

Pneumopathies d'hypersensibilité : interaction cellule-antigène et optimisation du diagnostic par le développement d'antigènes recombinants (PHS-ICAD)

Projet ANR 05 SEST 044-01- Décision ANR n°05977

Laurence Millon^{1,2}, Gabriel Reboux^{1,2}, Sandrine Roussel¹, Bénédicte Rognon¹, Anne-Pauline Bellanger^{1,2}, Frédéric Grenouillet^{1,2}, Jean Charles Dalphin^{1,3}, Isabelle Thaon^{1,4}, Michel Monod⁵, John-David Aubert⁶, Jean-Marc Fellrath⁷, Manfredo Quadroni⁸ Françoise Botterel⁹,
Stephane Bretagne⁹

¹UMR CNRS 6249 "Chrono-Environnement", Université de Franche-Comté, France

²Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, ³Service de Pneumologie et ⁴Service des Maladies Professionnelles, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, France

⁵Laboratoire de Mycologie, Service de Dermatologie et ⁶Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse

⁷Service de Pneumologie, Hopital Pourtales, Neuchatel, Suisse

⁸Plate-forme protéomique, Centre Intégratif de Genomique, Faculté de biologie et de médecine, Université de Lausanne, Suisse

⁹UMR BIPAR 956, Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, Hopital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

Introduction

Les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) sont des pneumopathies aiguës ou subaiguës pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire chronique très invalidante, allant parfois jusqu'au décès. Elles se développent essentiellement en milieu professionnel, lors de l'inhalation répétée d'antigènes issus de micro-organismes contaminant divers substrats (foins, fluides de coupe, fleur de saucisson...). La maladie du poumon de fermier est la plus fréquente des PHS rencontrée en France. Chez les fermiers en milieu de production laitière, la prévalence se situe entre 1 et 1,5%, jusqu'à 4% dans certaines zones en altitude [1, 2]. De nombreux agents étiologiques, principalement des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, Mucorales), sont incriminés. La preuve d'une exposition antigénique fait partie des critères majeurs de diagnostic [3]. Le traitement repose sur l'éviction antigénique, et dans certaines

situations ou celle-ci est impossible, sur une réduction du niveau d'exposition. Le traitement médical par corticoïde améliore les symptômes mais n'a aucune influence sur l'évolution de la maladie. Le mécanisme immuno-allergique de ces maladies est complexe et encore mal connu. Les PHS sont caractérisées par une forte accumulation de cellules inflammatoires au niveau du poumon. De nombreux éléments intervenant dans le processus inflammatoire, et notamment la nature des interactions entre cellules épithéliales, cellules immunes et antigènes restent à préciser.

L'implication de moisissures du genre *Aspergillus*, mais aussi d'autres espèces (*Absidia corymbifera*, *Wallemia sebi*...) dans les PHS, ainsi que l'intérêt d'utiliser des antigènes fabriqués à partir de champignons présents dans l'environnement des patients pour améliorer le diagnostic sérologique de ces maladies ont été démontrés [4, 5]. Cependant les antigènes actuellement utilisés sont des extraits totaux des différentes espèces incriminées. Ces extraits sont constitués d'une mosaïque d'antigènes, et leur production n'est pas standardisée. Le développement d'antigènes recombinants pour améliorer à la fois le diagnostic et la compréhension des mécanismes physiopathologiques des PHS fait partie des recommandations proposées en 2005 par le NHLBI/ORD (National Heart, Lung, and Blood Institute and the Office of Rare Diseases) Workshop [6].

D'autre part, la physiopathologie de cette « allergie » semi-retardée particulière n'est pas clairement établie. La diversité des circonstances et des agents étiologiques, couplées au nombre limité d'observations pour chaque type de PHS, rendent difficile la détermination des voies immunologiques en jeu. L'apport de l'expérimentation animale n'a pas permis de progrès décisif. *Saccharopolyspora rectivirgula*, a été longtemps le seul agent étiologique reconnu de la maladie du poumon de fermier [7, 8]. Cependant, différents travaux ont montré que d'autres espèces intervenaient dans le développement de la maladie. Ainsi, des moisissures environnementales comme *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* et *Wallemia sebi* sont retrouvées dans le foin des agriculteurs malades et ces même agriculteurs présentent des taux élevés d'IgG dirigées spécifiquement contre ces moisissures [4, 9]. Ces moisissures n'ont jamais été impliquées dans les modèles cellulaires ou animaux pour étudier la physiopathologie des PHS.

L'**objectif** des travaux de recherche effectués dans le cadre du projet PHS-ICAD était d'une part, d'améliorer le diagnostic sérologique des PHS par le développement d'antigènes

recombinants, d'autre part, de contribuer à la meilleure connaissance des mécanismes immuno-allergiques impliqués dans ces maladies.

La démarche suivie, impliquant l'isolement des moisissures dans l'environnement des patients, la caractérisation moléculaire des fractions protéiques induisant une réponse humorale spécifique chez les sujets malades, puis le développement d'antigènes recombinants spécifiques de ces fractions, avait donc pour but d'accroître la fiabilité des tests utilisés pour le diagnostic des PHS, en s'affranchissant des aléas liés au manque de standardisation des antigènes bruts. Notre étude avait également comme objectif d'étudier *in vitro*, sur un modèle de cellules épithéliales pulmonaires, la réponse immune lors de l'exposition aux moisissures citées ci-dessus, afin d'apporter une preuve supplémentaire de leur implication dans la maladie du poumon de fermier.

Résultats

1. Inclusion des patients et témoins – constitution d'une sérothèque

Au cours des 3 années du projet, le protocole de recrutement a permis d'inclure 27 patients atteints de la maladie du poumon de fermier (20 patients recrutés en France et 7 en Suisse), 11 patients atteints d'une maladie pulmonaire type pneumopathie interstitielle diffuse qui n'est pas une PHS, 40 agriculteurs non malades (=témoins exposés asymptomatiques), et 50 sujets urbains (=témoins non exposés asymptomatiques). Les sérums prélevés chez ces patients ont permis de tester l'efficacité diagnostique des tests sérologiques utilisant les antigènes purifiés et les antigènes recombinants produits.

2. Prélèvements environnementaux

Des prélèvements environnementaux ont été réalisés dans les fermes des agriculteurs malades, afin de déterminer les espèces de moisissures les plus fréquemment isolées, ainsi que leurs concentrations dans les substrats végétaux.

Ainsi, 58 lots de fourrages ont été analysés d'un point de vue microbiologique par ensemencement sur 4 milieux de culture. Douze espèces représentaient (97,2%) du nombre de colonies comptées sur les milieux de culture : *Eurotium spp.* (64.34%), *Wallemia sebi* (11.51%), *Cladosporium spp.* (5.40%), les levures blanches (3.83%), *Streptomyces* mésophiles (3.17%), *Penicillium spp.* (2.45%), *Aspergillus versicolor* (1.43%), *Absidia corymbifera* (1.41%), *Alternaria spp.* (1.26%), *Streptomyces* thermophiles (0.89%), *Rhodotorula spp.* (0.81%), *Saccharopolyspora rectivirgula* (0.75%). Au total, 43 espèces

fongiques et d'actinomycètes ont été isolées des fourrages de Suisse et de France. Parmi les *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami* représentait la forme sexuée la plus isolée, avec une moyenne de 96 200 UFC par gramme de fourrages (écart type = (229 200)).

3. Développement de tests sérologiques utilisant des extraits antigéniques purifiés

Au cours de cette étude, une nouvelle méthode de préparation d'antigènes à partir de micro-organismes environnementaux a été développée. Des extraits antigéniques purifiés ont été obtenus par digestion enzymatique à la lyticase des différentes formes de champignons obtenues par culture sur milieu spécifique, puis précipitation des protéines à l'acide trichloracétique et purification à l'acétone. *A. hollandicus/ Eurotium amstelodami* est l'espèce fongique la plus représentée dans les prélèvements environnementaux. Dans la nature, ce champignon peut être présent sous sa forme sexuée, asexuée ou végétative. Des extraits antigéniques purifiés ont été fabriqués à partir de la forme sexuée (ascospores) obtenue par culture sur milieu DG18, de la forme asexuée (conidies), obtenue sur milieu au Malt, et de la forme végétative (filament mycélien) obtenue en milieu cœur-cerveille liquide.

Test ELISA avec antigène purifié

Nous avons testé par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) la réponse immunitaire de 17 malades, 40 témoins exposés asymptomatiques et 20 témoins urbains vis-à-vis-à-vis des extraits antigéniques purifiés produits à partir des 3 formes. Les résultats ont été analysés par la méthode des courbes ROC (Receiver operating characteristic). L'aire sous la courbes est supérieure pour l'antigène d'ascospores (0,850; IC95%(0.735-0.965) par rapport à celle obtenue pour l'antigène de conidies (0,731 ; IC95%(0.597-0.865) ou l'antigène de filaments mycéliens (0,690; IC95%(0.560-0.839). Ainsi, l'antigène purifié d'ascospores d'*E amstelodami* permet la meilleure discrimination entre les agriculteurs malades et non malades[10].

Analyse en Western Blot avec les antigènes purifiés

Concernant *E. amstelodami*, les bandes révélées avec les sérums des malades sont plus nombreuses avec les antigènes d'ascospores qu'avec les antigènes de conidies. Avec les antigènes d'ascospores, on observe un nombre plus important de bandes avec le sérum des malades entre 45 et 30kDa qu'avec le sérum des témoins (moyenne chez les malades : 3.2 bandes, chez les témoins exposés et urbains : 0,3 et 1 bandes respectivement). Le nombre de bandes au dessus de 66kDa est équivalent pour les trois groupes de sujets (3,8 bandes en moyenne pour les malades, 4 pour les témoins exposés et 4,3 pour les urbains) (Rognon B. et al, article en préparation)

4. Développement d'antigènes recombinants issus de micro-organismes environnementaux

Deux espèces fongiques ont été utilisées pour réaliser la première étape du développement des antigènes recombinants : *Eurotium amstelodami*, car l'extrait antigénique issu de la forme ascospore présente un intérêt majeur pour le diagnostic, et *Neosartorya fischeri*, parce qu'il s'agit d'un champignon du genre *Aspergillus*, proche d'*E. amstelodami*, présentant également une forme sexuée, et dont le génome a été entièrement séquencé. La connaissance de la séquence facilite les étapes d'identification des protéines détectées en spectrométrie de masse

Des extraits antigéniques purifiés de ces deux champignons ont été fabriqués à partir de la forme sexuée (ascospores) obtenues par culture sur milieu Malt. Une analyse de l'extrait antigénique d'ascospores de *N. fischeri* a été réalisée par spectrométrie de masse (shot gun) par le Centre Intégré de Génomique de Lausanne. Une fois les doublons enlevés, 469 protéines différentes ont été dénombrées. Ce sont des protéines de paroi mais aussi des protéines intracellulaires.

La séparation des extraits antigéniques par migration sur un gel SDS PAGE en deux dimensions permet d'individualiser les protéines sous forme de spots. Trois gels d'acrylamide en deux dimensions ont été réalisés avec l'extrait antigénique d'ascospores de *N. fischeri*. Les 2 premiers ont été colorés au bleu de Coomassie. Le troisième a été transféré sur membrane de nitrocellulose et révélé avec le sérum d'un patient connu pour avoir une forte réponse immunitaire, en utilisant un système de marquage comprenant une anti-IgG couplée à la phosphatase alcaline. Un calque a été effectué avec le logiciel MELANIE® 7.0 et aligné sur les plans de découpages des deux premiers gels, afin de sélectionner les spots à analyser en spectrométrie de masse (MALDI-TOF et LC-MS). Quarante et ans spots ont été sélectionnés (Figure 1). Cinq protéines ont été retenues pour la fabrication d'antigènes recombinants. Les séquences ADN correspondant à ces 5 protéines ont été amplifiées par PCR et insérées dans le vecteur d'expression pET-11aH6, issus du vecteur pET de Novagen (Damstadt, Allemagne). Le vecteur a été cloné dans la souche d'*Escherichia coli* BL21 et son expression a été induite par l'IPTG.

Les cinq antigènes recombinants ont été testés en ELISA avec 16 sérums de malades montrant une réponse immunologique vis-à-vis d'un antigène somatique d'*Aspergillus*, 11 sérums de patients atteints d'une maladie pulmonaire type pneumopathie interstitielle diffuse qui n'est pas une PHS, 32 sérums de témoins exposés asymptomatiques et 32 sérums de

témoins urbains. L'analyse en courbe ROC a montré des aires sous la courbe de 0.897 (IC95% 0.807-0.986) pour Glutamate/Leucine/Phénylalanine/Valine dehydrogenase, et 0.880 (IC95% 0.780-0.979) pour la Glucosamine-6-phosphate isomerase (Figure 2). Ces nouveaux antigènes recombinants permettent ainsi une bonne discrimination entre malades atteints du poumon de fermier et agriculteurs asymptomatiques exposés (Roussel S. et al, *article en préparation*).

L'expérience acquise a permis par la suite le développement, en suivant la même démarche, de 6 antigènes recombinants issus de micro-organismes présents dans les fluides de coupe (*Mycobacterium immunogenum*). Ces antigènes présentent un intérêt majeur pour le diagnostic sérologique des PHS survenant en milieu industriel (Poumon de Mécanicien) [11, 12]. Une étude de marché a été réalisée en fin de programme (décembre 2008) afin d'envisager la création d'une micro-entreprise ou le transfert de savoir vers une entreprise existante, permettant de commercialiser des antigènes et kits utilisables pour le diagnostic des PHS. Ce processus est en marche mais nécessitera encore des études comparatives avec les antigènes utilisés actuellement ainsi que des développements industriels et de marketing.

5. Etude physiopathologique sur modèle cellulaire *in vitro*

Les méthodes d'analyse de la production des ARNm des médiateurs de la réponse immune par lors de l'inoculation de spores fongiques sur modèle cellulaire *in vitro* ont d'abord été développées dans le cadre des travaux sur la physiopathologie de l'aspergillose invasive [13] puis transposées pour étudier les mécanismes physiopathologiques des PHS.

Des cellules de la lignée A549 ont été exposées pendant 30 minutes, 2h, 4h, et 8h à des extraits solubles totaux de *S. rectivirgula*, *E. amstelodami*, *A. corymbifera* ou *W. sebi*. Le niveau d'expression des ARNm d'une chemokine pro-inflammatoire, l'IL-8, impliquée dans la réponse allergique a été étudié par PCR quantitative en temps réel. Les résultats de trois expositions indépendantes ont été analysés par un test ANOVA. L'extrait soluble de *S. rectivirgula* a entraîné une élévation marquée et progressive des taux d'ARNm d'IL-8, dès 4 heures après l'exposition initiale ($p < 0.01$) et majorée après 8h ($p < 0.0001$). Parmi les extraits totaux hydrosolubles de moisissures, seul celui d'*A. corymbifera*, a entraîné une augmentation nette des taux d'ARNm d'IL-8, 8h après le contact initial ($p < 0.0001$) (Figure 3). Ces résultats ont été confirmés par le dosage de la forme protéique de l'IL-8 dans le surnageant des cultures cellulaires par ELISA (923 pg/mL pour *S. rectivirgula* et 551 pg/mL *A. corymbifera*). Cette activité semi-retardée est à mettre en perspective avec le caractère particulier des PHS qui sont des allergies de type III et IV, dont les symptômes surviennent 6 à 8 h après l'exposition

aux antigènes contenus dans les fourrages. La production d'IL-8, avait déjà été rapportée dans le cadre d'expérimentation animale et de manipulation de culture cellulaire, pour démontrer le rôle de *S rectivirgula* comme agent étiologique des PHS. Nos résultats qui montrent une production d'IL8 lors de l'inoculation d'*A corymbifera*, apporte une preuve supplémentaire du rôle de cette moisissure comme agent étiologique du poumon de fermier [14].

Ces premiers résultats ont ouvert la voie à d'autres expérimentations réalisées selon la même méthodologie. Celles-ci visaient à comparer la réponse immune observée en réponse à différents extraits protéiques issus des trois formes de développement d'*E. amstelodami* (conidies, ascospores, filaments). L'extrait protéique de filaments d'*E. amstelodami* a entraîné une élévation plus marquée des taux d'ARNm d'IL-8 que les autres formes du champignon. Ces résultats doivent encore être confirmés (dosage par technique ELISA en cours).

Conclusion

Dans le cadre de notre protocole d'étude d'une PHS fréquente en Franche-Comté, la maladie du poumon de fermier, une chaîne complète de résultats provenant de l'observation du terrain, de l'analyse microbiologique des fourrages, de l'étude clinique et sérologique a permis d'aboutir à la production d'antigènes recombinants, efficaces pour le diagnostic. La production d'antigènes recombinants standardisés permet d'envisager le développement de kit de diagnostic des PHS et, à plus long terme, leur commercialisation. Par ailleurs, les résultats obtenus sur le modèle d'épithélium respiratoire *in vitro* confirment l'hypothèse que chaque espèce de moisissure a des capacités différentes à initier la réponse immuno-allergique initiale. *A. corymbifera* semble jouer un rôle particulièrement important et pourrait être reconnu comme un agent étiologique du poumon de fermier, à l'équivalence avec *S. rectivirgula*.

La maîtrise des techniques de production des antigènes recombinants, et d'étude de la réponse immune sur modèle cellulaire, acquise grâce à la collaboration des trois équipes impliquées, sera mise à profit dans le cadre du projet SOPHIA (« Sérologie Optimisée des PHS Industrielle et Agricole » - Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC national) – 2009/2011). L'objectif principal est de développer des techniques immuno-enzymatiques performantes et standardisées pour le diagnostic sérologique des PHS agricoles et industrielles, en utilisant des panels d'antigènes recombinants issus des micro-organismes isolés de l'environnement des patients. L'exploration des interactions cellules

épithéliales/moisissures sera également poursuivie, avec l'idée de tester des micro-organismes issus d'autres environnements (industriel, domestique), ainsi que différentes fractions de ces micro-organismes (extraits protéiques, sucres) ou métabolites (mycotoxines). De nouvelles voies thérapeutiques pourraient être envisagées à partir d'une meilleure compréhension de ces mécanismes. L'ensemble de ces travaux doit également permettre de mettre à disposition de nouveaux outils pour la compréhension et le diagnostic d'autres maladies allergiques plus répandues comme l'asthme atopique.

Références

1. Dalphin JC, Bildstein F, Pernet D, Dubiez A, Depierre A: Prevalence of chronic bronchitis and respiratory function in a group of dairy farmers in the French Doubs province. *Chest* 1989, 95:1244-1247.
2. Dalphin JC, Toson B, Monnet E, Pernet D, Dubiez A, Laplante JJ, Aiache JM, Depierre A.: Farmer's lung precipitins in Doubs (a department of France): prevalence and diagnostic value. *Allergy* 1994, 49:744-750.
3. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y: Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168:952-958.
4. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnnet K, Dalphin JC: Role of molds in farmers's lung disease in Eastern France. *Am J Resp Crit Care Med* 2001:1534-1539.
5. Reboux G, Piarroux R, Roussel S, Millon L, Bardonnnet K, Dalphin JC: Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J Med Microbiol* 2007, 56:1317-1321.
6. Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, Kreiss K, Kunkel S, Lynch D, Quirce S, et al: Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171:792-798.
7. Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Lacey ME, Skinner FA: Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 1963, 21:607-611.
8. Girard M, Lacasse Y, Cormier Y: Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 2009, 64:322-334.
9. Kaukonen K, Savolainen J, Viander M, Kotimaa M, Terho EO.: IgG and IgA subclass antibodies against *Aspergillus umbrosus* in farmer's lung disease. *Clin Exp Allergy* 1993, 23:851-856.

Principales publications issues du projet ANR

5. Reboux G, Piarroux R, Roussel S, Millon L, Bardonnnet K, Dalphin JC: Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers' lung disease. *J Med Microbiol* 2007, 56:1317-1321.
10. Roussel S, Reboux G, Rognon B, Monod M, Grenouillet F, Quadroni M, Fellrath JM, Aubert JD, Dalphin JC, Millon L: Comparison of three antigenic extracts of *Eurotium amstelodami* in farmer's lung disease serological diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2009 (in press).
11. Tillie-Leblond I, Grenouillet F, Reboux G, Roussel S, Chouraki B, Lorthois C, Dalphin JC, Wallaert B, Millon L: Thirteen clustered cases of metalworking fluids-associated hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J (in press)* 2009.
12. Roussel S, Rognon B, Barrera C, Reboux G, Salamin K, Grenouillet F, Thaon I, Dalphin JC, Tillie-Leblond I, Quadroni M, et al: Use of recombinant antigens from *Mycobacterium immunogenum* for serodiagnosis of metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis. *Clin & Exp Allergy* 2009.
13. Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, Rivollet D, Bieche I, Laurendeau I, Vidaud M, Botterel F, Bretagne S: *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* 2009, 58:174-179.
14. Bellanger AP, Reboux G, Botterel F, Candido C, Roussel S, Rognon B, Dalphin JC, Bretagne C, Millon L. Upregulation of *IL-8* and *IL-13* genes in A549 cells after exposure to fungal extract provides new proof of the involvement of *Absidia corymbifera* in farmer's lung disease. *Int Arch All Immunol*, soumis 2009