



Mise en évidence de moisissures des ambiances intérieures par la mesure des $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$

Indoor moulds detection by the measurement of $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$

V. Bex, F. Squinazi

Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, 11, rue George-Eastman 75013, Paris, France

Reçu le 7 janvier 2006 ; accepté le 16 janvier 2006

Résumé

L'intérêt que peut représenter le dosage des glucanes, constituant de la paroi fongique, pour estimer l'exposition aux moisissures des environnements intérieurs est évalué dans cet article. Dans la majorité des études, l'estimation de l'exposition aux moisissures est basée sur la mise en culture des spores. Cette approche qui repose sur la viabilité est limitée car seule une faible proportion des spores fongiques est revivable. De plus, les moisissures mortes sont également responsables d'effets sanitaires puisqu'elles sont encore aptes à libérer des molécules actives tel des allergènes et des glucanes. Le dosage LAL appliqué à la détection des glucanes est une méthode extrêmement sensible et des quantités aussi faibles que quelques picogrammes (quelques dizaines de spores fongiques) peuvent être détectées. Le prélèvement de glucanes dans l'air peut durer plusieurs jours, ce qui permet d'apprécier de façon satisfaisante l'exposition aux moisissures. Par contre, les glucanes ne sont pas spécifiques aux moisissures, ils sont également présents dans d'autres cellules végétales (dont le pollen) et quelques bactéries. La mesure des glucanes dans les environnements intérieurs, en tant qu'indicateur de la biomasse fongique, pour évaluer l'exposition aux moisissures constitue une approche intéressante. Cependant cette méthode est encore utilisée dans un nombre trop réduit d'études pour être validée.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The interest which the measurement of glucans, a constituent of fungal wall, can represent to estimate the exposure to indoor moulds is evaluated in this article. In most studies, the estimate of moulds exposure is based on viability. This approach is limited because only a small proportion of the fungal spores grows in culture. LAL test applied to glucans detection is an extremely significant method and quantities as small as some picograms (a few tens of fungal spores) can be detected. Airborne glucans sampling can be prolonged during several days, which makes it possible to appreciate in a satisfactory way moulds exposure. On the other hand, glucans are not specific to moulds, they are also present in vegetable cells (of which pollen) and some bacteria. The measurement of indoor glucans, as indicator of the fungal biomass, to evaluate moulds exposure constitutes an interesting approach. However this method is still used in a too reduced number of studies to be validated.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Moisissures ; $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$; Symptômes respiratoires ; Humidité ; Ambiances intérieures

Keywords: Allergy; Moulds; $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$; Indoor air sampling; Respiratory symptoms

Adresse e-mail : valerie.bex@paris.fr (V. Bex).

1. Introduction

De nombreuses études réalisées dans différents pays montrent qu'il existe une relation entre la présence d'humidité et de moisissures dans les environnements intérieurs et la prévalence de symptômes : irritations des yeux, du nez, de la gorge, toux sèche, maux de tête, fatigue et problèmes de peaux [1,2]. L'enquête à dimension européenne European Health Community Respiratory survey réalisée en 1991 et 1992 indique que les pays pour lesquels la prévalence de l'asthme est la plus forte, ont un pourcentage plus important de logements humides. De plus, il a été montré que la sensibilisation aux moisissures représente un facteur de risque élevé pour l'asthme sévère chez l'adulte [3,4].

Les bactéries et moisissures présentes dans les environnements humides sont capables de provoquer des effets sur la santé même une fois mortes en libérant des substances qui ont des potentialités inflammatoires : les plus étudiées sont les endotoxines pour les bactéries et les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ pour les moisissures.

Cet article propose une revue de la littérature récente sur les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ et examine l'intérêt de leur dosage pour évaluer l'exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs.

2. Évaluation de l'exposition aux moisissures

Les difficultés liées à l'évaluation de l'exposition aux particules à l'intérieur des locaux sont nombreuses, en particulier pour les moisissures ou leurs constituants [5]. Dans l'air intérieur, une proportion non négligeable de l'exposition fongique résulte des particules sédimentées qui sont remises en suspension par les activités exercées dans le local et par la ventilation. En conséquence, les concentrations en particules dans l'air intérieur sont soumises à d'importantes variations sur des laps de temps assez courts. De ce fait, plutôt que des prélèvements d'air qui sont de courte durée (> 10 min), l'analyse des poussières sédimentées est une méthode de plus en plus utilisée dans les études épidémiologiques en dépit des limitations évidentes pour évaluer l'exposition individuelle [6,7].

L'analyse des moisissures par culture est limitée car elle ne permet de comptabiliser que les spores revivifiables. Cependant, l'identification des espèces fongiques présentes est possible. La mesure de la concentration en ergostérol dans l'air par une analyse de l'échantillon en chromatographie-spectroscopie de masse permet un prélèvement de plusieurs jours et l'obtention d'une bonne image de l'exposition aux moisissures. Une seconde approche globale est la détermination de la concentration des $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ qui, contrairement à l'ergostérol, sont responsables d'effets sur la santé. Enfin, d'autres méthodes sont actuellement en développement (mesure des composés organiques volatiles fongiques, PCR, recherche d'anticorps) mais ne seront pas applicables en pratique avant plusieurs années.

3. Structure des $\beta\text{-1-3-D-glucanes}$

Les glucanes sont présents dans la paroi cellulaire des plantes et du pollen, de certaines bactéries (*Actinomyces*, *Streptomyces*) et de nombreux champignons [1,8]. Ce sont des polymères de glucose connectés par des liaisons α ou β en position $1\rightarrow3$, $1\rightarrow4$ ou $1\rightarrow6$. La structure responsable de l'activité biologique consiste en des sous-unités de glucose connectées par des liaisons $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ dont la majeure source est constituée par la paroi cellulaire des champignons. Dans l'espace périplasmique, les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ linéaires néosynthétisés sont modifiés pour former des enroulements aléatoires (polymère simple), des enroulements aléatoires avec des chaînes latérales, des structures en triple hélices, voire des structures en triple hélices avec des chaînes latérales. La conformation en triple hélices est majoritaire dans les glucanes d'origine fongique. Ces chaînes complexes sont ensuite associées aux autres polymères pariétaux (liaison covalente à la chitine et au galactomanane) pour constituer l'armature rigide de la paroi fongique. Les glucanes représentent 60 % du poids sec de la paroi des moisissures. Des expériences d'induction d'une inflammation pulmonaire par des molécules de glucanes chez des rongeurs, suggèrent que la conformation en triple hélices partiellement ouverte est la plus active [9]. Les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ provenant des moisissures communément isolées dans les environnements intérieurs ont un poids moléculaire compris entre 180 et 190 kDa, ce qui correspond aussi au poids moléculaire ayant l'effet toxique le plus marqué [10].

Les conditions de croissance des moisissures ne semblent pas modifier la concentration en glucanes des spores. La quantité de glucanes dépend essentiellement de la taille des spores.

Il a été montré que le récepteur des $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$, dectin-1, est exprimé à la surface des monocytes-macrophages et des neutrophiles [11].

4. Mesure de l'exposition aux $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$

4.1. Échantillonnage

Les prélèvements d'air sont réalisés sur des filtres en polycarbonate 0,8 μm ou sur des membranes en fibre de verre à un débit nominal compris entre 2 et 5 l/min pendant une durée variable (30 min à sept jours) selon les auteurs [1,10,12,13]. Lors du prélèvement, certains auteurs créent une perturbation de l'air pour remettre en suspension les poussières sédimentées et reproduire artificiellement une activité pratiquée dans le local étudié [1,12].

4.2. Analyse

La méthode de dosage généralement utilisée est le LAL (lysat d'améboocyte de limule). Elle est fondée sur la réactivité des améboocytes de limule, crabe en fer à cheval, avec les endotoxines bactériennes et les molécules de $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucane}$. Les facteurs mis en œuvre dans la cascade enzymatique qui

aboutissent à la libération de coagulogène sont les facteurs C et B pour les endotoxines, et le facteur G pour les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes. Les molécules de glucanes contenant à la fois des liaisons $(1\rightarrow3)$ et $(1\rightarrow4)$ sont également capables d'activer le facteur G. Les formes linéaires de glucanes sont plus actives sur le facteur G que les formes branchées ou adoptant une conformation en triple hélices. Un test spécifique pour la détection des glucanes existe, dans ce cas, le mélange réactionnel ne comporte que le facteur G. Le test LAL classique, contenant les trois facteurs, peut également être utilisé pour le dosage des glucanes (LAL modifié) mais les échantillons sont alors préalablement traités à la soude afin de détruire les endotoxines et augmenter la réponse du facteur G [10]. Dans les échantillons complexes, le traitement à soude ne détruirait pas toutes les endotoxines, conduisant à des résultats faussement positifs [14]. Une gamme étalon de curdlan, $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes d'*Alcaligenes faecalis*, est effectuée et les résultats sont exprimés en ng/m^3 d'air ou ng/g de poussières en équivalent curdlan. La sensibilité du LAL en cinétique chromogénique est de l'ordre de 20 pg/ml (soit une trentaine de spores fongiques intactes) et la reproductibilité exprimée en coefficient de variation est inférieure à 10 % [10,15].

Des méthodes alternatives pour l'analyse des glucanes fongiques utilisent une détection par des anticorps spécifiques [16–18]. La première technique est fondée sur l'inhibition du dosage EIA (enzyme immunoassay). Les anticorps spécifiques ont été purifiés après immunisation de lapins avec de la sérum albumine bovine conjuguée à un $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes d'algue marine, la laminarine. La sensibilité de cette technique est de l'ordre de 40 ng/ml et la reproductibilité exprimée en coefficient de variation est de l'ordre de 25 % [17–19]. Une seconde méthode utilise la technique Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*) et les anticorps utilisés sont spécifiques des liaisons $(1\rightarrow6)$ et $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes. La limite de détection est de l'ordre de 1 ng/ml [10]. Pour la détection de glucanes dans l'air, les techniques immunologiques sont rarement utilisées car elles ne sont pas assez sensibles. Elles sont plutôt mises en œuvre pour l'analyse de la poussière. Ces méthodes sont beaucoup moins coûteuses que les tests LAL, mais ne sont pas commercialisées actuellement.

Enfin, dans de rares travaux, l'analyse des glucanes est réalisée par chromatographie d'exclusion de taille couplée à une détection UV, ce qui permet de déterminer l'origine des glucanes.

5. Données d'exposition aux $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes

Peu de données sont disponibles sur les niveaux de $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes présents dans l'air et les poussières des environnements intérieurs. De plus, aucune comparaison des différentes méthodes d'élution et de dosage des glucanes à partir des mêmes échantillons n'ayant été réalisée, il est délicat de comparer les résultats obtenus. Une vingtaine d'études épidémiologiques et quelques études de cas ont été publiées essentiellement par l'équipe de R. Rylander en Suède, de RE Dales au Canada et de J. Douwes en Nouvelle-Zélande [10–14]. Dans

les environnements intérieurs non professionnels (habitats, écoles, bureaux...) les concentrations en glucanes mesurées évoluent entre 0,1 et 20 ng/m^3 avec la méthode LAL [20,21]. Les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans les environnements humides [22]. Dans les environnements professionnels, des teneurs importantes sont mesurées dans l'industrie du déchet avec des concentrations de l'ordre de 50 ng/m^3 pour la méthode LAL et des concentrations comprises entre 0,36 et 4,85 $\mu\text{g/m}^3$ pour l'Elisa. Des valeurs importantes de l'ordre de 100 ng/m^3 (test LAL) ont également été mises en évidence dans l'industrie du papier et dans les fermes : 0,82 $\mu\text{g/m}^3$ (méthode Elisa) [14].

6. Effets sanitaires des $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes

6.1. Effets sur des populations exposées

Les études épidémiologiques suggèrent une association entre l'exposition aux $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes et un large éventail d'effets sur la santé : irritation des voies aériennes supérieures, augmentation du risque d'atopie mais aussi et paradoxalement augmentation de la réponse immunitaire de type TH1 chez des sujets non atopiques, sensibilité et altération de la fonction pulmonaire plus importante chez les sujets atopiques que chez les non atopiques, fatigue [14]. Cependant, les résultats sont parfois contradictoires, les échantillons sont petits, les associations significatives sont rares et parfois les facteurs de confusion liés à d'autres bioaérosols (endotoxines, allergènes) pouvant causer le même type de symptômes ne sont pas ajustés.

6.2. Études d'exposition sur volontaires sains

Un effet pro-inflammatoire est démontré pour des doses très élevées de $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes sur le sang total. In vivo, en revanche, cet effet est peu marqué voire absent [23]. Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car les essais sont peu nombreux et toujours réalisés avec les mêmes molécules de glucanes (curdlan ou grifolan) qui ne sont pas nécessairement les plus actives.

6.3. Modèles animaux

Les expériences menées sur les modèles animaux suggèrent que les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes ont la capacité à forte concentration [1] d'induire une réponse via les éosinophiles et également via les neutrophiles avec pour conséquence une sécrétion de cytokines inflammatoires [2,23], de modifier l'inflammation provoquée par les endotoxines [3] et de modifier la réponse immunitaire IgE dépendante [1,14]. Cependant, les effets décrits sont parfois contradictoires, probablement à cause de l'utilisation de protocoles différents et de la nature des glucanes utilisés (origine, solubilité...). Il existe un consensus sur le fait que les $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanes d'origine distincte doivent avoir des effets biologiques différents.

7. Conclusions

L'intérêt que représente le dosage des glucanes d'origine fongique pour évaluer quantitativement l'exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs repose sur différents arguments :

- une estimation de l'exposition fondée uniquement sur la viabilité des moisissures n'est pas appropriée, car certains symptômes sont provoqués par des spores mortes ou leurs fragments. En revanche, la recherche d'indicateurs globaux de la biomasse fongique tels que l'ergostérol ou les glucanes, semble plus adaptée. L'étude réalisée dans 110 maisons canadiennes par Foto en 2005 [24], montre une corrélation importante entre les concentrations de glucanes et d'ergostérol mesurées et la présence de moisissures visibles. La corrélation est plus forte pour l'ergostérol ($r^2 = 0,873$, $p = 0,000$) que pour les glucanes ($r^2 = 0,758$, $p = 0,000$). Les deux méthodes sont de sensibilité et de reproductibilité équivalentes ;
- le dosage LAL appliqué à la détection des glucanes est une méthode extrêmement sensible et des quantités aussi faibles que quelques picogrammes peuvent être détectées ;
- les résultats obtenus en chromatographie d'exclusion de taille montrent que la majorité des glucanes aéroportés qui sont dosés dans les habitats sont d'origine fongique. Des glucanes de levures et de pollen sont présents dans seulement 3 à 4 % des échantillons prélevés en hiver [10] ;
- le prélèvement de glucanes dans l'air peut durer plusieurs jours, ce qui permet d'apprécier de façon satisfaisante l'exposition aux moisissures.

Ainsi, la mesure des glucanes dans les environnements intérieurs, en temps qu'indicateur de la biomasse fongique, pour évaluer l'exposition aux moisissures constitue une approche intéressante. C'est une méthode sensible et relativement spécifique en hiver. Cependant un nombre encore trop réduit d'études sont réalisées à ce jour pour évaluer correctement cette approche.

Les données actuellement disponibles suggèrent une association entre une exposition aux $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucanes}$ et une inflammation des voies respiratoires. Cependant, les résultats sont souvent discordants d'une étude à l'autre et les symptômes associés à l'exposition aux glucanes, ainsi que les mécanismes inflammatoires sous-jacents ne sont pas encore identifiés. Des études épidémiologiques de plus grande ampleur ainsi qu'une méthode standardisée pour l'évaluation de l'exposition aux glucanes sont nécessaires pour éclairer la relation qui existe entre l'exposition aux glucanes et la santé.

Références

[1] Thorn J, Rylander R. Airways inflammation and Glucan in a Rowhouse Area. *Am J Respir Care Med* 1998;157:1798–803.
 [2] Rylander R, Lin RH. $(1,3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ – relationship to indoor air-related symptoms allergy and asthma. *Toxicology* 2000;152:47–52.

[3] Zock JP, Jarvis D, Luczynska C, Sunyer J, Burney P. European Community respiratory Health Survey: Housing characteristics, reported mold exposure, and asthma in the European Community respiratory Health Survey. *J All Clin Immunol* 2002;110:285–92.
 [4] Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. European community respiratory health survey. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European community respiratory health survey. *BMJ* 2002;325(411):14.
 [5] Pasanen AL. A review: fungal exposure assessment in indoor environments. *Indoor Air* 2001;11:87–98.
 [6] Douwes J, van der Sluis D, Doekes G, Van Leusden F, Wijnands L, van Strien R, et al. Fungal extra cellular polysaccharide in house dust as a marker for exposure to fungi: relations with culturable fungi, reported home dampness and respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:494–500.
 [7] Heederik D, Dowes J, Wouters I, Doekes G. Organic dusts: beyond endotoxins. *Inhal Toxicol* 2000;12:27–33.
 [8] Williams DL. $(1\text{--}3)\text{-}\beta\text{-D-Glucans}$. Organic dusts. In: Rylander R, Jacobs RR, editors. *Exposure, effects and prevention*. Lewis Publishers; 1994. p. 83–8.
 [9] Young SH, Robinson VA, Barger M, Frazer DG, Castranova V, Jacobs RR. Partially opened triple helix is the biologically active conformation of $[1\text{--}3]\text{-}\beta\text{-D-Glucans}$ that induces pulmonary inflammation in rats. *J Toxicol Environ Health* 2003;66:551–63.
 [10] Foto M, Plett J, Berghout J, Miller DJ. Modification of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Anal Bioanal Chem* 2004;379:156–62.
 [11] McGinnis MR. Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Med Mycol* 2004;42(2):107–17.
 [12] Rylander R. Indoor air-related effects and airborne $[1\text{--}3]\text{-}\beta\text{-D-glucan}$. *Environ Health Perspect* 1999;107(3):501–3.
 [13] Heldal KK, Halstensen AS, Thorn J, Eduard W, Halstensen TS. Airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosol assessed by induced sputum. *Eur Respir J* 2003;21:641–55.
 [14] Douwes J. $(1\text{--}3)\text{-}\beta\text{-D-glucans}$ and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* 2005;15(3):160–9.
 [15] Beijer L, Thorn J, Rylander R. Effect after inhalation of $[1\text{--}3]\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ and relation to mould exposure in the home. *Mediat Inflamm* 2002;11:149–53.
 [16] Douwes J, Wouters I, Dubbeld H, Van Zwieten L, Steerenberg P, Doekes G, et al. Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: a relation with bio-aerosol exposure. *Am J Ind Med* 2000;37(5):459–68.
 [17] Chew GL, Douwes J, Doekes G, Higgins KM, van Strien R, Spithoven J, et al. Fungal extracellular polysaccharides, beta $[1\text{--}3]$ glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* 2001;11:171–8.
 [18] Gehring U, Douwes J, Doekes G, Koch A, Bischof W, Fahlbush B, et al. *Environ Health Perspect* 2001;109:139–44.
 [19] Douwes J, Doekes G, Heinrich J, Koch A, Bischof W, Brunekreef B. Endotoxin and Beta $[1\text{--}3]$ glucan in house dust and relation with home characteristics: a pilot study in 25 German houses. *Indoor Air* 1998;8:255–63.
 [20] Rylander R, Persson K, Goto H, Yuasa H, Tanaka S. Airborne beta-1,3 glucan may be related to symptoms in sick buildings. *Indoor Environ* 1992;1:263–7.
 [21] Rylander R, Norrhall M, Engdahl U, Tunsater A, Holt PG. Airways inflammation, atopy, and $[1\text{--}3]\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ exposures in two schools. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1685–7.
 [22] Rylander R. Airborne $[1\text{--}3]\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ and airway disease in a day-care center before and after renovation. *Arch Environ Health* 1997;52:281–5.
 [23] Beijer L, Rylander R. $(1\text{--}3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ does not induce acute inflammation after nasal deposition. *Mediators Inflamm* 2005;1:50–2.
 [24] Foto M, Vrijmoed LL, Miller JD, Ruest K, Lawton M, Dales RE. A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters. *Indoor Air* 2005;15(4):257–66.