

Détection colorimétrique des moisissures allergisantes de l'habitat domestique

F.M. KNIEST *

RESUME

Les allergènes produits par les moisissures peuvent induire des réactions allergiques cutanées positives chez 10 à 30 % de la population. La croissance des moisissures dans les habitations et l'excrétion d'exo-enzymes dans la poussière domestique est un phénomène normal. Le développement d'un test de détection simple et rapide destiné à déterminer la quantité d'allergènes des moisissures domestiques est souhaitable. La production d'enzymes telles que celles qui sont mesurées avec les bandes APIZYM paraît pouvoir être utilisée. Cette production est comparée à la croissance des moisissures à l'aide de tests de laboratoire utilisant une moisissure domestique xérophile très fréquente, *Aspergillus repens*. Dans un milieu de culture composé de résidus de rasage (squames épidermiques et poils de barbe) on a pu observer un accroissement de trois phosphatases, de deux estérases et de N-acetyl-béta-glucosaminidase. Une étude avec d'autres milieux nutritifs naturels, testant d'autres moisissures xérophiles sera effectuée ultérieurement.

SUMMARY

Colorimetric detection of allergenic fungi in the indoor environment. — The allergens, produced by the fungi, can induce allergic skin-problems in 10-30 p. cent of the population. Fungal growth in dwellings and linked excretion of exo-enzymes is a normal phenomenon in house-dust. The development of a simple and quick test to measure the quantity of fungal allergens in house dust seems necessary. The enzyme production, as measured by the APIZYM method, seems a useful base. In laboratory test, growth of a very common xerophilic fungus *Aspergillus repens*, is related to measure enzyme production. An increase of three phosphatases, two esterases and N-acetyl-beta-glucosaminidase could be found on a growth medium of human dander and beard hairs. Experiments with other natural growth media and with other common xerophilic fungi are planned in the near future.

Le rôle de certaines moisissures en tant que pneumallergènes, est actuellement parfaitement établi [10]. La connaissance de l'allergie aux moisissures est ancienne. En 1873 déjà, Blackley [4] dans une auto-observation avait montré que l'inhalation de spores de moisissures pouvait provoquer des accès de rhume des foins. En 1924, Storm Van Leeuwen [14] considère que la moitié des patients asthmatiques présente une hypersensibilité aux spores de moisissures.

Les allergènes incriminés sont présents dans les spores de moisissures ainsi que dans le mycelium ou dans le substrat de croissance. 39 p. cent seulement des moisissures signalées dans le milieu domestique ont été testées quant à

leur potentiel allergénique [6]. Les tests cutanés réalisés avec ces moisissures chez des patients sensibilisés sont positifs dans 10 à 32 p. cent des cas [6]. D'autres recherches actuellement poursuivies vont également dans ce sens [8, 12, 13].

Les moisissures allergéniques sont capables d'induire la production d'anticorps chez l'homme [11]. Un patient allergique aux moisissures n'aura aucun symptôme lors d'un séjour dans un endroit dépourvu de spores de moisissures. Des symptômes liés à l'hyperréactivité bronchique restent cependant possibles. Il pourrait y avoir une relation entre la croissance des moisissures et la production des allergènes.

La croissance des moisissures est un problème mondial. Les habitations modernes en Eu-

* Laboratoire d'Ectoparasitologie et Milieu de l'habitation, Groupe de Travail « Maison et Santé », Université de l'Etat, Catharijnesingel 101, 3511 GV UTRECHT (Pays-Bas).

Tirés à part : D. F.M. Kniest, adresse ci-dessus.

Conférence présentée aux Journées Nationales de la Société Française d'Allergologie, Strasbourg, 27-28 mai 1988.

rope occidentale contiennent un très grand nombre de biotopes propices aux moisissures tels que les papiers peints, les peintures, les animaux domestiques et les plantes, les déchets nutritifs de toute sorte [7].

Les allergènes produits par les moisissures sont une part des nombreuses causes « biotiques » des affections respiratoires. Une des possibilités permettant de résoudre les problèmes d'allergie aux moisissures est d'abaisser le niveau de ces allergènes dans l'environnement domestique, et dans la poussière de maison. Or, la détermination du niveau des allergènes des moisissures est non seulement coûteuse, mais encore difficilement praticable. Ainsi les analyses utilisant l'inhibition du RAST, qui peuvent donner une indication sur la concentration des allergènes ne sont réalisables qu'avec l'aide d'un laboratoire spécialisé. Il paraît opportun, et même nécessaire, de rechercher une méthode simple et aisément applicable par le praticien, permettant de contrôler régulièrement le niveau des allergènes de moisissures dans l'environnement du patient.

La croissance des moisissures peut être mise en rapport avec la quantité d'enzymes exogènes secrétées dans le milieu de croissance. Les enzymes, excrétées à l'extérieur du mycelium se retrouvent dans la poussière de maison.

Le but de cette étude est de rechercher s'il existe une relation entre l'augmentation des exoenzymes dans un milieu nutritif et la croissance des moisissures xérophiles dans ce milieu. Cette relation constituera la base de développement d'un test de détection d'une activité fongique. Ce test pourrait alors permettre de déterminer l'importance des allergènes de moisissure produits dans un endroit déterminé, puis de vérifier la réduction de ces allergènes après application de mesures d'éviction.

MATERIEL ET METHODES

Un mélange de squames épidermiques et de poils est prélevé avec un appareil de rasage (marque : Braun micron, Rép. Féd. d'Allemagne). Durant 72 heures on expose un tiers de ce matériel aux U.V.-C de quatre lampes germicides de 15 Watts (253,7 nm) (TUV-lampe germicide, Philips, Eindhoven, Pays-Bas) placées à 10 cm du substrat. Les particules sont étalées et agitées trois fois par jour pour assurer leur exposition totale. L'autre partie du matériel n'est pas irradiée.

Sur des milieux de Czapek on réalise une culture d'*Aspergillus repens*. On y dépose deux ml d'une solution de Tween 80 (0,02 %) avant de secouer fermement et soigneusement. On obtient

ainsi une suspension de 100 000 spores/ml au minimum. De cette suspension on prélève 0,1 ml pour le mélanger à 50 mg de substrat irradié (« Test UV »). Pour l'expérience cinq suspensions de spores sont nécessaires.

Dans cinq boîtes de Petri stériles partiellement remplies de plâtre (CaSO₄ ; Beamix, Pays-Bas) on place un filtre stérile, humidifié à l'aide de 3 ml d'eau distillée stérile. La suspension (matériel traité) est divisée en 5 parties déposées en cercle sur le filtre de chaque boîte de Pétri. Celui-ci permet d'éviter le dessèchement du matériel traité. Les boîtes sont ensuite scellées et conservées à 20 °C et 75 p. cent d'humidité relative.

Après 0 heure, 36 heures, 7 jours, 2 semaines et 4 semaines, on compte les spores en re-suspendant totalement les cinq parties assemblées d'une boîte de Pétri dans 5 ml d'eau distillée stérile ensuite placée dans un hémocytomètre. On y dénombre 25 cases de 1/16 mm² (le nombre de spores observé sera multiplié par 32 000 pour obtenir le nombre de spore/ml).

Pour la détermination Apizym (kit de détection enzymatique développé en France ; Api System S.A., Montalieu Vercieu, France), on ajoute 5 ml d'eau distillée stérile à la suspension restante. De ce liquide on pipette chaque fois 65 microlitres dans chacun des 20 microtubules du kit Apizym, lequel est maintenu pendant trois heures à 37 °C. On ajoute ensuite deux gouttes de zymA et de zymB respectivement pour chaque microtubule afin de produire la réaction. Après dix minutes, on élimine la couleur jaune interférante du réactif zymB au moyen d'un rayonnement sous lampe de 1 000 watts (Lampe halogène E9 ; Philips, Eindhoven, Pays-Bas) durant une minute. La réaction colorimétrique résiduelle du test Apizym (zymogramme) révèle la quantité d'enzymes présentes dans le mélange de squames avant, et pendant la croissance de la moisissure *Aspergillus repens*. Il est possible de démontrer la présence de 19 enzymes différentes : trois phosphatases, trois estérases, huit glucosidases et cinq protéases. On détermine l'intensité (0, 1, 2, 3, 4, 5) à l'aide d'une échelle colorimétrique. On peut ainsi déterminer la quantité d'enzymes détectées correspondant à la quantité de substrat hydrolysé en nanomoles pouvant s'élever à 0, 5, 10, 20, 30 et > 40 nanomoles. Une erreur de 20 p. cent est admise.

De cette manière, deux séries témoins (sans ensemencement de moisissures) ont été testées : l'une correspondant à 50 mg de squames non irradiés aux U.V.-C (« Témoin ») et l'autre correspondant à 50 mg de squames irradiés (« Témoin-UV »). Pour chaque série, on ajoute au matériel 0,1 ml de solution Tween 80 (0,02 %) à la place d'une suspension de spores fongiques. L'expérience est menée en duplicata.

TABLEAU I. — Zymogrammes (en unités) du milieu de résidu de rasage (squames épidermiques/poils de barbe) non irradié aux UV-C et non inoculé avec des spores de moisissures (témoin) durant une période d'incubation de quatre semaines (25 °C ; > 75 % humidité relative). Après quatre semaines une sporulation d'*Aspergillus niger* et *Penicillium* sp est observée.

Nom de l'enzyme (numéro Apizym)	0 h	Période d'incubation			
		36 h	1 sem.	2 sem.	4 sem.
Phosphatase alcaline (n° 2)	1	2	1	2	3
Phosphatase acide (n° 11)	5	4	5	5	5
Phosphoamidase (n° 12)	2	3	3,5	5	5
Estérase C4 (n° 3)	0	0	1	1,5	5
Estérase/lipase C8 (n° 4)	0,5	1	1	1,5	3
N-acétyl-bêta-glucosaminidase (n° 18)	0,5	0,75	2	3	4

TABLEAU II. — Zymogrammes (en unités) du milieu de résidu de rasage (squames épidermiques/poils de barbe) irradié aux UV-C et non inoculé avec des spores de moisissures (témoin UV) durant une période d'incubation de quatre semaines (25 °C ; > 75 % humidité relative). Après quatre semaines aucune sporulation de moisissures ne se produit.

Nom de l'enzyme (numéro Apizym)	0 h	Période d'incubation			
		36 h	1 sem.	2 sem.	4 sem.
Phosphatase alcaline (n° 2)	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Phosphatase acide (n° 11)	1	1	0,5	0,75	0,5
Phosphoamidase (n° 12)	1	1	1	1	0,5
Estérase C4 (n° 3)	0	0	0	0,25	1
Estérase/lipase C8 (n° 4)	0,5	0,5	1	1	1
N-acétyl-bêta-glucosaminidase (n° 18)	0	0	0	0	0

RESULTATS

Tant la solution stérile Tween 80 que l'eau stérile utilisée montrent une activité enzymatique de moisissures très limitée.

Le milieu de squames épidermiques et poils de barbe non irradié (« Témoin ») contient un très grand nombre de spores viables, le nombre en début d'expérience étant estimé à moins de 32 000 spores par ml. Après une semaine d'incubation, le substrat nutritif est couvert d'un grand nombre de différentes moisissures des genres *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp. Le nombre de spores est estimé à $7,2 \times 10^6$ par ml. Parallèlement, on observe une augmentation de l'activité enzymatique (tableau I).

Le milieu témoin irradié (« Témoin UV ») ne présente par contre aucune sporulation de moisissure, même après quatre semaines d'incubation. On retrouve tout au plus, un mycelium stérile à peine perceptible à l'œil nu. Le nombre de spores comptées à l'hémocytomètre ainsi que l'activité enzymatique sont peu modifiées (tableau II).

Les échantillons squames épidermiques et poils de barbe irradiés, inoculés avec des spores de moisissures *Aspergillus repens* (Test UV) montrent au temps zéro une quantité de spores de $22,4 \times 10^4$ par ml. Après 36 heures, le nombre de spores est diminué, se chiffrant à 32×10^3 (du fait de la germination). Il s'élève ensuite à nouveau et atteint après quatre semaines jusqu'à cinq fois la quantité initiale. Après deux semaines d'incubation, une sporulation de moisissure apparaît (il s'agit selon toute probabilité d'*Aspergillus repens*). Après quatre semaines d'incubation, la sporulation d'*Aspergillus repens* est nettement visible.

TABLEAU III. — Zymogrammes (en unités) du milieu de résidu de rasage (squames épidermiques/poils de barbe) irradié aux UV-C et inoculé avec des spores de moisissure *Aspergillus repens* (Test UV *) durant une période d'incubation de quatre semaines (25 °C ; > 75 % humidité relative). Après quatre semaines, une sporulation d'*Aspergillus repens* se produit nettement.

Nom de l'enzyme (numéro Apizym)	0 h	Période d'incubation			
		36 h	1 sem.	2 sem.	4 sem.
Phosphatase alcaline (n° 2)	0,63	0	0,25	1,25	3
Phosphatase acide (n° 11)	0	0	3,5	4,25	4,5
Phosphoamidase (n° 12)	0,5	1,25	3,25	4	4,25
Estérase C4 (n° 3)	0,13	0	3,5	2,75	3
Estérase/lipase C8 (n° 4)	0,25	0,25	0	1	1
N-acétyl-bêta-glucosaminidase (n° 18)	0	0	0,25	0,88	0,75

* Corrigé par l'activité enzymatique du témoin (témoin UV) pour exactement cerner l'effet de l'*Aspergillus repens*.

Parallèlement à cette croissance d'*Aspergillus repens*, on observe une nette élévation de l'activité des six enzymes : phosphatases alcaline et acide, phosphoamidase, esterase C4, lipase/estérase C8 et N-acétyl-bêta-glucosaminidase (tableau III).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Par comparaison avec le témoin stérile, l'expérience montre une nette relation entre l'augmentation des six exo-enzymes produites par *Aspergillus repens* et la croissance de cette moisissure. En vue d'obtenir un test enzymatique largement

utilisable pour la détection des moisissures pulvicoles, les zymogrammes d'autres moisissures xerophiles des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et de *Wallemia sebi* doivent être définis. Dans le même contexte devront être testés d'autres substrats, assimilables à la poussière de maison, afin de détecter l'éventuelle influence de la composition et de la qualité du substrat sur la production enzymatique.

Depuis peu, il existe un test semi-quantitatif et indirect de détection de la concentration des allergènes des acariens commercialisé sous le nom d'Acarex R*. Ce test est basé sur la mise en évidence d'un produit d'excrétion des acariens, la guanine. Il a été confirmé que la guanine présente dans la poussière de maison provenait essentiellement des acariens de la poussière de maison [5]. Contrairement à la guanine, les enzymes présentes dans la poussière de maison peuvent provenir d'un grand nombre d'organismes autochtones tels que les bactéries, les acariens et les in-

sectes (Kniest et coll. [9]). C'est pourquoi, il paraît nécessaire d'identifier clairement les enzymes spécifiques des moisissures dans l'optique d'un test de détection précis. Les phosphatases, paraissent ainsi peu adéquates comme premier indicateur d'activité fongique. La combinaison des phosphatases et de la très spécifique N-acetyl-beta-glucosaminidase (chitinase) semble plus appropriée.

Cet ou ces indicateurs devront donc en pratique être spécifiquement mis en relation avec des cas d'asthme induits par les moisissures. Cet indicateur devrait permettre la détermination d'un seuil limite d'exposition. Le test pratique permettant de mesurer l'activité des moisissures allergisantes dans des échantillons de poussière de maison et d'évaluer l'efficacité des mesures anti-allergènes n'est pas encore mis au point, mais une importante étape a été franchie. D'autres travaux concernant ce sujet sont en cours.

Remerciements

Je remercie le Docteur D. de Saint Georges Gridelet pour la traduction du manuscrit.

* Werner and Mertz, Sparte Umweltmedizin, MAINZ (RFA).

REFERENCES

1. Bischoff E., Schirmacher W. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. 1. Mitteilung. *Allergologie*, 1984, 7, 446-447.
2. Bischoff E., Schirmacher W. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. 2. Mitteilung : Weitere Gesichtspunkte. *Allergologie*, 1985, 8, 36-38.
3. Bischoff E., Schirmacher W., Schober G. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. 3. Mitteilung : Anwendung in der Praxis. *Allergologie*, 1985, 8, 97-99.
4. Blackley C. — *Experimental research on the causes and nature of Catarrhus aestivus (hay fever or hay asthma)*. Londres, Bailliere, Tindall and Cox, 1873.
5. Bronswijk J.E.M.H. van. — Guanine as a hygienic index for allergological relevant mite infestation in mattress dust. *Exp. Appl. Acarol.*, 1986, 2, 231-238.
6. Bronswijk J.E.M.H. van, Bischoff E., Schirmacher W., Berrens L., Schober G. — A rapid house-dust allergen test : preliminary results. *J. med. Entomol.*, 1986 a, 23, 217-218.
7. Bronswijk J.E.M.H. van, Rijckaert G., Lustgraaf B., van de. — Indoor fungi, distribution and allergenicity. *Acta bot. neerl.*, 1986 b, 35, 329-345.
8. Kersten W., Hock G.T. — Schimmelpilz Allergie. *Wien Med. Wochenschr.*, 1980, 130, 275-282.
9. Kniest F.M., Bouma C., Schober G. & Bronswijk J.E.M.H. van. — Detection of biotic contamination in mattress dust by determining the quantity of extracellular phosphatase enzymes. *J. med. Entomol.* (submitted).
10. Mallea M., Charpin J. — Moisissures. In : Charpin J., *Allergologie*, 2^e éd. Paris, Flammarion Medecine-Sciences, 1986.
11. Mazar A. — Antibodies to inhalant fungal antigens in patients with asthma in Israel. *Ann. Allergy*, 1981, 47, 361.
12. Prince H.E., Morrow M.B. — Practical approach to mold allergy. *West Virginia Med. J.*, 1962, 58, 129-135.
13. Romanski B., Taraszkiewicz W., Swiderska A. — Asthme aux moisissures. Etude clinique et immunologique. *Rev. fr. Allergol.*, 1968, 8, 51-58.
14. Storm van Leeuwen W. — Bronchial asthma in relation to climate. *Proc. Soc. Med.*, 1924, 17, 19.

■ ■ ■