purtilo, D.T., 1975. Pigeon breeders' disease: Immunofluorescent localization of sensitizing antigens in pigeon. *Clinical immunology and immunopathology* 4, 46-51.

Yoshizawa, Y., Miyake, S., Sumi, Y., Hisauchi, K., Sato, T., Kurup, V.P., the technical assistance of Kiyomi, W., 1995. A follow-up study of pulmonary function tests, bronchoalveolar lavage cells, and humoral and cellular immunity in bird fancier's lung. *Journal of allergy and clinical immunology* 96, 122-129.

Identification des protéines antigéniques impliquées dans la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux.

Résumé : Les maladies allergiques constituent une part importante des préoccupations de santé publique. Parmi elles, la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux (PEO) est une pathologie respiratoire liée à l'inhalation répétée de protéines antigéniques, localisées dans les fientes, les plumes et les squames des oiseaux. Actuellement, on connaît peu de chose sur la nature des antigènes impliqués dans la maladie. La mise en évidence d'immunoglobulines G (IgG) spécifiques des agents étiologiques est un élément important dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique. L'objectif de la thèse est d'identifier les protéines antigéniques de pigeon et de les produire par génie génétique afin de développer un test sérologique efficace et standardisé de type ELISA. L'approche immuno-protéomique développée combine l'utilisation d'analyses sérologiques (western blot, ELISA) et l'identification par spectrométrie de masse des protéines antigéniques et des protéines totales (shotgun) des fientes, squames et sérum de pigeon. Ainsi, 14 protéines antigéniques principalement localisées dans les fientes et les squames de pigeon ont été identifiées et 2 protéines recombinantes ont été produites, puis testées en ELISA. Les protéines recombinantes Immunoglobulin-lambda-like polypeptide-1 et Proprotéinase E sont très performantes pour le diagnostic sérologique du PEO avec une spécificité et une sensibilité respectives de 100% et 84%. Des protéines orthologues, potentiellement impliquées dans les réactions antigéniques croisées ont été identifiées à partir des fientes de perruche et de poule. Ce travail a permis d'identifier les protéines antigéniques des fientes de pigeon, d'apporter des précisions sur leur localisation, et de développer des antigènes recombinants standardisés et performants pour améliorer le diagnostic sérologique du PEO. Des études complémentaires, sur des modèles animaux et cellulaires, devront être menées pour explorer l'implication de ces protéines dans l'induction de la maladie.

Mots-clés : Maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux, Immuno-protéomique, Antigènes recombinants, Shotgun, Diagnostic sérologique, ELISA.

Identification of antigenic proteins involved in bird fancier's lung.

Abstract: Allergic diseases represent one of the most important public health concerns. Among them, Bird Fancier's Lung disease (BFL) is a respiratory illness associated with repeated inhalation of antigenic proteins, present in bird droppings, feathers and blooms. Currently, little is known about the nature of the antigens involved in the disease. The detection of immunoglobulin G (IgG) specific etiologic agents is an important factor in diagnostic and therapeutic management. The objective of this thesis is to identify the antigenic proteins of pigeons and to produce them by genetic engineering in order to develop an effective and standardized ELISA-type serological test. The immuno-proteomic approach created combines the use of serological analyses (western blot, ELISA) and the identification by mass spectrometry of antigenic proteins and total proteins (shotgun) of pigeon droppings, blooms and serum. Thus, 14 antigenic proteins mainly located in droppings and blooms were identified, and 2 recombinant proteins were produced and then tested with ELISA. The recombinant proteins Immunoglobulin-lambda-like polypeptide-1 and Proproteinase E are highly effective for the serological diagnosis of BFL, with specificity and sensitivity rates of 100% and 84%, respectively. Orthologous proteins potentially involved in cross-antigen reactions were identified from budgerigar and hen droppings. This work made it possible to identify the antigenic proteins of pigeon droppings, to provide further details on their location, and to develop standardized and efficient recombinant antigens to improve the serological diagnosis of BFL. Additional studies on animals and cell models will be needed to explore the role of these proteins in the induction of the disease.

Keywords: Bird fancier's lung, Immuno-Proteomics, Recombinant antigens, Shotgun, Serological Diagnosis, ELISA.