



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE/GENERAL REVIEW

Sérologie aspergillaire, d'hier à aujourd'hui pour demain

Aspergillus serology, from yesterday to today for tomorrow

F. Persat ^{a,*,b}

^a Service paludisme parasites du sang et mycologie médicale, hôpital de la Croix-Rousse, hospices civils de Lyon, 103, Grande Rue de la Croix-Rousse, 69137 Lyon, France

^b EA 41-69, fonctions normales et pathologiques de la barrière cutanée, université Claude-Bernard Lyon-I, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France

Reçu le 10 janvier 2012 ; accepté le 12 janvier 2012

Disponible sur Internet le 22 février 2012

MOTS CLÉS

Aspergillus ;
Sérologie ;
Sérodiagnostic ;
Immunoélectrophorèse ;
Elisa ;
Anticorps ;
Antigènes

KEYWORDS

Aspergillus ;
Serology ;
Serodiagnosis ;
Immunoelectrophoresis ;
Elisa ;
Antibodies ;
Antigens

Résumé La détection des anticorps anti-*Aspergillus* est réalisée depuis plus de 50 ans pour le diagnostic de différentes pathologies aspergillaires d'évolution chronique, comme l'aspergillome puis, plus tard, l'aspergillose chronique nécrosante. Elle fait aussi partie des critères de définition de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique. Cette recherche est indiquée pour le diagnostic initial de la maladie aspergillaire et son suivi, que ce soit l'évolution sous traitement ou la détection de rechutes. Son intérêt est limité pour le diagnostic des aspergilloses invasives aiguës, face à la détection des antigènes galactomannanes. Les résultats sérologiques pour un patient donné doivent être, comme d'habitude, interprétés en fonction de sa clinique et des autres données disponibles (imagerie, biologie dont la mycologie). Le but de cette revue est de faire le point sur les progrès réalisés depuis les origines et sur la place actuelle de la sérologie aspergillaire dans les laboratoires de diagnostic en France, suite à différentes enquêtes. Enfin, les améliorations prévisibles seront évoquées.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Anti-*Aspergillus* antibody detection has been performed for over 50 years for the diagnosis of different chronic *Aspergillus* infections, starting with aspergilloma and later with chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. It also enters into definition criteria for allergic broncho-pulmonary aspergillosis and contributes to the initial diagnosis of the aspergillosis, to the follow-up under treatment or to the detection of exacerbations. For the acute invasive aspergillosis, antibody detection has low interest compared to galactomannan antigen detection. Serology results have to be interpreted together with other clinical, radiological and biological, mycological criteria. This review describes the origins, the technical evolutions and the current place of *Aspergillus* serology in France. Finally, future improvements are discussed.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : florence.persat@chu-lyon.fr.

Introduction

La sérologie aspergillaire correspond à la détection des anticorps dans le sérum des patients, le terme sérodiagnostic recouvrant, en plus, la recherche d'antigènes ou d'autres molécules d'origine fongique dans le sérum. Le sérodiagnostic aspergillaire intervient, parmi les éléments cliniques et biologiques, comme argument dans le diagnostic des infections aspergillaires. Ces pathologies sont surtout pulmonaires, la contamination se faisant par inhalation de spores, d'où l'importance de l'imagerie pulmonaire dans le diagnostic.

Parmi les *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus* est le principal agent des aspergilloses humaines. Les pathologies aspergillaires sont associées à différents types de patients, en fonction de leur état immunitaire : ceux qui ont une immunité exacerbée et ceux qui ont une immunité locale ou générale diminuée. Schématiquement, les premiers pourront faire une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Les seconds pourront présenter des formes chroniques, comme l'aspergillome, ou des formes aiguës, comme l'aspergillose pulmonaire invasive (API) qui peut mettre rapidement en jeu la vie du patient (Fig. 1). La fréquence des aspergilloses a augmenté parallèlement avec le nombre de patients à risque, en raison d'une meilleure survie des patients face aux infections bactériennes et du recours à des traitements immunosuppresseurs plus longs et plus sévères, en particulier dans les services d'hématologie. Le sérodiagnostic aspergillaire, parmi l'ensemble des moyens disponibles, aide à décider de la mise en route d'un traitement. D'autres buts seront de suivre l'efficacité de ce traitement et de surveiller le patient pour détecter de nouveaux épisodes de la maladie.

Le but de cet article est de faire le point sur les progrès techniques réalisés depuis les origines et sur la place actuelle de ce sérodiagnostic fongique dans les laboratoires de diagnostic en France. Enfin, les améliorations futures prévisibles seront évoquées.

Années « précipitines »

Notre connaissance du sérodiagnostic des aspergilloses découle de résultats d'études souvent rétrospectives et parfois anciennes. Les aspergilloses étaient occasionnellement décrites avant les années 1950 [7]. Puis, l'application

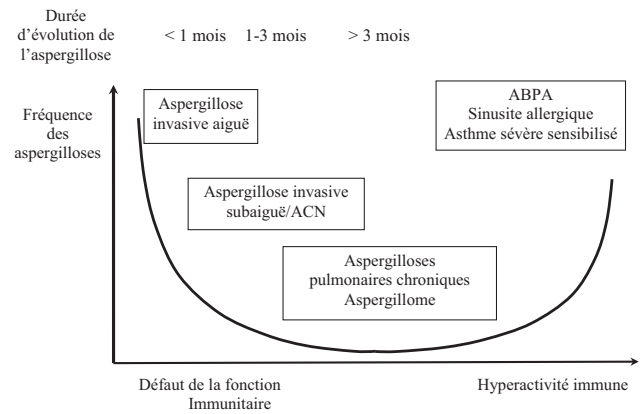


Figure 1 Différents types d'aspergilloses, avec leur durée d'évolution, en fonction de l'état immunitaire du patient. *Different types of aspergilloses with their evolution lengths in function of the patient's immune state.* Reproduit avec la permission de DW Denning [20], d'après les travaux de Casadevall et Pirofski [12].

de techniques sérologiques de précipitation comme la double immunodiffusion (DID) [50] et l'immunoélectrophorèse (IEP) [27] ont permis d'améliorer la détection des anticorps anti-aspergillaires chez les patients et donc le diagnostic.

Les premières études sur les sérums de patients ayant des aspergillomes ont été rapportées en 1964 par Longbottom et al., d'une part [46,47], et Biguet et al., d'autre part [8]. Les premiers ont rapporté que l'immunoélectrophorèse était bien plus sensible que la DID avec 56 sérums positifs au lieu de zéro, chez 57 patients ayant un aspergillome détecté radiologiquement. De plus, le nombre des arcs par immunoélectrophorèse était important, variant de six à 20.

Biguet et al. [8] détectaient des précipitines dans 40 sur 43 aspergillomes (dont 18 avaient été opérés). En parallèle, 22 contrôles ne présentaient pas de précipitines. Lors d'une étude sur 100 sérums de patients avec un aspergillome prouvé ou très suspecté [68], ce groupe d'auteurs avaient identifié les arcs de précipitation observés par IEP en fonction de leur position (Fig. 2) en les notant par des lettres depuis la cathode jusqu'à l'anode. Une bonne vingtaine de précipitines ont été observées, dont quatre plus fréquemment : l'arc C retrouvé dans 100 % des cas, l'arc F (65 % des cas), l'arc J (96 % des cas) et l'arc M (74 % des cas).

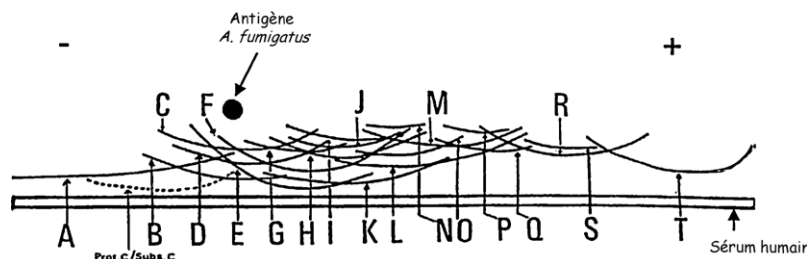


Figure 2 Diagramme immunoélectrophorétique du sérum d'un patient révélant 18 précipitines (plus deux arcs observés occasionnellement dans d'autres diagrammes).

Immunoelectrophoresis diagram of a patient's serum showing 18 precipitins (plus two occasional precipitins observed in other diagrams).

Diagramme présenté en 1966 par Tran Van Ky et al. [68].

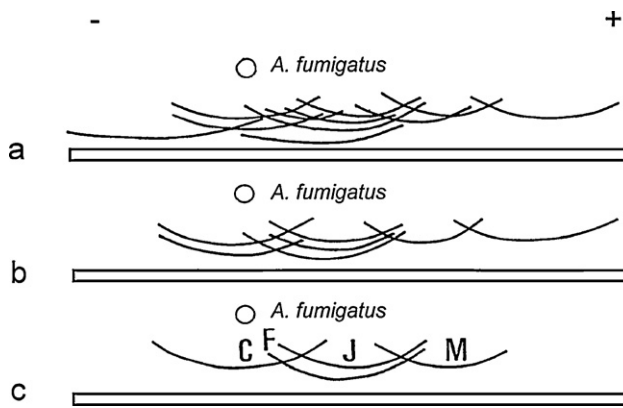


Figure 3 Suivi de l'évolution des anticorps précipitants dans le sérum d'un patient avant et après opération de son aspergillome : a : un mois avant l'opération ; b : deux mois après l'opération ; c : trois mois après l'opération. Les précipitines privilégiées (C, J, F, M) persistent trois mois après l'intervention.

Follow-up of precipitins in a patient's sera before and after surgery for aspergilloma: a: 1 month before surgery; b: 2 months after; c: 3 months after surgery. Only privileged precipitins (C, F, J, M) are persistent 3 months after surgery.

Schémas d'immunoélectrophorèse présentés en 1966 par Tran Van Ky et al. [68].

Ils ont montré aussi que le nombre d'arcs diminuait dans les mois qui suivaient l'opération (Fig. 3). Leur conclusion était que lorsque trois à quatre arcs étaient observés, l'organisme avait bien été imprégné par les antigènes du champignon testé. Ils recommandaient de rester prudent si seulement un ou deux arcs étaient observés, cela traduisant une infestation discrète ou une faible quantité d'anticorps produits. Dans ce dernier cas, un nouveau test sérologique était préconisé 15 jours à trois semaines après, pour voir s'il s'agissait d'une infection évolutive.

Par analogie avec des résultats observés précédemment dans les IEP parasitaires, ils ont recherché des précipitines porteuses d'activité enzymatique. C'est ainsi qu'ils ont détecté les arcs chymotrypsiques. L'arc chymotrypsique I, à double courbure, était présent lorsque plus de dix arcs étaient observés, ce qui était de peu d'utilité pour le diagnostic. En revanche, l'arc chymotrypsique II (à simple courbure) était présent dans tous les sérums des patients avec aspergillome, quel que soit le nombre de précipitines [68]. Cet arc correspond en fait à l'arc C, mentionné précédemment, avec 100 % de fréquence. Leur conclusion est que la présence de l'arc chymotrypsique II indique que l'organisme a eu un contact avec les antigènes d'*A. fumigatus*.

La seconde activité enzymatique, portée par une précipitine, est l'activité catalasique, non spécifique d'*A. fumigatus* [69]. Cette précipitine correspondait à l'arc J mentionné précédemment. Cet arc était observé quand les IEP étaient faites sur un gel d'agarose, ce qui améliorait la sensibilité de la technique par rapport à une simple gélose. Cet arc J en agarose, correspondant à l'arc L déjà observé sur gélose, était toujours présent lorsque l'IEP montrait plus de trois arcs de précipitation.

Pour ces auteurs, lorsque moins de trois arcs sont observés, par sécurité, il convient de faire ces révélations

enzymatiques sur les précipitines. De plus, ces révélations peuvent se faire successivement, avant éventuelle coloration des protéines. Pourtant, sur dix ans d'expérience, ils mentionnent une absence de précipitines une fois sur dix dans les « aspergillose vraies ».

Lors d'un bilan de leur activité diagnostique en Uruguay, Yarzabal et al. [73] ont bien montré la sous-estimation des aspergillose avant l'emploi de tests sérologiques : 22 cas d'aspergillome entre 1947 et 1967, contre 34 nouveaux cas, entre 1968 et 1973, après introduction de ces tests.

Évolution des techniques

Des améliorations ponctuelles de ces techniques de détection des précipitines ont été rapportées, comme la concentration préalable des sérums dans le cas des ABPA, pour retrouver des taux similaires à ceux observés avec les aspergillomes [32]. Dans les années 1970, d'autres techniques de détection des anticorps anti-*Aspergillus* ont été utilisées, comme l'immunofluorescence indirecte (IFI) [22], l'électrosynérèse (ES) [23], l'hémagglutination indirecte (HAI) [66] ou le dosage radio-immunologique (RIA) [51]. Ces techniques apparaissaient plus sensibles, mais la détection des activités enzymatiques spécifiques n'était plus recherchée, sauf, éventuellement, avec l'ES. À la fin des années 1970, Pinon et al. [56] ont décrit l'Enzyme Linked Immuno Electro Diffusion Assay (ELIEDA), avant l'arrivée de l'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Elisa) [61].

Avec l'Elisa, il est possible de traiter de grandes séries de sérums, la technique étant automatisable. Cette technique permet aussi une lecture des absorbances par un (spectro)-photomètre, donc non visuelle. Enfin, c'est une technique qui donne des résultats numériques qui peuvent être rendus soit en quantitatif, soit en qualitatif, par interprétation par rapport à des valeurs seuils. Cela fait que cette technique a longtemps été et est encore parfois considérée comme semi-quantitative, alors qu'il y a une lecture numérique au départ. Souvent une zone « grise » d'incertitude d'interprétation est définie dans cette technique, encore faut-il établir des seuils fiables et reproductibles.

Globalement, avant les années 1980, rares étaient les études portant sur plus de 30 patients avec un type d'aspergillome étiqueté (Tableau 1). Déjà apparaissaient des choix stratégiques différents quant aux pathologies aspergillaires prises en compte et leur définition, aux antigènes et techniques utilisés, et aux sérums témoins testés (témoin « sains » ou avec d'autres pathologies respiratoires...). Les sensibilités rapportées pour la détection des sérums de patients avec aspergillome étaient de l'ordre de 90,2 à 100 %, celles de patients atteints d'aspergillome broncho-pulmonaire (ABPA) de l'ordre de 63,4 à 84,8 % (en prenant en compte les études comprenant plus de dix cas d'ABPA), respectivement.

Choix des antigènes pour la détection des anticorps

Les résultats de recherche d'anticorps anti-aspergillaires sont entièrement dépendants des antigènes correspondants. Au départ, différentes conditions de cultures ont été testées [47]. Le principal paramètre de variation pour l'obtention des antigènes était la durée de cette culture [8].

Tableau 1 Études réalisées avant 1980 portant sur plus de 30 sérums de patients présentant un type d'aspergillose défini. *Studies performed before 1980 on more than 30 sera from patients with defined aspergilloses.*

Technique	Extrait antigénique	ABPA	Aspergillome	« Aspergillose pulmonaire invasive » ^a	Contrôles	
Année [réf]					Autres pathologies pulmonaires	Sujets sains
DID						
1964 [47]	Filtrat	59/93	56/57	—	14/185	0/60
1978 [37]	Filtrat	6/7	202/224	1/1	0/1431	—
IEP						
1966 [68]	Chymotrypsine	—	100/100	—	—	—
	Catalase	—	96/100	—	—	—
1972 [22]	Filtrat + mycélium	5/5	96/99	25/26 ^b	—	0/25
IFI						
1972 [22]	Hyphes	5/5	99/99	26/26	—	0/25
Elisa IgG						
1979 [61]	Protéines + polysaccharides	39/46	12/12	—	—	0/12

D'après Schoenheyder [59].

^a Cas avec des infiltrats aspergillaires pulmonaires inclus (cf. texte).

^b Cent vingt-six patients avec aspergillose sur 130 ont un arc de précipitation avec activité catalase ou chymotrypsine.

Des cultures relativement courtes, de trois semaines, ont été réalisées pour éviter d'avoir des produits de lyse du champignon. Le problème de standardisation des antigènes, toujours d'actualité, était déjà évoqué.

Les recherches ont porté sur les antigènes somatiques provenant d'un broyat du champignon lui-même, mais aussi sur les antigènes métaboliques obtenus par filtrat de culture et contenant les enzymes sécrétées relarguées par *A. fumigatus*.

Les antigènes majeurs avaient été repérés avec des hyperimmunsérums de lapin ou des sérums de patients. Des activités enzymatiques comme la chymotrypsine et la catalase avaient été détectées, comme indiqué précédemment [68,69].

Les activités chymotrypsines d'*A. fumigatus* correspondent à des sérines protéases non classiques, avec des séquences d'acides aminés cibles particulières, les dipeptidylpeptidases (DPPV) IV et V. Elles permettent au champignon d'avoir une source d'acides aminés pour sa croissance. Elles sont présentes dans les conidies et le mycélium et peuvent interagir avec le collagène et d'autres protéines de l'hôte, les dégrader et faciliter l'invasion du champignon chez son hôte. La DPP IV, une glycoprotéine de 95 kDa correspond à l'arc chymotrypsine I décrit précédemment et apparaît après quatre jours de culture. La DPPV, une glycoprotéine de 88 kDa, correspond à l'arc C, donc à l'arc chymotrypsine II. Elle correspond aussi à l'antigène 13 testé en Elisa par Harvey et al. [30]. Elle est sécrétée après sept jours de culture. Elle est détectée dans des arcs de précipitation par IEP, en particulier dans les sérums de patients avec aspergillome, mais moins dans les cas d'aspergillose broncho-pulmonaire [22].

Pour ce qui concerne l'activité catalase, au moins trois activités sont présentes chez *A. fumigatus* : la catalase A (84,5 kDa, homodimère), la catalase 1 ou B (360 kDa, tetramère) et la catalase 2 (82 kDa) qui a aussi une activité

péroxydase. Elles ne sont pas spécifiques de l'espèce et peuvent être produites par *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* et, aussi, *Scedosporium* sp. Elles ont un rôle de détoxification des dérivés oxygénés et permettent un échappement partiel à l'activité phagocytaire des cellules de l'hôte, facilitant la survie d'*A. fumigatus*. Cette activité enzymatique est un antigène majeur pour le diagnostic des aspergillomes, des ABPA ou en cas d'infiltrat pulmonaire aspergillaire.

Une troisième activité enzymatique remarquable est la RNase, ribonucléotoxine ou mitogilline, Ag 3, proche de l'allergène Asp f1 [72], de 18 kDa, spécifique d'*A. fumigatus*. Cette activité est hautement exprimée lors d'une croissance active du champignon. Elle agit sur la sous-unité 28S de l'ARN ribosomal conduisant à une inhibition de la synthèse des protéines de l'hôte. Des anticorps dirigés contre cette enzyme apparaissent précocement dans un modèle d'aspergillose chez les lapins [43]. Dans une autre étude sur 35 ABPA (patients atteints de mucoviscidose ou non), 30 présentaient des IgE anti-mitogilline [3].

Ainsi, ces enzymes ont été séquencées, des protéines recombinantes ont été réalisées et certaines ont été testées pour la détection des anticorps correspondant à des fins diagnostiques (mitogilline [72] ; catalases, RNase, DPPV [57]). Ces derniers auteurs ont aussi rapporté que le taux d'anticorps dirigé contre chaque antigène varie chez un patient et que l'antigène majeur pour le diagnostic est souvent différent selon les patients. Ainsi, la DPPV n'est discriminante pour l'ABPA que chez les patients ayant une mucoviscidose [57].

D'autres constituants de la paroi fongique, les galactomannanes (GM) font partie des antigènes circulant dans le sang des patients en cas d'aspergilloses invasives. Ils sont libérés de cette paroi quand le champignon est en croissance [41], et sont retrouvés aussi dans les filtrats de culture. Ils sont présents dans les antigènes glycoprotéiques 7 et 13. La

recherche d'anticorps anti-extrait mycélien [24] a montré, par western-blot, que, sur 38 sérums de patients avec une aspergillose invasive (172 sérums, plusieurs à *A. flavus*), 90 % réagissaient avec des glycoprotéines de 58 kDa. Ces glycoprotéines sont présentes dans la paroi du champignon et perdent 50 % de leur activité immunologique après action de la pronase et 100 % après périodate de sodium, montrant l'importance de la partie saccharidique dans cette réaction immunologique.

Un Elisa utilisant comme antigène l'Afmp1, une galactomannoprotéine recombinante purifiée d'*A. fumigatus*, détectait des anticorps chez les neuf sérums de patients avec aspergillome [14]. En revanche, la recherche des anticorps anti-GM eux-mêmes n'a montré que 26 % de positifs en Elisa sur 118 sérums de 57 patients avec aspergillomes (sérums tous positifs en DID et HAI) [42]. Au final, les études portant sur les différents antigènes ont favorisé la commercialisation de kits Elisa pour le diagnostic des aspergillooses.

Choix de la classe d'anticorps à détecter

Les types d'anticorps à détecter ont fait aussi l'objet de recherches. Les techniques comme l'IEP font intervenir des anticorps précipitants, d'autres, comme l'Elisa, permettent la recherche de différentes classes d'immunoglobulines. La correspondance entre ces deux techniques n'est pas totale : tous les anticorps précipitants ne se fixent pas sur les plaques Elisa, inversement d'autres anticorps peuvent être fixés [35]. Pour ce qui est des classes d'immunoglobulines elles-mêmes, Pinon et al. [56] rapportaient, en 1978, que les IgA étaient fréquemment retrouvées. L'intérêt de leur détection est controversé, les titres d'IgG étant plus élevés que ceux des IgA [54]. Enfin, les IgM n'ont pas semblé avoir grand d'intérêt [58].

En 1987, Brummund et al. [11] ont testé, comme antigène, un filtrat de culture par BALISA (Elisa avec amplification avidine-biotine) avec des sérums de 13 patients avec ABPA, 12 avec aspergillomes, neuf avec un asthme et test cutané positif et neuf patients normaux. Les différentes classes d'immunoglobulines IgE, IgD, IgG, IgA et IgM ont été testées. Dans l'ABPA, toutes les classes d'immunoglobulines étaient augmentées. La recherche d'IgG et d'IgE permettait de différencier l'ABPA de l'aspergillome : pour l'ABPA, 100 % de patients avaient des IgG anti-aspergillaires et 85 % des IgE, pour les aspergillomes, 100 % avaient des IgG, mais seulement 16 % des IgE. Les IgD et IgA apparaissaient comme une aide éventuelle dans le diagnostic d'ABPA pour différencier les patients asthmatiques des patients sains. Pourtant, les IgE, IgG et IgA spécifiques d'allergènes recombinants ont moins d'utilité dans le diagnostic des ABPA chez des patients atteints de mucoviscidose, que chez les autres patients [39].

Une autre étude [63], sur 238 patients atteints de mucoviscidose, a montré des valeurs plus élevées des différentes classes d'IgG, sauf les IgG3, chez les patients avec ABPA, par rapport aux patients colonisés par *A. fumigatus*, mais sans ABPA, eux-mêmes avec des valeurs plus élevées par rapport aux sujets sains.

Dans l'étude sur l'Elisa mitogilline, lors du suivi d'aspergillooses disséminées, les IgA étaient détectées dans moins d'épisodes que les IgG. Il a aussi été observé une baisse des IgG juste avant la mort d'un patient [72].

En pratique, ce sont principalement les IgG et les IgE anti-*Aspergillus fumigatus* qui sont recherchées. Les premières sont recherchées habituellement par les laboratoires de mycologie, les secondes sont souvent dosées avec les IgE totales dans les laboratoires d'immunologie ou d'allergologie. En fait, les réponses spécifiques humorales diffèrent considérablement chez les patients selon les formes cliniques d'aspergillooses [38].

Détection sérologique pour les aspergillooses chroniques et les aspergillose broncho-pulmonaire allergique

Notre connaissance du sérodiagnostic des aspergillooses est basée sur des résultats d'études souvent rétrospectives et, comme déjà vu, parfois anciennes portant principalement sur l'aspergillome, l'ABPA et l'aspergillose invasive. Or la définition des différents types d'aspergillooses est complexe, elle évolue et a encore besoin d'uniformisation [2]. Auparavant, les auteurs rapportaient des cas d'aspergillose invasive, chronique invasive ou invasive sub-aiguë lorsque le champignon envahissait les tissus chez des patients atteints de tuberculose ou de sarcoïdose [16]. Ces types d'aspergillose correspondraient plutôt actuellement à des aspergillooses chroniques nécrosantes (ACN), notion apparue en 1982 [9]. Ainsi, dans le Tableau 1, certains cas d'« aspergillose pulmonaire invasive » cités correspondraient plus, eux-aussi, à des ACN.

En 2011, la réflexion sur les définitions des différentes aspergillooses, en particulier pulmonaires chroniques, était toujours en cours [64]. Après une exposition à *Aspergillus*, celui-ci peut persister en colonisant les voies aériennes (nez/sinus) sans provoquer de maladie. Le champignon pourra alors être détecté lors d'examen direct et de mise en culture des prélèvements respiratoires.

Pour les aspergillooses elles-mêmes, différentes formes de maladies peuvent donc être distinguées en séparant les aspergillooses aiguës se développant en moins d'un mois, les ACN se développant entre un et trois mois et les aspergillooses chroniques, de développement plus lent, supérieur à trois mois (Fig. 1) [20]. Schématiquement, pour les aspergillooses se développant en moins d'un mois, c'est la détection des antigènes qui primera, pour les autres, si le patient n'est pas fortement immunodéprimé, c'est la détection des anticorps qui sera importante. Pour les aspergillooses à composante allergique, la recherche des IgE totales et spécifiques s'impose (Tableau 2).

Ainsi, la sérologie aspergillaire, selon Sarfati et al. [57], permet de quantifier la sensibilisation des patients asthmatiques aux allergènes aspergillaires en mesurant le taux d'Ac anti-*Aspergillus*. Chez les patients avec une mucoviscidose, le diagnostic précoce d'une ABPA est nécessaire pour permettre un traitement rapide et éviter une altération irréversible des muqueuses. Huit critères différents interviennent dans ce diagnostic dont un taux élevé d'IgE totales (> 1000 UI/mL), une montée des IgE, IgG et aussi des IgA spécifiques anti-*A. fumigatus* et la présence d'anticorps précipitants [65]. Ces auteurs indiquent de tester d'abord les IgE totales, puis les IgE et IgG spécifiques et les précipitines. Une montée des titres est associée aux phases d'ABPA aiguë et aux exacerbations, une baisse est corrélée avec une

Tableau 2 Critères diagnostiques sérologiques spécifiques pour les différentes aspergilloses.
Specific serological criteria for the diagnosis of the different aspergillosis types.

Terrain clinique du patient	Risque aspergillaire	Critères sérologiques spécifiques à rechercher	Commentaires
Asthme	ABPA	IgE, IgG, spécifiques Précipitines	9 % de patients asthmatiques avec des précipitines [1]
Mucoviscidose	ABPA	IgE, IgG, spécifiques Précipitines (contre l'Ag métabolique) dont l'arc catalasique	Réponse des IgG plus faibles/ aspergillome [61]. Idem pour les précipitines (sauf concentration) [32]. Précipitines chez 69-90 % des cas [1]
Cavité pulmonaire	Aspergillome	IgG spécifiques (IgG1, IgG2) Précipitines (contre l'Ag somatique) dont l'arc chymotrypsique, l'arc catalasique	IgG élevées, nombre élevé d'arcs de précipitation
Immunodépression modérée	ACN (> 1 mois)	IgG spécifiques Précipitines	IgG élevées, 82 % des patients avec montée des IgG [6]
Greffés d'organe solide	API	Anticorps avant la greffe Antigènes GM après la greffe	Ag : variation/type de greffe (56 % de greffés du poumon, 30 % de greffés de foie) [71]
Patients en soins intensifs	API	Antigènes GM	Les stratégies de suivi des Ag sont encore à explorer. Intérêt des anticorps ?
Neutropéniques (hématologie)	API	Antigènes GM	Suivi des Ag codifié. Persistance des Ag, mauvais pronostic, revoir le traitement. Intérêt des anticorps ?

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; ACN : aspergillose chronique nécrosante ; API : aspergillose pulmonaire invasive ; GM : galactomannanes.

amélioration du patient [18]. Cela correspond aux résultats mentionnés précédemment par Schoenheyder et al. [60], pour qui la présence d'*A. fumigatus* dans un crachat associée avec une détection de complexe antigène-anticorps avec activité catalasique n'était pas de bon pronostic chez ces patients. Ils avaient observé de tels complexes chez cinq patients atteints d'ABPA quand il y avait une exacerbation, avec montée des titres d'IgE spécifiques et totales et de précipitines.

Dans une étude rétrospective de 2010 [25], sur 17 ABPA suivies, neuf avaient, au moment du diagnostic, des Elisa positifs. Les neuf présentaient aussi un arc de précipitation porteur de l'activité catalase, cet arc persistant longtemps. Cet arc était toujours présent dans les sérums pour lesquels un arc porteur de l'activité chymotrypsine avait été détecté.

Les patients présentant des cavités pulmonaires après une tuberculose, un cancer du poumon, un emphysème ou une bronchite pulmonaire chronique obstructive (BPCO) sont à surveiller car un aspergillome peut se développer en restant silencieux cliniquement. Un suivi sérologique des IgG et des précipitines (avec leurs activités enzymatiques, en particulier la chymotrypsine) sera alors important à faire, une montée de ces anticorps pouvant traduire le développement d'un aspergillome. Il en est de même chez les patients susceptibles de présenter d'autres formes proches d'aspergilloses pulmonaires chroniques, comme les formes cavitaires et fibrosantes.

Les patients modérément immunodéprimés et sans infection VIH, leucémie ou maladie granulomateuse chronique,

peuvent développer une ACN. D'après Denning et al. [19], celle-ci est caractérisée par une perte de poids et/ou une toux productive et/ou des hémoptysies, une lésion pulmonaire cavitaire avec infiltrats intracavitaires, formation de nouvelles cavités et expansion des cavités au cours du temps. La présence de précipitines anti-*A. fumigatus* entre dans les critères de diagnostics mycologiques de cette aspergillose, comme la mise en évidence du champignon par culture (si d'autres agents pathogènes pulmonaires ne sont pas détectés en parallèle). Il y a aussi augmentation des marqueurs inflammatoires (protéine C réactive, Vs...).

Le problème pour ces aspergilloses est donc de bien définir dans quel cadre entre le patient observé, sachant que si ces définitions se sont affinées au cours du temps, le patient lui-même évolue et peut avoir successivement ou simultanément un aspergillome, une ABPA, une ACN et, en final, une aspergillose invasive.

Détection sérologique dans les aspergilloses invasives

Un consensus sur les critères de définition des infections fongiques invasives dont l'aspergillose invasive n'a été fourni par l'EORTC qu'en 2002 [4], pour les patients immunodéprimés atteints de cancer et receveurs de cellules souches. Ces critères ont ensuite été révisés en 2008 [21] pour élargir la notion des patients susceptibles de présenter une aspergillose invasive en raison de facteurs hôte supplémentaires :

un traitement pour maladie maligne, une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, une greffe d'organe solide, un traitement par corticostéroïdes et autre traitement immunodépresseur, ainsi que les immunodéficiences primaires.

La détection dans le sérum des antigènes de type GM [4], puis celle des glucanes (qui ne sont pas spécifiques d'*Aspergillus*) [21] ont été intégrés parmi les critères microbiologiques de définition de ces API.

Lors de la conférence ECIL 3 [48], les techniques diagnostiques sérologiques, ont été abordées. Un suivi prospectif par les GM dans le sérum des patients neutropéniques ayant une chimiothérapie intensive pour leucémie ou receveurs de greffe allogénique est nécessaire pour diagnostiquer précocement les aspergilloses invasives. Ce suivi doit être réalisé tous les trois à quatre jours pour augmenter la sensibilité et la précocité de détection. Si les antigènes persistent malgré un traitement antifongique, cela est de mauvais pronostic, et il faut revoir le management du patient. La stratégie de suivi des GM est combinée avec des examens par scanner et évaluations clinique et microbiologique. Toujours d'après l'ECIL 3, un index supérieur ou égal à 0,7 ou deux sérums consécutifs avec un index supérieur ou égal à 0,5 implique de faire rapidement un bilan du patient.

Les anticorps sont-ils réellement à écarter pour ces patients ? Les patients avec induction d'une forte immunodépression vont normalement sortir d'aplasie et présenter à nouveau des anticorps. La détection d'anticorps peut alors permettre un diagnostic rétrospectif d'aspergillose invasive [33]. Pour Grillot et al. [28], six sur 17 cas d'AI observés sur plusieurs années avaient présenté une montée d'anticorps ou une séroconversion en IFI et en Elisa. Ces auteurs préconisaient alors une surveillance des anticorps une fois par semaine chez les patients à risque. Une autre étude avait aussi noté que neuf sur 21 patients atteints d'API présentaient un ou deux arcs de précipitation en IEP, incitant à appliquer un seuil de positivité plus faible pour ce type de patients immunodéprimés [10].

Des anticorps peuvent être présents si les patients ont déjà eu des épisodes d'API. Quand la mémoire immune revient, six mois après la greffe, le taux d'anticorps peut remonter [57]. L'absence d'anticorps ou leur baisse est plutôt de mauvais pronostic chez ces patients [40].

L'étude de Weig et al. [72] a montré la détection d'anticorps contre la mitogilline chez 20 patients (82 sérums) ayant une API ou une aspergillose disséminée à d'autres organes. Neuf épisodes positifs (24 sérums) en IgG ont été rapportés, ainsi que six épisodes positifs (dix sérums) en IgA, dont deux épisodes avec des IgG négatives, soit une sensibilité combinée de 55 %. En 2002, Chan et al. [14] montraient de leur côté, à l'aide d'un Elisa utilisant la protéine recombinante Afmp1p, une sensibilité de 33,3 % chez 15 patients avec une API prouvée. En 2004, Kappe et al. [34] rapportaient une détection d'anticorps par Elisa et/ou HAI chez 23 % de ce même type de patients (API prouvée). La détection d'anticorps a aussi été mentionnée comme pouvant expliquer une antigénémie négative [55]. Enfin, lors des tests d'Elisa avec différentes protéines recombinantes [57], il a été mis en évidence deux groupes de patients selon leur taux d'anticorps.

La définition d'API s'est progressivement élargie aux patients non neutropéniques [26], mais la stratégie diagnostique sera différente de celle utilisée pour les patients

neutropéniques. Par exemple, les patients non neutropéniques ont une moins grande probabilité d'avoir des signes cliniques spécifiques d'aspergillose invasive, mais ont souvent des signes de pneumonie intercurrente due à un autre micro-organisme [17]. La technique sérologique de référence reste, a priori, la recherche des antigènes GM, mais leur surveillance en préventif sera plus difficile que dans les services hématologie. Une étude récente de 2011 [31] a testé cette détection de GM, selon différentes stratégies de prélèvements sériques, chez des patients atteints de BPCO. La sensibilité du test restait faible (de 41,7 à 53,8 %), quelle que soit la stratégie, pour une spécificité de 83,3 à 93,5 %. De plus, cet article mentionnait aussi la présence d'anticorps chez trois patients, sur les 13 étudiés, alors que le test GM est négatif. Cornillet et al. [17] avaient calculé la sensibilité de détection des anticorps chez les patients ayant une API : 48 % pour les patients non neutropéniques contre 6,25 % pour les patients neutropéniques sévères. La recherche d'anticorps pourrait donc être indiquée chez ces patients [71].

Le taux d'anticorps anti-aspergillaires sériques présents chez les patients devrait être évalué à leur entrée dans les services d'hématologie ou de soins intensifs, avant éventuel traitement immunosuppresseur, pour définir s'il y a une colonisation ou une infection aspergillaires pré-existantes. Si la détection d'anticorps est positive, cela renforce le risque d'une infection aspergillaire [15], et il convient de faire des recherches mycologiques et/ou des traitements préventifs.

Une synthèse plus précise fait appel à une comparaison de différentes études or, comme indiqué précédemment, les paramètres de ces études sont très variables, tant par les techniques mises en œuvre que par les définitions des cas d'aspergillose et des témoins, ainsi que par les réponses possibles de l'hôte face à l'infection. De plus, les articles actuels sont moins centrés sur ces techniques seules que sur le diagnostic global du patient. Le **Tableau 3** regroupe quelques données extraites d'études récentes. Ces études restent limitées par catégorie d'aspergillose, le nombre de patients concernés est souvent faible, car il est parfois difficile de classer les patients dans une catégorie bien définie. Parmi toutes les techniques de sérodiagnostic aspergillaire spécifiques évoquées, c'est le kit Elisa Platelia *Aspergillus* de la société Biorad pour la recherche d'antigènes GM qui est la plus utilisée et c'est la seule qui a fait l'objet, à notre connaissance, de méta-analyses [45,53].

État des lieux en France

Historiquement, les laboratoires utilisaient leurs propres techniques sérologiques, artisanales et peu coûteuses, avec des antigènes souvent préparés sur place. Les techniques les plus pratiquées en France en 2007, d'après l'enquête faite via l'Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales (association ANOFEL) sur le sérodiagnostic fongique, étaient les techniques de recherche d'anticorps précipitants, éventuellement porteurs d'activité enzymatique (DID, IEP, ES) et HAI, IFI et Elisa.

Les pratiques pouvaient être légèrement divergentes entre laboratoires pour une même technique, donnant des

Tableau 3 Quelques données récentes mentionnant des techniques de recherche d'anticorps spécifiques (hors IgE) pour le diagnostic des aspergilloses.*Some recent studies on aspergillosis diagnosis reporting data on anti-Aspergillus antibodies (except IgE).*

Type d'aspergillose	Année Réf	Nombre de patients (/témoins)	Technique/avec Ag	Sensibilité %	Spécificité %
ABPA sur mucoviscidose	2006 [57]	16 ABPA/51 témoins	Elisa IgG : /Ag DPPV + RNase	75	94
			/Ag DPPV + Catalase	88	92
	2008 [44]	13 ABPA/36 témoins	Elisa IgG	53,7	83,7
	2010 [25]	13 ABPA/48 témoins	Elisa IgG IEP	92,3 92,3	87,5 —
Aspergillome	2006 [57]	57 aspergillomes/41 témoins	Elisa IgG/Ag Catalase + DPPV	93	95
	2009 [36]	12	DID Précipitines	100	—
	2011 [75]	39	Elisa Ag GM Précipitines	41,7 100	—
ACN	[36] 2009	16	Précipitines Elisa Ag GM	81,3 56,3	— —
	[49] 2010	30	Précipitines	97	—
API chez patients non neutropéniques	2006 [17]	23	Elisa Ag GM	65	—
API chez patients BPCO	2011 [31]	21	IEP + DID/ES ou Elisa IgG	48	—
		12	Elisa Ag GM Si Ac + Ag	58,3 83,3	— —
API chez patients neutropéniques	2006 [57]	23 API/35 témoins	Elisa IgG/Ag catalase	78	74
	2006 [17]	11 API	Elisa Ag GM	64	—
		16 API	IEP + DID/ES ou Elisa IgG	6,25	—
2010 [15]	19 API/54 témoins	Elisa IgG/Ag protéines	67–84	52–65	

résultats différents, en particulier pour les techniques de précipitation, mais les interprétations finales restaient similaires. Cela a été montré lors d'un essai en 2010 entre huit laboratoires. Cela montrait aussi qu'il était préférable qu'un même patient soit suivi par un même laboratoire avec les mêmes techniques.

En 2011, le premier essai de contrôle qualité externe de la société Probioqual montre globalement une augmentation, par rapport à 2007, de l'utilisation des techniques comme l'Elisa (48 à 65 % des centres entre 2007 et 2011), au détriment de l'HAL, moins utilisée, ou l'IEP. Les contraintes de l'accréditation impliquent un large recours aux techniques commercialisées, ce qui se traduit bien dans les faits. En 2007, 46 % des Elisa utilisés en routine étaient des kits commerciaux contre 84 % en 2011. De même, 20 % des IEP en 2007, puis 83 % en 2011 étaient réalisées grâce à des kits. Il faut noter, pour l'IEP, que la révélation des arcs de précipitation porteurs d'activités enzymatiques est pratiquée de longue date en France, mais les données récentes sont rares.

La mise en place de la démarche d'accréditation au plan national va aider à la standardisation du diagnostic, mais celle-ci a un coût. En effet, les kits commerciaux sont chers et encore récents, au moins pour ce qui concerne les Elisa de recherche d'anticorps. Ils doivent faire leurs preuves à long terme. Le recours pour tous les laboratoires à un seul même kit soulève pourtant un point délicat car la situation de monopole n'est pas favorable économiquement. De plus,

les laboratoires ne sont pas à l'abri d'une rupture ou d'un arrêt de fabrication du kit par l'industriel, comme cela c'est déjà produit ces dernières années.

Perspectives techniques

Comme déjà signalé, la recherche sur les antigènes protéiques d'intérêt est toujours en cours, par exemple, avec étude du sécrétome d'*A. fumigatus* par *western blot* en deux dimensions couplé à de la spectrométrie de masse [62], ces auteurs retrouvant les activités DPPV et catalases [62]. Un Elisa contenant un antigène polysaccharidique synthétique, le tétra β (1 \rightarrow 5) Galactofuranosyl, est aussi en cours de test pour recherche des anticorps sériques [13].

Le recours à un antigène recombinant, de nature non précisée, est utilisé dans le kit Elisa commercialisé récemment par la société BioRad pour la détection des IgG anti-aspergillaires. Tout dernièrement, une étude montre que cette technique sensible est une bonne méthode de screening pour les aspergilloses non invasives et devrait permettre de réduire le recours à des tests de détection de précipitines [29].

Les Elisa commercialisés vont de plus en plus être réalisés dans des automates, ce qui devrait encore améliorer la standardisation. Une autre technique de détection des IgG anti-*Aspergillus*, non citée jusque-là, est, elle, entièrement automatique : la technique FIEA (fluorescent immuno enzyme assay, système Phadia's ImmunoCAP[®]), utilisée au

départ pour la détection des IgE totales et spécifiques d'*A. fumigatus* [5]. Elle a montré 86 % de concordance avec la DID [70] et 93 % avec les précipitines pour les patients sans mucoviscidose [6]. Pour ces derniers auteurs, la recherche de précipitines reste pourtant plus informative chez les patients très positifs en IgG.

D'autres pistes de recherche sont aussi en cours d'exploration comme l'étude des témoins de la réaction immune. Ainsi, la molécule de type *Thymus activation related chemokine* (TARC) permet une différenciation des patients atteints de mucoviscidose ayant une ABPA par rapport aux patients sensibilisés [44].

En parallèle de l'amélioration des kits pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus*, celle pour la détection des antigènes doit aussi continuer. L'utilisation de technique d'immuno-chromatographie a été rapportée [67], ce test qualitatif pourrait permettre d'avoir un résultat plus rapidement qu'un Elisa. En ce qui concerne la recherche de GM, le kit Elisa de BioRad est donné comme un kit qualitatif, mais l'aspect quantitatif, assez utilisé en pratique courante, est à explorer plus précisément. Pour la détection des glucanes circulants, ce kit permet la détection de différentes infections fongiques (hors les mucormycoses, à un degré moindre hors les cryptococcoses) [52]. Sa place dans la démarche diagnostique est encore à explorer, en raison de la présence de faux positifs dont la nature est probablement encore mal identifiée. En raison de sa forte valeur prédictive négative, ce test pourrait être utilisé plutôt comme un outil pour écarter une infection fongique profonde, donc une aspergillose. Ce « non-diagnostic » serait à tester pour éviter de traiter, à tort, des patients avec des antifongiques très coûteux. Une amélioration du coût et du design pratique de kits comme le kit Fungitell pourrait aussi être envisagée en passant par des techniques de type Elisa [74]. La place respective de ces nouveaux tests de recherche d'anticorps et d'antigènes dans la stratégie diagnostique sera à définir.

Conclusion

La détection des anticorps anti-*Aspergillus* fait partie des critères de définition des formes aiguës ou d'exacerbation de l'ABPA et de définition des aspergillomes et autres aspergilloses chroniques. La présence d'anticorps anti-*A. fumigatus* traduit un contact antérieur avec ce champignon et le suivi de ces anticorps peut être informatif sur l'infection aspergillaire en cours. Si la détection et le suivi des antigènes pour le diagnostic des API ont bien leurs places chez les patients neutropéniques en hématologie, la détection des anticorps pourrait être utile dans certains cas [71].

Une autre approche serait d'améliorer la stratégie d'utilisation des différentes techniques disponibles en fonction des types d'aspergilloses et en fonction de leurs coûts respectifs. De nombreuses questions peuvent se poser. Quand faire une recherche de précipitines actuellement face à l'Elisa (en parallèle, en confirmation, en suivi du patient) ? Quel seuil de positivité choisir pour une technique donnée ? Faut-il aussi favoriser la sensibilité ou la spécificité d'une technique pour la détection des aspergilloses ? Quand et à quelle fréquence faire les prélèvements sériques ? Les critères qui définissent une sérologie aspergillaire positive (technique, seuil choisi...)

sont aussi souvent absents dans les articles, alors qu'il faudrait les préciser systématiquement. Une démarche d'uniformisation des définitions cliniques des aspergilloses est faite [2], or les résultats du sérodiagnostic entrent dans ces critères de définition. Les techniques sérologiques doivent donc aussi s'harmoniser, ce qui faciliterait les études nationales ou internationales. Dans ce cadre, un nombre plus important de cas d'aspergillose bien documentés pourrait être analysé, sachant que les aspergilloses ne représentent qu'une faible proportion de l'ensemble des patients. Comme les traitements antifongiques sont des traitements coûteux, en particulier pour les API, des évaluations médico-économiques globales et approfondies devront aussi être faites.

Pour favoriser l'émergence de nouvelles techniques et de nouveaux kits, des tests réguliers à échelle multicentrique sont à envisager. Cela permettrait à tous les centres de mieux anticiper le choix de leurs techniques de sérodiagnostic lors des appels d'offre hospitaliers. Pour cela, il faudrait que des fonds soient débloqués dans un autre cadre que les PHRC cliniques (l'évaluation de kits est plutôt en amont des études cliniques prospectives), ou que les STIC qui sont, eux, plutôt orientés vers les nouvelles techniques très onéreuses. C'est dans ces conditions qu'on pourra préciser la place du sérodiagnostic aspergillaire, en tenant compte des évolutions futures, dans l'ensemble de tous les moyens de diagnostic des aspergilloses.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Merci à ceux qui ont participé directement ou indirectement à ce travail : à Lucas de Crignis, étudiant à Lyon I ; à Sophie Levy-Chalmain, Emilie Martin et Laetitia Beraud, internes aux Hospices civils de Lyon ; à Probioqual pour l'essai du contrôle de qualité externe de 2011 ; aux participants aux différentes enquêtes ANOFEL et aux tests inter-laboratoire, au groupe sérodiagnostic fongique de la SFMM (et pour certains aux trois à la fois) ; à la Société Biorad pour son aide à la bibliographie ; à Claude Guiguen pour la relecture de ce manuscrit.

Références

- [1] Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 2009;135:805–26.
- [2] Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, Jindal SK. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:936–44.
- [3] Arruda K, Platts-Mills TAE, Fox JW, Chapman MD. *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J Exp Med* 1990;172:1529–32.
- [4] Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7–14.

- [5] Barton RC, Hobson RP, Denton M, Peckham D, Kerr Brownlee K, Conway S, et al. Serologic diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis through the detection of immunoglobulin G to *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:287–91.
- [6] Baxter C, Jones A, Webb K, Gore R, Denning D. A comparison of the precipitation technique and immunocap FIEA for measurement of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus*. *Conference Proceedings AAA 4th 2010*; site internet : http://www.aspergillus.org.uk/secure/conferences/confabstracts/searchconfAAA.php?this_page=43&no_of_results=229&authorsearch=&authboolean=AND&searchkeyword=&keyboolean=AND&abbrevselect=AAA+4th&Submit=GO.
- [7] Biguet J, Tran Van Ky P, Capron A, Fruit J. Analyse immunoelectrophorétique des fractions antigéniques solubles d'*Aspergillus fumigatus*. *Ordre d'apparition des anticorps expérimentaux du lapin ; comparaison de ces derniers avec des anticorps naturels humains*. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1962;254:3768–70.
- [8] Biguet J, Tran Van Ky P, Andrieu S, Fruit J. Analyse immunoelectrophorétique d'extraits cellulaires et de milieux de culture d'*Aspergillus fumigatus* par des immuns sérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'aspergillome bronchopulmonaire. *Ann Inst Pasteur* 1964;107:72–97.
- [9] Binder RE, Faling LJ, Pugatch RD, Mahasaen C, Snider GL. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. *Medicine* 1982;61:109–24.
- [10] Borron F, Persat F, Borel E, Piens MA, Mojon M. Evaluation de l'immunoelectrophorèse rapide Paragon[®] (Beckman) appliquée au sérodiagnostic aspergillaire. *J Mycol Med* 1994;4:220–5.
- [11] Brummund W, Resnick A, Fink JN, Kurup VP. *Aspergillus fumigatus*-specific antibodies in allergic bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma: evidence for a polyclonal antibody response. *J Clin Microbiol* 1987;25:5–9.
- [12] Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 1999;67:3703–13.
- [13] Cattiaux L, Sendid B, Collot M, Machez E, Poulain D, Mallet JM. Synthetic biotinylated tetra β (1→5) galactofuranoside for *in vitro* aspergillosis diagnosis. *Bioorg Med Chem* 2011;19:547–55.
- [14] Chan CM, Woo PCY, Leung ASP, Lau SKP, Che XY, Cao L, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:2041–5.
- [15] Clancy IC, Wingard J, Nguyen M. Elevated serum IgG responses against *Aspergillus fumigatus* proteins prior to hematopoietic stem cell transplant (HSCT) identify patients at risk for invasive aspergillosis (IA). *Conference Proceedings AAA4th 2010*; accès internet : http://www.aspergillus.org.uk/secure/conferences/confabstracts/searchconfAAA.php?this_page=43&no_of_results=229&authorsearch=&authboolean=AND&searchkeyword=&keyboolean=AND&abbrevselect=AAA+4th&Submit=GO.
- [16] Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *App Microbiol* 1972;23:301–8.
- [17] Cornillet A, Camus S, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clinical Infectious Diseases* 2006;43:577–84.
- [18] Delhaes L, Frealle E, Pinel C. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: state of the art and further challenges. *Med Mycol* 2010;48:577–87.
- [19] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatak H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis* 2003;37:S265–80.
- [20] Denning DW. The extraordinary spectrum of diseases caused by *Aspergillus*. *International Union of Microbiological Societies 2011*; site internet : <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?education/slides.htm~main>.
- [21] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive. *Clin Infect Dis* 2008;46:1813–21.
- [22] Drouhet E, Camey L, Segretain G. Valeur de l'immunoprécipitation et de l'immunofluorescence indirecte dans les aspergilloses broncho-pulmonaires. *Ann Inst Pasteur* 1972;123:379–95.
- [23] Drouhet E, Tabet-Derraz O, Sanchez-Sousa A, Viviani MA. Application de l'électrosynérèse et de l'immunoelectrophorèse bidimensionnelle au diagnostic des aspergilloses et à la standardisation des antigènes aspergillaires. *Bull Soc Fr Myc Med* 1973;2:7–10.
- [24] Framatico PM, Buckley HR. Identification and characterization of an immunodominant 58-kilodalton antigen of *Aspergillus fumigatus* recognized by sera of patients with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1991;59:309–15.
- [25] Fricker-Hidalgo H, Coltey B, Llerena C, Renversez JC, Grillot R, Pin I. Recombinant allergens combined with biological markers in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1330–6.
- [26] Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients. *Rev Mal Resp* 2010;27:34–46.
- [27] Grabar P, Williams CA. Méthodes permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim Biophys Acta* 1953;10:193–4.
- [28] Grillot R, Lebeau B, Pinel C, Fricker H, Ambroise-Thomas P. Diagnostic biologique des mycoses systémiques en onco-hématologie. *J Mycol Med* 1991;1:4–10.
- [29] Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based EIA for the diagnosis of non-invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2011. doi: 10.1128/JCM.01257.11.
- [30] Harvey C, Longbottom JL. Characterization of a second major antigen Ag 13 (antigen C) of *Aspergillus fumigatus* and investigation of its immunological reactivity. *Clin Exp Immunol* 1987;70:247–54.
- [31] He H, Ding L, Li F, Zhan Q. Clinical features of invasive bronchial-pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive respiratory diseases: a prospective study. *Critical Care* 2011;15:2–12.
- [32] Hearn VM, Wilson EV, Proctor AG, MacKenzie DWR. Preparation of *Aspergillus fumigatus* antigens and their analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *J Med Microbiol* 1980;3:451–8.
- [33] Hoppe WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5:609–22.
- [34] Kappe R, Rimek D. Antibody detection in patients with invasive aspergillosis. *Mycoses* 2004;47:55–9.
- [35] Kaufmann HF, Beaumont F, Meurs H, Van der Heide S, De Vries K. Comparison of antibody measurements against *Aspergillus fumigatus* by means of double-diffusion and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:255–61.
- [36] Kitasato Y, Tao Y, Hoshino H, Tachibana K, Inoshima N, Yoshida M. Comparison of *Aspergillus* galactomannan antigen testing with a new cut-off index and *Aspergillus* precipitating antibody testing for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respirology* 2009;14:701–8.
- [37] Krakova P, Halweg H, Podsiado B. Mycological and serological studies in the diagnosis of various forms of pulmonary aspergillosis. *Scand J Respir Dis* 1978;2:213–6.

- [38] Kurup PV, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:439–56.
- [39] Kurup VP, Knutsen AP, Moss RB, Bansal NK. Specific antibodies to recombinant allergens of *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients with ABPA. *Clin Mol Allergy* 2006;4:11–7.
- [40] Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:310–50.
- [41] Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol* 2010;12:863–72.
- [42] Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszkeski JM, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994;62:5424–33.
- [43] Latgé JP, Moutaouakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes K, Prevost MC. The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1991;59:2586–94.
- [44] Latzin P, Hartl D, Regamey N, Frey U, Schoeni MH, Casaulta C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2008;31:36–42.
- [45] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patient. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;4:CD007394.
- [46] Longbottom JL, Pepys J, Temple Clive F. Diagnostic precipitin test in *Aspergillus* pulmonary mycetoma. *Lancet* 1964;1:588–9.
- [47] Longbottom JL, Pepys J. Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. *J Path Bact* 1964;88:141–52.
- [48] Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Daniel Poulain D, Viscoli C. Non-invasive diagnostic procedures for yeast infections. 3rd European Conference on infections in leukemia 2009; 25–26 September, Juan les Pins, France. Accès internet : <http://www.eortc.be/home/IDG/ECIL/ECIL%203%20Non%20culture-based%20diagnostic%20procedures%20for%20Aspergillus.pdf>.
- [49] Nam HS, Jeon K, Um SW, Suh GY, Chung MP, Kim H, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases. *Int J Infect Dis* 2010;14:479–82.
- [50] Ouchterlony Ö. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand* 1949;26:507–15.
- [51] Patterson R, Wang JLF, Roberts M, Zeiss CR. Comparison of radioimmunoassay techniques in the detection of IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* antigens. *J Immunol* 1978;120:66–71.
- [52] Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (133)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2008;46:1009–13.
- [53] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdan N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a Galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006;42:1417–27.
- [54] Piechura JE, Huang CJ, Cohen SH, Kidd JM, Kurup VP. Antigens of *Aspergillus fumigatus*. II Electrophoretic and clinical studies. *Immunol* 1983;49:657–65.
- [55] Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2184–6.
- [56] Pinon JM, Charpentier O, Level MC, Remy G, Sulahian A, Dropsy G. Etude critique des réactions immuno-enzymatiques couplées aux tests de précipitation sur membranes d'acétate de cellulose. *Bull Soc Pathol Exot* 1978;77:189–95.
- [57] Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:279–91.
- [58] Schoenheyder H, Andersen P, Stenderup A. Serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in patients with pulmonary aspergillosis detected by immunofluorescence. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1982;90:273–9.
- [59] Schoenheyder H. Pathogenetic and serological aspects of pulmonary aspergillosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 1987;51:1–62.
- [60] Schoenheyder H, Jensen T, Laessoe IH, Hoiby N, Koch C. Serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* catalase in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:40–4.
- [61] Sepulveda R, Longbottom JL, Pepys J. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Allergy* 1979;9:359–71.
- [62] Singh B, Oellerich M, Kumar R, Mumar M, Rhadoria D, Reichard U, et al. Immuno reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. *J Prot Res* 2010;9:5517–29.
- [63] Skov M, Presslet T, Jensen HE, Hoiby N, Koch C. Specific IgG subclass antibody pattern to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Thorax* 1999;54:44–50.
- [64] Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis, including simple aspergilloma. *Eur Respir J* 2011;37:865–72.
- [65] Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judd MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis-state of the art: cystic fibrosis foundation consensus conference. *Clin Infect Dis* 2003;37:S225–64.
- [66] Tönder O, Rödsæther M. Indirect haemagglutination for demonstration of antibodies to *Aspergillus fumigatus*. *Acta Path Microbiol Scand* 1974;82:871–8.
- [67] Thornton C. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vacc Immunol* 2008;15:1095–105.
- [68] Tran Van Ky P, Biguet J, Fruit J. Localisation et fréquence des arcs des immunoelectrophorogrammes produits par le sérum des malades atteints de mycétomes aspergillaires appliqués contre l'antigène *Aspergillus fumigatus*. *Rev Immunol* 1966;30:13–20.
- [69] Tran Van Ky P, Vaucelle T. Étude d'une fraction antigénique d'*Aspergillus fumigatus* support d'une activité catalasique. Conséquence sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. *Rev Immunol* 1968;1–2:37–52.
- [70] Van Hoeyveld E, Dupont L, Bossuyt X. Quantification of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* and pigeon antigens by ImmunoCAP technology: an alternative to the precipitation technique? *Clin Chem* 2006;52:1785–93.
- [71] Verweij PE. Galactomannan and anti-*Aspergillus* antibody detection for the diagnosis of invasive aspergillosis. In: Latgé JP, Steinbach WJ, editors. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. 2008. p. 363–72 [chapitre 28].
- [72] Weig M, Frosch M, Tintelnot K, Haas A, Gross U, Linsmeier B, et al. Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 2001;39:1721–30.
- [73] Yarzabal LA, Da Luz S, Josey M, Torres JM, Vigna, Olga Muras I. Pruebas de inmunoprecipitación en el diagnóstico de la aspergilosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1973;15:1–9.
- [74] Yoneda A, Kurokawa T. A sensitive sandwich ELISA to measure (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan levels in blood. *J Immunol Methods* 2011;365:158–65.
- [75] Zait H, Hamrioui B. Aspergillome pulmonaire : à propos de 39 cas. *J Mycol Med* 2011;21:138–41.