

**ETUDE SEROLOGIQUE PROSPECTIVE VIS-A-VIS DE  
PENICILLIUM NALGIOVENSE CHEZ 97 SUJETS  
TRAVAILLANT AUX SALAISONS DE LACAUNE (TARN)**

**THESE**

**pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

**obtenu après soutenance du MEMOIRE  
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

Présentée et soutenue publiquement  
le 01 Décembre 1995 à Toulouse

par

**Philippe LABORDERIE**

Né le 27/04/67 à Figeac

**JURY**

Président : Pr BENOIST  
Assesseurs : Pr ABBAL  
Pr DIDIER  
Dr RECCO

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**FACULTE DE PHARMACIE**

---

**DOYEN DE LA FACULTE:** Monsieur le Professeur RABY Claude

**ASSESEURS:** Monsieur le Professeur GHESTEM Axel  
Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférences

**PROFESSEURS:**

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse

**ETUDE SEROLOGIQUE PROSPECTIVE VIS-A-VIS DE  
PENICILLIUM NALGIOVENSE CHEZ 97 SUJETS  
TRAVAILLANT AUX SALAISONS DE LACAUNE (TARN)**

*A mes parents*

*A Catherine*

*A mes amis*

**A NOTRE PRESIDENT DE THESE**

**Monsieur le Professeur BENOIST**

**Professeur des Universités  
Laboratoires d'Immunologie  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques - Toulouse**

Vous nous faites un très grand honneur en acceptant la  
présidence du jury de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et  
de notre profond respect.

## **A NOTRE JURY DE THESE**

**Monsieur le Professeur ABBAL**

**Professeur des Universités  
Laboratoire d'Immunologie  
Faculté de Médecine - Toulouse Rangueil**

Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury.  
Nous vous en remercions très respectueusement et nous  
vous exprimons toute notre reconnaissance.

**Monsieur le Professeur DIDIER**

**Professeurs des Universités  
Service de Pneumologie  
Faculté de Médecine - Toulouse Rangueil**

Vous avez accepté de participer à ce jury.  
Nous vous en remercions et soyez assuré de notre  
profonde reconnaissance.

**Madame le Docteur RECCO**

**Maître de conférence des Universités  
Laboratoire de Parasitologie  
Faculté de Médecine - Toulouse Rangueil**

Vous avez bien voulu nous confier ce travail et nous  
guider tout au long de sa réalisation.  
Nous vous remercions pour votre encadrement dans le  
service de Parasitologie.  
Soyez assurée de notre profonde reconnaissance.

# Sommaire

## Première partie

<b>A- Définition des alvéolites allergiques extrinsèques.....</b>	<b>1</b>
<b>B- Historique.....</b>	<b>2</b>
<b>C- Classification des alvéolites allergiques extrinsèques.....</b>	<b>4</b>
<b>D- Epidémiologie.....</b>	<b>7</b>
D.I Technique de fabrication des saucissons.....	7
D.II Allergènes.....	9
D.III Fréquence.....	9
D.IV Exposition professionnelle ; nature du poste de travail.....	10
D.V Age.....	11
D.VI Sexe.....	11
D.VII Durée d'exposition, temps de latence.....	11
D.VIII Facteurs personnels.....	12
D.IX Rôle du tabac.....	13
D.X Influence du climat.....	14
<b>E- Physiopathologie.....</b>	<b>16</b>
E.I Mécanismes.....	16
E.I.1 L'hypersensibilité du type III.....	16
E.I.2 L'hypersensibilité de type IV.....	19
E.I.3 L'hypersensibilité de type I.....	21
E.I.4 L'hypersensibilité de type II.....	22
E.II Rôle du complément.....	23
E.II.1 La voie classique.....	23
E.II.2 La voie alterne.....	23
E.III Rôle des macrophages.....	24

E.IV Immunorégulation de l'alvéolite allergique extrinsèque et facteurs génétiques.....	26
E.V Etude du liquide de lavage broncho-alvéolaire.....	27
E.V.1 Cytologie.....	27
E.V.1.1 Alvéolite précoce à polynucléaire.....	27
E.V.1.2 Alvéolites à lymphocytes dans les stades subaigus et chroniques.....	28
E.V.2 Biochimie.....	29
E.V.3 Immunologie.....	29
E.VI Conclusion.....	30
<b>F- Diagnostic clinique.....</b>	<b>33</b>
F.I La forme aiguë intermittente.....	33
F.I.1 Signes fonctionnels.....	33
F.I.2 Signes généraux.....	34
F.I.3 Signes physiques.....	35
F.I.4 Evolution.....	35
F.II La forme subaiguë.....	36
F.II.1 Signes fonctionnels.....	36
F.II.2 Signes généraux.....	36
F.II.3 Signes physiques.....	36
F.II.4 Evolution.....	37
F.III La forme chronique.....	37
F.III.1 Signes fonctionnels.....	37
F.III.2 Signes généraux.....	37
F.III.3 Signes physiques.....	38
F.III.4 Evolution.....	38
F.IV Autres formes cliniques.....	38
F.IV.1 Forme suraiguë.....	38
F.IV.2 Forme associée à une détresse respiratoire.....	39
F.IV.3 Forme à rechutes.....	39
F.V Conclusion.....	39
<b>G- Examen paraclinique.....</b>	<b>40</b>
G.I Etude radiologique.....	40

G.I.1	Forme classique.....	40
G.I.2	Fomes particulières.....	41
G.I.3	Evolution.....	42
G.II	Exploration fonctionnelle respiratoire.....	42
G.II.1	Spirométrie.....	42
G.II.1.1	Paramètres spirométriques : définition.....	43
G.II.1.2	Forme aiguë subaiguë.....	44
G.II.1.3	Forme chronique.....	44
G.II.2	Mécanique respiratoire.....	45
G.II.2.1	Etude des échanges gazeux.....	45
G.II.2.1.1	Gazométrie.....	45
G.II.2.1.2	Diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone : Dlco.....	46
G.II.2.2	Etude de la compliance pulmonaire.....	47
G.III	Etude du liquide de lavage broncho-alvéolaire.....	47
G.III.1	Etude des populations lymphocytaires.....	47
G.III.2	Etude biochimique.....	49
G.III.2.1	Etude des protides.....	49
G.III.2.2	Etudes des lipides.....	50
G.III.2.3	Etude des substances vasoactives.....	51
G.IV	Conclusion.....	51
<b>H-</b>	<b>Examens biologiques standards.....</b>	<b>52</b>
H.I	Numérotation formule sanguine.....	52
H.II	Syndrome inflammatoire.....	52
H.III	Electrophorèse des protides sanguins.....	53
H.IV	Complément sérique.....	53
H.V	Test cutané tuberculinique.....	53
H.VI	Exploration immunologique.....	53
H.VI.1	Test de provocation in vivo.....	54
H.VI.1.1	Test d'inhalation.....	54
H.VI.1.2	Test cutanés.....	55
H.VI.2	Exploration immunologique in vitro.....	55
H.VI.2.1	Les allergènes d'alvéolite allergique extrinsèque.....	56

H.VI.2.2 Recherche d'un état d'hypersensibilité immédiate.....	57
H.VI.2.3 Recherche de précipitines.....	58
H.VI.2.3.1 Techniques de précipitation.....	59
H.VI.2.3.2 Technique immunoenzymatique : ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay).....	61
H.IV.2.3.3 Autres techniques utilisées pour la recherche de précipitines dans les alvéolites allergiques extrinsèques autres que celles du "brosseurs de saucissons".....	62
H.VI.2.3.4 Résultats.....	62
H.VI.2.4 Recherche d'une réaction d'immunité à médiation cellulaire.....	63
H.VI.2.4.1 Test de transformation lymphocytaire.....	64
H.VI.2.4.2 Test d'inhibition de migration des macrophages.....	65
H.VII Conclusion.....	66
<b>I- Etude anatomo-pathologique.....</b>	<b>67</b>
<b>J- Diagnostic différentiel.....</b>	<b>69</b>
J.I Dans les formes récentes.....	69
J.I.1 Avec la tuberculose miliaire et la sarcoïdose.....	69
J.I.2 Avec l'asthme.....	69
J.I.3 Avec les pneumopathies infectieuses non tuberculeuse.....	70
J.I.3.1 Virales.....	70
J.I.3.2 Bactériennes.....	70
J.I.4 Avec d'autres alvéolites allergiques extrinsèques.....	70
J.I.5 Avec le syndrome toxique des poussières organiques : (organic dust toxic syndrome).70	
J.II Dans les formes chroniques.....	71
J.II.1 Avec les pneumopathies infectieuses.....	71
J.II.2 Avec les granulomatoses.....	71
J.II.3 La lymphangite carcinomateuse.....	72
J.II.4 Les fibres interstitielles des maladies de système.....	73
J.II.5 Les pneumoconioses.....	73
J.II.6 Les causes cardio-vasculaires.....	75
J.II.7 Les pneumopathies toxiques et médicamenteuses.....	75
J.II.8 Diverses étiologies de fibrose pulmonaire.....	76

<b>K- Traitement</b> .....	77
K.I Eviction.....	77
K.II Traitement symptomatique.....	77
K.III Prévention.....	78

## Deuxième partie

<b>A- Introduction</b> .....	79
<b>B- Matériel et méthodes</b> .....	80
B.I Les antigènes.....	80
B.I.1 Préparation des antigènes PV 7, <i>Penicillium nalgiovense</i> et <i>Penicillium chrysogenum</i> total.....	80
B.I.2 Préparation des antigènes <i>Penicillium chrysogenum</i> somatique et métabolique.....	81
B.II Sérums.....	82
B.III Méthode.....	83
B.III.1 Immunoélectrophorèse rapide.....	83
B.III.2 Electrosynérèse : Co-immunoélectrodifusion CoIED.....	87
B.III.3 ELIFA : Enzym Linked Immunofiltration Assay.....	88
<b>C- But de l'étude</b> .....	92
<b>D- Résultats</b> .....	93
D.I Etude des résultats biologiques.....	93
D.I.1 Immunoélectrophorèse (IE).....	98
D.I.2 L'électrosynérèse (ES).....	98
D.I.3 L'ELIFA.....	99
D.II Etude de validité biologique de l'électrosynérèse et de l'ELIFA.....	100
D.II.1 L'électrosynérèse.....	100
D.II.2 L'ELIFA.....	102
D.III Résultats des études cliniques et épidémiologiques.....	104
D.IV Exploitation statistique des résultats.....	104

D.IV.1 Relation entre l'électrosynérèse et l'immunoélectrophorèse.....	104
D.IV.2 Relations entre les sérologies et l'exposition.....	105
D.IV.2.1 Relation entre les sérologies et l'exposition.....	106
D.IV.2.2 Relations entre l'électrosynérèse et l'exposition.....	106
D.IV.2.3 Relations entre l'ELIFA et l'exposition.....	107
D.IV.3 Relations entre le brossage et les sérologies.....	108
D.IV.3.1 Relation entre l'activité de brossage et l'immunoélectrophorèse (IE).....	108
D.IV.3.2 Relations entre le brossage et l'électrosynérèse (ES).....	109
D.IV.3.3 Relation entre l'ELIFA et l'activité de brossage.....	109
D.IV.4 Relation entre les signes cliniques et d'autres paramètres.....	110
D.IV.4.1 Relation entre les signes cliniques et l'exposition.....	111
D.IV.4.2 Relation entre les signes cliniques et le brossage.....	111
D.IV.4.3 Relation entre les signes cliniques et la sérologie.....	112
<b>E- Discusion.....</b>	<b>114</b>
E.I A propos des résultats obtenus en Immunoélectrophorèse, en Electrosynérèse et l'ELIFA.....	114
E.II A propos de la validité biologique des résultats.....	118
E.III A propos de l'exploitation statistiques des résultats.....	120
E.III.1 Relation entre la sérologie et l'exposition.....	120
E.III.2 Relation entre la sérologie et l'activité de brossage.....	121
E.III.3 Relation entre la symptomatologie et d'autres paramètres : exposition et sérologies..	122
<b>F- Conclusion.....</b>	<b>125</b>

PREMIERE PARTIE

## **A- Définition des alvéolites allergiques extrinsèques**

Les alvéolites allergiques extrinsèques, aussi appelées pneumopathies à précipitines, pneumonies interstitielles allergiques, pneumonies allergiques diffuses sont des pneumopathies granulomateuses interstitielles diffuses provoquées par une réaction d'hypersensibilité après inhalation répétée de particules organiques animales ou végétales ou de produits chimiques simples, doués de propriétés antigéniques.

Les allergènes peuvent être d'origine aérienne et atteindre les alvéoles par inhalation (poumon du fermier, poumon d'éleveur d'oiseaux...) ou peuvent parvenir aux unités alvéolo-capillaires par le flux sanguin (réaction aux médicaments) ; dans les deux cas il en résulte une atteinte inflammatoire de l'alvéole pulmonaire et de la bronchiole terminale due à la réaction immunoallergique.

## **B- Historique**

Déjà connue dans l'antiquité, la première description d'une pathologie pulmonaire engendrée par des antigènes organiques remonte à une étude de Bernardino Ramazzini da Carpi en 1713 faite chez les tamiseurs de grains. Pasteur-Vallery-Radot décrit des affections semblables chez les pelleteurs de grain en 1928, de même que Torvey chez les écorceurs d'érable en 1932 (3).

C'est en 1932 que Campbell rapporte ses observations sur le poumon du fermier.

En 1948, Felmann décrit pour la première fois des pneumopathies de sujets exposés à des déjections de pigeons. En 1960, Plessner rapporte des pneumopathies chez les trieurs de plumes de canard. En 1965, Reed publie une observation de poumon d'éleveurs de pigeons (3).

En 1980, N'Diaye, Adam et De Kergunic décrivent pour la première fois, un cas d'alvéolite allergique extrinsèque due à la flore de saucisson (31). En 1982, un deuxième cas sera décrit par Court (10). En 1984, Grange, Salque, Defauchy et Prost publient un troisième cas qui pour la première fois est nettement authentifié par un test d'exposition réaliste à la moisissure recueillie sur le lieu de travail (19).

D'autres cas d'alvéolite allergique extrinsèque due à la flore de saucisson ont été décrits depuis.

Pepys à partir de 1961 et Jenkins en 1964 décrivent les principales acquisitions immunologiques qui ont permis d'individualiser ces affections, mettant en évidence le rôle de l'hypersensibilité semi-retardée (type III dans la

classification de Gell et Coombs) et la présence d'anticorps précipitants dans le sérum des patients atteints d'alvéolite allergique extrinsèque de type poumon de fermier. Wenzel en 1971 et Marks en 1976 évoquent le rôle de l'activation lymphocytaire (3).

L'analyse du liquide de lavage broncho-alvéolaire à partir de 1974 a permis à Reynold en 1977 et à Voisin la même année de décrire les perturbations dans les alvéolites (3).

### **C- Classification des alvéolites allergiques extrinsèques**

Parmi les alvéolites allergiques extrinsèques, le poumon de fermier et le poumon d'éleveurs d'oiseaux sont les deux plus fréquentes mais il en existe beaucoup d'autres dont l'alvéolite allergique extrinsèque due à la flore de saucisson.

On peut identifier en fonction de l'origine des allergènes deux types d'alvéolites allergiques extrinsèques ; celles observées en milieu rural et celles observées en milieu industriel sachant que dans les deux cas la liste n'est pas exhaustive (Cf. tableau I et II page 5 et 6).

**TABLEAU I : PRINCIPALES ALVEOLITES ALLERGIQUES  
EXTRINSEQUES EN MILIEU RURAL**

<b>MALADIES</b>	<b>RESERVOIRS D'ANTIGENES</b>	<b>ANTIGENES</b>
Poumon des éleveurs d'Oiseaux	Sérum ou excreta aviaires	Protéines aviaires, Actinomycètes thermophiles, Champignons
Poumon du fermier	Foin moisi	Thermoactinomycètes * <i>Micropolyspora faeni</i> * * <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> ,...
Maladies des Champignonnistes	Compost ensemencé par les spores de champignons	Thermoactinomycètes * <i>Micropolyspora faeni</i> , Spores de pleurotes
Poumon du fromager	Croûtes de fromages recouvertes de moisissures	Acariens * <i>Penicillium casei</i>
Maladie des broyeurs de saucissons	Peaux de saucissons recouverts de moisissures	* <i>Penicillium nalgiovense</i> * <i>Penicillium chrysogenum</i>
Maladies des Minotiers et Grainetiers	Farine de blé contaminée par les charançons	Acariens * <i>Sitophilus granarius</i>
Maladies des Ecorceurs d'érable	Poussières entre écorces et bois d'érable	* <i>Cryptostroma corticale</i>
Maladie des Indigènes en Nouvelle-Guinée	Chaume des toits	* <i>Streptomyces olivaceus</i>
Maladies des Ouvriers du Paprika	Grains de Paprika	* <i>Mucor stolonifer</i>
Poumon d'insecticide	Insecticide contenant du pyréthre	* Pyrethrum

\* Dénomination actuelle : *Faenia rectivirgula*

**TABLEAU II : PRINCIPALES ALVEOLITES ALLERGIQUES  
EXTRINSEQUES OBSERVEES EN MILIEU INDUSTRIEL**

MALADIE	AGENT RESPONSABLE	INDUSTRIES CONCERNES	ANTIGENES
Bagassose	Résidu des fibres de canne à sucre	Papier, carton, isolants	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , Champignons
Suberose	Poussière de liège	Bouchons de liège. Produits manufacturés en liège	<i>Penicillium frequentans</i>
Maladie des ouvriers de produits détergents	Enzymes détergents ajoutés aux lessives	Lessives, savons	Enzymes du <i>Bacillus subtilis</i>
Byssinose Cannabiose Linose	Coton Chanvre Lin	Cordage, filatures, tissages Bobinages	Antigènes fongiques : Débris de la plante, Actinomycètes? Champignons ?
Maladies des malteries	Orge et houblon germés	Whisky, bière	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
Maladies des bois	Séquoia, sipo, iroko	Contre-plaqué, usinage menuiserie, rabotage	<i>Aureobasidium pullulans</i> Poussières fines des bois
Maladies des fourreurs	Poils d'animaux		Actinomycètes? Champignons ?
Poumon des torréfacteurs de café	Poussière de café vert	Torréfaction artisanale	Actinomycètes? Champignons ?
Poumon des travailleurs de la pâte à bois	Pâte de bois moisie	Industrie du bois	<i>Alternaria</i>
Poumons des climatiseurs (ou humidificateurs)	Moisissures des filtres des climatiseurs ou humidificateurs	Bureaux climatisés, industrie	<i>Micropolyspora faeni</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
Poumon des isocyanates	Isocyanates	Vernis, colles, peintures, mousse de polyuréthane	Isocyanate
Poumon des cordonniers	Cuir	Cordonnerie	Cuir
Poumon du médicament	Spécialité Pharmaceutique correspondante Post-hypophyse		Nitrofurantoïne, sulfamides, salazopyrine, PAS, clotrimazole, imidazole, pénicilline, tétracyclines, ampicilline, sels d'or, D-pénicillamine, phénylbutazone, azathioprine, acébutolol, hydrochlorothiazide, amiodarone, méthotrexate, procarbazine, diphénylhydantoïne, imipramine, carbamazépine, hydralazine, procaïnamide, oxyphénylbutazone

## **D- Epidémiologie**

Pour mieux comprendre l'épidémiologie de ces alvéolites professionnelles allergiques, il convient d'exposer dans un premier temps la technique de fabrication des saucissons.

### **D.I Technique de fabrication des saucissons**

Un saucisson sec moyen est composé d'environ trois quarts de viande maigre et d'un quart de gras auxquels s'ajoute un certain nombre d'ingrédients et d'additifs : sel, sucre, nitrate, aromates, épices, colorants et ferments. Les boyaux vont permettre la mise en forme du saucisson.

La fabrication du saucisson se fait en plusieurs étapes :

1- tout d'abord une sélection des viandes est réalisée puis une congélation en vue du stockage avant de travailler la viande.

2- les viandes sont décongelées et il est réalisé un présalage du maigre au sel et au nitrate et/ou du gras.

3- la mée est préparée par un hachage du maigre, du gras, un hachage simultané du maigre, du gras et un mélange du maigre, du gras et un mélange du maigre, du gras et d'additifs.

4- la mée est mise au repos en salle réfrigérée.

5- ensuite, le poussage est une opération qui consiste à remplir les boyaux avec la mée.

6- les saucissons sont mis sur bâton et trempés dans un bain de fleur de surface.

7- les saucissons subissent un égouttage puis un salage ou saumurage avant d'être étuvés.

8- l'étuvage peut se faire selon différentes techniques, mais les paramètres communs sont une température comprise entre 20 et 25°C, un pourcentage d'humidité qui varie de 60 à 90 % et une étuve qui est ventilée en permanence. Les saucissons sortent fleuris de l'étuve.

9- pour des raisons gustatives, éventuellement un fumage peut être réalisé mais cela freine le développement de la fleur de saucisson.

10- ensuite le séchage est pratiqué sous ventilation à 10-16°C avec une hygrométrie de 75 à 85 %.

En réalité, le séchage est rarement assez rapide pour éviter complètement le développement de toute moisissure sauvage, c'est pourquoi il est nécessaire de maintenir une dose d'ensemencement en fleur de surface suffisamment élevée, de maintenir les séchoirs propres par des nettoyages et des désinfections régulières.

11- enfin le traitement du saucisson avant la vente est la dernière étape. Il a pour but de rendre le saucisson plus attractif à la vente.

Il est d'abord brossé et lavé pour enlever les moisissures vertes de la fleur trop abondante. C'est au cours de cette manipulation que les personnes travaillant dans l'industrie du saucisson sont en contact avec les allergènes responsables de l'alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons".

Les saucissons subissent ensuite un fleurage ou un enrobage avant d'être étiquetés et mis en sachet. Le fleurage consiste à passer le saucisson dans un mélange pulvérulent de couleur blanche à base de talc et de poudre de riz, imitant la fleur naturelle.

## D.II Allergènes

La flore externe appelée fleur de saucisson, au moment du broyage est essentiellement constituée de Microcoques, de levures et de moisissures.

Elle est composée de moisissures sauvages qui se sont développées en cours d'étuvage, en début de séchage et de la fleur blanche de surface déposée sur le saucisson avant l'étuvage qui a pour but de freiner le développement trop important de ces moisissures sauvages et d'améliorer l'arôme du saucisson.

La moisissure d'apport de couleur blanche contenue dans la fleur blanche de surface est du *Penicillium nalgiovense*.

Parmi les moisissures sauvages aussi appelées moisissures vertes, la plus fréquemment rencontrée est le *Penicillium chrysogenum*.

## D.III Fréquence

Le nombre de cas d'alvéolite allergique extrinsèque à *Penicillium* est assez limité. Trois cas d'alvéolite allergique extrinsèque que l'on peut qualifier de domestiques, puisque les contaminations ont eu lieu chez des particuliers, ont été publiées. Dans deux cas, une défaillance du système de chauffage central est à l'origine du développement des moisissures qui ont entraîné une sensibilisation chez les deux couples logeant dans ces maisons. Les champignons impliqués dans ces deux cas étaient *Penicillium species* pour l'un et *Penicillium cyclopium*, *Penicillium chrysogenum* pour l'autre (15,51).

Le troisième cas relate la contamination d'une jeune femme par du *Penicillium expansum* présent dans l'air environnant de la maison (34).

Le nombre de cas d'alvéolite allergique extrinsèque à *Penicillium*, que l'on peut classer parmi les maladies professionnelles, est plus important. On trouve les cas d'alvéolite allergique extrinsèque du laveur de fromage dû à *Penicillium casei* et parfois à *Penicillium roquefortii* qui est cependant moins immunogène que *Penicillium casei* (12,16,28,4).

Il a été aussi rapporté des cas de sensibilisation aux moisissures chez des ouvriers du bois. Parmi ces moisissures ont été isolé de l'*Aspergillus* et du *Penicillium* (25). Des cas de suberoses ont aussi été décrits chez les travailleurs du liège. L'allergène impliqué est le *Penicillium frequentans* (50,44).

L'alvéolite allergique du "brosseur de saucissons" est certainement moins connue. Le nombre de cas répertoriés depuis 1980, date de la première alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons" décrite par N'Diaye, Adams et De Kergunic s'élève à douze (31,10,11,18,19,30,20).

Il est donc difficile d'établir l'incidence de la maladie même au sein d'une population exposée.

#### **D.IV Exposition professionnelle ; nature du poste de travail**

De par la nature de l'allergène impliqué dans l'étiologie de la pathologie, on peut aisément comprendre que seule les personnes travaillant dans l'industrie du saucisson sont exposées et donc susceptibles de développer une alvéolite allergique extrinsèque.

En effet, le mélange pulvérulent de commercialisation (poudre de riz et talc) déposé sur les saucissons après le brossage et le lavage n'est pas impliqué dans le processus physiopathologique puisqu'il ne contient pas de moisissures. De plus, une étude sérologique d'un malade s'est avérée négative vis à vis de ce mélange (19).

Les personnes les plus exposées sont celles qui se trouvent au poste de broissage - lavage des saucissons. En effet, le brosseur de saucisson respire un aérosol contenant de nombreuses poussières et moisissures, notamment les conidies de *Penicillium nalgiovense*.

L'opération épisodique de décapage s'effectue le plus souvent sur une machine composée de deux rouleaux brosses souples animés d'un mouvement de rotation qui crée un important aérosol au niveau des voies respiratoires supérieures du "brosseur de saucissons".

#### **D.V Age**

Cette pathologie touche les personnes de tout âge. Etant donné le nombre limité de cas décrits, il est difficile de se prononcer ; toutefois, il semblerait qu'il y ait un pic de fréquence autour de cinquante ans (Cf. tableau III).

#### **D.VI Sexe**

Le travail de broisseurs de saucisson est très souvent réalisé par les femmes car il semble à priori peu pénible. C'est pourquoi la grande majorité des sujets atteints sont du sexe féminin (Cf. tableau III).

#### **D.VII Durée d'exposition, temps de latence**

Dans les cas d'alvéolite allergique extrinsèque, la durée d'exposition n'a pas de conséquence sur l'intensité de la symptomatologie. Le temps de latence entre le début de l'exposition et l'apparition des premiers signes cliniques est très variable (Cf. tableau III).

**TABLEAU III : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DES DIFFERENTS CAS D'ALVEOLITE ALLERGIQUE EXTRINSEQUE A *PENICILLIUM NALGIOVENSE* DECRITS**

<b>Référence bibliographique de chaque cas</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Age (ans)</b>	<b>19</b>	<b>49</b>	<b>39</b>	<b>51</b>	<b>58</b>	<b>54</b>	<b>53</b>	<b>51</b>	<b>25</b>
<b>Sexe M : Masculin F : Féminin</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
<b>Durée d'exposition avant l'apparition des symptômes</b>	<b>qq. mois</b>	<b>2 ans</b>	<b>4 ans</b>	<b>5 ans</b>	<b>6 ans</b>	<b>3 ans</b>	<b>qq. jours</b>	<b>19 ans</b>	<b>qq. jours</b>

Trois cas pour lesquels nous n'avons pas de renseignements épidémiologiques et que nous n'avons pas répertorié dans ce tableau ont été rapportés par Grillot et coll (20).

#### **D.VIII Facteurs personnels**

En ce qui concerne les alvéolites allergiques extrinsèques, de nombreux points restent irrésolus. Le fait que seul certains patients exposés se sensibilisent, et qu'un certain nombre seulement des patients sensibilisés développent la maladie, reste inexpliqué. Ainsi parmi les patients qui présentent une alvéolite subclinique combien développent une maladie chronique et pourquoi ?

Le terrain atopique de certains patients peut être rapproché de l'étiopathogénie des alvéolites allergiques extrinsèques ainsi que la modification des défenses immunitaires. Cependant, ces circonstances favorisantes liées au

terrain même du sujet ne permettent pas d'expliquer de manière satisfaisante l'évolution vers l'alvéolite allergique extrinsèque (8,38).

Pour certains auteurs, il existerait un certain degré de prédisposition dont le substratum serait représenté par les antigènes du système d'histocompatibilité et notamment l'antigène HLA B<sub>8</sub> et/ou l'antigène HLA B<sub>W</sub><sub>40</sub>, mais ces données sont fragmentaires (1).

### **D.IX Rôle du tabac**

Une étude épidémiologique de Depierre et Dalphin dans le Doubs a montré une fréquence plus élevée de poumon de fermier chez des non fumeurs (14).

De nombreux auteurs suggèrent le rôle protecteur du tabac vis à vis des alvéolites allergiques extrinsèques (7).

Pour Carillo interviendrait une diminution de la concentration sérique d'IgG, IgM, IgA de 10-20 %, une augmentation paradoxale des IgE et un effet toxique plus général sur les lymphocytes T, plus particulièrement les lymphocytes T<sub>4</sub> helpers. Ceci entraînerait un défaut relatif de présentation du motif antigénique aux cellules immuno-compétentes et surtout une altération des fonctions des macrophages alvéolaires dont le rôle est primordial dans la pathogénie de la maladie (5).

Pour Pforte, l'effet de la cigarette interviendrait dans la réponse immune, en interférant avec la réaction inflammatoire et en modifiant la production d'IgE, de récepteur F<sub>c</sub> des IgE au niveau du macrophage, et la production d'IL<sub>4</sub> (38).

## **D.X Influence du climat**

Certaines entreprises utilisent une technique de séchage à l'air libre pendant plusieurs semaines. La quantité de moisissures se développant à la surface du saucisson varie en fonction des conditions météorologiques. Par temps sec, le saucisson se couvre de la moisissure blanche préensemencée sur le boyau. Par contre lorsque le temps devient humide, pendant une longue période, la moisissure verte tend à se développer sur la moisissure blanche et donne au saucisson un aspect verdâtre qui pourrait compromettre la vente. Il faut donc décaper entièrement le saucisson pour faire réapparaître la couche blanche. Ceci permet d'expliquer que la symptomatologie des sujets atteints réapparaissent plus volontiers par temps humide.

**TABLEAU IV : CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES  
D'HYPERSENSIBILITE SELON GELL ET COOMBS**

	<b>Type I ALLERGIE IMMEDIATE (anaphylaxie)</b>	<b>Type II CYTOLYSE</b>	<b>Type III ALLERGIE SEMI- RETARDEE (Phénomène d'Arthus)</b>	<b>Type IV ALLERGIE RETARDEE (Tuberculique)</b>
<b>DELAI D'APPARITION</b>	<b>immédiat (quelques minutes)</b>	<b>variable</b>	<b>semi-retardé (4 à 8 heures)</b>	<b>retardé (quelques jours)</b>
<b>DUREE</b>	<b>30 à 60 minutes</b>	<b>variable</b>	<b>2 à 24 heures</b>	<b>48-72 heures</b>
<b>EXEMPLES D'ANTIGENE</b>	<b>pneumallergènes pénicilline trophallergènes</b>	<b>antigène médicamenteux incompatibilité foeto- maternelle transfusion incompatible</b>	<b>actinomycètes thermophiles aspergillus enzymes protéolytiques</b>	<b>B.K. bactéries, virus, parasites, mycoses</b>
<b>ANTICORPS</b> - Type - Quantité - Fixation cellulaire	<b>Réagines : IgE- (IgG) circulants minime</b>  <b>+</b>	<b>IgG-IgM circulants, fixant le complément</b>  <b>0</b>	<b>Précipitines : IgG, IgM, IgA circulants et précipitants fixant le complément importante</b>  <b>0</b>	<b>non décelables</b>
<b>ROLE DU COMPLEMENT</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>0</b>
<b>TRANSMISSION PASSIVE</b>	<b>sérum</b>	<b>sérum</b>	<b>sérum</b>	<b>lymphocytes</b>
<b>DUREE</b>	<b>quelques jours</b>		<b>quelques heures</b>	<b>nombreux jours ou mois</b>
<b>MECANISMES</b>	<b>- les mastocytes fixent les IgE en présence d'antigène et libèrent des médiateurs chimiques vaso-actifs</b>	<b>- l'antigène est fixé à la cellule. - l'anticorps circulant se fixe sur l'antigène en présence de complément et aboutit à la lyse cellulaire</b>	<b>- formation de complexes antigènes- anticorps, avec fixation du complément au niveau de la paroi vasculaire - augmentation de la perméabilité capillaire</b>	<b>- captation de l'antigène par les macrophages. - infiltration locale de monocytes et lymphocytes sur le site d'introduction de l'antigène - sécrétion de lymphokines par les lymphocytes sensibilisés</b>
<b>LESIONS HISTOLOGIQUES</b>	<b>Inflammatoires, fugaces et réversibles : -vasodilatation - oedème - contraction muscles lisses - éosinophilie - hypersécrétion</b>	<b>- lyse cellulaire totale ou incomplète</b>	<b>- granulome inflammatoire à PN et PE - hémorragies et thromboses - atteintes vasculaires - nécroses fibrinoïdes tissulaires</b>	<b>- granulome inflammatoire avec infiltration de cellules mononuclées</b>
<b>EXEMPLES</b>	<b>- choc anaphylactique - urticaire - asthme</b>	<b>- anémie hémolytique - anémie post- transfusionnelle - rejets greffes accélérés</b>	<b>- maladie sérique</b>	<b>- allergie tuberculique - dermatite de contact</b>

## **E- Physiopathologie**

Nous exposerons successivement les hypothèses liées aux mécanismes immunologiques d'hypersensibilité répertoriés dans la classification de Gell et Coombs puis des mécanismes immunologiques moins spécifiques faisant intervenir diverses cellules immunocompétentes, médiateurs et effecteurs (Cf tableau IV page 15).

### **E.I Mécanismes immunologiques spécifiques**

A la suite des travaux initiaux de Pepys en 1966 et de Molina en 1969, on a vu se préciser le profil des pneumopathies immunologiques liées à l'environnement. Leur physiopathologie semblait reposer sur le schéma simple des maladies à complexes immuns appartenant à la classification didactique des hypersensibilités de Gell et Coombs. A l'heure actuelle, on peut affirmer que la réaction immunologique de type III associée au phénomène d'Arthus n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la physiopathologie des alvéolites allergiques extrinsèques, mais interviennent aussi d'autres types de réactions immunes.

#### **E.I.1 L'hypersensibilité du type III**

L'hypersensibilité du type III est une réaction immunologique faisant intervenir une agression allergique et la production d'anticorps circulants en réponse à cette agression.

Dans les alvéolites allergiques extrinsèques, le pneumallergène doit pouvoir atteindre l'alvéole pulmonaire ; dans le cas présent, le diamètre des conidies de *Penicillium nalgiovense* est compris entre 2,2 et 3,5  $\mu\text{m}$  (37).

Le dépôt antigénique à la surface de l'alvéole pulmonaire va provoquer la fabrication d'anticorps précipitants aussi appelés précipitines. Ces précipitines sont en grande partie des IgG, mais aussi pour une faible part des IgM et des IgA. Ces précipitines sont mises en évidence dans de nombreux cas d'alvéolites allergiques extrinsèques impliquant *Penicillium* (10,11,18,19,30,31,39,34) (15,51) ou tous autres types d'antigènes notamment *Microspora faeni* et *Thermoactinomyces vulgaris* (54,41).

Pour que le complexe antigène-anticorps puisse engendrer un réseau et entraîner des lésions tissulaires, il est nécessaire qu'il y ait un excès d'antigènes par rapport à l'anticorps dans un rapport de 3/2.

Les complexes immuns vont se déposer autour des petits vaisseaux et fixer le complément. L'activation de la voie classique du complément va aboutir à la formation de  $\text{C}_{3\text{a}}$  qui entraîne une agglutination plaquettaire, une augmentation de la perméabilité capillaire et une activation du  $\text{C}_5$  et  $\text{C}_7$ .

La libération de facteurs chimiotactiques favorise la margination des polynucléaires et leur diapédèse. Les polynucléaires et les macrophages phagocytent les complexes immuns et libèrent les enzymes lysosomiales.

Il en résulte des lésions inflammatoires et nécrotiques qui constituent les lésions de vascularites à l'origine des dégâts tissulaires.

L'intervention de l'hypersensibilité de type III dans la pathogénie de l'alvéolite allergique extrinsèque peut se justifier par différents arguments :

- cliniques : Les premiers symptômes apparaissent après un délai de 4 à 8 heures d'exposition aux moisissures (19,18,11).

Les tests de provocation respiratoire réalisés à l'aide de ces mêmes moisissures donnent des délais de réponses identiques (11,19).

Des modèles expérimentaux animaux sensibilisés avec des antigènes tels que *Micropolyspora faeni* ou de la sérum albumine bovine donnent des signes inflammatoires, cliniques et des délais de réponses superposables à ceux observés dans un phénomène d'Arthus.

- immunologiques : La présence de précipitines est constante chez tous les patients atteints d'alvéolite allergique extrinsèque. De plus, l'arrêt de l'exposition à l'allergène entraîne une diminution significative du titre de précipitines (54). Toutefois, il existe des sujets asymptomatiques qui possèdent des précipitines.

Un autre argument est la possibilité de transmettre la maladie à des singes normaux en leur faisant inhaler des antigènes, après leurs avoir transfusés le sérum de singes atteints de la maladie (3).

- cytologiques : L'utilisation de techniques de lavage broncho-alvéolaire a permis l'étude sur des sites assez proches des sites d'activités inflammatoires. Ces études du liquide de lavage broncho-alvéolaire confirment l'hypothèse selon laquelle, le premier événement après l'inhalation antigénique est une réaction à complexes immuns avec attraction chimiotactique de polynucléaires dans les alvéoles à partir du flux sanguin.

En effet, on a pu mettre en évidence une augmentation du pourcentage de polynucléaires et de l'activité chimiotactique neutrophile dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire du patient atteint d'alvéolite allergique extrinsèque (35).

Une étude récente de 1993 de Vogelmeyer a permis de mettre en évidence par chimiluminescence, l'augmentation de polynucléaires activés sanguins dans les premières heures suivant une stimulation antigénique chez des patients atteints de la maladie du poumon de fermier. Selon Vogelmeyer, lors de la phase aiguë d'une alvéolite allergique extrinsèque, les polynucléaires sont libérés du pool marginal dans la circulation sanguine et migrent à travers l'interstitium pour atteindre l'alvéole pulmonaire, participer à la réponse immune et à la réaction inflammatoire (52).

- histologiques : chez des patients porteurs d'une maladie de poumon de fermier, divers auteurs ont pu par immunofluorescence retrouver à la fois l'antigène, les dépôts d'immunoglobulines, et de C<sub>3</sub> dans les lésions. Ceci a été confirmé expérimentalement chez les lapins (1,29).

L'hypersensibilité de type III n'est pas le seul mécanisme impliqué. Elle intervient dans la phase précoce de l'alvéolite allergique, c'est à dire dans les 48 premières heures. Un mécanisme d'hypersensibilité retardée de type IV vient très probablement se surajouter après quelques jours.

### **E.I.2 L'hypersensibilité de type IV**

Le rôle de l'hypersensibilité à médiation cellulaire dans la pathogénie des alvéolites allergiques extrinsèques a été évoqué en 1969 par Seal mais la preuve n'en a été faite qu'en 1973 par Caldwell (3).

L'hypersensibilité de type IV est basée sur l'interaction entre l'antigène et les lymphocytes T sensibilisés.

Un certain nombre de médiateurs solubles, que sont les lymphokines, sont libérés par les lymphocytes. Ces lymphokines vont attirer et activer les macrophages qui seront responsables d'une cytotoxicité non spécifique. Une

sous-population de lymphocytes T est activée par les antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité et se différencie en cellules cytotoxiques pour les cellules cibles portant l'antigène approprié (notamment les macrophages). L'accumulation importante de macrophages va provoquer l'apparition de cellules épithélioïdes et l'apport de cellules géantes par fusion des macrophages.

Morphologiquement, cette combinaison de types cellulaires comprenant des macrophages, des lymphocytes proliférants et des fibroblastes associés à des zones de fibroses et des nécroses, constitue un granulome.

Certains arguments vont dans le sens d'une hypersensibilité de type IV :

- expérimentaux : Salvaggio a montré chez plusieurs espèces animales, que le transfert intrapéritonéal de cellules spléniques ou de ganglions lymphatiques sensibilisés, suivi d'une provocation antigénique par voie respiratoire, introduisait des lésions pulmonaires ressemblant étroitement à l'alvéolite allergique extrinsèque humaine (46,47).

Salvaggio a aussi montré chez des animaux d'expérience la présence de façon répétée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, de macrophages alvéolaires activés, de lymphocytes T, de taux élevés de lymphokines et d'immunoglobulines (46,47).

- cliniques : Même si chez l'animal d'expérience des délais de réaction de 24 à 48 heures après stimulation antigénique ont été démontrés, chez l'homme la chronologie d'apparition de signes cliniques semble plutôt en faveur d'une hypersensibilité de type III (3).

- histologiques : chez les patients atteints, les biopsies pulmonaires montrent presque constamment des images de granulome épithéliogiganticellulaire (1).

- cytologiques : l'analyse cytologique des liquides de lavage broncho-alvéolaire de malades atteints d'alvéolites allergiques extrinsèques montrent plusieurs jours après une exposition par inhalation une accumulation de lymphocytes, signe d'une hypersensibilité de type IV (53,6,21).

### **E.I.3 L'hypersensibilité de type I**

Il semble que le système IgE - basophile initie, dans certains cas au moins, les premiers chaînons physiopathologiques des alvéolites allergiques extrinsèques. Déjà la clinique nous permet de soupçonner une telle intervention par suite de la relative fréquence, de diverses étiologies dans les manifestations d'hypersensibilité immédiate sous forme d'éruption, d'hyperéosinophilie, de manifestation asthmatique (1).

De plus Morell et coll ont constaté un fort pourcentage de positivité du test cutané immédiat chez trente six patients atteints d'alvéolite allergique extrinsèque. Toutefois le dosage des IgE n'a pas montré une augmentation significative du taux chez ces malades (29).

Pforte par marquage immunocytochimique a permis de mettre en évidence à la surface des macrophages alvéolaires des récepteurs pour les fragments  $F_c$  des IgE. Ceci lui a permis de proposer le schéma explicatif hypothétique suivant sur l'interaction des IgE et macrophages dans l'alvéolite allergique extrinsèque. Les macrophages présentent l'antigène aux lymphocytes T spécifiques. Les lymphocytes T produisent des lymphokines dont l'IL4. L'IL4

va favoriser la synthèse par les lymphocytes B d'IgE spécifiques, et l'expression à la surface du macrophage de récepteurs pour le fragment  $F_c$  des IgE. La fixation d'IgE sur ces cellules entraîne la libération par le macrophage de cytokines et de substances vaso-actives.

Cependant l'implication des IgE dans une réaction immune immédiate n'a pu être évoquée que chez trois patients sur les dix que comporte l'étude de Pforte. Il concède donc que l'hypersensibilité de type I n'est qu'un épiphénomène dans la physiopathologie de la maladie (38).

Soler a mis en évidence une élévation du nombre de mastocytes et de basophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire immédiatement après l'inhalation d'un allergène chez des patients atteints d'alvéolite allergique extrinsèque. Parallèlement à cette augmentation de mastocytes, il a constaté que le taux d'histamine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire croissait de façon similaire. D'autres médiateurs ont été dosés par d'autres auteurs tels que le SRSA, ECFA, le PAF (platelet aggregating factor). Ces substances vaso-actives résultant de la dégranulation des mastocytes sont la marque de l'intervention de l'hypersensibilité immédiate dans l'initiation de la physiopathologie de l'alvéolite allergique extrinsèque. En effet, elle favorise l'accumulation possible des complexes immuns au niveau de la membrane basale du capillaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

#### **E.I.4 L'hypersensibilité de type II**

Elle ne semble pas jouer un rôle dans la survenue de l'alvéolite allergique extrinsèque et rien à l'heure actuelle ne permet d'impliquer l'ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) dans la physiopathologie de l'alvéolite allergique extrinsèque.

## **E.II Rôle du complément**

### **E.II.1 La voie classique**

L'activation de la voie classique du complément succède à la formation de complexes immuns. Certains IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> lorsqu'elles s'associent à l'antigène dévoilent sur le fragment F<sub>c</sub> au niveau des domaines CH<sub>3</sub> des IgM et CH<sub>2</sub> des IgG des sites qui deviennent des activateurs immuns du C<sub>1q</sub>.

La voie classique est un mode d'activation spécifique du complément qui aboutit à la production et à la libération de facteurs chimiotactiques, de substances vasoactives d'enzymes lysosomiales par les macrophages. Il en résulte une augmentation de la perméabilité vasculaire et des lésions nécrotiques.

### **E. II.2 La voie alterne**

Dès 1975, des études réalisées *in vitro* avaient montré que la poussière de foin moisi activait la voie alterne du complément aussi efficacement que le zymosan. C'est ainsi qu'en injectant de telles substances chez le rat et le lapin non préalablement sensibilisés, on observa des réactions histopathologiques similaires. On sait maintenant que certaines poussières organiques peuvent activer *in vitro* le complément avec la libération de C<sub>3b</sub> ; ce facteur est à l'origine de la libération par le macrophage d'enzymes lysosomiales qui accélèrent la production de C<sub>3b</sub>, entraîne l'apparition de facteurs chimiotactiques et aboutit à l'activation de nouveaux macrophages alvéolaires. Il est donc très vraisemblable que dans un assez grand nombre d'alvéolites allergiques extrinsèques, l'activation du complément puisse se faire au moins en partie par la voie alterne non spécifique, non immunologique (1).

### E.III Rôle des macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires ont un rôle central dans la physiopathologie de l'alvéolite allergique extrinsèque. Ces cellules issues des monocytes sanguins circulants, possèdent des récepteurs pour le fragment  $Fc$  des immunoglobulines et pour le  $C3$ . Les macrophages sont capables d'ingérer des antigènes particuliers et notamment fongiques et de phagocyter les complexes immuns. En présence de  $C3b$ , les macrophages alvéolaires vont libérer des enzymes lysosomiales. Ces derniers ont également la capacité de cliver le  $C3$ , d'engendrer ainsi la production de facteurs chimiotactiques du complément et du  $C3b$ , et d'aboutir à l'activation de nouveaux macrophages. Elles réalisent de cette façon un phénomène de recrutement macrophagique (1).

Les lymphocytes B et les plasmocytes interviennent en synthétisant les IgG spécifiques nécessaires à la formation de complexes immuns qui seront phagocytés par les macrophages (1).

Les lymphocytes T sensibilisés au contact de l'antigène vont produire des lymphokines, le MIF (migration inhibitory factor) qui active et immobilise le macrophage au lieu de l'inflammation, le MAF (migration activating factor), des facteurs blastogéniques. Ces lymphokines vont potentialiser l'activation des macrophages (46).

De plus Salvaggio a montré sur des modèles animaux la production locale d'IL1 par les macrophages, qui participe ainsi à la formation et à l'entretien de la lésion granulomateuse pulmonaire (46).

Salvaggio a aussi montré le rôle des produits de dégradation de l'acide arachidonique par la voie de la lipoxgénase. Le leucotriène  $C_4$ , le leucotriène  $D_4$ , le 5 HETE et le 12 HETE interviennent dans la régulation de la fonction des cellules immuno-compétentes et dans la genèse de la réaction inflammatoire (46,47).

Parallèlement, la voie de la cyclooxygénase conduisant à des métabolites de l'acide arachidonique habituellement impliqués dans l'inflammation semble n'avoir aucun rôle dans l'induction de la granulomatose pulmonaire expérimentale (46,47).

Selon Rylander, les macrophages jouent un rôle important mais les plaquettes riches en prostaglandines et autres médiateurs de l'inflammation sont très probablement impliqués dans la physiopathologie de l'inflammation pulmonaire (32).

D'autres auteurs tels que Costabel apportent quelques restrictions quant au rôle exact joué par les macrophages alvéolaires. En effet, les antigènes HLA DR (classe II) qui sont importants pour la présentation antigénique des macrophages aux cellules T, sont exprimés sur pratiquement tous les macrophages alvéolaires des sujets atteints de pneumopathie d'hypersensibilité, sans différence avec des sujets normaux et des patients porteurs d'autres maladies interstitielles pulmonaires. Les récepteurs à la transferrine sont exprimés seulement au cours de la phase de différenciation terminale des macrophages et sont responsables de la captation du fer qui est nécessaire pour augmenter la croissance cellulaire et la prolifération. Il est intéressant de noter que le pourcentage de macrophages alvéolaires exprimant les récepteurs à la transferrine est augmenté dans les sarcoïdoses actives et plutôt diminué dans les pneumopathies d'hypersensibilité. Peut-être que les récepteurs à la transferrine sont diminués en nombre dans les pneumopathies d'hypersensibilité par l'action de lymphocytes cytotoxiques et en particulier des cellules natural killer qui sont parmi les cellules prédominantes de cette maladie. Une autre explication pourrait être la disparition au moment de la phagocytose des particules antigéniques. Cependant, des études montrent l'activation des macrophages alvéolaires dans les pneumopathies d'hypersensibilité. Les activités phagocytaires et bactéricides des macrophages alvéolaires sont augmentées chez

le lapin deux et quatre semaines après sensibilisation et nouveau contact avec *Microsporydia faeni* (8,9).

Il a aussi été décrit récemment une augmentation de la méthylation des phospholipides membranaires des macrophages alvéolaires qui correspondent à une activation macrophagique chez certains porteurs d'hypersensibilité pulmonaire.

#### **E.IV Immunorégulation de l'alvéolite allergique extrinsèque et facteurs génétiques**

Il a été démontré chez des modèles animaux expérimentaux que la formation du granulome pulmonaire et la production d'IL<sub>1</sub> étaient associées à une inhibition de la réaction d'hypersensibilité retardée. Les cellules lymphoïdes des granulomes de ces souris anergiques ont la propriété de supprimer une réponse proliférative antigéno-induite et la production d'IL<sub>2</sub> par les lymphocytes T helpers. La réaction d'hypersensibilité retardée est corrélée à la production d'IL<sub>2</sub> par les lymphocytes T helpers qui induisent cette réaction d'hypersensibilité de type IV et qui peuvent réverser l'anergie de souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis*.

Ceci permet de penser que l'anergie est en relation avec une diminution de la production d'IL<sub>2</sub> antigéno-induite due à l'action de lymphocytes T suppresseurs ou de médiateurs solubles dérivés de ces lymphocytes (46,47).

De plus des animaux sensibilisés présentant une granulomatose ressemblant à une alvéolite allergique extrinsèque peuvent devenir désensibilisés suite à une série de provocations antigéniques. Cette désensibilisation est spécifique mais n'est pas transférable par immunosérum (46,47).

Des études immunogénétiques des pneumonies granulomateuses ressemblant à une alvéolite allergique extrinsèque ont été conduites dans différentes lignées de souris. Après inoculation de BCG tué, les bons répondeurs développent une granulomatose intense mais pas les mauvais répondeurs. L'intensité de la réponse granulomateuse est dans ce modèle un trait dominant polygénique lié au locus contrôlant les chaînes lourdes des immunoglobulines. Les lignées qui développent une réaction granulomateuse intense sont habituellement anergiques, l'anergie étant également sous contrôle génétique (46,47).

## **E.V Etude du liquide de lavage broncho-alvéolaire**

### **E.V.1 Cytologie**

La cytologie varie en fonction du type d'alvéolite et de la chronologie de l'exposition.

#### **E.V.1.1 Alvéolite précoce à polynucléaire**

Selon Yoshizawa, même si l'on a pu démontrer une augmentation du nombre de polynucléaires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire dans les phases aiguës d'alvéolite allergique extrinsèque, les polynucléaires neutrophiles ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules présentes dans l'alvéole pulmonaire ; autour de 10 % (35,53).

Les facteurs chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles sont des marqueurs plus fiables de l'importance des polynucléaires dans l'alvéolite précoce.

Selon Costabel, une augmentation significative du pourcentage de polynucléaires neutrophiles peut être observée dans les 24 heures suivant le début de l'exposition antigénique. Huit jours après, le pourcentage de polynucléaires et de lymphocytes ne diffère pas du taux initial avant exposition ; dans le lavage broncho-alvéolaire (8,9).

### **E.V.1.2 Alvéolites à lymphocytes dans les stades subaigus et chroniques**

Plusieurs jours après l'exposition par inhalation, la réponse locale immune va tendre vers une réaction à médiation cellulaire. A ce stade subaigu et chronique, la pneumopathie d'hypersensibilité se caractérise par une alvéolite lymphocytaire.

La lymphocytose moyenne est de 60 à 70 % alors que dans une sarcoïdose elle se situe entre 30 et 50 %.

Du point de vue morphologique, ce sont de grands lymphocytes de forme atypique à cytoplasme large et noyau irrégulier. A cette lymphocytose frappante s'ajoute une élévation modérée de polynucléaires neutrophiles : 8 à 10 %, quelques plasmocytes 0,1 à 2 %, voire quelques mastocytes (8,9,21,54,22,46,47,40,6).

#### **\* Population lymphocytaire**

Contrairement à la sarcoïdose et à la béryllose, maladies où prédominent les lymphocytes T helpers, les alvéolites allergiques extrinsèques sont des alvéolites à lymphocytes T de phénotype suppresseur cytotoxique positif pour le CD8. On observe donc dans ces pneumopathies d'hypersensibilité une diminution du rapport CD4/CD8. Les cellules natural killer sont significativement augmentées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et

l'on trouve des signes d'activation de lymphocytes T qui sont HLA DR positifs (8,9,21,54,22,46,47,40).

**\* Evolution de l'alvéolite lymphocytaire**

Lorsque les patients ne sont plus exposés aux risques, la lymphocytose peut persister des années malgré une amélioration ou une guérison clinique et un retour à la normale des polynucléaires neutrophiles, plasmocytes et mastocytes.

Après une diminution, le rapport CD4/CD8 revient à la normale. Les cellules T HLA DR se normalisent dans les six mois après la suppression de l'exposition.

**E.V.2 Biochimie**

Costabel a rapporté une composition anormale du surfactant montrant une diminution ou un défaut de phosphatidylcholine. Ces modifications sont corrélées à une augmentation de la viscosité du liquide alvéolaire et l'altération précoce de la diffusion alvéolo-capillaire.

**E.V.3 Immunologie**

Des concentrations élevées en IgG et IgA et accessoirement en IgM ont été détectées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des malades présentant des alvéolites allergiques extrinsèques (41).

On a pu montrer la spécificité de ces immunoglobulines en réalisant des réactions d'immuno-précipitation vis-à-vis d'allergènes impliqués dans ces alvéolites allergiques extrinsèques (30,54).

Reynolds et coll. ont pu mettre en évidence la production locale d'immunoglobulines au niveau de bronchioles pulmonaires, en dosant les immunoglobulines dans le sérum et le liquide de lavage broncho-alvéolaire et en calculant le ratio par rapport à l'albumine. En tenant compte de la capacité de diffusion capillaire des immunoglobulines sériques, il a pu montrer des concentrations en IgG, IgM et IgA dans les sécrétions bronchiques trois à sept fois supérieures à celles présentes dans le sérum (41).

La forte concentration locale en IgM et IgG permet de conforter le rôle physiopathologique de l'hypersensibilité de type III.

Le rôle des IgA semble plus obscur. Il leur a été conféré un rôle protecteur dans les alvéolites allergiques extrinsèques, car en se liant compétitivement avec les IgM et les IgG aux antigènes inhalés, elles limitent l'activation du complément et la réponse immune de type hypersensibilité retardée.

Cependant l'étude de Reynolds montre un taux aussi élevé d'IgA dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de sujets exposés asymptomatiques que dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de sujets symptomatiques. Il semble donc peu probable que les IgA aient un rôle protecteur dans les alvéolites allergiques extrinsèques.

## **E.VI Conclusion**

En conclusion, on peut résumer la physiopathologie des alvéolites allergiques extrinsèques en plusieurs étapes :

- une étape d'induction médiée par le système IgE-basophile faisant intervenir une réaction d'hypersensibilité immédiate. Cette étape peut être éventuellement associée à des réactions asthmatiformes qui favorisent la stagnation d'allergènes dans l'arbre respiratoire. La conséquence de ces

réactions d'hypersensibilité de type I est une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire.

- 4 à 8 heures après l'exposition antigénique entre en jeu l'hypersensibilité de type III avec formation de complexes immuns.

Au niveau de l'alvéole pulmonaire, on observe un afflux de neutrophiles qui par "release" de substances vasoactives va faciliter la diapédèse, l'infiltration de polynucléaires neutrophiles, l'oedème et des lésions de vascularite.

- 12 heures après le contact, l'hypersensibilité de type IV prend le relais. Il en résulte une alvéolite de type lymphocytaire constituée majoritairement de lymphocytes T<sub>8</sub> et de cellules natural killer.

- après quelques semaines, la réaction à médiation cellulaire se poursuit avec une augmentation du nombre de lymphocytes T<sub>4</sub> et aboutit à la formation d'un granulome.

- après quelques mois voire quelques années, la répétition des lésions alvéolaires peut aboutir à une prolifération fibroblastique. La fibrose pulmonaire devient un risque potentiel.

**TABLEAU V : Déroulement des réactions immunes et aspect de l'alvéolite dans les pneumopathies d'hypersensibilité (d'après COSTABEL) (35)**

<b>PERIODE</b>	<b>REACTION IMMUNE</b>	<b>ASPECT DU L.B.A.</b>	<b>ASPECT HISTOPHATHOLOGIQUE S ET RADIOLOGIQUES</b>
<b>4 à 48 HEURES</b>	<b>Réactions à complexes immuns</b>	<b>Afflux de neutrophiles</b>	<b>vascularite Oedème Infiltration neutrophile</b>
<b>12 heures à plusieurs jours</b>	<b>Réaction cellulaire</b>	<b>Augmentation des Lymphocytes CD8 + Cellules NK Plasmocytes</b>	<b>Infiltrat mononuclé essentiellement lymphocytaire</b>
<b>Quelques semaines à quelques mois</b>	<b>Réaction cellulaire de type retard</b>	<b>Augmentation des Lymphocytes CD4 + Cellules NK</b>	<b>Infiltrat mononuclé Granulome</b>
<b>Quelques mois à quelques années</b>	<b>Répétition des lésions alvéolaires Prolifération fibroblastique</b>	<b>Augmentation des lymphocytes Augmentation des neutrophiles</b>	<b>Fibrose Poumon en "Rayon de Miel"</b>

## **F- Diagnostic clinique**

En dépit de la grande variété de matériel antigénique, les symptômes des alvéolites allergiques extrinsèques sont relativement uniformes. On peut distinguer trois grands tableaux cliniques :

- la forme aiguë intermittente
- la forme subaiguë
- la forme chronique

Malgré le manque d'expérience en matière d'alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons", on peut affirmer que les signes cliniques et l'évolution sont semblables à ceux observés dans les autres pneumopathies d'hypersensibilité.

### **F.I La forme aiguë intermittente**

Elle est due à l'inhalation massive de conidies de *Penicillium nalgiovense* avec apparition des premiers signes cliniques dans les 4 à 8 heures suivant le début de l'exposition.

Elle est parmi les formes les plus fréquemment observées (10,11,18). Il est classique d'associer la forme aiguë à une exposition à des quantités importantes d'allergènes (40,42).

#### **F.I.1 Signes fonctionnels**

La dyspnée est le signe fonctionnel essentiel toujours présent à un moment ou à un autre de la maladie et aisément perceptible à la parole.

Malgré la suppression de l'exposition allergénique, la dyspnée persiste et disparaîtra plusieurs heures plus tard spontanément (49). Le patient fait rarement le rapport entre l'apparition de la dyspnée et l'exposition aux poussières organiques. C'est le médecin du travail qui semble le mieux placé pour diagnostiquer ce genre d'affection. En effet en dehors du contexte, seule une anamnèse poussée du malade permettra d'évoquer l'étiologie de cette pathologie. Entre ces périodes de stimulation antigénique, un certain degré de dyspnée d'effort peut persister.

La toux quasi constante est tenace, sèche, de type irritatif parfois coqueluchoïde. Plus souvent, la toux peut être accompagnée d'expectorations mucoïdes voire mucopurulentes et traduisent dans ce cas une surinfection bronchique (11,18,49,19,31). De la même manière que la dyspnée, la toux persistera et disparaîtra après plusieurs heures spontanément, après l'arrêt de l'exposition antigénique.

D'autres signes fonctionnels de moindre importance peuvent être associés. Une petite aphonie a été décrite par Court (10). Il a été rapporté des rhinites et des conjonctivites associées (11,12).

### **F.I.2 Signes généraux**

La fièvre d'apparition brutale peut être comprise entre 38° et 39° c. Dans les heures suivant le début de l'exposition elle ne traduit pas une surinfection bronchique (11,10,19).

Il est fréquent d'observer un syndrome général de type grippal avec fièvre, myalgies, arthralgies, céphalée et sueurs ; les arthralgies pouvant notamment s'expliquer par l'intervention d'un phénomène d'Arthus dans la physiopathologie de la maladie.

Un amaigrissement et une asthénie peuvent être observées si les épisodes dus à une exposition itérative surviennent fréquemment.

### **F.I.3 Signes physiques**

A l'auscultation pulmonaire, on peut retrouver la présence de râles crépitants et sous-crépitanants. Il s'agit de râles fins uniquement inspiratoires et prédominants à la fin de l'inspiration, parfois limités aux deux bronches mais le plus souvent diffus dans les deux champs pulmonaires et mieux perçus au niveau des bases. Leur valeur sémiologique est considérable et témoigne ici de la participation de l'alvéole au processus inflammatoire. Leur constatation chez un sujet dyspnéique n'est pas spécifique d'alvéolite allergique extrinsèque mais doit faire rechercher systématiquement la possibilité d'un contact antigénique (31,3,49). Une cyanose et une tachycardie peuvent être observées mais ne sont pas constantes (31).

### **F.I.4 Evolution**

Si l'on ne pense pas à rattacher la maladie à l'exposition professionnelle du sujet, les crises sont rythmées par les horaires de travail. Entre les crises, l'examen clinique est normal ce qui confirme la nécessité de consulter le médecin du travail de l'entreprise. La répétition des crises risque d'entraîner un amaigrissement et une asthénie et surtout un passage à la chronicité avec toutes les complications que cela peut comporter.

## **F.II La forme subaiguë**

Elle succède très souvent à la forme aiguë. Elle est aussi fréquente car c'est le stade de la maladie au cours duquel, le plus souvent le patient va consulter. Les signes cliniques sont habituellement moins nets à ce stade.

### **F.II.1 Signes fonctionnels**

La dyspnée est quasi constante et d'apparition progressive. On peut remarquer une dyspnée d'effort prononcée.

La toux est sèche non productive et rebelle à toute thérapeutique. C'est très souvent cette dyspnée plus ou moins invalidante et cette toux rebelle qui vont amener le malade à consulter.

### **F.II.2 Signes généraux**

On peut retrouver un syndrome algique.

L'amaigrissement et l'altération de l'état général sont des symptômes quasi constants, qui peuvent faire penser à une néoplasie.

Il peut exister des épisodes fébriles liés ou non à une surinfection bronchique.

### **F.II.3 Signes physiques**

On retrouve toujours les râles crépitants prédominants aux bases.

#### **F.II.4 Evolution**

A ce stade, la maladie est encore réversible s'il y a éviction de la source antigénique. Si la stimulation antigénique persiste, il existe un risque de passage à la chronicité.

#### **F.III La forme chronique**

La symptomatologie des alvéolites allergiques extrinsèques correspond à un tableau d'insuffisance respiratoire chronique liée à une fibrose pulmonaire. Cette évolution est rare dans le cadre d'alvéolite allergique extrinsèque de type poumon de fermier ou poumon d'éleveurs d'oiseaux. Elle n'a pour l'instant jamais été décrite chez les "brosseurs de saucissons", cependant cette forme chronique représente un risque potentiel, c'est pourquoi il semble important d'en parler. Etant donné le nombre limité de cas rapportés, il est difficile d'établir l'incidence des formes compliquées (40,49).

La forme chronique d'une alvéolite allergique extrinsèque fait le plus souvent suite à la forme subaiguë relativement insidieuse.

##### **F.III.1 Signes fonctionnels**

La dyspnée est constante. La toux d'accompagnement est en général productive associée à une hypersécrétion bronchique (3).

##### **F.III.2 Signes généraux**

On observe souvent une altération modérée de l'état général qui associe un amaigrissement, une asthénie, et une anorexie (3).

### **F.III.3 Signes physiques**

La cyanose est un signe fréquent. On pourra souvent remarquer un hippocratisme digital habituel dans les fibroses pulmonaire (49).

Les râles crépitants existent mais ils sont masqués par les complications de la pathologie à ce stade.

### **F.III.4 Evolution**

Le tableau d'insuffisance respiratoire chronique correspond à un stade irréversible de fibrose interstitielle diffuse. L'évolution se fait vers l'accentuation irréversible de la fibrose et vers le coeur pulmonaire chronique avec insuffisance ventriculaire droite. A ce tableau s'associe souvent un trouble ventilatoire obstructif, ces formes se présentent alors sous l'aspect d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive dont le diagnostic étiologique devient plus difficile.

## **F.IV Autres formes cliniques**

### **F.IV.1 Forme suraiguë**

Elle n'a jamais été décrite chez les "brosseurs de saucissons" mais elle est un risque éventuel dans le cadre d'alvéolite allergique extrinsèque. Elle se présente sous la forme d'un oedème aigu du poumon de type lésionnel. C'est une forme rapidement mortelle due à l'inhalation massive d'une grande quantité d'allergènes. Le décès survient dans un tableau d'hypoxémie réfractaire majeure (49).

### **F.IV.2 Forme associée à une détresse respiratoire**

Certaines alvéolites allergiques extrinsèques peuvent être associées à une atteinte de la plèvre altérant profondément la fonction respiratoire. C'est ainsi que l'on observe des alvéolites allergiques extrinsèques associées à des pneumothorax uni ou bilatéraux ou à des épanchements pleuraux importants (3).

### **F.IV.3 Forme à rechutes**

Les formes à rechutes correspondent le plus souvent à des périodes d'hospitalisation au cours desquelles on observe une amélioration spontanée de la maladie due à l'arrêt de la stimulation antigénique et en moindre partie au traitement symptomatique.

Si le diagnostic étiologique n'est pas posé ; lors de nouvelles stimulations, le sujet va rechuter. La symptomatologie pourra être de même intensité ou le plus souvent exacerbée. Il devient alors important de faire la relation entre la chronologie d'apparition des symptômes et les périodes de travail (11,15,30,27).

### **F.V Conclusion**

En conclusion, on peut dire que les signes cliniques sont évocateurs d'un diagnostic qui ne pourra être posé qu'après confirmation par la réalisation d'examens complémentaires que sont les examens paracliniques développés dans le prochain paragraphe et les examens biologiques.

## **G- Examen paraclinique**

Le diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque repose sur des examens complémentaires que sont l'étude radiographique, l'exploration fonctionnelle respiratoire et l'étude du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

### **G.I Etude radiologique**

On peut rencontrer différents aspects radiologiques des alvéolites allergiques extrinsèques mais aucune image n'est pathognomonique de la maladie. Il existe toutefois une forme classique qui correspond à l'image d'un syndrome interstitiel.

#### **G.I.1 Forme classique**

Dans la forme aiguë de la maladie, aucune anomalie ne peut être décelée sur la radiographie. Les premières images suspectes ne sont observées qu'à partir de la forme subaiguë.

Les anomalies observées sont celles d'un syndrome interstitiel : aspect en "verre dépoli" évoquant une pathologie alvéolaire, images réticulo-micronodulaires ou miliaires, opacités linéaires prédominants aux bases et dans les régions périhilaires évoluant vers le poumon en rayon de miel (10,31,49,27).

On observe aussi un épaississement de la trame broncho-vasculaire.

Au début de l'évolution, les foyers granulomateux sont disséminés donnant une image micronodulaire qui peut être discrète et fine à la limite de la visibilité ou au contraire très nette, donnant un aspect de miliaire dont le diagnostic différentiel est difficile.

Au stade plus avancé, l'extension de l'infiltration donne un aspect moins net aux nodules et il apparaît une opacité de type réticulaire intéressant tout le champ pulmonaire, de façon bilatérale et symétrique. La réticulation peut cependant être plus accentuée au niveau des bases.

Au stade ultime de fibrose interstitielle diffuse, correspondant aux formes chroniques, on observe l'aspect en rayon de miel : opacités linéaires circonscrivant des espaces clairs et réalisant une multitude de micro-cavités à parois fines assez bien dessinées, bien visibles à la périphérie du poumon.

Un tel aspect correspond à une fibrose interstitielle irréversible et à une diminution importante de la compliance pulmonaire (3).

Trois caractères négatifs sont importants à souligner :

- l'absence d'adénopathie hilare que l'on rencontre dans la sarcoïdose, mais leur présence a été parfois observée.
- l'absence d'épanchement pleural
- l'absence d'image cavitaire

Il est à noter que les perturbations radiologiques sont retardées par rapport aux troubles fonctionnels qu'objectivent l'exploration fonctionnelle respiratoire (13).

### **G.I.2 Formes particulières**

Les images réticulo-micronodulaires sont les plus fréquentes, toutefois on peut retrouver des aspects différents :

- aspect réticulo-macronodulaire
- aspect floconneux ou pommelé diffus, pseudo-oedémateux
- atteinte apicale

- forme unilatérale
- forme avec atteinte pleurale faisant rechercher une pathologie associée
- forme avec image d'emphysème et hyperclarté des bases

La radiographie peut aussi montrer une image strictement normale.

### **G.I.3 Evolution**

Tant que la radiographie ne montre qu'une image réticulo-micronodulaire voire réticulaire, l'arrêt d'exposition permet en environ un à deux mois d'observer la diminution très nette des lésions radiographiques.

## **G.II Exploration fonctionnelle respiratoire**

C'est une étude dynamique qui permet de qualifier et de quantifier l'anomalie de la fonction respiratoire. Si elle est réalisée à distance d'une stimulation antigénique, elle peut être négative à tort, c'est pourquoi il faut la réaliser après une stimulation volontaire ou professionnelle du malade.

### **G.II.1 Spirométrie**

Elle permet d'obtenir les volumes respiratoires statiques, dynamiques et les débits ventilatoires.

### G.II.1.1 Paramètres spirométriques : définition

Parmi les paramètres les plus importants, on trouve :

- la capacité vitale, CV = volume maximal d'air qui peut être expiré lentement et complètement après une expiration forcée,
- le volume résiduel, VR = volume d'air restant dans les poumons à la fin d'une expiration maximale,
- la capacité pulmonaire totale, CPT = volume d'air contenu dans les poumons après inspiration forcée.

Ces valeurs sont des volumes pulmonaires statiques, à la différence des valeurs pulmonaires dynamiques qui reflètent les propriétés non élastiques du poumons et principalement l'état des voies aériennes.

Parmi ces volumes pulmonaires dynamiques, on trouve le VEMS = volume expiratoire maximal seconde qui est le volume d'air maximal expiré pendant la première seconde après une inspiration complète. Normalement il est supérieur à 75 % de la capacité vitale. Cette valeur est souvent exprimée en pourcentage de la capacité vitale :  $VEMS/CV$ . Le rapport  $VEMS/CV$  est appelé rapport de Tiffeneau.

Ces différents paramètres permettent de définir le syndrome obstructif et le syndrome restrictif.

Le syndrome restrictif se définit par une capacité vitale inférieure à 80 % de la valeur théorique avec un rapport de Tiffeneau dans les normes.

Le syndrome obstructif est défini par un rapport de Tiffeneau inférieur à 75 % de la valeur théorique (12).

Il est à noter que le  $DMME_{25-75}$  %, qui correspond à la pente du VEMS comprise entre 25 et 75 % de la capacité vitale, est un indicateur plus sensible d'un syndrome obstructif à un stade précoce.

### **G.II.1.2 Forme aiguë subaiguë**

La forme subaiguë qui correspond à la plupart des cas décrits et la forme aiguë se présentent le plus souvent sous la forme d'un syndrome restrictif pur. Le rapport de Tiffeneau est normal alors que la capacité vitale est diminuée (10,18,39).

La capacité pulmonaire totale est diminuée et le rapport VR/CPT reste normal. Toutefois, dans un certain nombre de cas, les paramètres de l'exploration fonctionnelle respiratoire peuvent être normaux (11,19).

A distance des périodes d'exposition, les épreuves respiratoires se normalisent, c'est pourquoi il est parfois nécessaire de mettre en contact le sujet avec l'allergène présumé avant d'en réaliser l'exploration.

La normalité du test d'exploration fonctionnelle respiratoire ne permet pas d'écarter le diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque.

Dans d'autres cas d'alvéolites allergiques extrinsèques de type poumon de fermier ou poumon d'éleveurs d'oiseaux, il a été décrit un syndrome obstructif associé à un syndrome restrictif (3,42). A l'heure actuelle, aucune publication ne rapporte de syndrome mixte dans les alvéolites allergiques extrinsèques du "brosseur de saucissons".

### **G.II.1.3 Forme chronique**

Il n'a pas été rapporté de formes chroniques chez les "brosseurs de saucissons", toutefois dans les alvéolites allergiques extrinsèques, il a été décrit des formes chroniques dans lesquelles le syndrome restrictif fait place à un syndrome obstructif avec diminution du rapport de Tiffeneau et de la capacité vitale (24).

Dans le cas d'une évolution vers la fibrose pulmonaire, on peut observer une diminution de l'ensemble des volumes.

## **G.II.2 Mécanique respiratoire**

L'étude de la mécanique ventilatoire regroupe l'étude de la résistance des voies aériennes, de la compliance pulmonaire, des pressions inspiratoires et expiratoires classiques ainsi que les échanges gazeux.

### **G.II.2.1 Etude des échanges gazeux**

Elle peut être réalisée de façon statique en mesurant la gazométrie artérielle et dynamique en établissant la diffusion alvéolo-capillaire à l'oxyde de carbone DLco.

#### **G.II.2.1.1 Gazométrie**

Dans les premières phases de la maladie, on observe une hypoxémie plus ou moins marquée (diminution de la Pa O<sub>2</sub>) sans hypercapnie (Pa CO<sub>2</sub> normale) (39,49).

Il est possible d'observer dans certains cas une hypocapnie (31).

La Sa O<sub>2</sub>, capacité de saturation en oxygène de l'hémoglobine peut être légèrement diminuée (39).

A ce stade, la soustraction à l'exposition entraîne une normalisation rapide des paramètres biologiques.

Dans les formes chroniques, le tableau est celui d'une insuffisance respiratoire chronique avec majoration de l'hypoxie et une hypercapnie

fréquente. Au stade de fibrose irréversible, la normalisation de ces paramètres devient impossible.

#### **G.II.2.1.2 Diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone : DLco**

La diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone est définie comme le nombre de millilitres d'oxyde de carbone absorbés par minute et par millimètres de mercure. La DLco sur une seule respiration est déterminée en demandant au patient d'inspirer à fond à partir du volume résiduel un mélange contenant une concentration faible et connue d'oxyde de carbone et de rester en apnée pendant 10 secondes, puis d'expirer lentement jusqu'au volume résiduel. Un échantillon de l'air alvéolaire (en fin d'expiration) est analysé pour mesurer le taux d'oxyde de carbone et la quantité absorbée pendant cette respiration est alors calculée et exprimée en ml/min/mmHg. La diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone permet de mettre en évidence un trouble du rapport ventilation sur perfusion.

La diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone est souvent abaissée et de façon très précoce, ce qui est un apport important pour le diagnostic (31,39,49). Toutefois dans certains cas, elle peut rester normale (10,19).

Afin d'éliminer l'intervention de la restriction respiratoire dans l'évolution du transfert d'oxyde de carbone, la diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone peut-être rapportée au volume alvéolaire, VA. Le rapport  $DLco/VA$  traduit le transfert d'oxyde de carbone par unité de poumon ventilé (31).

### **G.II.2.2 Etude de la compliance pulmonaire**

La compliance pulmonaire statique est définie par la variation de volume par unité de pression et reflète l'élasticité et la distensibilité du poumon. Son évaluation nécessite l'utilisation d'une sonde oesophagienne à ballonnet ; ce qui est rarement réalisé. En clinique, la compliance pulmonaire est déduite de la modification des volumes pulmonaires statiques.

L'étude de la compliance pulmonaire est un bon marqueur de l'évolution vers la fibrose pulmonaire. Elle présente donc un intérêt dans le suivi des formes chroniques. Un abaissement de la compliance pulmonaire traduirait donc une évolution vers la fibrose interstitielle. Toutefois une compliance basse n'est pas un critère absolu d'irréversibilité (49).

### **G.III Etude du liquide de lavage broncho-alvéolaire**

Le lavage broncho-alvéolaire est réalisé au cours d'une bronchoscopie par instillation de solution physiologique de chlorure de sodium dans le poumon suivie d'une aspiration de ce liquide. Ceci permet d'étudier les cellules, les protéines, les lipides présents dans les alvéoles pulmonaires.

#### **G.III.1 Etude des populations lymphocytaires**

Le liquide de lavage broncho-alvéolaire d'un sujet sain contient 85 à 90 % de macrophages, 5 à 10 % de lymphocytes et moins de 5 % de polynucléaires. Dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire d'un sujet atteint d'alvéolite allergique extrinsèque, on va remarquer en premier lieu une hypercellularité du liquide (40). L'augmentation du nombre de cellules correspond à une augmentation du nombre absolu de lymphocytes, c'est

pourquoi on qualifie ces alvéolites de lymphocytaires. Il y a en principe une inversion du rapport macrophages/lymphocytes.

La valeur moyenne de lymphocytes est comprise entre 60 et 70 %. Toutefois, toutes les alvéolites lymphocytaires ne sont pas des alvéolites d'hypersensibilité.

Dans les sarcoïdoses, on observe des alvéolites lymphocytaires mais en principe le taux de lymphocytes ne dépasse pas les 50 % (8,9,40). Dans certains cas d'hypersensibilité, il a été rapporté des taux de lymphocytes approchant les 90 % (54).

Cependant, dans les phases aiguës de la maladie, on peut observer parallèlement à l'augmentation du nombre de lymphocytes, une augmentation fugace du nombre de polynucléaires neutrophiles dont le taux dépasse 5 % et peut atteindre jusqu'à 30 % (40).

La découverte d'une lymphocytose alvéolaire chez un sujet en contact avec des allergènes responsables d'alvéolites allergiques ne signifie pas que ce sujet soit porteur de la maladie. La signification de l'alvéolite lymphocytaire chez des sujets exposés asymptomatiques n'est pas connue mais deux hypothèses sont à retenir :

- l'alvéolite lymphocytaire représente une forme infraclinique d'alvéolite allergique.

- la présence de lymphocytes constitue une défense normale à l'inhalation répétée d'antigènes (6).

De plus l'absence de progression clinique en présence d'abondants lymphocytes alvéolaires nous permet de penser que la lymphocytose alvéolaire n'est pas synonyme de forme chronique progressive de la maladie.

L'étude des sous-populations lymphocytaires nous montre une nette prédominance des lymphocytes T par rapport aux lymphocytes B (8,9,1).

Alors que dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de sujets normaux le rapport lymphocytes T helpers/lymphocytes T suppresseurs est plutôt favorable aux lymphocytes T helpers ; on observe dans les alvéolites allergiques une inversion du rapport CD4/CD8, ce qui permet notamment de faire le diagnostic différentiel avec la sarcoïdose qui présente une augmentation des lymphocytes T helpers et une augmentation du rapport CD4/CD8 (54,22).

Cependant, ceci n'est pas spécifique car il faut savoir que l'on peut aussi observer une inversion du rapport CD4/CD8 chez les sujets exposés asymptomatiques précédemment décrits présentant une lymphocytose alvéolaire (40).

Parmi les autres cellules que l'on peut retrouver dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, on pourra observer des macrophages alvéolaires activés présentant un métabolisme intense avec des inclusions cytoplasmiques mais aussi des mastocytes. Une étude de Soler a permis de mettre en évidence une quantité de mastocytes 1000 fois supérieure à la normale dans les heures suivant un contact allergique dans le cadre d'une hypersensibilité pulmonaire (48).

## **G.III.2 Etude biochimique**

### **G.III.2.1 Etude des protéides**

Le dosage des protéines dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire est exprimé en valeur absolue ou peut-être apprécié par rapport à une substance de référence, l'urée notamment ; ce qui permet d'éviter une erreur liée à une dilution excessive éventuelle.

L'albumine est en général augmentée, et il n'existe pas de différence significative entre la phase aiguë et la phase de repos d'une alvéolite allergique extrinsèque (53).

On observe une augmentation du taux d'immunoglobulines qui est surtout due à une augmentation de la quantité d'IgA et d'IgG. De plus on peut remarquer qu'il existe une différence significative du taux d'IgG et d'IgA entre les phases aiguës et les phases de repos où les IgA et les IgG sont en quantité moindre (53).

Cependant le rapport immunoglobulines/albumine n'est pas significativement différent entre les deux phases.

Le dosage des facteurs de fibroses pulmonaires ne peut être effectué en routine, toutefois, il a été réalisé dans différentes études. Les facteurs les plus fréquemment étudiés sont le procollagène type III, l'acide hyaluronique, la fibronectine, le FGF (Fibroblast Growth Factor) (24).

On observe une augmentation de ces différents paramètres dans les hypersensibilités pulmonaires. De plus le dosage du procollagène type III et de l'acide hyaluronique serait corrélé avec la symptomatologie c'est à dire que l'on observe une augmentation de ces paramètres dans les phases aiguës et une diminution dans les phases de non exposition antigénique.

Une étude réalisée sur six ans n'a pas montré de corrélation entre les paramètres précédents et l'évolution de la fonction pulmonaire. Toutefois, une faible corrélation a été montrée entre le taux de fibronectine et l'image pulmonaire au scanner dans les phases aiguës (24).

### **G.III.2.2 Etudes des lipides**

L'analyse des lipides est plus représentative de l'état pulmonaire que l'étude des protides.

Le taux des phospholipides totaux est augmenté. La fraction phosphatidyl-choline est plus souvent abaissée alors que les fractions phosphatidyl-éthanol-amine et phosphatidyl-inositol sont augmentées.

Ces paramètres sont très intéressants car ce sont de très bons marqueurs de l'état des pneumocytes responsables de la sécrétion de surfactant (3).

### **G.III.2.3 Etude des substances vasoactives**

Le dosage de l'histamine présente plus un intérêt fondamental qu'un réel intérêt diagnostique. En effet, il a été réalisé dans certaines études pour montrer le rôle que joue l'hypersensibilité immédiate dans la physiopathologie des alvéolites allergiques extrinsèques. De plus ce dosage ne semble pas très fiable car il y a un release d'histamine par les mastocytes dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire après que le prélèvement ait été réalisé.

On peut tout de même signaler une augmentation du taux d'histamine parallèle à l'augmentation du taux des mastocytes dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire dans les phases aiguës d'hypersensibilité pulmonaire (48).

### **G.IV Conclusion**

En conclusion, une étude cytologique et biochimique du liquide de lavage broncho-alvéolaire est un apport supplémentaire à l'imagerie médicale et à l'étude fonctionnelle respiratoire. Seule la confrontation de tous les résultats permettra d'affirmer le diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque.

## **H- Examens biologiques standards**

Ces examens ne permettent pas de mettre en évidence une anomalie spécifique des alvéolites allergiques extrinsèques, mais sont des éléments d'orientation dans le diagnostic et de suivi dans l'évolution de la maladie.

### **H.I Numérotation formule sanguine**

Dans beaucoup de cas, la numération formule sanguine est assez peu perturbée. Le nombre des globules rouges, des globules blancs, de plaquettes et le taux d'hémoglobine sont normaux (10,11).

Toutefois, on peut dans un certain nombre de cas remarquer une hyperleucocytose modérée avec polynucléose neutrophile (19,49).

L'hyperleucocytose semble plus fréquente dans les alvéolites allergiques extrinsèques dues à d'autres *Penicillium* que *Penicillium nalgiovense*, notamment dans les alvéolites allergiques extrinsèques domestiques. Elle est d'ailleurs souvent plus marquée (34,15,51).

Il n'a pas été rapporté de cas d'hyperéosinophilie due à une alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons".

### **H.II Syndrome inflammatoire**

L'alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons" se présente sur le plan biologique comme un syndrome inflammatoire.

La vitesse de sédimentation sera le plus souvent modérément augmentée. Toutefois, dans certains cas elle pourra être normale (11,10).

Le fibrinogène évolue de façon similaire à la vitesse de sédimentation puisque celle-ci est intimement liée à la quantité du fibrinogène.

### **H.III Electrophorèse des protides sanguins**

L'électrophorèse des protides sanguins permet de mettre en évidence une augmentation polyclonale d'immunoglobulines qui porte essentiellement sur les IgG et en moindre importance sur les IgA.

L'augmentation modérée de la protidémie si elle survient est liée à une augmentation des protéines inflammatoires et des immunoglobulines.

### **H.IV Complément sérique**

Le complément sérique n'est le plus souvent pas diminué dans le sang (31). En effet, la consommation de complément est locale au niveau pulmonaire et insuffisante pour faire baisser la complémentémie.

### **H.V Test cutané tuberculinique**

L'anergie tuberculinique a été observée sur des modèles animaux expérimentaux (46,47). Elle n'a jamais été décrite ni testée chez des "brosseurs de saucissons" ayant une alvéolite allergique extrinsèque.

### **H.VI Exploration immunologique**

L'exploration immunologique peut être divisée en deux parties :

- les tests de provocation in vivo
- l'exploration immunologique

## H.VI.1 Test de provocation in vivo

### H.VI.1.1 Test d'inhalation

Cette épreuve consiste à faire inhaler au patient une solution antigénique préparée à partir de l'allergène que l'on pense être responsable de la symptomatologie. Ce test de réalisation simple doit être exercé en milieu hospitalier sous surveillance attentive. Après exposition, le malade est suivi toutes les heures au début puis par tranches de plusieurs heures. On recueillera des renseignements cliniques, biologiques, radiologiques, fonctionnels respiratoires.

Les tests d'inhalation des moisissures de saucisson entraînent :

- une augmentation de la température corporelle quatre heures après l'exposition
- une augmentation du nombre de leucocytes à la quatrième heure
- une diminution significative de la diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone à la vingt-quatrième heure
- une non modification de la spirométrie
- une toux et une dyspnée à la huitième heure

La température et le nombre de leucocytes retournent à la normale en 24 heures (19).

Sur le plan radiologique, étant donné le temps de latence nécessaire à l'apparition d'opacités parenchymateuses, on ne peut espérer avoir une modification de l'image qu'après quelques jours.

### H.VI.1.2 Test cutanés

Les tests cutanés sont le plus souvent réalisés par intradermo-réaction avec une solution antigénique composée à partir de l'allergène en cause.

La solution antigénique peut être préparée à partir de culture de *Penicillium nalgiovense* ou à partir du produit de broyage des saucissons. Ces tests cutanés peuvent parfois être difficiles à interpréter car les solutions préparées sont parfois irritantes et sont donc responsables de réactions non spécifiques.

La lecture des tests cutanés se fait en deux temps :

- une lecture instantanée qui permet d'apprécier une réaction immédiate
- une lecture à la sixième heure ou la vingt-quatrième heure qui permet d'apprécier une réaction semi-retardée.

D'après un cas rapporté par Dalphin, ces tests cutanés ont été réalisés chez une patiente présentant une hypersensibilité pulmonaire à la poussière de saucisson. Ces tests ont été réalisés à partir de deux solutions de produit de broyage de saucisson de fabrication différente. La patiente a présenté pour les deux solutions une réaction semi-retardée intense sans réaction immédiate.

Parallèlement, trois témoins dont deux possédaient un terrain atopique n'ont pas présenté de réaction (11).

Ceci confirme le rôle joué par l'hypersensibilité de type III dans la physiopathologie de l'alvéolite allergique extrinsèque du brosseur de saucisson.

### H.VI.2 Exploration immunologique in vitro

C'est une étape importante de la démarche diagnostique de l'alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons". En effet la mise en évidence

de précipitines dans les pneumopathies immunologiques est la preuve de l'exposition et de la sensibilisation du malade.

#### **H.VI.2.1 Les allergènes d'alvéolite allergique extrinsèque**

Les antigènes peuvent être préparés à partir de culture pure de *Penicillium nalgiovense* ou de *Penicillium chrysogenum* ou à partir de la poudre de broyage des saucissons.

En principe les cultures pures de *Penicillium nalgiovense* et de *Penicillium chrysogenum* sont obtenues par ensemencement sur gélose Sabouraud de la poudre de broyage et repiquages successifs.

##### *Penicillium chrysogenum* : culture

Il présente un thalle à croissance rapide vert bleu à vert jaune devenant gris ou brun ; souvent surélevé au centre sillonné radialement, velouté ou un peu floconneux. Le revers est jaune vif à brun jaune parfois brun rouge. Un exsudat jaune plus ou moins foncé à brun jaune diffusible est généralement présent (37).

L'odeur est en principe aromatique.

A l'aspect microscopique, on observe des pénicilles asymétriques et souvent complexés à ramifications divergentes. Les conidiophores lisses portent des métules sur lesquels sont fixés des phialides ampulliformes. Les conidies subglobuleuses lisses sont disposées en longues colonnes irrégulières.

C'est un *Penicillium* commun que l'on peut trouver dans le sol, les denrées alimentaires et les matières organiques (37).

*Penicillium chrysogenum* peut être toxique par la production de pénicillines et de notatine pouvant perturber le transport d'oxygène par le sang (37).

*Penicillium nalgiovense* : culture

Sur milieu CIA, le thalle est floconneux jaune pâle, orange ou chamois au centre et à conidiogénèse réduite. Le revers est jaune avec un exsudat clair à brun. Le conidiophore est lisse ou très finement granuleux. Il porte des métules et des phialides ampulliformes. Les conidies sont globuleuses lisses vertes pâles en masse.

On retrouve ce *Penicillium* sur les fromages d'Ellischauer, à Nalviogy en Bohême. Il est bien évidemment commercialisé et utilisé comme couverture pour les saucissons. Il n'est pas toxique (37).

*Penicillium nalgiovense* est le champignon que l'on retrouve en quantité la plus importante dans la poudre de brossage.

Les précipitines mises en évidence dans les alvéolites allergiques extrinsèques des "brosseurs de saucissons" sont principalement dirigées contre *Penicillium nalgiovense* (18). *Penicillium chrysogenum* ne donne que de faibles réponses sérologiques. Il est possible de tester les sérums par rapport à une solution antigénique de poudre de brossage de saucisson. Les résultats obtenus permettent d'affirmer sans équivoque la présence de précipitines dirigées contre les moisissures de saucisson (11).

#### **H.VI.2.2 Recherche d'un état d'hypersensibilité immédiate**

En dehors des patients présentant un terrain atopique, on n'a jamais pu mettre en évidence une augmentation du taux d'IgE sériques dans les alvéolites

allergiques extrinsèques même si on leurs reconnaît un rôle dans la physiopathologie de ce type d'hypersensibilité pulmonaire.

L'intérêt de détecter un terrain atopique réside dans le fait que le bronchospasme facilite la stagnation des conidies de *Penicillium* au niveau des alvéoles et ainsi favorise la sensibilisation.

Les IgE spécifiques peuvent être recherchées par des techniques immuno-enzymatiques ou par des techniques radioimmunologiques de type RAST (Radio Allergo Sorbent Test).

### **H.VI.2.3 Recherche de précipitines**

Il est possible de mettre en évidence la présence de complexes immuns circulants de manière non spécifique en utilisant leurs propriétés physiques ou biologiques ou de façon spécifique en utilisant leurs propriétés immunologiques.

Les explorations les plus intéressantes sont celles permettant la mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène de la maladie .

Cependant on peut détecter les complexes immuns circulants par une technique de précipitation par le PEG (Polyéthylène Glycol) ou par néphélométrie après avoir utilisé la propriété qu'ont les complexes immuns circulants de se lier au C1<sub>q</sub>. En effet, en mettant en présence le sérum du malade avec des particules de latex sur lesquelles sont fixées le C1<sub>q</sub>, on peut doser les complexes immuns circulants.

Toutefois, les techniques permettant la détection d'anticorps spécifiques sont les plus utilisées et ce sont celles que nous allons détailler.

### H.VI.2.3.1 Techniques de précipitation

Ce sont les techniques les plus couramment utilisées. Elles permettent de mettre en contact l'antigène et l'anticorps par migration sur des supports qui peuvent varier. Dans la zone d'équivalence antigène-anticorps, il va se former un ou plusieurs arcs de précipitation. Les plus utilisées sont :

- l'immunodiffusion double d'Ouchterlony
- l'immunoélectrophorèse selon Grabar
- l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de Laurell
- la coimmunoélectrodifffusion ou électrosynérèse
- l'ELIFA = Enzyme Linked Immuno Filtration Assay

#### \* l'immunodiffusion double d'Ouchterlony

Cette technique utilise un gel dans lequel est creusé deux puits, un pour l'antigène l'autre pour le sérum. Le sérum et la solution antigénique vont diffuser dans le gel pour créer éventuellement un arc de précipitation qui sera révélé grâce à une coloration.

Cette technique longue n'est pas très sensible. Elle est le plus souvent utilisée en association avec une technique plus sensible dans le cadre de dépistage massif (11,31).

#### \* l'immunoélectrophorèse selon Grabar

C'est une technique en gel d'agarose qui permet la séparation électrophorétique de l'antigène puis une diffusion des anticorps du sérum et donc une précipitation des complexes immuns.

Cette technique est plus sensible et plus spécifique que la technique d'immunodiffusion d'Ouchterlony mais est tout aussi longue.

Toutefois, c'est probablement la technique d'immunoprécipitation la plus utilisée (31,11).

\* l'électrophorèse bidimensionnelle de Laurell

Cette technique utilise deux électrophorèses en gel, successives. La première électrophorèse permet une séparation des anticorps dans le sérum, la seconde électrophorèse perpendiculaire à la première permet la migration des anticorps dans le gel imprégné d'antigène. Cette méthode permet d'obtenir après coloration des arcs de précipitations dits en « fusée » dont la hauteur est proportionnelle à la quantité d'anticorps dans le sérum.

Cette technique est sensible, spécifique mais est peu utilisée.

\* la coimmunoélectrodifffusion sur membrane d'acétate de cellulose CoIED ou électrosynérèse

La technique consiste à déposer sur une membrane d'acétate de cellulose du côté anodique de la membrane, les sérums à étudier et du côté cathodique de la membrane, l'antigène. La migration électrophorétique des deux constituants l'un vers l'autre va permettre la formation d'arcs de précipitation qui seront révélés ultérieurement (30,36,17).

Cette technique est simple, rapide (environ trois heures dont deux heures de migration) et sensible (30,36,17).

\* ELIFA : Enzym Linked Immuno Filtration Assay

C'est une technique qui ne peut être réalisée que si l'électrophorèse est positive. En effet, cette méthode consiste à révéler les arcs obtenus en électrosynérèse par fixation d'antiglobulines spécifiques sur les complexes antigènes-anticorps de précipitation après filtration de la bande d'acétate de cellulose par la solution d'antiglobuline spécifique marquée par une enzyme. Il suffit ensuite de révéler par une solution de substrat. Ceci permet d'obtenir les isotypes des immunoglobulines correspondant aux précipitines impliquées dans la pathologie.

Cette technique avait été développée à l'origine pour réaliser le diagnostic de toxoplasmose congénitale chez le nouveau-né.

**H.VI.2.3.2 Technique immunoenzymatique : ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay)**

La technique ELISA utilise des plaques sensibilisées avec l'antigène contre lequel sont dirigées les précipitines. Le plus souvent, les antigènes étant personnalisés, la préparation des plaques est faite au laboratoire. La révélation se fait par des antiglobulines marquées par une enzyme puis par rajout d'une solution substrat. Cette technique n'a jamais été utilisée pour les alvéolites allergiques extrinsèques du "brosseur de saucissons" mais a été utilisée pour des alvéolites allergiques extrinsèques domestiques à *Penicillium* (15).

Cette technique est simple, automatisable, quantitative, rapide.

### **H.VI.2.3.3 Autres techniques utilisées pour la recherche de précipitines dans les alvéolites allergiques extrinsèques autres que celles du "brosseur de saucissons"**

#### **\* Réaction d'immunofluorescence indirecte**

Elle est réalisée pour la recherche de précipitines dans le poumon d'éleveurs d'oiseaux.

Ceci semble difficilement réalisable pour les alvéolites allergiques extrinsèques du "brosseur de saucissons".

#### **\* Radio-immunologie**

Le principe est le même que pour l'immunoenzymologie mais l'antiglobuline est radiomarquée par l'iode 135. Cette technique est plus lourde à mettre en oeuvre et moins maniable que l'ELISA donc moins intéressante.

#### **\* Hémagglutination**

Cette technique est utilisée pour le poumon d'éleveurs d'oiseaux. Elle permet de raccourcir le temps de réponse et est facile à réaliser. Le problème réside dans la fabrication d'hématies sensibilisées.

### **H.VI.2.3.4 Résultats**

Le premier paramètre à prendre en compte avant d'interpréter les résultats est la qualité de l'antigène utilisé. En effet, la sérologie doit être ciblée sur le ou les principaux antigènes responsables de l'alvéolite. Ceci nécessite une

étude approfondie de l'environnement au contact duquel les malades se sont contaminés (32).

Les sérologies montrent le plus souvent la présence surtout d'IgG mais aussi d'IgA spécifiques en grande quantité en phase aiguë. On retrouve aussi des IgM et beaucoup plus rarement, en dehors de tout contexte atopique, des IgE (33).

Certains sujets ont remarqué que les malades exposés possédaient plusieurs types d'immunoglobulines alors que les sujets exposés asymptomatiques ne présentaient qu'un seul isotype d'IgA ou IgG (32).

A distance des périodes d'expositions, on peut remarquer une diminution significative du taux d'IgG et d'IGA (33).

Cependant la présence de précipitines ne signe pas forcément la maladie. En effet, une sérologie positive est un bon marqueur de l'exposition mais doit être confrontée aux signes cliniques et au reste de l'exploration fonctionnelle.

Toutefois, une forte sérologie a plus de probabilité de signer une alvéolite alors qu'une faible sérologie traduirait plutôt une exposition.

#### **H.VI.2.4 Recherche d'une réaction d'immunité à médiation cellulaire**

Ce sont des techniques peu utilisées en routine.

On distingue deux types :

- test de transformation lymphoblastique
- test d'inhibition de migration des macrophages

### H.VI.2.4.1 Test de transformation lymphoblastique

#### \* Principe

Le petit lymphocyte a la propriété de se transformer en cellule lymphoblastique lorsqu'il est mis en présence de certaines substances stimulantes dites blastogéniques, certaines sont spécifiques (antigènes avec lesquels le petit lymphocyte a été en contact) et d'autres ne le sont pas (phytohémagglutinines) (13).

#### \* Technique

On isole les cellules mononuclées à partir de sang veineux puis on rajoute l'agent présumé blastogénique.

Une difficulté majeure consiste à choisir très exactement la dilution de cet antigène : s'il est suffisamment concentré, son pouvoir stimulant éventuel peut être mis en évidence ; à l'inverse, des concentrations trop élevées risquent d'entraîner une lyse des lymphocytes.

Des tubes témoins sans agent stimulant sont indispensables afin de préciser le taux de transformations lymphoblastiques spontanées.

La recherche des cellules lymphoblastiques peut se faire de deux manières :

- sur frottis du culot de sédimentation et coloration au May-Grünwald Giemsa. Les cellules blastiques sont des cellules de 12 à 15  $\mu\text{m}$ , à noyau volumineux, nucléolé et à cytoplasme hyperbasophile. Le test est positif si plus de 4 % des cellules mononuclées sont des cellules blastiques sans que le nombre de lymphoblastes dans le tube témoin ne dépasse 2 % (13).

- par mesure de l'incorporation de thymidine radioactive par une culture de lymphocytes. Pour un test positif, le taux de transformation sera compris entre 5 et 40 % (13).

#### **H.VI.2.4.2 Test d'inhibition de migration des macrophages**

##### **\* Principe**

Dans un milieu de culture approprié, on observe une migration des macrophages à partir d'un tube capillaire. Cette migration in vitro est inhibée lorsque les macrophages sont mis en présence d'un antigène auquel l'organisme dont ils proviennent est sensibilisé.

Le macrophage n'est en fait qu'un simple réactif et cette inhibition n'est possible que par l'intermédiaire de lymphocytes qui doivent toujours être présents dans la réaction. Cette inhibition est liée à la libération par les lymphocytes sensibilisés à l'antigène, de facteurs inhibant la migration des macrophages (MIF) ; le surnageant du milieu de culture lymphocytaire a le même effet inhibiteur (13).

##### **\* Technique**

Il existe deux type de techniques :

- la technique à double système, dans laquelle les lymphocytes obtenus après sédimentation de sang veineux périphérique, sont cultivés 24 heures dans un milieu contenant l'antigène. Le surnageant acellulaire est alors testé sur des macrophages prélevés chez des sujets non sensibilisés à l'antigène étudié (13).

- la technique en un temps qui est plus simple à réaliser. La suspension leucocytaire isolée est placée dans un tube capillaire à hématocrite. Les tubes capillaires sont disposés dans des chambres de diffusion remplies d'un milieu de culture auquel on peut ajouter l'antigène étudié.

En l'absence d'antigène ou en cas de non sensibilisation à l'égard de l'antigène testé, la migration des macrophages est nettement visible au bout de 2 à 4 heures.

Après 2 heures, la migration des macrophages dessine sur le milieu de culture un bourgeonnement en chou-fleur au bout du tube capillaire.

Il faut calculer l'indice de migration par rapport à un témoin pour pouvoir interpréter le test (13).

La concentration en antigène est primordiale ; une concentration trop élevée peut être toxique pour les cellules et une concentration trop faible peut stimuler la migration *in vivo*.

## **H.VII Conclusion**

La biologie et notamment l'immunologie est un apport considérable dans le diagnostic de l'alvéolite allergique extrinsèque.

La recherche de précipitines dirigées contre des antigènes personnalisés demande parfois une adaptation des techniques immunologiques utilisées et notamment en ce qui concerne les concentrations en antigènes.

## I- Etude anatomo-pathologique

Les études anatomo-pathologiques sont rarement pratiquées en raison du caractère invasif des techniques de prélèvement.

La biopsie transbronchique permet d'effectuer des prélèvements au cours de la fibroscopie. Elle peut confirmer parfois le diagnostic dans les cas difficiles en retrouvant un granulome interstitiel, alvéolaire, ou giganto-cellulaire compatible avec la maladie. Toutefois, il existe un risque de pneumothorax au cours de ce prélèvement.

Plus rarement une biopsie pulmonaire chirurgicale à thorax ouvert pourra être réalisée pour apporter le diagnostic dans le cadre de fibrose pulmonaire diffuse d'étiologie inconnue.

Les fragments de biopsie recueillis sont étudiés en microscopie électronique optique et en immunofluorescence.

Dans les formes récentes, donc au stade d'alvéolite, on peut observer une inflammation caractérisée par un épaissement des parois alvéolaires surtout dans les régions situées autour des bronchioles terminales. On note une congestion capillaire témoignant de la vasodilatation et une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles puis ultérieurement de lymphocytes.

Au stade de pneumopathie interstitielle diffuse, on observe des nodules granulomateux formés de cellules macrophagiques centrales géantes entourées de lymphocytes et de fibroblastes plus ou moins riches en collagène.

De nombreux plasmocytes peuvent être mis en évidence. Des études réalisées en immunofluorescence montre l'activité de ces plasmocytes responsables de la production locale d'IgG, d'IgA et d'IgM.

Le granulome induit par les lymphocytes, macrophages, fibroblastes prédomine au niveau des artérioles musculaires et des bronchioles terminales.

L'évolution se fait vers un épaississement des cloisons interalvéolaires, le remplacement des fibres élastiques par des fibres de collagène ce qui explique le trouble du transfert gazeux et les images pulmonaires radiologiques de micronodulation (3).

Dans les formes plus évoluées, le nodule granulomateux sans nécrose centrale peut déjà coexister avec des aspects de fibrose. A ce stade les lésions semblent encore réversibles.

Les formes anciennes prennent l'aspect de fibrose interstitielle diffuse sans spécificité et avec des septa alvéolaires considérablement épaissis par de profondes modifications dans le réseau des fibres de collagène.

Le granulome est plus petit, constitué presque exclusivement de cellules de types fibroblastiques, entouré de gaine de collagène. En phase terminale l'architecture pulmonaire alvéolaire et bronchiolaire a totalement disparu et le poumon normal est remplacé par des cavités kystiques.

A ce stade, les lésions sont irréversibles.

## **J- Diagnostic différentiel**

### **J.I Dans les formes récentes**

#### **J.I.1 Avec la tuberculose miliaire et la sarcoïdose**

Le diagnostic le plus important à éliminer est celui de tuberculose miliaire et de sarcoïdose.

Dans les cas douteux une corticothérapie ne peut être prescrite, en traitement antituberculeux d'épreuve est commencé en attendant la confirmation du diagnostic.

En ce qui concerne la tuberculose, le diagnostic sera posé après culture bactériologique d'une expectoration.

Dans le cadre d'une sarcoïdose, on observera une augmentation des lymphocytes T helpers associée à une lymphocytose pulmonaire avec une augmentation du rapport CD4/CD8 ainsi qu'une augmentation du taux d'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et le sang.

#### **J.I.2 Avec l'asthme**

Le diagnostic est plus facile à établir. On observe une réaction de type réaginique, une hypercosinophilie. Il existe en principe un terrain atopique et on n'observe pas de syndrome restrictif ni d'altération de la diffusion alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone.

### **J.I.3 Avec les pneumopathies infectieuses non tuberculeuse**

#### **J.I.3.1 Virales**

Elles se présentent le plus souvent sous forme d'un syndrome pseudogrippal avec asthénie et myalgie.

#### **J.I.3.2 Bactériennes**

La radiographie pulmonaire montre dans ce cas une image de condensation pulmonaire localisée.

### **J.I.4 Avec d'autres alvéolites allergiques extrinsèques**

On peut être amené à réaliser un diagnostic différentiel avec un poumon d'éleveurs d'oiseaux ou un poumon du fermier. Associé à l'anamnèse du malade, on réalise le diagnostic différentiel sur le type de précipitines mises en évidence en utilisant différents allergènes.

### **J.I.5 Avec le syndrome toxique des poussières organiques : (organic dust toxic syndrom)**

Cette affection se caractérise par un syndrome pseudogrippal, non allergique non infectieux. Il succède à une exposition massive à différentes poussières organiques d'origines agricoles souvent contaminées pas des spores fongiques.

La radiographie, les épreuves fonctionnelles sont normales. On ne note pas la présence de précipitines sériques. L'évolution est favorable sans traitement, sans évolution vers la fibrose (26,2).

## **J.II Dans les formes chroniques**

### **J.II.1 Avec les pneumopathies infectieuses**

Les pneumopathies à *Mycoplasma pneumoniae* peuvent être confondues avec des pneumopathies interstitielles primitives car ces bactéries peuvent donner des opacités alvéolo-interstitielles bilatérales pouvant persister souvent plus de quatre semaines malgré l'amélioration clinique sous traitement antibiotique par des cyclines (13).

### **J.II.2 Avec les granulomatoses**

La sarcoïdose atteint des sujets jeunes. Au stade chronique, les opacités sont surtout nodulaires et s'associent souvent à des adénopathies médiastinales et périphériques. La dyspnée est généralement modérée, les râles crépitants peu fréquents. Au stade de fibrose, les lésions prédominent aux apex et sont rétractiles (13).

Comme dans les formes aiguës, il est important de doser l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de mettre en évidence une hyperlymphocytose alvéolaire à lymphocytes T helpers.

L'histiocytose est une maladie de l'homme fumeur s'accompagnant d'un pneumothorax et d'un syndrome interstitiel radiographique, et dont la cause est inconnue. Elle est due à la prolifération locale ou généralisée de cellules

d'aspect histiocytaire ressemblant aux cellules de Langerhans dont certaines contiennent des structures intracytoplasmiques laminaires (corps en X).

Le diagnostic est porté sur la présence de corps en X dans les cellules histiocytaires à l'examen en microscopie électronique des cellules du liquide de lavage broncho-alvéolaire ou des biopsies pulmonaires (recherche de lymphocytes de type CD1). L'aspect radiologique typique est celui d'une hyperclarté des sommets des lésions réticulo-nodulaires et microkystiques dans les parties inférieures des deux champs.

L'exploration fonctionnelle respiratoire montre surtout en syndrome mixte restrictif et obstructif avec désaturation oxyhémoglobinée à l'effort. Il existe parfois une localisation osseuse, avec des lacunes aux radiographies et un diabète insipide (13).

### **J.II.3 La lymphangite carcinomateuse**

La dyspnée est majeure ainsi que la toux et, le plus souvent, il n'y a pas de râles crépitants.

L'interrogatoire retrouve parfois la notion d'un cancer antérieurement traité.

La radiographie montre des opacités linéaires à accentuation périhilaire et des lignes de Kerley B (traits horizontaux situés sur le côté externe des lobes inférieurs sans toucher la plèvre). Il existe un syndrome restrictif parfois associé à une composante obstructive avec une hypoxie.

L'endoscopie peut montrer une infiltration diffuse de l'arbre bronchique et permet les biopsies bronchiques qui peuvent indiquer une infiltration néoplasique du chorion.

#### **J.II.4 Les fibres interstitielles des maladies de système**

Dans certains cas, comme la polyarthrite rhumatoïde, la pneumopathie interstitielle apparaît en règle générale plusieurs années après le début de la maladie, elle peut parfois la précéder.

Dans le syndrome de Caplan-Colinet, on peut observer l'association d'une pneumopathie interstitielle d'origine rhumatoïde et d'une silicose (plus rarement d'une anthracose ou d'une asbestose). Une ou plusieurs opacités arrondies sont visibles à la radiographie du thorax. Ces nodules peuvent augmenter rapidement en quelques semaines et s'excaver.

Dans la sclérodermie, l'atteinte pulmonaire n'est pas rare et peut se compliquer d'un carcinome bronchio-alvéolaire.

Des pneumopathies interstitielles s'observent aussi dans le syndrome de Gougerot-Sjögren et plus rarement dans les polymyosites, le lupus érythémateux disséminé (13).

#### **J.II.5 Les pneumoconioses**

L'anamnèse professionnelle du malade permet le plus souvent de retrouver l'étiologie de la pneumopathie interstitielle (Cf. tableau VI).

**Tableau VI : Pneumoconioses et autres maladie pulmonaires  
professionnelles**

MALADIE	AGENT CAUSAL	SIGNES CLINIQUES	SIGNES RADIOLOGIQUES
Aluminose (maladie de Shaver)	Abrasifs d'aluminium, bauxite	Exposition : 6 mois à 2 ans dyspnée ; parfois pneumothorax	Image granitée, emphysème Adénopathies médiastinales
Anthracose	Poussières de charbon (silicose souvent associée)	Emphysème, dyspnée rarement dyspnée marquée	Images réticulées rarement fibrose massive
Asbestose	Fibres d'amiante	Dyspnée, toux, expectorations	Images réticulaires floues Epaississement de la plèvre
Asthme	Chez des sujets non allergiques, de nombreuses poussières peuvent causer de l'asthme : - poussière de bois - enzymes des poudres à lessives - sels de platine - gomme arabique - soie - insecticides - diisocyanates - laques cosmétiques (coiffeurs) - résines synthétiques - matières plastiques	Crises d'asthme	Pas de signes radiologiques
Barytose	Sulfate de baryum	Emphysème modéré	Emphysème modéré
Béryllose	Béryllium Susceptibilité individuelle très variable	Aiguë : rhino-pharyngite, Chronique : simule la sarcoïdose	Aiguë : image pneumonie atypique Chronique : simule la sarcoïdose
Byssinose	Poussière de coton, de lin, de chanvre	Asthme forme chronique : emphysème	Forme aiguë : radiologie pulmonaire normale forme chronique : fibrose pulmonaire
Maladie des ouvriers du silo	Oxyde d'azote	Dyspnée, oedème du poumon	Images micronodulaires
Métaux durs (Pneumoconioses à)	Tungstène + cobalt, chrome, nickel, titane	Dyspnée, évolution possible vers l'insuffisance respiratoire	Fibrose interstitielle
Sidérose	Fer (soudeurs, affûteurs)	Dyspnée nulle ou modérée	Trame broncho-vasculaire, augmentée
Silicose	Silice	Insuffisance respiratoire progressive	Augmentation de la trame broncho-vasculaire, images nodulaires, adénopathies hilaires
Stannose	Sels d'étain	Nuls ou dyspnée modérée	Nuls ou trame augmentée
Talcoses	Silicates de magnésium (industrie de caoutchouc)	Insuffisance respiratoire progressive	Fibrose interstitielle

### **J.II.6 Les causes cardio-vasculaires**

Le poumon cardiaque vieilli, l'insuffisance ventriculaire gauche, ainsi que le rétrécissement mitral, sont des causes de syndrome interstitiel radiologique. Le diagnostic sera porté après, connaissance des antécédents (hypertension artérielle, insuffisance coronaire), étude radiologique (gros coeur), auscultation (souffle de valvulopathie, galop gauche) et éventuellement échoradiographie. Le doute pourra être levé par un traitement d'épreuve par des diurétiques (13).

### **J.II.7 Les pneumopathies toxiques et médicamenteuses**

L'inhalation de toxiques peut entraîner des oedèmes pulmonaires lésionnels qui évoluent vers la fibrose.

Les causes toxiques sont importantes à connaître car non exceptionnelles et uniquement extériorisées par un interrogatoire minutieux recherchant l'utilisation de :

#### **\* Traitement anticancéreux :**

Le poumon radique comporte des antécédents précoces non fibrosants et des antécédents retardés avec fibrose.

Les chimiothérapies avec au premier plan ; la bléomycine. Plus accessoirement, le cyclophosphamide et la lamustine peuvent être impliqués.

#### **\* Traitement anti-infectieux :**

La nitrofurantoïne par des traitements itératifs et prolongés peut provoquer des pneumopathies aiguës allergiques mais rarement des fibroses.

\* Autres traitements :

D'autres médicaments sont susceptibles d'entraîner des pneumopathies allergiques ; parmi eux on trouve le méthysergide, l'amiodarone, les beta bloquants tels que l'acébutolol, les sels d'or, la D penicillamine.

Il n'y a pas de corrélation entre la durée et la quantité de médicaments absorbés et la survenue de pneumopathies allergiques.

**J.II.8 Diverses étiologies de fibrose pulmonaire**

On peut citer les maladies de surcharge (hémosidérose, amyloïdose, maladie de Gaucher, maladie de Nieman-Pick), la lymphangio- myomatose et le syndrome de Goodpasture.

## **K- Traitement**

Il est représenté par deux étapes successives, dont le premier temps est l'éviction de l'antigène, et le second le traitement symptomatique du malade.

### **K.I Eviction**

L'éviction représente le traitement le plus efficace de l'affection. Si elle est précoce et totale, elle permet un retour rapide à un bon état général.

Toute nouvelle exposition peut alors entraîner les mêmes signes déjà décrits et représente un danger potentiel dans la mesure où elle peut être une nouvelle étape de l'évolution vers la fibrose pulmonaire. L'éviction doit donc être définitive. Ceci est d'autant plus difficile à faire admettre que l'origine de l'allergie est professionnelle.

### **K.II Traitement symptomatique**

Dans le cadre d'une dyspnée importante, le traitement de première intention sera l'oxygénothérapie dont le but est de corriger l'hypoxie.

La corticothérapie sera utilisée lorsque toutes les étiologies infectieuses et notamment tuberculeuse auront été écartées. Utilisée à dose moyenne les premiers jours, la corticothérapie sera diminuée progressivement. Elle permet d'améliorer plus rapidement l'état général du patient grâce à son effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur qui diminue la production de précipitines par le système immunitaire du malade.

### K.III Prévention

Il est possible d'utiliser des masques anti-poussières qui permettent de limiter la quantité de conidies de champignons inhalée. Toutefois, compte tenu de la taille des conidies de *Penicillium*, ce moyen s'est avéré insuffisant.

De plus, le port du masque n'est pas toujours suivi car beaucoup de gens le supportent mal.

Une autre solution consiste à limiter la dispersion de l'aérosol au cours du brossage. Des plaques de plastic souple au dessus des brosses ont été utilisées mais en vain car le mélange trop pulvérulent s'échappe toujours en quantité suffisante peut être allergisant (18,49).

C'est alors qu'il fut constaté que les moisissures vertes plus aériques, moins compactées à la surface du champignon, s'éliminaient très facilement sous un jet d'air comprimé en laissant les moisissures blanches en place. Il est donc possible de construire une pièce dépressionnaire dans laquelle l'air comprimé serait projeté sur les saucissons et l'aérosol serait aspiré. Seul ce moyen s'est montré réellement efficace (49).

Il existe aussi des machines automatiques à broser les saucissons. L'efficacité du système réside dans l'étanchéité de l'automate. Le cas décrit par Dalphin rapporte une exposition répétée à la poussière de saucisson due à la présence d'une machine dans le couloir de l'entreprise et dont l'étanchéité n'était pas totale (11).

DEUXIEME PARTIE

## **A- Introduction**

Le diagnostic d'alvéolite allergique du "brosseur de saucissons" n'est pas toujours facile. Après avoir posé le diagnostic clinique d'alvéolite, même si l'anamnèse professionnelle du patient permet d'avoir de fortes présomptions quant à l'origine de la maladie, la biologie va apporter les preuves de l'exposition allergisante à la poussière de saucisson. En effet, la recherche de précipitines sériques est un paramètre important pour pouvoir affirmer le caractère professionnel de la maladie.

L'étude que nous rapportons ici, consistant en la recherche de précipitines sériques chez des sujets exposés à la fleur de saucisson, comporte deux techniques. La première technique utilisée est l'immunoélectrophorèse en gel, technique de référence pour de nombreuses sérologies parasitaires et mycosiques ; elle est amplement utilisée en parasitologie. La seconde technique est l'électrosynérèse sur acétate de cellulose. Elle est moins utilisée que la précédente mais présente l'avantage de pouvoir soit colorer de manière non spécifique les arcs de précipitation, soit de typer les précipitines sériques à l'aide d'antiglobuline marquée grâce à une technique d'immunofiltration = ELIFA (Enzym Linked Immunofiltration Assay).

Nous allons exposer successivement dans cette seconde partie le matériel et les méthodes sérologiques utilisées, le but de l'étude, les résultats et la discussion de ces résultats avant de conclure.

## **B- Matériel et méthodes**

### **B.I Les antigènes**

Plusieurs antigènes ont été testés dans les deux techniques.

- le PV 7 ou fleur de saucisson correspond à la poudre blanche que l'on met sur le saucisson avant le séchage. Elle est essentiellement composée de *Penicillium nalgiovense*.

- *Penicillium nalgiovense*

- *Penicillium chrysogenum* total, extrait somatique de *Penicillium chrysogenum* et extrait métabolique de *Penicillium chrysogenum*.

#### **B.I.1 Préparation des antigènes PV 7, *Penicillium nalgiovense* et *Penicillium chrysogenum* total**

La technique de préparation des antigènes est identique pour *Penicillium chrysogenum* total, *Penicillium nalgiovense* et le PV 7 ; seule la matière première de départ varie.

*Penicillium nalgiovense* et *Penicillium chrysogenum* sont obtenus par culture sur gélose Yeast extract malt alors que le PV 7 est utilisé tel qu'il est conditionné. Le champignon et le PV 7 sont dégraissés par l'éther pendant 12 heures. On réalise ensuite une filtration et l'élimination du solvant.

On met le résidu à macérer dans le liquide de Coca pendant huit jours.

Le liquide de Coca est une solution composée pour 0,5 % de chlorure de sodium, 0,275 % de carbonate de sodium, 0,4 % de phénol, et de 95 % d'eau distillée. On filtre la solution obtenue sur « Seitz » puis on dialyse 12 heures.

On lyophilise (et par la même on stérilise) la solution par congélation centrifuge à - 78°C.

### **B.I.2 Préparation des antigènes *Penicillium chrysogenum* somatique et métabolique**

Les antigènes somatique et métabolique de *Penicillium chrysogenum* sont préparés à partir d'une souche de *Penicillium chrysogenum* dans un bouillon de Sabouraud.

#### **\* Préparation de l'extrait somatique *Penicillium chrysogenum***

On rince le champignon sur un filtre à l'eau distillée trois fois puis on essore par filtration à vide. On recueille les champignons dans un becher qui est placé 30 minutes à 4°C pendant 10 à 15 minutes. On broie 6 fois 1 minute dans un broyeur à couteau à 1000 tours/minute. Entre chaque broyage, il faut placer la cuve à 4°C pendant 10 à 15 minutes. On additionne ensuite le broyat d'un volume égal d'eau salée. On ultrasonne puis le mélange est soumis à l'agitation magnétique une nuit à 4°C.

On centrifuge à 2000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est dialysé contre une solution de polyvinyl pyrrolidone à 50 %. Partant de 50 ml de champignon, plus 50 ml d'eau on doit arriver à 2 ml de dialysat.

Le dialysat est lyophilisé en ampoule de 1 ml.

#### **\* Préparation métabolique de *Penicillium chrysogenum***

Elle est réalisée à partir de milieu de culture donc des substances excrétées dans ce milieu. On n'utilise pas le champignon lui même. Le milieu de

culture recueilli après filtration est dialysé plusieurs fois à 4°C, 24 heures contre de l'eau distillée. On pratique ensuite une deuxième dialyse contre une solution de polyvinyl pyrrolidone à 50 %.

On lyophilise ensuite en ampoule de 1 ml.

## **B.II Les sérums**

Notre étude sérologique porte sur 97 sérums de personnes travaillant dans l'industrie du saucisson.

Parmi ces personnes, toutes ne sont pas exposées de la même manière.

Le personnel administratif est très peu exposé.

Parmi le personnel affecté à la fabrication du saucisson, on distingue 3 catégories :

- les employés qui travaillent en secteur dit "frais" c'est à dire ceux qui travaillent la viande avant le séchage

- les employés qui travaillent en secteur dit "sec" c'est à dire ceux qui travaillent sur les saucissons après leur sortie de l'étuve

- les employés polyvalents qui travaillent à la fois en secteur dit "sec" et "frais".

Le personnel qui travaille au sec subit une forte exposition puisque ce sont eux qui réalisent le brossage des saucissons. Le personnel qui travaille en secteur frais est beaucoup moins exposé.

Nous verrons ultérieurement que pour des raisons de simplicité, nous avons divisé le personnel de ces entreprises en 2 groupes ; un groupe d'exposition faible et un groupe d'exposition forte. Dans le groupe d'exposition faible, sont regroupés les gens du personnel administratif et ceux travaillant en secteur frais. Dans le groupe d'exposition forte, sont regroupés les gens du personnel travaillant en secteur sec et les polyvalents.

De plus, on a recruté 16 sérums de personnes dont on savait qu'elles n'avaient subi aucun contact avec la fleur de saucisson. 5 sujets ont été choisis parmi les entreprises de l'enquête et 11 sujets sont des donneurs de sang du Centre de Transfusion Sanguine de Toulouse.

Parmi les sérums des donneurs de sang du Centre de Transfusion Sanguine, les 11 sérums choisis l'ont été car ils présentaient un arc flou en immunoélectrophorèse avec PV 7. Ces sérums considérés comme témoins négatifs ont été choisis pour permettre une meilleure interprétation des immunoélectrophorèses et des électrosynérèses des sérums de l'enquête.

### **B.III Méthode**

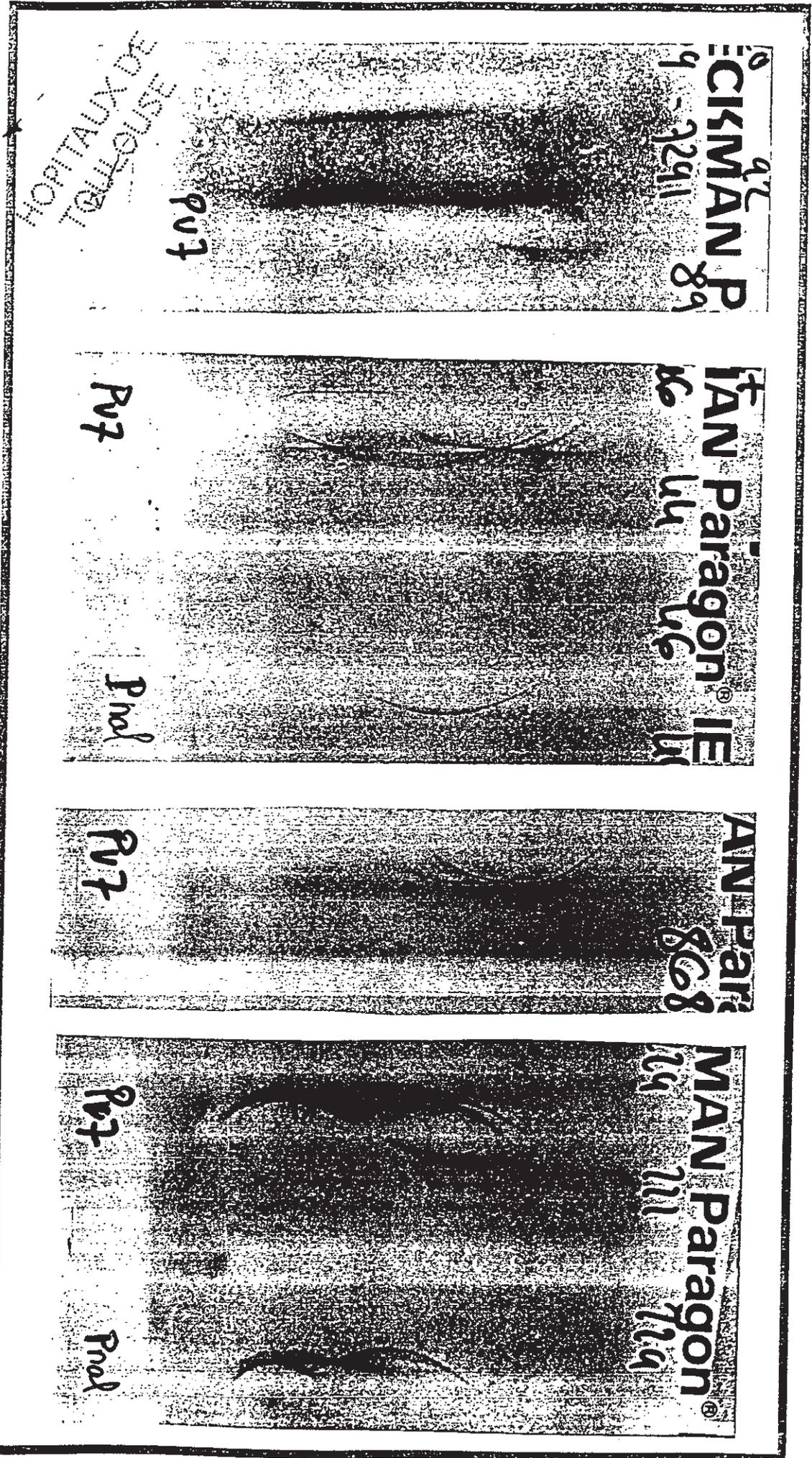
#### **B.III.1 Immunoélectrophorèse rapide**

Les immunoélectrophorèses ont été effectuées avec des gels et l'appareil PARAGON Beckman. Cette technique comporte une séparation préalable des antigènes par électrophorèse puis une diffusion et une précipitation en gélose après ajout de sérum.

L'antigène est placé dans un petit puits prévu à cet effet ; on en trouve sept sur la plaque. Après application de 3 à 5  $\mu$ l de solution d'antigène, la plaque est mise à migrer pendant 12 minutes sous une différence de potentiel de 100 V dans un tampon à pH 8,6.

L'électrophorèse terminée, on réalise l'application des sérums. Les sérums utilisés seront concentrés 3 fois si possible. Après avoir appliqué une matrice, on dépose 120  $\mu$ l de sérum dans les rigoles de la matrice parallèles à l'axe de migration de l'antigène. On attend 20 minutes que le sérum ait imprégné le gel, on sèche et le gel est mis à incuber 18 à 24 heures à température ambiante en atmosphère humide.

IMMUNOELECTROPHORESE RAPIDE



Après 18 à 24 heures, l'immunoélectrophorèse est colorée. Le gel est d'abord placé en contact 1 heure au moins avec une solution de citrate de sodium à 5 % pour éliminer les arcs non spécifiques dus à la CRP. Puis le gel est passé 2 fois en solution saline à 0,85 % et sous presse pendant 10 minutes. Le gel est ensuite séché à l'étuve à 37°C. La coloration est réalisée avec une solution de noir amide ou de violet acide 3 à 5 minutes et la coloration est stoppée par passage de 2 fois 3 minutes dans de l'acide acétique à 5 %.

Cette méthode quantitative permet d'obtenir des arcs de précipitation le long des dépôts de sérums. Sa durée total est de 24 heures.

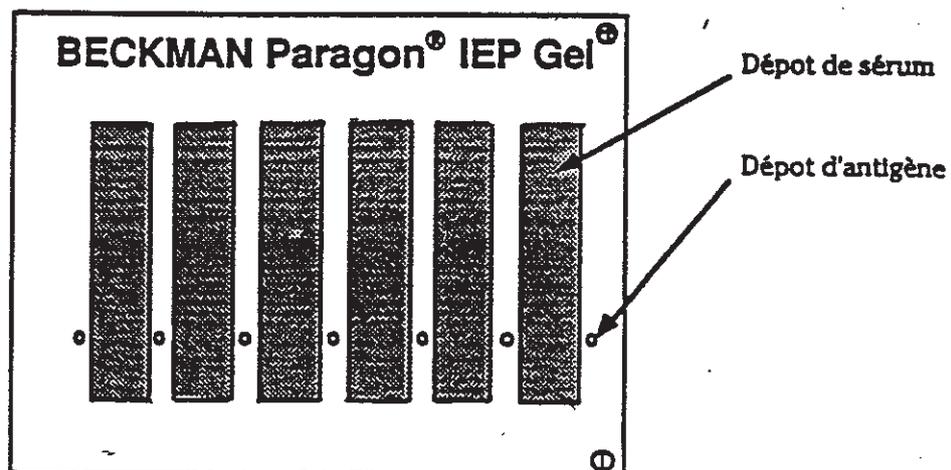
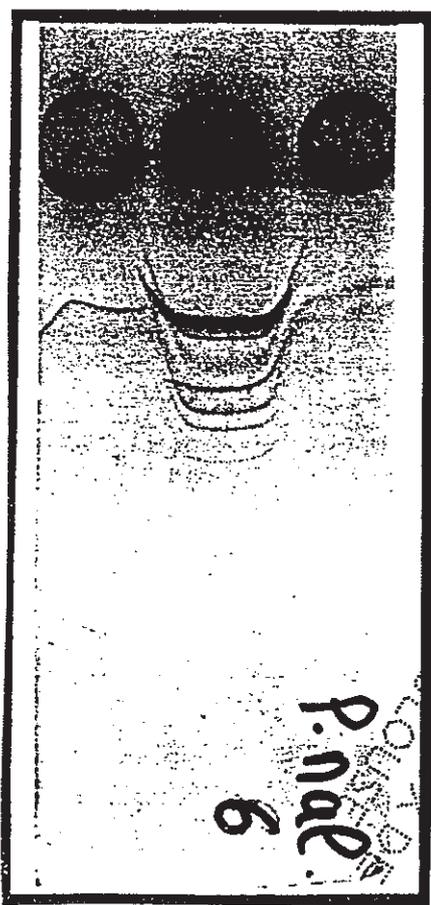
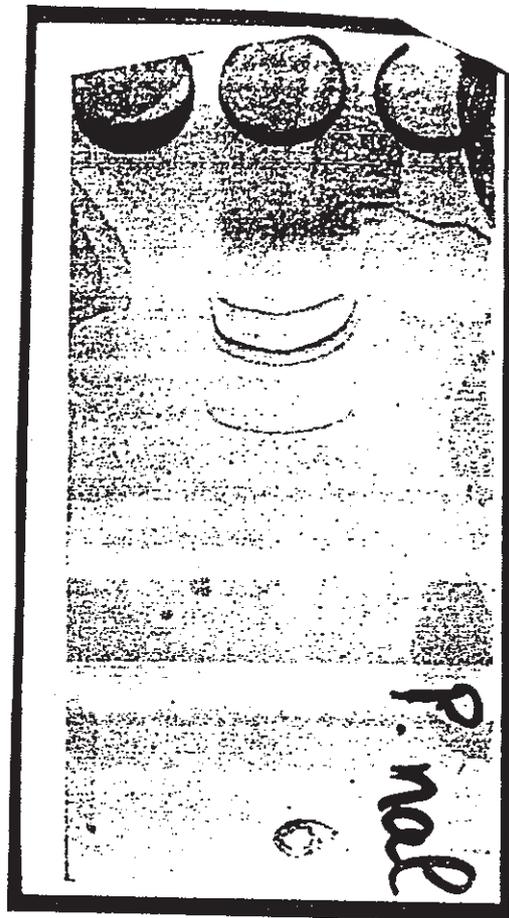


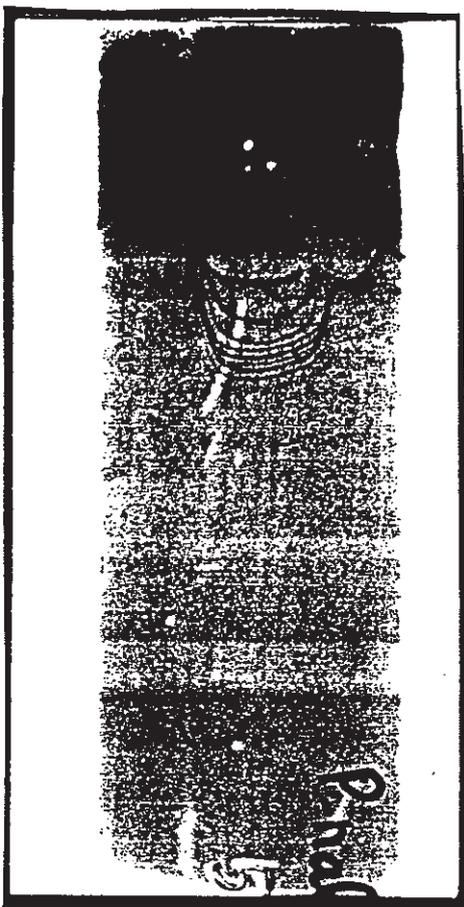
Schéma du gel d'immunoélectrophorèse

Une photographie d'immunoélectrophorèse positive est présentée page 84.

ELECTROCOSYNERESE



ELIRA IGG

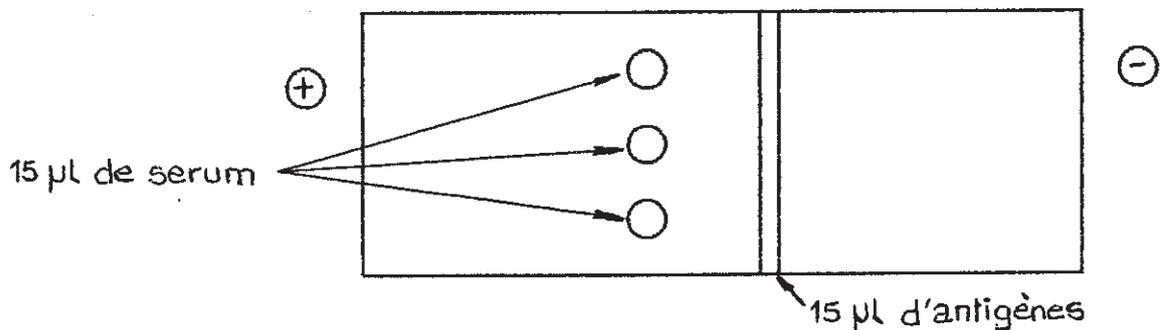


### B.III.2 Electrosynérèse : Co immunoélectrodifusion CoIED

L'électrosynérèse est une technique en un temps où l'antigène et l'anticorps migrent en sens inverse sur un support, sous l'effet d'un courant électrique, pour former des arcs de précipitation à la zone d'équivalence. Le support utilisé ici est l'acétate de cellulose et la technique est la suivante.

On imprègne préalablement les bandes d'acétate de cellulose dans le tampon de migration tris-glycine-citrate pH 9 pendant 5 minutes. On place ensuite les membranes encore humides sur le portoir de la cuve de migration contenant le tampon de migration.

On met sous tension 10 minutes sous 140 V. Ensuite on réalise les dépôts d'antigènes et de sérum. Du côté de la cathode, on réalise un dépôt linéaire de 15  $\mu$ l d'antigène. Du côté de l'anode, on dépose par gouttes de 15  $\mu$ l 3 sérums ; dont un positif est disposé au centre. Les dépôts de sérums et d'antigènes sont séparés de 2 centimètres.



Ensuite on met à migrer pendant 2 heures 15 minutes sous une différence de potentiel de 140 V. La cuve ne devra être fermée qu'après avoir séché les dépôts. Après la migration, on débranche et on laisse stabiliser 5 minutes les

bandes dans la cuve fermée, après avoir jeté le tampon de migration. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon RBS-eau physiologique sous agitation pendant 5 minutes. Les bandes sont à nouveau lavées sous agitation 10 minutes dans un deuxième tampon de lavage eau physiologique plus tampon de migration.

Ensuite, on colore pendant 7 minutes sans agitation dans une solution de bleu de Coomassie. Enfin, on réalise 2 décolorations successives sous agitation de 3 minutes dans une solution de méthanol-acide acétique-eau bidistillée. Les membranes sont conservées dans une solution d'acide acétique à 5 %.

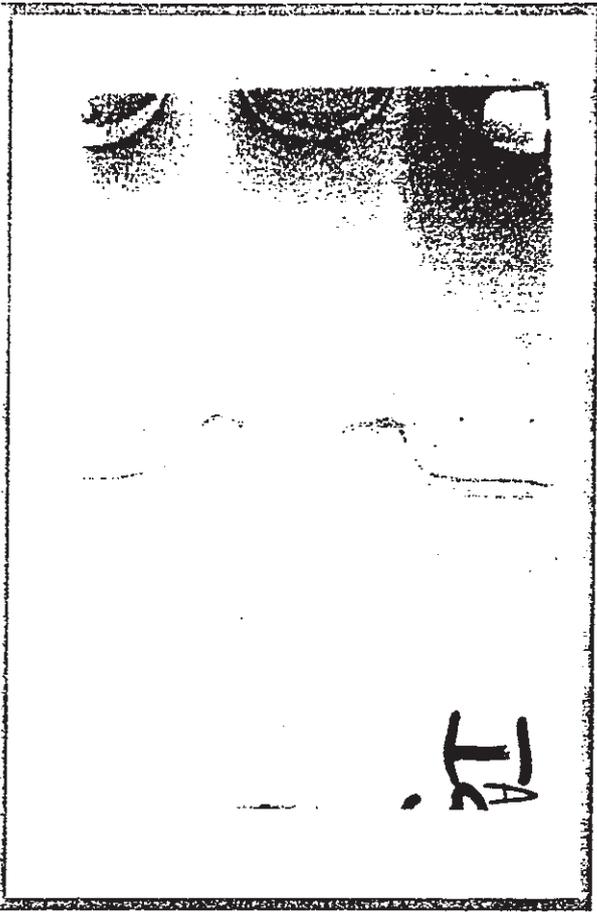
Cette technique, elle aussi qualitative, présente l'avantage d'être plus rapide que l'immunoélectrophorèse.

Une photographie d'électrosynérèse positive est présentée page 86.

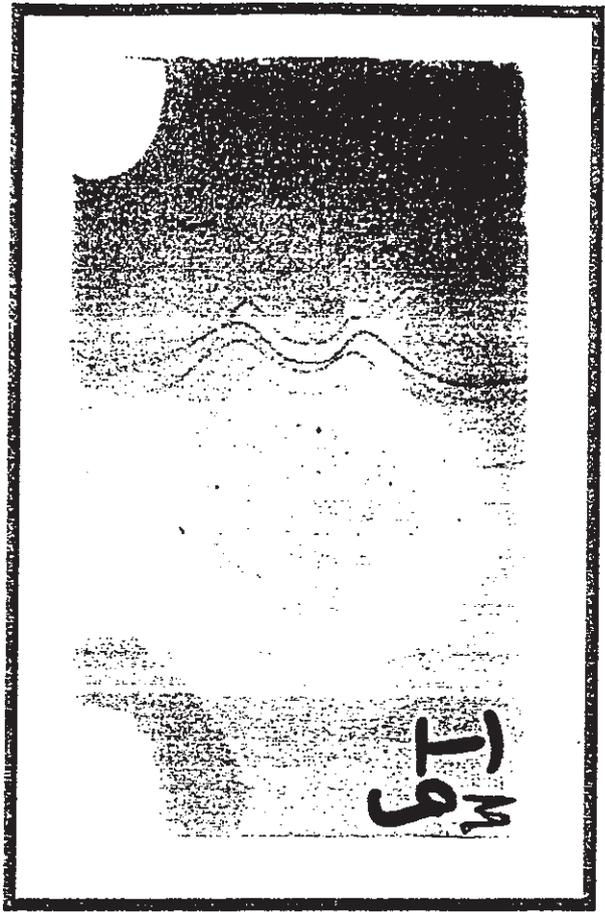
### **B.III.3 ELIFA : Enzym Linked Immunofiltration Assay**

L'ELIFA est une technique qui permet de révéler spécifiquement les arcs obtenus en électrosynérèse. En effet, grâce à une antiglobuline spécifique, on peut identifier l'isotype de l'immunoglobuline impliquée dans la réaction à complexe immun.

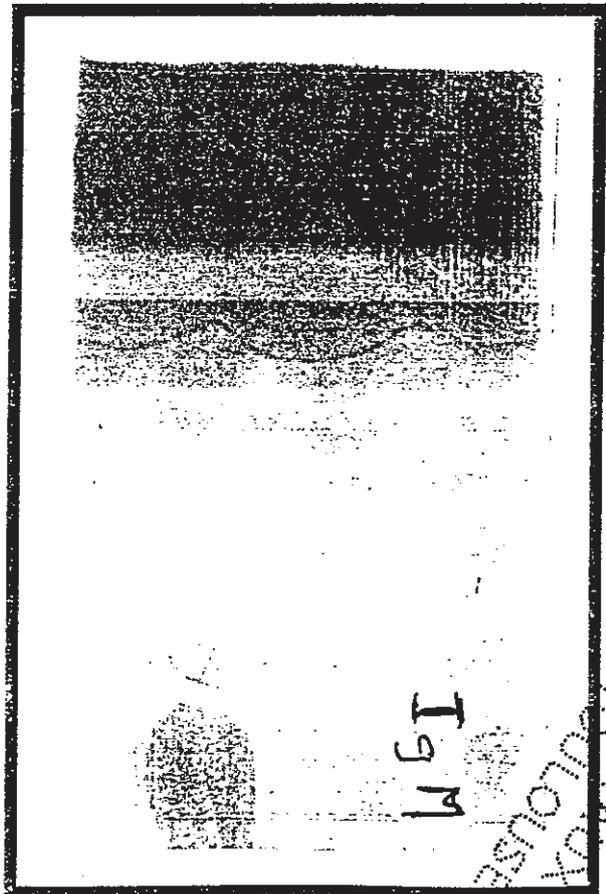
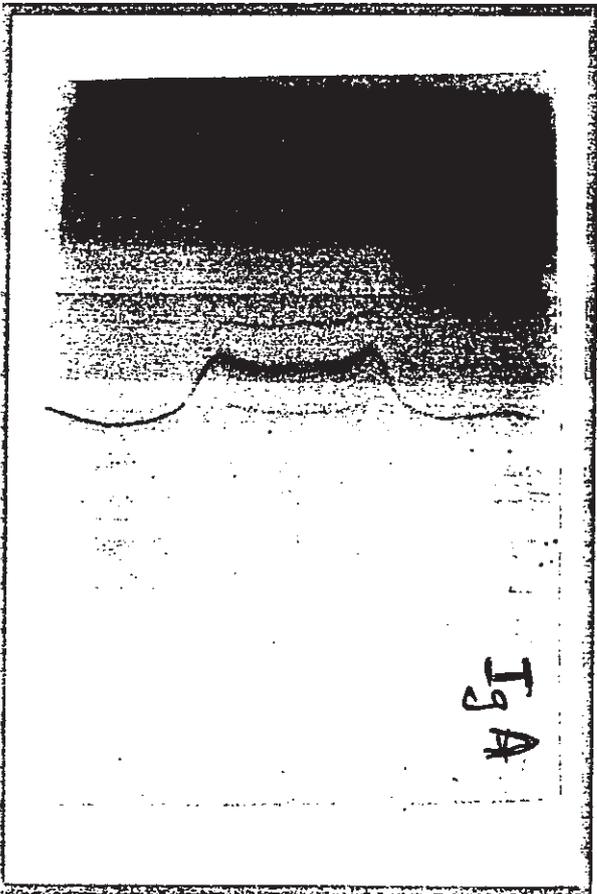
La technique est la suivante. On réalise une électrosynérèse comme décrit ci-dessus mais après la migration de 2 heures 15 minutes et la stabilisation de 5 minutes suivant la migration, la membrane d'acétate de cellulose est préparée pour subir une immunofiltration. On découpe la bande aux dimensions de la cellule de filtration et on identifie les bandes. On réalise un lavage de 15 minutes sous agitation dans une solution RBS-eau physiologique puis un lavage de 10 minutes sous agitation dans un tampon PBS. Les bandes sont ensuite placées



ELIFA IGA



ELIFA IGM



HOPITAL  
TOULOUSE  
DE

dans la cellule de filtration (cf. schéma p 91 ). On filtre avec 10 ml de tampon PBS-tween-albumine pendant 10 minutes.

Ensuite, on réalise une immunofiltration de 15 minutes en utilisant 15 ml de tampon PBS-tween-albumine dans lequel on aura dilué l'antiglobuline spécifique. Pour la détection d'IgG, on dilue 6  $\mu$ l de solution d'anti-gamma dans 15 ml de tampon PBS-tween-albumine ; pour les IgM, on dilue 15  $\mu$ l d'anti-mu dans 15 ml de tampon PBS-tween-albumine ; et pour les IgA, on dilue 60  $\mu$ l d'anti-alpha dans 15 ml de tampon PBS-tween-albumine. Pour rincer, on filtre avec 5 ml de tampon PBS. Enfin, on révèle l'activité phosphatase alcaline supportée par les antiglobulines grâce aux substrats Nitro bleu de tetrazolium et Bromo chloro indolyl phosphate solubilisés dans un tampon de révélation.

Des photographies d'ELIFA IgA, IgM, IgG positives sont présentées page 86 et page 89.

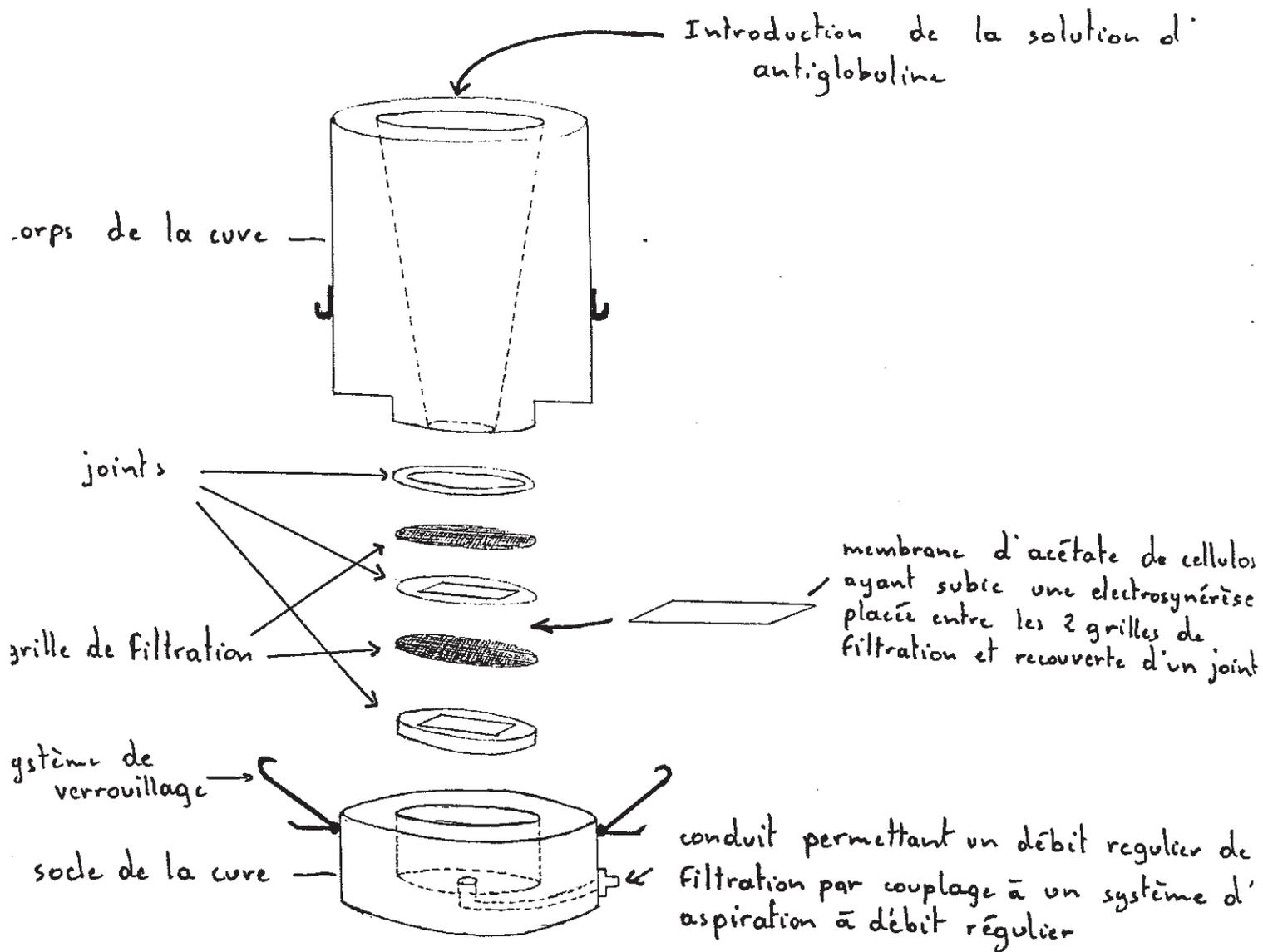


schéma de cuve à ELIFA

### **C- But de l'étude**

Le but de l'étude est de mettre en évidence des précipitines dirigées contre *Penicillium nalgiovense* chez des personnes travaillant dans l'industrie du saucisson.

Pour cela, trois techniques immunologiques ont été utilisées. L'immunoélectrophorèse rapide en gel qui est déjà utilisée par le laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil pour la détection de pneumopathies immunologiques peut être considérée comme la technique de référence. Notre étude nous permettra ainsi d'évaluer l'électrosynérèse nouvellement utilisée au laboratoire de parasitologie du CHU de Rangueil avec ces antigènes fongiques, par rapport à l'immunoélectrophorèse.

L'ELIFA a pour but d'affiner la détection des précipitines par l'isotypage des immunoglobulines impliquées dans la réaction immunologique.

En effet, par l'étude du type d'immunoglobuline détectée chez le patient et le suivi sérologique de ce dernier, on peut espérer différencier le sujet contact asymptomatique du malade développant une alvéolite allergique. C'est la raison pour laquelle les données de l'ELIFA seront confrontées aux données épidémiologiques et cliniques.

## **D- Résultats**

97 sérums de sujets travaillant à la fabrication industrielle des saucissons ont été étudiés. Les résultats sont répertoriés dans les quatre tableaux pages 94,95,96,97.

Les 97 sérums ont été testés en immunoélectrophorèse rapide (IER) et électrosynérèse vis-à-vis de cinq antigènes : PV 7 (fleur de saucisson), *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium chrysogenum* (antigène total), *Penicillium chrysogenum* (antigène métabolique), *Penicillium chrysogenum* (antigène somatique).

Les résultats des sérologies avec les extraits métaboliques et somatiques de *Penicillium chrysogenum* n'ont pas été rapportés dans le tableau car elles sont rarement positives et sont redondantes avec l'extrait total de *Penicillium chrysogenum*.

L'ELIFA comprenant la détection d'IgG, d'IgA et d'IgM a été réalisée sur 65 sérums vis-à-vis de *Penicillium nalgiovense*. Ces sérums correspondent à ceux qui présentaient un ou plusieurs arcs plus ou moins nets en électrosynérèse. *Penicillium nalgiovense* a été choisi car c'est l'antigène qui a permis d'obtenir le plus grand nombre d'arcs avec le plus grand nombre de sérums.

### **D.I Etude des résultats biologiques**

Les résultats sont exprimés dans les tableaux ci-après.

N° SÉRUM	IE		ES		ELIFA			Secteurs de Travail	Durée de l'exposition (années)	Score clinique global		Activité de Brossage
	PV7	P. n.	P. ch.	PV7	P. n.	P. ch.	IgG			IgM	IgA	
10222	0	0	0	0	0	0			27	0	0	0
10224	5	4	1	7	7	0	8	4	0	2	2	1
10226	0	0	0	0	0	0			21	2	2	1
10228	0	0	0	0	0	0			21	3	3	1
10230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10232	0	0	0	0	2	0	5	3	4	2	2	1
10240	0	0	0	0	0	0			21	7	7	0
10242	1	0	0	1	0	0	0	0	0	9	9	1
10244	1	0	0	1	3	0	4	2	0	9	9	1
10246	1	1	0	3	2	0	2	1	1	0	0	1
10248	0	0	0	0	0	0			8	7	7	1
10250	3	0	0	3	4	0	4	3	3			
10252	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	1
10254	0	0	0	0	0	0			0,6	0	0	0
10256	0	0	0	0	0	0			1	0	0	1
10258	0	0	0	0	0	0			1	0	0	1
10260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	1
7281	0	0	0	0	0	0	0	0	7	3	3	1
7283	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	3	3	1
7285	0	0	0	0	0	0			0,5	0	0	0
7287	0	0	0	0	0	0			12	2	2	0
7289	0	0	0	0	0	0			0,5	3	3	0
7291	3	2	1	4	6	0	5	2	4	1	1	0
7293	2	1	0	2	5	0	3	1	1	14	14	1
7295	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	3	0
7253	2	1	0	2	2	0	4	0	0			
7255	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7257	0	0	0	0	0	0			3,5	9	9	1

N° SÉRUM	IE		ES			ELIFA			Secteurs de Travail	Durée de l'exposition (années)	Score clinique global		Activité de Brossage
	PV7	P. n.	P. ch.	PV7	P. n.	P. ch.	IgG	IgM			IgA	global	
7259	1	0	0	1	2	0	3	1	1	3	21	2	1
7261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	9	0
7263	0	0	0	0	0	0				1	14	11	0
8511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	13	4	
8513	0	0	0	0	0	0				2	11	5	1
8515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	27	0	0
8517	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	27	1	1
8519	0	0	0	0	0	0				1	15	0	0
8521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	21	4	0
8523	1	0	0	3	1	0	4	0	2	2	5	2	0
8525	2	0	0	3	2	0	4	0	0	1	18	0	0
8527	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	0	0
8529	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		4	0
10267	0	1	0	0	1	0	4	1	1	2	20	5	0
11616	0	0	0	0	0	0				1	4	1	0
11618	0	0	0	0	0	0				1	21	0	0
11620	4	2	1	4	4	0	6	4	2	2			
11622	1	0	0	1	1	0	4	1	3	4	3	11	1
11624	0	0	0	0	0	0				1	1	0	0
11626	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
11788	2	1	0	6	7	2	6	2	2	2			
13844	4	1	0	6	6	0	7	3	1	2	2	5	1
13846	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	0	1
13848	0	0	0	0	0	0				4	18	2	0
13850	0	0	0	0	0	0				4	24	2	0
13852	3	0	0	1	3	0	2	0	2	2	11	9	1
13854	4	3	0	4	5	0	7	4	3	2	22	11	1
13856	3	2	1	0	1	1	2	0	0	3	3	5	1
13858	0	0	0	0	0	0				3	27	5	0

N° SÉRUM	IE		ES			ELIFA			Secteurs de Travail	Durée de l'exposition (années)	Score clinique global	Activité de Brossage
	PV7	P. n.	P. ch.	PV7	P. n.	P. ch.	IgG	IgM				
7230	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	4	0
7240	2	1	0	4	7	0	5	1	2	5	6	1
7249	3	1	0	5	7	0	8	4	2	21	3	1
7251	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1,3	0	0
7265	0	0	0	0	3	0	3	1	3	15	9	0
7267	0	0	0	0	0	0	0	0	1	13	13	1
7269	0	0	0	0	0	0	0	0	1	29	0	0
7271	0	0	0	0	2	0	2	0	2			
7273	3	0	0	4	5	0	6	1	2			
7275	0	0	0	0	5	0	0	5	2	13	2	1
7277	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	7	0
7279	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	1	0
7297	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	5	1
7299	0	0	0	0	0	0	0	0	3	11	14	1
7301	0	0	0	0	0	0	0	0	2		1	1
8501	0	0	0	0	0	0			4	31	0	0
8503	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	6	0
8505	0	0	0	0	0	0			1	14	0	0
8535	0	0	0	0	0	0			3	6	12	1
8537	0	0	0	0	0	0			3	12	2	0
8539	1	0	0	0	2	0	6	0	2	8	6	1
8541	3	1	0	4	5	0	5	1	2	3	7	1
8546	0	0	0	0	0	0			3	8	7	1
8544	0	0	0	0	0	0			3	7	4	0
8548	1	1	0	1	2	0	5	0	3	11	5	1
10214	0	0	0	0	0	0			3	27	0	1
10216	0	0	0	0	0	0			3	24	8	1
10218	2	0	0	3	1	0	4	1	1	0,1	3	0
10220	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,5	8	1

N° SÉRUM	IE		ES			ELIFA			Secteurs de Travail	Durée de l'exposition (années)	Score clinique global	Activité de Brossage
	PV7	P. n.	P. ch.	PV7	P. n.	P. ch.	IgG	IgM				
13860	2	2	0	0	0	5	3	4	1	14		
13862	0	0	0	0	0				3	6	8	1
13868	5	2	0	3	6	5	4	3	3	0,1	2	0
8507	3	2	1	4	8	6	3	3	2	17	5	1
8533	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	12	1
10262	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	9	0
10264	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	6	0
10234	3	1	1	2	3	6	1	4	2	15	2	1
13864	0	0	0	0	0	0	0	0	4	16	6	1
13866	0	0	0	0	0				3	6	0	0

### D.I.1 Immunoélectrophorèse (IER)

PV 7

P. nal.

P. chry.

IER	Effectif : 97
0	68 : 70,1 %
1 à 5 arcs	29 : 29,9 %

IER	Effectif : 97
0	78 : 80,4 %
1 à 4 arcs	19 : 19,6 %

IER	Effectif : 97
0	91 : 93,8 %
1 arc	6 : 6,2 %

Parmi les 16 témoins négatifs, 5 ne présentaient aucun arc de précipitation ni avec PV 7, ni avec *Penicillium nalgiovense*. Les 11 témoins du Centre de Transfusion Sanguine présentaient près du dépôt antigénique, 1 arc flou qui a été considéré comme artéfactuel et qui n'a pas été pris en compte lors de l'interprétation des autres immunoélectrophorèses de l'étude.

### D.I.2 L'électrosynérèse (ES)

PV 7

P. nal.

P. chry.

ES	Effectif : 97
0	71 : 73,2 %
1 à 7 arcs	26 : 26,8 %

ES	Effectif : 97
0	64 : 66 %
1 à 8 arcs	33 : 34 %

ES	Effectif : 97
0	94 : 96,9 %
1 à 2 arcs	3 : 3,1 %

Parmi les 16 témoins négatifs, 1 seul sujet a présenté 2 arcs flous, fins et de coloration très faible en électrosynérèse avec PV 7.

9 témoins négatifs sur 16 ont présenté en électrosynérèse avec *Penicillium nalgiovense* un arc flou identique dans tous les cas, disposé à 1 cm. du dépôt de sérum et qui a été considéré comme artéfactuel. L'interprétation des électrosynérèses des sérums de l'enquête a tenu compte de l'existence de ce type d'arc non spécifique assez caractéristique.

### D.I.3 L'ELIFA

#### ELIFA IgG

ELIFA	Effectif : 65
0	32 : 49,2 %
1 à 8 arcs	33 : 50,8 %

#### ELIFA IgM

ELIFA	Effectif : 65
0	40 : 56,9 %
1 à 5 arcs	25 : 38,5 %

#### ELIFA IgA

ELIFA	effectif : 65
0	37 : 56,9 %
1 à 4 arcs	28 : 43,1 %

L'ELIFA est une méthode semi-quantitative qui permet d'apprécier la quantité de précipitines dans le sérum par le nombre d'arcs obtenus. Ce sont les IgG qui sont retrouvées en plus grande quantité. Il a été détecté jusqu'à 8 arcs de précipitation et le nombre de sérums pour lesquels on a trouvé au moins 5 arcs s'élève à 17 sur les 33 positifs en IgG. Les IgM sont retrouvées en moins grande quantité : seulement 6 sérums sur les 25 positifs en IgM possédaient entre 4 et 5 arcs de précipitation.

Les IgA sont retrouvées en moins grande quantité que les IgG mais possèdent une fréquence d'apparition sensiblement plus élevée que les IgM puisque 43,1 % des sérums sont positifs en IgA contre 38,5 % en IgM.

Toutefois, les arcs obtenus en ELIFA IgA, sont beaucoup plus marqués que ceux obtenus en IgM ce qui rend la technique plus facile à lire et ce qui permet de penser que les IgA sont globalement en plus grande quantité que les IgM.

Il est à noter que lors de la mise au point de la technique ; le profil des arcs de précipitation obtenus en ELIFA IgG et ELIFA IgA était superposable pour les sérums les plus positifs, ce qui nous a amené à penser que la solution d'antiglobuline marquée utilisée n'était pas pure et possédait peut-être des anti-IgG marquées.

Nous avons écarté cette hypothèse en testant dans un premier temps une solution d'antiglobuline anti-IgA utilisée à concentration habituelle à laquelle on a ajouté une quantité suffisante de sérum d'un malade atteint d'un myélome à IgG dont le taux d'IgA était fortement abaissé.

Cette manipulation qui consistait à neutraliser les éventuelles anti-IgG marquées n'ayant pas fonctionné, on a utilisé dans un deuxième temps une solution d'endobuline ® qui est une préparation purifiée d'IgG.

Nous n'avons pas observé d'inhibition des arcs de précipitation ce qui prouve que les arcs obtenus en ELIFA IgA correspondent bien à la présence de précipitines de type IgA dans le sérum de ces patients.

## **D.II Étude de validité biologique de électrosynérèse et de l'ELIFA**

La validité d'une méthode diagnostic est toujours relative à une méthode de référence. Ici la méthode de référence est l'immunoélectrophorèse rapide. Nous allons donc estimer la sensibilité et la spécificité de l'électrosynérèse et de l'ELIFA par rapport à l'IER.

### **D.II.1 L'électrosynérèse**

Étant donné le peu de résultats positifs obtenus dans les deux techniques avec l'antigène *Penicillium chrysogenum*, nous n'étudierons que l'antigène PV 7 et l'antigène *Penicillium nalgiovense*. Les résultats sont répertoriés dans les tableaux ci-après.

Electrosynérèse *P. nalgiovense* (par rapport à IER technique de référence)

Nbre de sérums	Positif IER	Négatif IER	Total
Positif ES	19	14	33
Négatif ES	1	63	64
Total	20	77	97

sensibilité = 95 %      spécificité = 82 %  
 valeur prédictive positive = 57 %  
 valeur prédictive négative = 98 %

## Electrosynérèse PV 7 (par rapport à IER technique de référence)

Nbre de sérums	Positif IER	Négatif IER	Total
Positif ES	26	0	26
Négatif ES	3	68	71
Total	29	68	97

sensibilité = 90 %      spécificité = 100 %  
 valeur prédictive positive = 100 %  
 valeur prédictive négative = 96 %

On peut remarquer que la sensibilité est meilleure pour le *Penicillium nalgiovense* que pour le PV 7. Par contre la spécificité de *Penicillium nalgiovense* est très inférieure à celle de PV 7. L'électrosynérèse a aussi été testée en **répétabilité** (aptitude à donner des résultats identiques pour un même sérum au cours d'une même manipulation), et en **reproductibilité** (aptitude à donner des résultats identiques dans une même technique pour un même sérum au cours de manipulations différentes).

Vis-à-vis de PV 7, l'étude de la répétabilité a été réalisée sur 5 sérums positifs qui ont été inclus chacun 2 fois dans la même manipulation, et ont donné des résultats identiques.

Vis-à-vis de *Penicillium nalgiovense*, l'étude de la répétabilité a été réalisée sur 3 sérums positifs qui ont été inclus chacun 2 fois dans la même manipulation et ont donné des résultats identiques.

La reproductibilité vis-à-vis de PV 7 et de *Penicillium nalgiovense* a été étudiée par la réalisation de différentes manipulations avec un même sérum.

Ainsi avec l'antigène PV 7, un sérum a été testé trois fois et 7 sérums ont été testés deux fois, ce qui a permis d'obtenir des résultats identiques pour ces 10 sérums. Que ce soit vis-à-vis de *Penicillium nalgiovense* ou de PV 7, la reproductibilité et la répétabilité de électrosynérèse sont excellentes.

## D.II.2 L'ELIFA

L'ELIFA pour des raisons déjà exposées auparavant n'a été réalisé qu'avec l'antigène *Penicillium nalgiovense*. L'étude de la sensibilité et la spécificité ont été réalisées par rapport à l'IER qui ne permet que la détection d'anticorps totaux. Cette méthode d'évaluation semble à priori peu satisfaisante mais nous ne disposons pas d'autre méthode fiable d'évaluation, la clinique étant notamment peu parlante et les examens paracliniques difficilement réalisables sur la totalité de la population des sujets interrogés.

ELIFA P. nalgiovense IgG (par rapport à IER P. nalgiovense)

Nbre de sérums	Positif IER	Négatif IER	Total
Positifs ELIFA IgG	19	14	33
Négatifs ELIFA IgG	0	32	32
Total	19	46	65

sensibilité = 100 %      Spécificité = 72 %  
 valeur prédictive positive = 60 %  
 valeur prédictive négative = 100 %

ELIFA P. nalgioense IgM (par rapport à IER P. nalgioense)

Nbre de sérums	Positif IER	Négatif IER	Total
Positif ELIFA IgM	16	9	25
Négatif ELIFA IgM	3	17	40
Total	19	46	65

sensibilité = 84 %      spécificité = 80 %

valeur prédictive positive = 64 %

valeur prédictive négative = 93 %

ELIFA P. nalgioense IgA (par rapport à IER P. nalgioense)

Nbre de sérums	Positif IER	Négatif IER	Total
Positif ELIFA IgA	17	13	30
Négatif ELIFA IgA	2	33	35
Total	19	46	65

sensibilité = 89 %      spécificité = 72 %

valeur prédictive positive = 57 %

valeur prédictive négative = 94 %

La sensibilité des IgG est la plus grande. La sensibilité des IgA est moins bonne et celle des IgM encore moins.

Par contre les IgM sont les plus spécifiques. Les IgA et les IgG ont une sensibilité identique.

Sur le plan de la répétabilité, 6 sérums ont été testés deux fois dans une même manipulation en ELIFA IgA, 3 sérums ont été testés deux fois dans une même manipulation ELIFA IgM. Trois sérums ont été testés deux fois dans une même manipulation ELIFA IgG. A chaque fois les sérums ont donné des résultats identiques avec un nombre d'arcs et une forme d'arcs identiques.

En ce qui concerne la reproductibilité, en ELIFA IgG 3 sérums ont été testés deux fois, 2 sérums 3 fois, 1 sérum 5 fois, dans des manipulations différentes. En ELIFA IgM, 2 sérums ont été testés 7 fois, 1 sérum 6 fois, 1

sérum 3 fois et 1 sérum 2 fois. En IgA, 2 sérums ont été testés 3 fois, 1 sérum 2 fois, 1 sérum 4 fois, 1 sérum 5 fois. Dans tous les cas, on a obtenu des images identiques avec un nombre d'arcs d'intensité et de forme identiques.

### **D.III Résultats des études cliniques et épidémiologiques**

Parmi les 97 sujets chez lesquels on a réalisé une sérologie, 88 ont répondu à l'interrogatoire clinique et épidémiologique.

Les résultats cliniques sont représentés par un score correspondant à la sommation des signes fonctionnels au travail et en dehors des périodes de travail (toux, expectoration, gêne, sifflement, malaise, céphalée, éternuement, obstruction nasale), des signes généraux (fièvre, asthénie, amaigrissement), des signes paracliniques (radiographie), de l'exploration fonctionnelle respiratoire (syndrome obstructif, restrictif). Plus le score augmente et plus le nombre de signes présents est important.

Parmi les 88 sujets étudiés 44 sont des "brosseurs" et 44 n'ont jamais brossé.

### **D.IV Exploitation statistique des résultats**

#### **D.IV.1 Relations entre l'électrosynérèse et l'immunoélectrophorèse**

Elle permet d'étudier la similitude des résultats obtenus en immunoélectrophorèse et en électrosynérèse.

Relation ES-IER avec PV 7

Nbre de sérums	Négatif en IER (0)	Positif en IER (1 à 5 arcs)	Total
Négatif en ES (0)	68	3	71
Positif en ES (1 à 7 arcs)	0	26	26
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>29</b>	<b>97</b>

$p < 0,001$  : relation très significative

Relation ES-IER avec *Penicillium nalgiovense*

Nbre de sérums	Négatif en IER (0)	Positif en IER (1 à 5 arcs)	Total
Négatif en ES (0)	63	1	64
Positif en ES (1 à 8 arcs)	14	19	33
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>20</b>	<b>97</b>

$p < 0,001$  : relation très significative

Le test du  $\text{CHI}^2$  permet de montrer une **relation très significative** entre l'électrosynérèse et l'immunoélectrophorèse avec  $p < 0,001$  pour l'antigène *Penicillium nalgiovense* et l'antigène PV 7.

Les deux méthodes permettent donc d'obtenir des résultats sérologiques très proches.

#### D.IV.2 Relations entre les sérologies et l'exposition

Afin de pouvoir comparer l'exposition avec les résultats sérologiques de ces sujets, on a réuni les sujets en 4 groupes initiaux ("frais", "sec", "polyvalents", "administratif") puis en deux groupes : un groupe d'exposition faible comprenant les gens travaillant en secteur "frais" et "administratif" et un groupe d'exposition importante comprenant les gens travaillant en secteur "sec" ainsi que les "polyvalents".

### D.IV.2.1 Relations entre les sérologies et l'exposition

#### Relation PV 7 en IER et exposition

PV 7 en IER	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	32	36	68
1 à 5 arcs	5	24	29
Total	37	60	97

$p < 0,01$  : relation significative

#### Relation P. nalglovense en IER et exposition

P nal en IER	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	36	42	78
1 à 8 arcs	1	18	19
Total	37	80	97

$p < 0,01$  : relation significative

Pour les deux antigènes, le test du  $\text{CHI}^2$  montre **une relation significative entre l'exposition et la sérologie** avec  $p < 0,01$ .

Ceci signifie qu'il existe une bonne relation entre une exposition forte à la poussière de brossage de saucisson et la présence chez les sujets en contact avec ces poussières, de précipitines dirigées contre ces antigènes.

### D.IV.2.2 Relations entre l'électrosynérèse et l'exposition

#### Relation PV 7 en ES et exposition

PV 7 en ES	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	33	38	71
1 à 7 arcs	4	22	26
Total	37	60	97

$p < 0,01$  : relation significative

#### Relation P. nalglovense en ES et exposition

P nal en ES	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	34	31	65
1 à 8 arcs	3	29	32
Total	37	60	97

$p < 0,001$  : relation très significative

Le test du  $\text{CHI}^2$  donne une **relation significative entre l'électrosynérèse avec l'antigène PV 7 et l'exposition** avec  $p < 0,01$ . La relation devient très significative avec  $p < 0,001$  quand l'électrosynérèse est réalisée avec l'antigène *Penicillium nalgiovense*.

Ceci signifie que la relation entre l'exposition à la poussière de saucisson et la mise en évidence de précipitines en électrosynérèse vis-à-vis de l'antigène PV 7 est bonne mais qu'elle est supérieure quand on utilise le *Penicillium nalgiovense* comme antigène.

Ceci prouve aussi que le choix de l'antigène *Penicillium nalgiovense* est le plus opportun pour réaliser l'ELIFA.

#### D.IV.2.3 Relations entre l'ELIFA et l'exposition

Relation ELIFA IgG et exposition

ELIFA IgG	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	17	15	32
3 à 8 arcs	5	28	33
Total	22	43	65

$p < 0,001$  : relation très significative

Relation ELIFA IgA et exposition

ELIFA IgA	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	19	18	37
1 à 4 arcs	3	25	28
Total	22	43	65

$p < 0,001$  : relation très significative

Relation ELIFA IgM et exposition

ELIFA IgM	Exposition faible	Exposition forte	Total
0	19	21	40
1 à 4 arcs	3	22	25
Total	22	43	65

$p < 0,01$  : relation significative

Le test du  $\text{CHI}^2$  montre **une relation significative** avec  $p < 0,01$  entre l'ELIFA IgM et l'exposition et **une relation très significative** avec  $p < 0,001$  entre l'ELIFA IgA, l'ELIFA IgG et l'exposition.

Cela signifie que les IgG et les IgA sont de très bons marqueurs de l'exposition à la poussière de saucisson. Les IgM semblent être moins fiables.

### D.IV.3 Relations entre le brossage et les sérologies

#### D.IV.3.1 Relation entre l'activité de brossage et l'immunoélectrophorèse (IE)

##### Relation PV 7 en IER et brossage

PV 7 en IER	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	40	26	66
1 à 5 arcs	4	18	22
Total	44	44	88

$p < 0,001$  : relation très significative

##### Relation *P. nalgiovensis* en IER et brossage

PV 7 en ES	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	42	32	74
1 à 8 arcs	2	12	14
Total	44	44	88

$p < 0,01$  : relation significative

D'après le test du  $\text{CHI}^2$ , **la relation entre l'immunoélectrophorèse en PV 7 et le brossage est très significative**. Elle n'est que significative avec  $p < 0,01$  pour le *Penicillium nalgiovensis*.

### D.IV.3.2 Relation entre le brossage et l'électrosynérèse (ES)

Relation PV 7 en ES et brossage

PV 7 en ES	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	40	28	68
1 à 7 arcs	4	16	20
Total	44	44	88

$p < 0,01$  : relation significative

Relation P nalgiovene en ES et brossage

P nal ES	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	38	25	63
1 à 8 arcs	6	19	25
Total	44	44	88

$p < 0,01$  relation significative

Pour les deux antigènes, le test du  $\text{CHI}^2$  montre **une relation significative** avec  $p < 0,01$  **entre l'électrosynérèse et le brossage.**

### D.IV.3.3 Relation entre l'ELIFA et l'activité de brossage

Parmi les 85 ELIFA réalisés, on ne connaît l'activité de brossage que de 55 sujets.

Relation ELIFA IgG et brossage

ELIFA IgG	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	16	15	31
1 à 7 arcs	6	18	24
Total	22	33	55

$p < 0,1$  : relation moyennement significative

Relation ELIFA IgM et brossage

ELIFA IgM	Non brosseurs	Brosseurs	Total
0	18	18	36
1 à 4 arcs	4	15	19
Total	22	33	55

$p < 0,1$  : relation moyennement significative

## Relation ELIFA IgA et brossage

ELIFA IgA	Non brosses	Brosses	Total
0	17	17	34
1 à 4 arcs	5	16	21
Total	22	23	55

## Relation non significative

Le test du  $\text{CHI}^2$  montre **une relation faible entre le brossage et PELIFA IgM et IgG** et **une relation non significative entre le brossage et PELIFA IgA**. Les résultats décevants de l'ELIFA et de l'électrosynérèse à un moindre niveau permettent de valoriser l'immunoélectrophorèse en tant que méthode de référence.

**D.IV.4 Relation entre les signes cliniques et d'autres paramètres**

La symptomatologie clinique est exprimée par un score dont l'importance augmente avec le nombre de signes. Afin de comparer les signes cliniques avec d'autres paramètres, on se doit de fixer un seuil qui permet de partager la totalité des sujets en deux populations : un groupe peu symptomatique donc à priori "sain" et un groupe très symptomatique donc à priori "malade". Les patients présentant une forte symptomatologie ont un score supérieur ou égal à 8 ; et 8 est donc le seuil fixé pour former ces deux groupes.

#### D.IV.4.1 Relation entre les signes cliniques et l'exposition

	Exposition faible	Exposition forte	Total
Faible symptomatologie	29	44	73
Forte symptomatologie	7	9	16
Total	36	53	89

Le test du  $\text{CHI}^2$  montre une **relation non significative** entre la clinique et l'exposition.

#### D.IV.4.2 Relation entre les signes cliniques et le brossage

	Non brosseurs	Brosseurs	Total
Faible symptomatologie	40	29	69
Forte symptomatologie	4	15	19
Total	44	44	88

$p < 0,01$  : relation significative

Le test du  $\text{CHI}^2$  permet la mise en évidence d'une **relation significative** entre le brossage et la symptomatologie.

### D.IV.4.3 Relation entre les signes cliniques et la sérologie

Relation entre l'IER avec PV 7 et la symptomatologie

Nbre de sérums	Positif en IER PV 7	Négatif en IER PV 7	Total
Faible symptomatologie	16	57	73
Forte symptomatologie	6	10	16
Total	22	67	89

$\text{CHI}^2 = \text{Non significatif}$

Relation entre l'électrosynérèse avec PV 7 et la symptomatologie

Nbre de sérums	Positif en ES PV 7	Négatif en ES PV 7	Total
Faible symptomatologie	14	59	73
Forte symptomatologie	6	10	16
Total	20	69	89

$\text{CHI}^2 = \text{Non significatif}$

Relation entre L'ELIFA IgG et la symptomatologie

Nbre de sérums	Positif en ELIFA IgG	Négatif en ELIFA IgG	Total
Faible symptomatologie	18	25	43
Forte symptomatologie	6	7	13
Total	24	32	56

$\text{CHI}^2 = \text{Non significatif}$

## Relation entre L'ELIFA IgA et la symptomatologie

Nbre de sérums	Positif en ELIFA IgA	Négatif en ELIFA IgA	Total
Faible symptomatologie	16	27	43
Forte symptomatologie	5	8	13
Total	21	35	56

CHI<sup>2</sup> = Non significatif

Les résultats de l'ELIFA IgM, l'électrosynérèse avec *Penicillium nalgiovense* et de l'immunoélectrophorèse avec *Penicillium nalgiovense* ne sont pas répertoriés ci-dessus mais sont identiques, avec un test du CHI<sup>2</sup> non significatif.

**L'ensemble de ces résultats sérologiques confrontés aux signes cliniques ne permet pas de mettre en évidence une relation statistique significative** par le test du CHI<sup>2</sup>. Ceci montre qu'il n'existe pas de relation entre la présence de précipitines dirigées contre les antigènes de cet environnement et l'existence chez les personnes travaillant dans cette industrie de signes cliniques liés à l'inhalation de poudre de brossage.

## E- Discussion

### **E.I A propos des résultats obtenus en Immunoélectrophorèse, en Electrosynérèse et en ELIFA**

#### **\* Immunoélectrophorèse**

L'antigène PV 7 est celui qui a donné le plus grand nombre de résultats positifs. Près de 30 % des sujets ont de 1 à 5 arcs de précipitation.

Avec l'antigène *Penicillium nalgiovense*, près de 20 % des sujets ont de 1 à 4 arcs de précipitations.

Avec *Penicillium chrysogenum*, 6 sujets seulement ont 1 seul arc de précipitation.

#### **\* Electrosynérèse**

L'antigène *Penicillium nalgiovense* s'avère plus antigénique avec cette technique puisque 34 % des sujets ont de 1 à 8 arcs alors qu'avec PV 7 seulement 27 % des sujets ont de 1 à 7 arcs. Avec *Penicillium chrysogenum*, seulement 3 sujets ont de 1 à 2 arcs.

La fleur de saucisson (PV 7) est une "mosaïque antigénique" très complexe (*Penicillium nalgiovense*, talc, calcite...) et compte tenu des résultats obtenus avec *Penicillium nalgiovense* en électrosynérèse, nous avons été amenés à préférer cet antigène en électrosynérèse puis en ELIFA pour réaliser le profil immunologique des sérums de ces sujets.

Ce choix est justifié par les prélèvements mycologiques réalisés au poste de broissage dans une entreprise de l'étude ; elles ont montré que *Penicillium nalgiovense* était présent en grande quantité par rapport aux souches sauvages.

Les cultures sur l'air environnant ont permis d'isoler 640 colonies de *Penicillium nalgiovense* pour 20 colonies de *Penicillium glabrum* et 4 colonies de *Penicillium cyclopium*.

De plus, de l'étude statistique réalisée page 105, il ressort toutefois qu'il existe pour un même antigène (*Penicillium nalgiovense*, PV 7) une relation très significative entre les deux techniques.

**Tableau des publications des résultats des sérologies réalisées en immunoélectrophorèse et en électrosynérèse vis-à-vis de *Penicillium nalgiovense* et de la fleur de saucisson**

	Référence bibliographique de chaque cas	2	3	3	3	3	54	54	54	6	7
nombre	IE fleur de saucisson	10-14	nr	nr	nr	nr	14	8	21	7	nr
d'arcs	IE <i>Penicillium nalgiovense</i>	3-4	nr	nr	nr	nr	9	4	11	1	⊕
en	ES fleur de saucisson	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	ES <i>Penicillium nalgiovense</i>	nr	7	7	4	4	nr	nr	nr	nr	nr

⊕ : le nombre n'était pas indiqué

nr : technique sérologique non réalisée

L'étude de Grange et coll. montre la présence de précipitines contre les moisissures sauvages (*Penicillium chrysogenum*) et non contre les moisissures d'apport. Ceci est en contradiction avec l'ensemble des autres études réalisées à ce sujet (19).

Les publications rapportant la détection des précipitines en immunoélectrophorèse avec l'antigène fleur de saucisson permettent de remarquer que le nombre d'arcs obtenu est globalement plus important que celui obtenu chez les sujets de notre enquête positifs en immunoélectrophorèse avec PV 7. L'antigène "fleur de saucisson" peut être variable d'une étude à l'autre ainsi que l'extraction antigénique utilisée dans les différentes études.

Par ailleurs, les sérologies ont été réalisées sur des sérums de patients chez lesquels il avait été diagnostiqué une alvéolite allergique extrinsèque et qui présentaient une forte symptomatologie.

Par contre en immunoélectrophorèse avec *Penicillium nalgiovense*, les résultats publiés sont comparables à ceux obtenus dans notre étude (11,20,31,39).

En ce qui concerne l'électrosynérèse, elle n'a été réalisée que par l'équipe de Geraut et Morin. Les résultats obtenus sont superposables à ceux obtenus dans notre enquête (18).

#### \* ELIFA

N'ont été testés en ELIFA que les sérums qui présentaient des arcs nets et pour certains des arcs flous et difficiles à interpréter.

Sur les 65 sérums testés :

- plus de la moitié ont des IgG spécifiques (1 à 8 arcs)
- 28 soit 43 % ont des IgA spécifiques (1 à 4 arcs)
- 25 soit 38,5 % ont des IgM spécifiques (1 à 5 arcs)

Autant la lecture des arcs IgG et IgA est facilitée par le nombre et la netteté des arcs, autant la lecture des arcs IgM s'est avérée plus délicate, arcs moins nombreux et moins nets.

De plus lors de la révélation, les arcs IgM étaient plus lents à apparaître ce qui laisse à penser que les IgM étaient en quantité plus faible que les IgG et les IgA.

Ceci est corroboré par les publications sur les différents isotypes d'immunoglobulines isolés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et les sérums des sujets atteints de pneumopathies d'hypersensibilité.

En effet Yoshizawa et coll. ont montré la présence de quantités importantes d'IgG et d'IgA spécifiques dans le sérum et le liquide de lavage broncho-alvéolaire de sujets atteints de pneumopathie d'hypersensibilité dont 5 étaient des poumons d'éleveurs d'oiseaux (54).

De même Ojanen et coll. ont montré la présence dans le sérum d'IgA et d'IgG spécifiques chez 13 patients atteint de poumon de fermier.

Le taux d'IgM spécifiques détectées était bien inférieur au taux d'IgG et d'IgA (32,33).

Toutefois, dans ces publications, la détection des anticorps était réalisée par ELISA ce qui permettait de les quantifier.

**Tableau des résultats d'une publication sur des sérologies ELIFA vis-à-vis de l'antigène *Penicillium nalglovense* (30)**

Présence d'arcs en ELIFA	IgG	IgM	IgA
Cas n° 1	+	+	+
Cas n° 2	+	+	+
Cas n° 3	+	+	+
Cas n° 4	+	+	-

Comme pour l'électrosynérèse, seule l'équipe de Morin et Geraut a réalisé une sérologie ELIFA. Les résultats ne sont pas exprimés en nombre d'arcs obtenus mais seulement par une réponse d'absence ou de présence d'arcs de

précipitations (30). On remarque la présence systématique d'IgG et d'IgM. Les IgA ne sont retrouvés que chez 3 sujets sur 4. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans notre étude. En effet, les sujets possédant des IgG possèdent aussi le plus souvent des IgM et des IgA. Seule la présence systématique d'IgM peut paraître surprenante mais le nombre de cas limité explique un résultat qui n'est peut être qu'un concours de circonstance.

Il faut aussi rappeler que ces sérologies ont été réalisées chez des sujets subissant une forte exposition ce qui explique que les 4 sérologies ELIFA soient positives.

L'ELIFA ne correspond en fait qu'à une révélation isotypique des immunoglobulines impliquées dans une réaction antigène-anticorps à l'origine de l'arc de précipitation. On ne peut donc théoriquement pas obtenir un ELIFA positif avec un sérum ayant une électrosynérèse négative. Cette discordance a pourtant été observée pour un sujet qui présentait des arcs de précipitation en immunoélectrophorèse avec *Penicillium nalgiovense* et ne présentait pas d'arcs en électrosynérèse pour ce même antigène. Cette anomalie peut s'expliquer par un mauvais rapport antigène-anticorps qui a négativé à tort l'électrosynérèse. Toutefois, différentes dilutions d'anticorps et d'antigène ont été testées sans pouvoir obtenir d'arc de précipitation pour ce sérum. Malgré la grande sensibilité de l'électrosynérèse cet exemple montre les limites de cette technique.

## **E.II A propos de la validité biologique des résultats**

Parmi les 29 sujets positifs en immunoélectrophorèse avec PV 7, 3 sont négatifs en électrosynérèse alors que pour les 26 sujets positifs en électrosynérèse avec PV 7, aucun n'est négatif en immunoélectrophorèse. Ceci montre que l'antigène PV 7 est plus adapté à l'immunoélectrophorèse qu'à l'électrosynérèse.

Par contre parmi les 20 sujets positifs avec *Penicillium nalgiovense* en immunoélectrophorèse, 1 seul est négatif en électrosynérèse. De plus, parmi 33 sérums positifs en électrosynérèse avec *Penicillium nalgiovense*, 14 sérums sont négatifs en immunoélectrophorèse.

A notre avis il ne peut s'agir de faux positifs en électrosynérèse car ce sont des sérums qui présentaient des arcs très nets. Ceci est certainement le fait de la meilleure sensibilité connue de l'électrosynérèse par rapport à l'immunoélectrophorèse. Le fait est peut être aussi le résultat de l'utilisation du bon rapport antigène-anticorps que nous avons obtenu après plusieurs essais de différentes dilutions d'antigène.

Comme l'électrosynérèse, il est logique que la sensibilité de l'ELIFA avec *Penicillium nalgiovense* soit supérieure à celle de l'immunoélectrophorèse.

Quant aux trois isotypes, la sensibilité des IgG est la meilleure, celle des IgA est moindre et celle des IgM plus faible encore.

Ceci est parfaitement corréolé aux publications réalisées sur ce sujet (54,32,33).

Il est vraisemblable que les sérums négatifs en immunoélectrophorèse avec *Penicillium nalgiovense* et qui s'avèrent positifs électrosynérèse et en ELIFA diminuent à tort l'évaluation de la spécificité de l'électrosynérèse et de l'ELIFA.

### E.III A propos de l'exploitation statistique des résultats

#### E.III. 1 Relation entre la sérologie et l'exposition

Quelque soit la taille de l'entreprise, artisanale, semi-industrielle, industrielle, tout le personnel est soumis en permanence et à des degrés divers à une atmosphère contaminée essentiellement par les spores *Penicillium nalgiovense* et à un degré moindre de *Penicillium chrysogenum* mais aussi des particules minérales irritantes constituant la fleur de saucisson. Par contre les niveaux d'exposition varient en fonction des postes de travail selon les 2 groupes que nous avons défini ; très importante chez les brosseurs permanents ou occasionnels ; moindre chez les sujets travaillant en secteur "frais" ou administratif.

Ainsi en immunoélectrophorèse avec PV 7 et *Penicillium nalgiovense*, la relation est significative entre une forte exposition et l'existence d'une sérologie positive.

En électrosynérèse, cette relation est significative avec PV 7 mais devient très significative avec *Penicillium nalgiovense*.

En ELIFA, la présence d'IgG et d'IgA spécifiques de *Penicillium nalgiovense* est en relation très significative ( $p < 0,001$ ) avec la notion de forte exposition. Cette relation n'est que significative entre les IgM spécifiques de *Penicillium nalgiovense* et cette forte exposition.

Il semble donc que l'antigène *Penicillium nalgiovense* extrêmement présent dans cet environnement, soit responsable d'une sensibilisation forte du personnel. L'électrosynérèse avec *Penicillium nalgiovense* s'est avérée la technique la mieux adaptée à la recherche de ces précipitines.

Dans ce processus de sensibilisation, les IgG et les IgA spécifiques de *Penicillium nalgiovense* sont d'excellents marqueurs.

La présence d'IgG dans le cadre d'une hypersensibilité semi-retardée est en rapport avec la physiopathologie. En effet dans les réactions immunologiques de type III, il existe une prédominance des IgG sériques spécifiques de l'allergène, responsables de la formation de complexes immuns (1).

Les IgA sont des immunoglobulines des sécrétions séromuqueuses ayant une activité antibactérienne, antivirale, inhibitrice de l'absorption d'antigènes inertes et d'haptènes par les muqueuses digestives respiratoires. Ceci leur conférerait un rôle protecteur. Costabel a notamment montré qu'on les retrouvait à des taux plus élevés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire que dans le sérum (8,9).

On peut aisément comprendre que la stimulation antigénique des muqueuses bronchiques et alvéolaires par les conidies de *Penicillium nalgiovense* induise la production d'IgA sécrétoires qui deviennent alors un bon marqueur d'exposition à l'allergène.

Quant aux IgM, seul un suivi sérologique et clinique de ces sujets permettrait de connaître la valeur réelle à leurs attribuer.

### **E.III.2 Relation entre la sérologie et l'activité de brossage**

La relation est très significative entre l'activité de brossage et la présence de précipitines en immunoélectrophorèse avec PV 7. Cette relation n'est que significative entre cette même activité et la sérologie positive en électrosynérèse avec *Penicillium nalgiovense*.

Paradoxalement, les résultats de l'ELIFA confrontés à l'activité de brossage sont peu ou pas corrélés. En effet, la présence d'IgG et d'IgM spécifiques de *Penicillium nalgiovense* n'est que moyennement significative entre la présence d'IgA et l'activité de brossage.

Pour mieux apprécier la sensibilité et la spécificité des IgG, IgA, IgM spécifiques, il eut fallu tester les sérums d'un groupe apparié de sujets n'ayant aucun contact avec cet environnement très particulier.

L'immunoélectrophorèse avec PV 7 semble donc la technique adaptée pour la détection d'un état de sensibilisation chez les brosseurs.

En effet, l'utilisation d'un antigène plus ciblé et plus spécifique tel que *Penicillium nalgiovense* n'est pas un apport pour la détection de précipitines chez ces sujets. Peut être que ces sujets confrontés à une stimulation massive par la fleur de saucisson se sensibilisent à d'autres allergènes présents en quantité plus faible que *Penicillium nalgiovense* mais plus antigénique.

### **E.III.3 Relation entre la symptomatologie et d'autres paramètres : exposition et sérologies**

La relation entre les signes cliniques et l'exposition n'est pas significative.

De même, il n'y a pas de relation significative entre la forte positivité des résultats sérologiques et l'importance des signes cliniques.

Etant donné le faible nombre de sujets présentant une forte symptomatologie:

- n = 16, pour l'étude statistique vis-à-vis de l'électrosynérèse, de l'immunoélectrophorèse, de l'exposition ;

- n = 13, pour l'étude statistique vis-à-vis de l'ELIFA

Il est regrettable que nous n'ayons pu avoir les renseignements cliniques concernant les 5 sujets présentant les sérologies les plus fortes.

Peut être les résultats s'en seraient trouvés modifiés. Toutefois, une relation significative a été obtenue entre la symptomatologie et l'activité de brossage.

On peut donc observer que la sérologie est corrélée surtout à l'exposition et à un moindre niveau à l'activité de brossage et que les signes cliniques est corrélée au brossage. Comment peut-on expliquer ces résultats ?

Tout d'abord, les manifestations cliniques ne sont peut être pas le résultat de la seule sensibilisation à *Penicillium nalgiovense*. En effet d'autres allergènes peuvent intervenir pour induire une hypersensibilité à complexes immuns. Ceci peut expliquer le fait que l'antigène PV 7 soit meilleur pour détecter une sensibilisation chez les brosseurs.

De plus la forte symptomatologie clinique peut aussi être due à l'effet des poudres minérales présentes dans l'environnement et qui ont un pouvoir irritant bronchique. En effet l'exposition au talc est considérée comme inducteur de toux d'expectoration et de dyspnée (43,30).

Le fait que *Penicillium nalgiovense* ne soit pas la seule cause des manifestations cliniques observées chez ces sujets peut aussi expliquer la bonne relation qui existe entre la sérologie et l'exposition, alors que cette relation est moins bonne avec l'activité de brossage. En effet, dans l'air ambiant de l'entreprise et à distance des postes de brossages, on trouve essentiellement les spores de *Penicillium nalgiovense* (11).

De plus, l'effet irritant des poudres minérales étant lié à la quantité inhalée, ces personnes ont plus de probabilité de se sensibiliser contre le *Penicillium nalgiovense* (le phénomène étant "dose indépendant" car immunologique) que d'irriter leurs muqueuses respiratoires avec du talc (le phénomène étant mécanique). Ceci est peut être moins vrai pour les "brosseurs" (30).

Cependant, il paraît fort probable que les poudres minérales interviennent dans le processus physiopathologique en tant que cofacteur de l'immunisation par un mécanisme d'irritation mécanique.

L'absence de corrélation entre la forte symptomatologie clinique et la positivité de la sérologie témoigne une fois encore du fait que les anticorps spécifiques sont le témoin d'une sensibilisation mais ne sont pas obligatoirement responsables de la maladie.

De plus, parmi les 97 sujets étudiés, rien ne permet d'affirmer que ces gens font ou feront une alvéolite allergique extrinsèque. En effet, le diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque nécessite l'association de symptômes respiratoires compatibles, d'une exposition antigénique prouvée, d'une diminution du coefficient de transfert du CO, d'une imagerie compatible et d'une alvéolite lymphocytaire (40).

Dans cette étude, le liquide de lavage broncho-alvéolaire n'a pas été réalisé et les radiographies n'ont pas montré d'anomalies compatibles avec une pneumopathie d'hypersensibilité. La tomodensitométrie qui a une meilleure sensibilité que la radiographie classique pour le diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque n'a pas non plus été réalisée (43).

De plus, les épreuves fonctionnelles respiratoires chez 91 sujets n'ont pas montré d'anomalies.

Le diagnostic de pneumopathies d'hypersensibilité parmi ces sujets ne peut donc pas être affirmé sur les résultats de cette enquête.

Toutefois, le cas d'alvéolite allergique extrinsèque, diagnostiqué chez une personne travaillant aux salaisons de Lacaune, qui est à l'origine de cette étude et les différents cas décrits dans la littérature, justifient que le personnel de ces entreprises bénéficie d'une surveillance pneumologique et sérologique régulière.

## F- Conclusion

L'alvéolite allergique extrinsèque du "brosseur de saucissons" est une pneumopathie d'hypersensibilité faisant partie des nombreuses pneumopathies allergiques professionnelles, mais qui n'est pas reconnue à l'heure actuelle comme une maladie professionnelle.

Son diagnostic repose sur la présence de signes cliniques, d'alvéolite lymphocytaire à CD<sub>8</sub>, d'images radiographiques compatibles, d'anomalies fonctionnelles respiratoires, mais aussi sur la mise en évidence de précipitines sériques spécifiques.

Cette étude démontre que l'allergène principal impliqué est *Penicillium nalgiovense*.

Cependant, la présence de précipitines spécifiques de *Penicillium nalgiovense* semble être davantage le témoin d'une sensibilisation due à une forte exposition que le marqueur d'une pneumopathie d'hypersensibilité.

En effet, parmi les employés des usines de salaisons de Lacaune, on observe une prévalence élevée de précipitines sériques associée à des affections respiratoires allergiques d'intensités modérées. Ces manifestations cliniques bénignes sont beaucoup moins intenses que celles observées chez des malades atteints de poumon d'éleveurs d'oiseaux ou de poumon de fermier. De même, il n'a jamais été décrit chez le "brosseur de saucissons" de cas de fibroses pulmonaires à la différence d'autres pneumopathies d'hypersensibilité.

Même si la fleur de saucisson semble ne causer que des désordres immunologiques d'une importance toute relative, entraînant des manifestations cliniques modérées, il convient toutefois d'établir une surveillance pneumologique de ces sujets par les médecins du travail.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Akoun G : concept actuel de la physiopathologie des alvéolites allergiques extrinsèques. Rev franc. allergol 1980, 20 (n° 1) 11-7.
2. Ameille J : fièvre d'inhalation une pathologie respiratoire aiguë tonique à ne pas méconnaître.
3. Besiers C : alvéolites allergiques extrinsèques (poumon d'éleveurs d'oiseaux et poumon du fermier) : critères diagnostiques et intérêt des isotypes spécifiques IgG, IgM, IgA. Thèse de médecine, université de Reims, 1994.
4. Campbell Ja, Kryda Mj, Treuhaft M.W, Marx J.J, Roberts Rc chux worker's hypersensitivity pneumonitis. Am Rev Respi Dis, 1983,127 : 495-6.
5. Carillo T, Rodriguez de Castro F, Cueras M, Diaz F et al. : Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fanciers. Allergy, 1991, 46, 241-244.
6. Cormier Y, Belanger J, Laviolette M, Hebert J. Poumon de fermier alvéolite lymphocytaire chez les sujets symptomatiques et asymptomatiques. Rev Fr allergol, 1985, 25, n°4, 180-184.
7. Cormier Y, Belanger J : the fluctuant nature of précipitating antibodies in dairy farmers. Thorax, 1989, 44, 469-473.
8. Costabel U : The alvéolitis of hypersensitivity pneumonitis. Eur Respr J, 1988, 1, 5-9.

9. Costabel U : l'alvéolite dans les pneumopathies d'hypersensibilité. Rev Mal. Resp, 1989, 6, 121-126.
10. Court P : alvéolite allergique extrinsèque : une nouvelle circonstance étiologique, thèse médecine, Lyon, 1982,48 p dactylographie.
11. Dalphin JC, François J, Baugier B, Picard L, Bourgeois M, Depierre A : un cas d'hypersensibilité semi-retardée à la poussière de saucisson sec. Rev Mal Resp, 1988, 5, 633-635.
12. Dalphin JC, Illig S, Pernet D, Dubiez A, Debieurre D, Teyssier-Coth C, Depierre A : Symptôme et fonction respiratoire dans un groupe d'affineurs de gruyère de comté. Rev Mal Resp, 1990, 7, 31-37.
13. Delbreil JM : maladie du poumon de fermier et des éleveurs d'oiseaux, enquête prospective chez 820 volontaires du nord Aveyron. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Paul Sabatier de Toulouse, 1995.
14. Depierre A, Dalphin Jc, Pernet D, Dubiez A, Faucompré C, Breton JL : épidémiological study of farmer's lung in five districts of thhe french doubs province. Thorax, 1988, 43, 429-435.
15. Fergusson RJ, Milne LJR, Crompton GK : Penicillium allergic alvéolitis : faculty installation of central heating. Thorax, 1984,39, 294-298.
16. Galland Ch, Reynaud C, De haller R, Polla Bs, Levenberger : maladie des laveurs de fromages ; une forme toujours actuelle d'alvéolite allergique extrinsèque en milieu rural. Rev Mal Resp, 1991, 8, 381-386.

17. Gari M, Recco P, Pinon JM, Seguela JP : intérêt de la co-immunoélectrodifffusion sur acétate de cellulose dans le diagnostic du poumon du fermier pour la mise en évidence de systèmes précipitants remarquables. Rev Fr allergol, 1983, 23 (n°1), 19-22.
18. Geraut CH, Morin O, Dupas D, Vermeil C, Marty : les alvéolites allergiques extrinsèques dans l'industrie de fabrication des saucissons.
19. Grange F, Salque M, Defauchy A et Prost G : un nouveau cas d'alvéolite allergique à la flore de saucisson. Arch Mal Prof, 1984, 45, 215-216.
20. Grillot R, Pinel C, Perdrix A, Parat S, Gueho E, Ambroise-thhomas P : asthme, alvéolite allergique extrinsèque et industrie des saucisson. Exploration de l'immunité humorale face à *Penicillium nalgiovense*. communication société française de parasitologie, 1989.
21. Hebert J, Cormier Y, Beaudouin R, Beaudouin J, Laviolette M : physiopathologie de la maladie du poumon de fermier aux moisissures. Rev Fr allergol, 1981, 21, 2, 73-78.
22. Johnson MA, Nemeth A, Conder A, Clarke SW, Poulter LW : cell mediated immunity in pigeon breeder's lung : the effect of removal from antigen exposure. Eur Respir J, 1989, 2, 44-450.
23. Keith C, Meyer MD : occupational and environmental lung disease. Beryllium and lung disease : chest, 1994, 106, 942-46.

24. Lalancette M, carrier G, Laviolette M, Ferland S, Rodrique J, Begin R, Cantin A, Cormier Y : Farmer's lung : long term out come and lack of predictive value bronchoalvéolar fibrosing factors. Am Rev Respir Dis vol 148, pp 216-221, 1993.
25. Maier A, Bronner J, Orion B, Wissler JC, Hammann M : bronchopneumopathie des ouvriers du bois et sensibilisation aux moisissures. Rev Fr allergol, 1981, 21, 2, p73-78.
26. May J, Stallones L, Darrow D, Pratt D : organic dust toxicity (pulmonary mycotoxicosis) associated with silo unloading. Thorax, 1986, 41,919-923.
27. Moinard J, Vergeret J, Tunon de Lara JM, Taytard A : une nouvelle forme du poumon des champignonnistes. Rev Mal Resp, 1991, 8, 308-310.
28. Molina C, Tourreau A, Aiache JM, Brun J, Jeanneret A, Roche G : manifestation allergique chez les fromagers : étude clinique, apidermiologique et immunologique. Rev Fr allergol, 1975, 15, 89-91.
29. Morell F, Orriols R, Jeanneret A, Aiache JM, Molina CL : Hypersensibilité immédiate et alvéolites allergiques extrinsèques. Rev Fr allergeo, 1982, 22, 2, 91-95.
30. Morin O, Geraut Ch, Gari M, Vermeil C, Etrillard S : manifestation allergiques à Penicillium dans une usine de fabrication de saucissons. Etude clinique, sérologiques, épidémiologiques. Bull Soc Fr Mycol Médicale, 1984, 13, 403-408.
31. N'Diaye PF, Adam G, De Kergunic JP : alvéolites allergiques extrinsèques une nouvelle inconstance étiologique. Concours Ned, 1980, 102, 7315-7318.

32. Ojanen T : class spécifique antibodies in sérodiagnosis of farmer's lung. *British journal of industrial medicine*, 1992, 49, 332-336.
33. Ojanen T, Tehro EO, Turkiainen H, Mäntyjärvi RA : class spécifique antibodies during follow up of patients with farmer's lung. *Eur Respir J*, 1990, 3, 257-260.
34. Park Hs, Jung Ks, Kim So, Kim Sj : hypersensitivity pneumonitis induced by *Penicillium expansum* in a home environment : *Clinical and Experimental allergy*, 1994, volume 24, p 383-385.
35. Pesci A, Bertorelli G, Dall'Oglio PP, Neri GP, Olivieri D : évidence in bronchoalvéolar lavage for third type immune réactions of hypersensitivity pneumonitis. *Eur Resp J*, 1989, 77, 359-361.
36. Pinon JM, Smets P, Gari M, Recco P, Seguela JP : IgA de pigeon, antigène majeur dans la maladie du poumon d'éleveur d'oiseaux. Intérêt diagnostique de sa mise en évidence par co-immuno-électrodifusion. *Rev Fr allergol*, 1982, 22 (n°4-5), 207-210.
37. Pitt JI : the genres *penicillium* and its teleomorphic states, *Eupenicillium* and *Talaromyces* : académic press.
38. Pforte A, Schild U, Breyer G, Häussinger K, Ziegler-Weitbroch Hwl : a role IgE in extrinsic allergic alvéolitis ? *Clin investig*, 1992, 70, 277-282.
39. Reynaud C, Vodor JF, Bernstein M, Nerbollier G, Richardet C, Dolla B : salami et alvéolite allergique extrinsèque : une nouvelle pathologie professionnelle en Suisse. *S<sub>O</sub>2 Präventivmed*, 1992, 37, 263-268.

40. Reynaud C : alvéolites allergiques extrinsèques : approche diagnostic revue médicale de la Suisse romande, 1991, 11, 193-197.
41. Reynolds SP, Edwards JH, Jones Kp, Davies BH : immunoglobulin and antibody levels in bronchoalvéolar lavage fluid from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. Clin exp immunol, 1991, 86, 278-285.
42. Rose C, King T : controversies in hypersensitivity pneumonitis. Am. Rev Respir Dis, 1992, 145, 1-2.
43. Rouzaud P : étude prospective de la pneumopathie d'hypersensibilité à la fleur de saucisson chez 124 ouvriers des salaisons de lacaune, thèse de médecine, université de Toulouse, 1995 : 95 Tou 1539.
44. Ruiz-Manzano J, Valdec M, Icon M-A, Morell F, Sendra Sj : sulcrosis : alvéolitis allergica extrinseca in un trabajador del corcho. Med clin barc, 1984 feb 18, 82 (6), 265-266.
45. Rylander R : symptoms and mechanism inflammation of the lung. American journal of industrial medicine, 1984, 25, 19-23.
46. Salvaggio JE : immune réactions in allergic alvéolitis Eur Respi J, 1991, 4, suppl. 13, 47s-59s.
47. Salvaggio JE : hypersensitivity pneumonitis : J. allergy clin immunol, 1987, 79, 4, 558-571.

48. Soler P, Nioche S, Valeyre D, Basset F, Benveniste J, Burtin C, Battesti JP, Georges R, Hance Aj : role of mast cells in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Thorax*, 1987, 42, 565-572.
49. Trela C, Rouch Y, Refregier M, Pujol M : à propos d'un cas évoquant un diagnostic d'alvéolite allergique extrinsèque dans l'industrie de fabrication des saucissons (amélioration des conditions de travail du poste de "brosseurs de saucissons") : documents non publiés.
50. Underner M, Cazenave-robot, Patte F : pathologie broncho-pulmonaire professionnelle due au travail du bois : démarche diagnostique. *Rev pneumol clin*, 1988, 44, 83-93.
51. Van Assendelft A, Raitio M, Turkia V : fuel-induced hypersensitivity pneumonitis caused by *Penicillium* species : *Chest*/87/3/march 1985, p394-396.
52. Volgelmeier C, Krombach F, Münzig S, König G, Mazur G, Beinert T, Günther F : activation of blood neutrophils in acute episodes of farmer's lung. *Am Rev Respir Dis*, 1993, 148, 396-400.
53. Yoshizawa Y, Ohdama S, Tanoue M, Tanaka M, Ohtsuka M, Vetake K, Hasegawa S : analysis of bronchoalveolar lavage cells and fluids in patients with hypersensitivity pneumonitis. Possible role of chemotactic factors in the pathogenesis of diseases. *Int. archs allergy appl. immun*, 1986, 80, 376-382.

54. Yoshizawa Y, Miyashita Y, Inoue T, Sumi Y, Miyazaki Y, Sato T, Ohtsuka M : sequential evaluation of clinical et immunological findings in hypersensitivity pneumonitis. Serial subclass distribution of antibodies. *Clinical immunology and immunopathology*, 1994, Vol 73, n° 3 december, pp 330-337.