

Université de Bourgogne Franche-Comté

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques

Ecole Doctorale « Environnement, Santé »

Année 2015

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 décembre 2015

Par

Alexandre NAEGELE

**Impact des acariens et des micro-organismes de l'habitat dans le
développement de l'asthme et de la Broncho-Pneumopathie
Chronique Obstructive (BPCO).**

Directeur de thèse : Dr Gabriel REBOUX

Co-directeur : Dr Sandrine ROUSSEL

UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement

Jury

Pr Marie MACHOUART

Rapporteur

Pr Christophe PARIS

Rapporteur

Dr Isabelle THAON

Examineur

Pr Laurence MILLON

Examineur

Dr Sandrine ROUSSEL

Co-directeur de thèse

Dr Gabriel REBOUX

Directeur de thèse

Remerciements

Pour commencer ce mémoire, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, Gabriel Reboux, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci pour cet encadrement de tous les jours, de ce soutien y compris dans les moments les moins agréables où les remarques sans « pincettes » permettaient une remise en question quotidienne. Grâce à lui, je pense être aujourd'hui être un tout autre chercheur.

Je remercie également profondément Sandrine Roussel, co-directrice de ce travail, pour ses nombreux conseils, sa confiance et sa gentillesse.

Je suis très reconnaissant envers Laurence Millon, responsable du service de Parasitologie-Mycologie, de m'avoir accueilli et soutenu depuis les prémices de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Marie Machouart, Christophe Paris et Isabelle Thaon d'avoir bien voulu me donner de leur temps pour faire partie de ce jury et juger mon travail. J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de mon comité de thèse Françoise Botterel et Philippe Bonniaud pour leur disponibilité et leurs précieux conseils tout au long de cette expérience.

Je tiens à remercier Habiba Hamari du Réseau d'Allergologie de Franche-Comté, Martine Bochaton et Laure Blanchon de la Mutualité de Bourgogne pour leur contribution dans le recrutement des patients allergiques et les prélèvements réalisés à leurs domiciles ainsi que Claire Labartette d'ATMO Franche-Comté pour le recrutement de logements contrôlés et pour la distribution des capteurs de poussières.

Je remercie également le service de Parasitologie-Mycologie et Emeline pour sa bonne humeur, son élevage d'acariens et la réception des blattes, Pauline pour son aide dans le projet Balistic et sa compagnie au congrès MicrobAERO, Florent pour cet éternel débat sur la possibilité de prélever les acariens au micro-manipulateur, Fred pour ses conseils avisés et aux personnes de la laverie pour les milliers de milieux de culture produits pour la réussite des différentes études.

Un grand merci à tous les collègues de la fac et en particulier à Mallo, que je considère comme la troisième encadrante « technique », pour ses nombreux conseils, son aide précieuse,

les nombreux rires échangés et surtout son soutien inconditionnel dans les moments difficiles. Avec elle, j'ai toujours pu « manipuler » avec quatre mains. Merci à Monsieur 2.0 alias Benoit pour son aide indispensable dans l'analyse des résultats et les nombreuses discussions sur la logique statistique qui me dépasse trop souvent, à Steffi pour son exemple de travail et sa capacité à se sortir de cette thèse « fourre-tout » dont je me suis largement inspirée, à Coralie pour ses nombreux conseils en immuno et sa sympathie, à Audrey pour son aide et ses cours de test ELISA, à Adeline pour les nombreuses discussions sur le pourquoi de la thèse, à Jenny pour la touche verte et nature du labo et à Béné que j'ai quelques fois sollicitée.

Merci également aux collègues de bactério Cédric, Sophie, Charlotte, Aurélie, Paulo, Anne-Sophie, Meryem, Arnaud, Catherine, Kathy et Patrick pour les nombreux surnoms qu'ils m'ont prêtés et les bons moments passés autour des repas durant toutes ces années.

Je remercie vivement Jean-Charles Dalphin, Nelly, Lucie et Matthieu du service de Pneumologie pour le recrutement, la distribution des capteurs et les prises de sang dans la détermination de l'exposition et de la sensibilisation des patients de l'étude Balistic.

Mes remerciements vont également à Daniel Gilbert, directeur de Chrono-Environnement, pour son accueil dans sa structure et aux informaticiens Charles-Henri et JD pour leur disponibilité et leur réactivité.

J'associe à ces remerciements tous mes camarades de thèse du team FJC 2014 : Laura, Aurore, Clémence, Sandrine, Adam, Geoffrey pour les nombreuses réunions d'organisation et les moments d'amitié que nous avons partagés.

Mes derniers remerciements iront à ma famille et à mes amis. Je tiens à remercier ma maman et Denis toujours présents malgré mes sautes d'humeur de thésard et relecteurs avisés de ce manuscrit, mon père, Delphine et ma sœur Clara pour leur soutien et les nombreuses discussions scientifiques, ma sœur Nadège et mon beau-frère Anthony de m'avoir contaminé par le virus de la bio et compris durant ces années de thèse. Merci à mes amis, pour leur écoute et leurs encouragements même si certains me parlent toujours du stress des plantes (enfin surtout un...). Et enfin un grand merci à ma pitchoune Amandine pour sa présence de tous les jours, la motivation qu'elle m'a transmise et son soutien dans cette aventure.

Liste des abréviations

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

Ac : Anticorps

ACARI : Acariens et allergies en environnement intérieur

Ag : Antigène

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ARN : Acide ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe (*Area under the curve*)

Aw : Activité de l'eau (*Activity of water*)

BALISTIC : BPCO en milieu rural : dépistage, caractérisation et constitution d'une cohorte

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

CEI : Conseiller en Environnement Intérieur

CEP : Capteur Electrostatique de Poussières

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

COV : Composés Organiques Volatils

COVm : Composés Organiques Volatils d'origine microbienne

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

Ct : Cycle seuil (*Cycle threshold*)

CV : Capacité Vitale

CVF : Capacité Vitale Forcée

DD : Double Diffusion sur gel d'agarose

DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

DEP : Débit Expiratoire de Pointe

DG18 : Dichloran Glycérol 18%

DO : Densité Optique

EFR : Exploration Fonctionnelle Respiratoire

ELFE : Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance

ELISA : Méthode immuno-enzymatique par dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPA : Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (*United States Environmental Protection Agency, US EPA*)

ERMI : Indice de contamination fongique environnementale (*Environmental Relative Moldiness Index*)

ES : Electrosynérèse sur acétate de cellulose

GA²LEN : Réseau européen de lutte contre l'asthme et les allergies (*Global Allergy and Asthma European Network*)

GINA : Programme visant à diminuer la prévalence, la morbidité et la mortalité liées à l'Asthme (*Global Initiative of Asthma*)

GOLD : Programme qui regroupe des personnels de soins de santé et les pouvoirs public dans le but de faire connaître la BPCO et améliorer la prévention et les traitements des patients à travers le monde (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*)

HAS : Haute Autorité de Santé

HQE : Haute Qualité Environnementale

HR : Humidité Relative

ICODE : Impact du Compostage Domestique sur L'Environnement intérieur

IFI : Infection Fongique Invasive

Ig (A, E, G, M) : Immunoglobuline de type A, E, G ou M

LLN : Limite Inférieure de la Normale

LPS : Lipopolysaccharide

MALDI-TOF : Spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (*Time-Of-Flight mass spectrometry*).

NGS : séquençage de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OQAI : Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

PDF : Poumon De Fermier

pH : Potentiel Hydrogène

PHS : Pneumopathie d'Hypersensibilité

qPCR : PCR quantitative

ROC : courbe caractéristique de fonctionnement du récepteur (*Receiver operating characteristics*)

SBS : Syndrome du Bâtiment Malsain (*Sick Building Syndrome*)

SHS : Service d'Hygiène et de Santé

SRU : loi sur la Solidarité et le Renouvellement Urbain

SYBERT : Syndicat mixte de Besançon et de sa Région pour le Traitement des déchets

UFC : Unité Formant Colonie

UISI : Unité du Système Internationale

VEMS : Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde

VMC : Ventilation Mécanique Contrôlée

Liste des illustrations

Figure 1 : Schéma des différentes études et intégration dans le travail de thèse.	30
Figure 2 : Acariens domestiques observés au microscope (x100) (photographies Alexandre Naegele).	33
Figure 3 : Classification zoologique des acariens (Jeong et al., 2012).	34
Figure 4 : Deux fèces d'acariens en microscopie électronique d'un diamètre compris entre 10 et 40 μ M. échelle, 10 μ M. (Tovey et al., 1981).	37
Figure 5 : Phylogénie et classification des moisissures (Hibbett et al. 2007).	42
Figure 6 : Cycle de vie des moisissures, exemple de <i>Penicillium chrysogenum</i> (cycle asexué) (d'après Dantigny et al., 2005).	44
Figure 7 : Moisissures observées sur milieu DG18 (a gauche) et au microscope (x400) (à droite) (photographies Steffi Rocchi).	46
Figure 8 : Actinomycète thermophile (<i>Saccharomonospora glauca</i>) cultivé sur milieu R8 (photographie Caroline Jamet).	50
Figure 9 : Modèle conceptuel de la relation entre les acariens domestiques et les moisissures (Colloff, 2010).	51
Figure 10 : Evolution de la prévalence de l'asthme dans le monde ces dernières décennies (Eder et al., 2006).	54
Figure 11 : Capteur électrostatique de poussière (EDC).	72
Figure 12 : Spectre MALDI-TOF.	77
Figure 13 : Exemple d'une bande d'électrosynérèse sur acétate de cellulose. S1, S2, S3 correspondent aux trois sérums de patients testés vis-à-vis d'un antigène donné.	80
Figure 14 : Principe de la technique ELISA indirect.	81
Figure 15 : Principe de la technique ELISA sandwich.	82
Figure 16 : Corrélations significatives entre les concentrations en <i>D. pteronyssinus</i> et les concentrations en <i>A. alternata</i> et <i>C. sphaerospermum</i> . Concentrations en acariens et en moisissures exprimées en log équivalents ADN. ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.	149
Figure 17 : Corrélations significatives entre les concentrations en <i>D. farinae</i> et les concentrations en <i>S. chartarum</i> . Concentrations en acariens et en moisissures exprimées en log équivalents ADN. ** : $p < 0,01$.	150
Figure 18 : Corrélations significatives entre les concentrations en acariens de stockage et les concentrations en <i>A. glaucus</i> , <i>A. versicolor</i> , en <i>C. sphaerospermum</i> et en <i>W. sebi</i> .	

Concentrations en acariens et en moisissures exprimées en log équivalents ADN. *** : $p < 0,005$; ** : $p < 0,01$. _____ 151

Figure 19 : Corrélations significatives entre les concentrations en acariens de stockage et les concentrations en *A. versicolor*, en *C. sphaerospermum* et en *W. sebi*. Concentrations en acariens et en moisissures exprimées en log équivalents ADN. *** : $p < 0,005$; * : $p < 0,05$. _____ 152

Figure 20 : Principales recommandations pour la conception et la construction de bâtiments afin de prévenir les problèmes d'humidité (D'après OMS, 2009). _____ 195

Valorisation scientifique

Publications à comité de relecture

- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Emeline SCHERER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *International Journal of Environmental Health Research* 2013; 23: 91-95. doi:10.1080/09603123.2012.699029.
- Sandrine ROUSSEL, Gabriel REBOUX, **Alexandre NAEGELE**, Jorge MARTINEZ, Mallory VACHEYROU, Emeline SCHERER, Laurence MILLON. Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR. *Environment International* 2013; 55: 20-24. doi:10.1016/j.envint.2013.02.002.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Indoor composting and microbiological consequences. *Indoor air*. In press. doi:10.1111/ina.12242.
- **Alexandre NAEGELE**, Sandrine ROUSSEL, Gabriel REBOUX. L'acarien transporteur d'allergènes. *Revue Française d'Allergologie*. In press. doi.org/10.1016/j.reval.2015.07.005.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Benoit VALOT, Emeline SCHERER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Quantifying domestic mites in dwellings with quantitative PCR: are storage mite concentrations underestimated compared to house dust mite concentrations? *Science of the Total Environment*. Soumis le 8 Décembre 2015.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Matthieu VEIL-PICARD, Martial BOTEBOL, Jean-Jacques. LAPLANTE, Isabella ANNESI-MAESANO, Nicolas ROCHE, Bruno DEGANNO, Anne-Pauline BELLANGER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON, Jean-Charles DALPHIN. Role of chronic microbial exposure on COPD development in dairy farmers (nested study from the BALISTIC cohort). *Journal of Medical Microbiology*. En révision.
- Emeline SCHERER, Benoit VALOT, Mallory VACHEYROU, **Alexandre NAEGELE**, Jenny KNAPP, Steffi ROCCHI, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON, Gabriel REBOUX. Quantification of pets and cockroaches in homes using qPCR: a new tool to evaluate exposure and risk of allergies. *International Journal of Environmental Health Research*. En révision.

Publications sans comité de relecture

- **Alexandre NAEGELE**, Steffi ROCCHI. Plaquette de prévention sur l'impact du compostage domestique sur l'environnement intérieur distribuée par l'ADEME, 2014.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX. Moisissures et acariens. *Allergies et habitat*, Chiesi N°2 Avril 2013, p 10.

- Sandrine ROUSSEL, **Alexandre NAEGELE**. Impact des composteurs domestiques sur l'environnement intérieur. Risques sanitaires liés à la pollution des milieux aériens et hydriques, Les cahiers de la Recherche Avril 2013, pp14-15.
- Sandrine ROUSSEL, **Alexandre NAEGELE**. Impact des composteurs domestiques sur l'environnement intérieur. Potentiel de l'ADEME N°100 Décembre-Janvier-Février 2014, p 3.
- Sandrine ROUSSEL, **Alexandre NAEGELE**. Méli-mélo d'épluchures inoffensif. En direct N°251 Janvier-Février 2014, pp 4-5.
- **Alexandre NAEGELE**, Sandrine ROUSSEL. Bio déchets et air intérieur ? GreenNews Techno N°121 Janvier 2014, p 6.

Communications scientifiques

- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Emeline SCHERER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Interactions acariens / moisissures intérieures, Journées d'Allergologie Max Bourgeois, 6 avril 2012, Besançon.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Emeline SCHERER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Interactions acariens/moisissures intérieures, Congrès De La Société Française De Mycologie Médicale, 24 Novembre 2012, Paris.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Impact des micro-organismes de l'habitat dans le développement de l'asthme et de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) et évaluation des risques induits par les changements de mode de vie domestique, Séminaires des Doctorants, 14 Décembre 2012, Besançon.
- **Alexandre NAEGELE**, Sandrine ROUSSEL, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Emeline SCHERER, Laurence MILLON. Développement et validation d'une méthode de PCR en temps réel pour la quantification des acariens dans l'environnement, Congrès De La Société Française De Parasitologie, 15 Mai 2013, Dijon.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Influence des composteurs domestiques sur la flore microbiologique de l'environnement domestique, Congrès MicrobAERO2013, 7 Octobre 2013, Clermont-Ferrand-La bourboule.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Compostage et flore microbiologique : quelles conséquences pour l'environnement domestique ? Colloque Environnement Des Maladies Allergiques, 14 Novembre 2013, Besançon.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Mode de vie et flore fongique : Etude du compostage domestique (poster), Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, 29 Novembre 2013, Paris.

- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Emeline SCHERER, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. House dust mites sampling and quantification in dwellings, First Emerging Topics meeting, DNA watch, 4-5 December 2013. Frasné.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Mallory VACHEYROU, Benoit VALOT, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Mode de vie et flore fongique : cas du compostage domestique, Congrès De La Société Française De Mycologie Médicale, 29 Novembre 2013, Paris.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Impact des micro-organismes de l'habitat dans le développement de l'asthme allergique, Congrès de la Société de Biologie de Besançon, 10 Décembre 2014, Besançon.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Jean-Charles DALPHIN, Sandrine ROUSSEL, Laurence MILLON. Impact des micro-organismes de l'habitat dans le développement des maladies respiratoires : cas de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), Séminaire des Doctorants, 12 Décembre 2014, Besançon.
- **Alexandre NAEGELE**, Gabriel REBOUX, Laurence MILLON, Sandrine ROUSSEL. Bio-seau de compostage et qualité biologique de l'air intérieur : état des lieux après un an de surveillance, Rencontres Scientifiques de l'ANSES, 19 Mai 2015, Paris.

Table des matières

INTRODUCTION	19
I. Contexte	21
II. Chiffres, législation et sources de pollution de l'air intérieur	22
III. Problématique et objectifs	25
1. Problématique	25
1) Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'air intérieur et risque allergique	25
2) Influence des interactions acariens/moisissures sur l'exposition aux allergènes	27
3) Influence du mode de vie sur la pollution biologique de l'air intérieur	28
2. Objectifs et intégration des études	29
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	31
I. Les acteurs de la pollution biologique de l'air intérieur	33
1. Les acariens	33
1) Classification et cycle de vie des acariens	34
2) Ecologie des acariens en environnement intérieur et influence des facteurs environnementaux	35
3) Les composantes responsables d'effets cliniques : les allergènes	36
4) Les effets sur la santé associés aux acariens	39
2. Les champignons	41
1) Classification et cycle de vie des champignons	41
2) Ecologie des moisissures en environnement intérieur	44
3) Les composantes responsables d'effets cliniques et leurs effets sur la santé	47
3. Les bactéries	49
4. Interactions acariens/moisissures	50
1) Lieux de vie et conditions communs	52
2) Aspect nutritionnel : sélection des moisissures et influence sur la vie des acariens	52
3) Transports et dégradation des spores	53
II. Les problèmes de santé publique liés aux acariens et aux micro-organismes	54
1. L'asthme	54
1) Définitions	55
2) Symptômes	55
3) Diagnostic	56
4) Traitements	57
5) Mécanismes immunitaires	57
2. L'allergie	58
1) Définition	58
2) Symptômes	59
3) Diagnostic	59
4) Traitements	60
5) Mécanismes immunitaires	61
3. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive	61

1) Définition _____	61
2) Diagnostic _____	62
3) Traitements _____	63
4) Mécanismes _____	64
5) Facteurs de risque _____	65
4. L'hypothèse hygiéniste et les effets controversés des acariens et des micro-organismes _____	66
1) Le concept de l'hypothèse hygiéniste _____	66
2) Eléments en faveur de l'hypothèse hygiéniste _____	67
3) Eléments limitants de l'hypothèse hygiéniste _____	67
4) Les autres effets controversés _____	68
III. La mesure de l'exposition en acariens et en micro-organismes en environnement intérieur _____	69
1. Les méthodes de prélèvements _____	69
1) Les prélèvements d'air _____	69
2) Les prélèvements de surface _____	71
3) Les prélèvements de poussières _____	71
2. Méthodes d'analyse _____	72
1) Le comptage microscopique _____	72
2) Le dosage colorimétrique _____	73
3) La culture _____	74
4) La PCR et la qPCR _____	74
5) La spectrométrie de masse _____	76
6) La métagénomique _____	77
IV. Mesure de la sensibilisation aux acariens et aux micro-organismes _____	79
1) Les tests à lecture immédiate _____	79
2) Les tests d'immuno-précipitations _____	80
3) Les tests immuno-enzymatiques _____	80
CHAPITRE 1 _____	83
Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'environnement intérieur et risque allergique _____	83
I. Détection et quantification des acariens dans la poussière domestique : une nouvelle application pour la qPCR _____	85
1. Contexte _____	85
2. Présentation de l'étude _____	86
1) Objectifs _____	86
2) Mise au point des qPCR _____	86
3) Application _____	86
3. Principaux résultats _____	86
4. Article Environment International 2013 _____	87

II. Quantification des acariens domestiques dans les logements de patients allergiques par qPCR	93
1. Contexte	93
2. Présentation de l'étude	94
1) Objectifs	94
2) Mise au point des qPCR	94
3) Application	94
3. Principaux résultats	94
4. Article Insect Science soumis le 8 septembre 2015	95
III. Mesure de l'exposition aux animaux domestiques et aux blattes dans les logements par qPCR et évaluation globale du risque allergique	109
1. Contexte	109
2. Présentation de l'étude	110
1) Objectifs	110
2) Mise au point des qPCR	110
3) Application	110
3. Principaux résultats	110
4. Article International Journal of Environmental Health Research soumis le 10 octobre 2015	111
IV. Conclusion	125
CHAPITRE 2	127
Influence des interactions acariens/moisissures sur l'exposition aux allergènes	127
I. Préférences alimentaires des acariens <i>Dermatophagoides farinae</i> : sélection et dispersion des moisissures	129
1. Contexte	129
2. Présentation de l'étude	130
1) Objectifs	130
2) Mise au point des dispositifs <i>in vitro</i>	130
3) Application	130
3. Principaux résultats	130
4. Article International Journal of Environmental Health Research 2013	131
II. Dispersion des allergènes par les acariens	139
1. Contexte	139
2. Présentation de l'étude	139
3. Principaux résultats	140
4. Article Revue française d'allergologie 2015	140

III. Corrélation acariens/moisissures dans les logements	147
1. Contexte	147
2. Matériel et méthodes	147
1) Recrutement	147
2) Prélèvements	148
3) Analyses	148
3. Résultats	149
1) Corrélation entre acariens et moisissures dans les logements de l'étude ACARI	149
2) Corrélation entre acariens et moisissures dans les logements de l'étude ICODE	151
IV. Conclusion	153
CHAPITRE 3	155
<i>Influence du mode de vie sur la pollution biologique de l'air intérieur et risque inflammatoire</i>	155
I. Impact des micro-organismes de l'habitat sur le développement de la BPCO chez les éleveurs laitiers	157
1. Contexte	157
2. Présentation de l'étude	158
1) Objectifs	158
2) Recrutement	158
3) Prélèvements	159
4) Analyses	159
3. Principaux résultats	159
4. Article Journal of Medical Microbiology soumis le 15 octobre 2015	160
II. Impact du compostage domestique sur l'environnement intérieur	171
1. Contexte	171
2. Présentation de l'étude	171
1) Objectifs	171
2) Recrutement	171
3) Prélèvements	172
4) Analyses	172
3. Principaux résultats	172
4. Article Indoor Air 2015	173
III. Conclusion	185
DISCUSSION GENERALE	187
I. Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'environnement intérieur	189
II. Pollution biologique de l'air intérieur et risques sanitaires	192
III. Mode de vie et pollution de l'air intérieur	196

<i>IV. Conclusion et Perspectives</i>	198
ANNEXES	201
REFERENCES	215

INTRODUCTION

I. Contexte

L'environnement intérieur retient de plus en plus notre attention du fait que nous passons de 80 à 90 % de notre temps à l'intérieur (Woodcock and Custovic, 1998; Yooseph et al., 2013) et plus particulièrement dans nos logements. En effet, d'après l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) (2011), les Français passent en moyenne 16 heures par jour dans leur logement. Depuis la crise énergétique et pétrolière des années 70, l'environnement intérieur est affecté par l'augmentation des coûts de l'énergie. Il y a alors une demande d'amélioration de l'isolation des bâtiments et une diminution de l'aération dans le but de limiter les pertes de chaleur. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO, 2010), un tel confinement nous mène à une dégradation de la qualité de l'air intérieur avec l'apparition d'un grand nombre de polluants et le développement des acariens et des micro-organismes.

Dans le même temps, et suite aux conséquences financières, des technologies et des matériaux de construction se développent pour permettre des constructions rapides et économiques. Cependant, ces nouveautés participent également à l'émission de nombreux polluants nouveaux dans l'air intérieur (WHO, 2010). De plus, l'évolution de certaines pratiques domestiques liées à la réduction de nos déchets, notamment induite par les mesures du Grenelle de l'environnement, conduit également à l'apparition de nouvelles sources.

En parallèle de ces constats, la prévalence des maladies respiratoires chroniques a augmenté à travers le monde lors des 40 dernières années (Eder et al., 2006; Russell, 2006; Vandentorren et al., 2003). Cette augmentation est supposée être multifactorielle et résulte d'interactions complexes entre prédisposition génétique et facteurs environnementaux. Selon les estimations de l'OMS ("OMS | Affections respiratoires chroniques"), 235 millions d'individus sont asthmatiques, 64 millions ont une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) tandis que des millions d'autres souffrent de rhinite allergique ou d'autres pathologies respiratoires (<http://www.who.int/respiratory/fr/index.html>). L'ensemble des maladies allergiques (asthme, rhinite, conjonctivite, ...) concerne 25 à 30 % de la population française et la bronchite chronique 7 % (<http://www.inserm.fr/#>). Bien que le terrain atopique, le terrain génétique et le tabagisme soient des facteurs majeurs de ces pathologies, la pollution de l'air joue aussi un rôle clé, en particulier dans l'aggravation de ces pathologies et dans le déclenchement des symptômes associés (WHO, 2010).

II. Chiffres, législation et sources de pollution de l'air intérieur

Depuis quelques années, cette problématique de la qualité de l'air intérieur est devenue une importante question de santé publique. En effet, les risques sanitaires liés à la dégradation de la qualité de l'air intérieur sont de plus en plus évoqués par la communauté scientifique. Pour preuve, l'OMS a déclaré via un communiqué de presse (25 mars 2014) que 4,3 millions de décès prématurés seraient liés à la pollution de l'air intérieur. En France, cette prise de conscience a conduit à la mise en place de différentes mesures. Depuis le début des années 90, des textes soulignent la prévention des risques professionnels et proposent des contrôles d'installation des systèmes d'aération des locaux professionnels (Loi du 31 décembre 1991 du code du travail). Au même moment, les premiers bâtiments haute qualité environnementale (HQE) ont été construits en prenant en compte la qualité sanitaire de l'air, la santé et le confort des usagers. Par la suite, en 2001, un organisme visant à étudier la pollution de l'air intérieur (OQAI) est alors créé suite au premier plan national santé environnement. Les premières interdictions de substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques sont intervenues en 2010 et il a été écrit dans le code de l'environnement qu'"une surveillance de la qualité de l'air est obligatoire pour le propriétaire ou l'exploitant de certains établissements recevant du public..." (Art. L221-8). Dans le même but de surveillance, les matériaux de l'habitat tels que les produits de construction, les revêtements des murs, les meubles, ou encore les éléments de décoration ont également été normalisés. Il existe même un étiquetage obligatoire afin de relater les émissions de composés organiques volatiles (COV) depuis 2012. Les établissements destinés à accueillir du public auraient dû renforcer leur surveillance : au 1^{er} janvier 2015 pour les écoles maternelles, au 1^{er} janvier 2018 pour les écoles élémentaires et au 1^{er} janvier 2020 pour les établissements d'enseignement, de formation professionnelle du second degré ou de loisirs et au 1^{er} janvier 2023 pour les autres établissements. Depuis, ces mesures difficiles à mettre en place ont été abrogées de la section 3 du code de l'environnement.

Les sources potentielles de pollution de l'air intérieur sont nombreuses. Elles comprennent les animaux domestiques, les plantes, les taches d'humidité (dégâts des eaux), les matériaux de construction et d'équipement, les produits de nettoyage, la fumée de tabac, les bio-contaminants, les procédés de combustion (cuisson d'aliments, recyclage des déchets organiques ménagés), le chauffage et la production d'eau chaude sanitaire (Viegi et al., 2004). La pollution de l'air extérieur peut également nuire à la qualité de l'air à l'intérieur des

habitations, en particulier dans les habitations très ventilées, les habitations à proximité de sources de pollution ou encore les habitations de professionnels fréquemment exposés (agriculteur, employé de stations d'épuration, ouvrier de la sidérurgie, ...).

Une augmentation du risque de symptômes respiratoires a été associée à la présence de sources de pollution physico-chimique : tabagisme passif (Cheraghi and Salvi, 2009; DiFranza et al., 2004; Pattenden, 2006), emploi de produits d'entretien (Henderson et al., 2008; Sherriff et al., 2005), appareils à gaz (Garrett et al., 1998), la réalisation de travaux (Jaakkola et al., 2004), exposition aux produits de la combustion (Belanger and Triche, 2008). Pour la pollution biologique, l'asthme et la rhinite allergique ont été reliés à la présence d'allergènes au domicile (Lin et al., 2012). Les premiers polluants intérieurs associés à des effets respiratoires sont les allergènes de la poussière, le dioxyde d'azote (NO₂) et les particules fines (Blanc et al., 2005).

Une partie des polluants de l'air intérieur est aujourd'hui mieux documentée et certaines relations dose/effets ont pu être définies mais celles-ci concernent principalement les substances toxiques. En effet, depuis 2004, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) travaille sur des valeurs guides de qualité de l'air intérieur. C'est à sa suite, que les pouvoirs publics ont définis des valeurs guides pour certains polluants chimiques comme le formaldéhyde (30 µg/m³) et le benzène (5 µg/m³) (Décret n° 2011-1727 du 02/12/11) mais ces mesures ne concernent pas les polluants biologiques.

Pourtant, nous sommes également exposés à de nombreux bioaérosols composés par les micro-organismes, les allergènes, les mycotoxines, les endotoxines ou les composés microbiologiques. Nous retrouvons dans nos habitations de nombreux micro-organismes (moisissures, bactéries, ...) et acariens profitant de nos conditions de vie : température, humidité, éléments d'ameublement nourrissants, aliments, squames de peau, Ceux-ci, leurs composants ou leurs produits métaboliques, peuvent également provoquer différents effets sur notre santé (Kanchongkittiphon et al., 2015; Spaan et al., 2006; Thomas, 2010; C Tischer et al., 2011).

Malgré un retard par rapport aux polluants chimiques, les polluants biologiques sont de plus en plus évoqués lorsque l'on s'intéresse aux logements insalubres. Un groupe de travail « moisissures dans l'habitat » a été créé en 2003 par le conseil supérieur d'hygiène publique de France et une loi sur la solidarité et le renouvellement urbain (SRU) a été créée

pour permettre à toute personne, estimant que son logement n'est pas sain, de solliciter la direction départementale des affaires sanitaires et sociales (DDASS) ou le service d'hygiène et de santé de sa ville (SHS). Depuis, les plaintes pour logements insalubres sont en augmentation et prouvent une prise de conscience des particuliers concernant les troubles liés aux moisissures. Une nouvelle profession a justement été développée, en 2009 suite au Grenelle de l'environnement, pour mesurer l'exposition aux micro-organismes et aux acariens de l'habitat suite à une prescription du médecin généraliste ou du pneumologue. Il s'agit de conseillers en environnement intérieur (CEI).

Parmi les sources les plus préoccupantes, le phénomène d'accroissement d'humidité au sein des logements pose un certain nombre de questions. En effet, ce phénomène est favorable au développement des micro-organismes et des acariens qui est le résultat d'une augmentation des températures et des problèmes d'isolation et de ventilation de l'habitat. Pourtant, il est recommandé d'équiper les pièces techniques (cuisine, WC, salle de bain) de ventilations mécaniques contrôlées (VMC) (Arrêté du 24 mars 1982 relatif à l'aération des logements). Un système de VMC est composé d'un caisson chargé d'aspirer l'air intérieur et sur lequel sont reliées plusieurs gaines. Ces dernières sont branchées à des bouches d'aération placées dans les pièces techniques par lesquelles s'échappe l'air pollué, tandis que l'air extérieur pénètre dans la maison par des entrées situées sur les fenêtres des pièces principales (chambres, séjour). Divers types de ventilation existent de manière à limiter les pertes énergétiques et optimiser la qualité de l'air intérieur. Lorsque l'installation se contente d'évacuer l'air pollué, il s'agit de VMC simple flux qui n'offre qu'un débit d'air constant quelles que soient les conditions intérieures et extérieures. Plus performante, la VMC hygro-réglable permet de moduler le renouvellement de l'air en fonction du taux d'humidité ambiante grâce à des capteurs placés sur les bouches d'extraction et les entrées d'air. Une VMC double flux permet d'améliorer le confort thermique de la maison. Le principe : l'air pollué est extrait des pièces techniques et réchauffe, grâce à un échangeur thermique, l'air capté à l'extérieur. Cet air chaud est ensuite insufflé dans les pièces de vie.

Les causes d'humidité sont nombreuses et variées. Elles peuvent être dues à des défauts du bâtiment : infiltrations par les toits ou les murs, remontées par les sols ; à des défauts d'isolation : formation de ponts thermiques, condensations sur les vitres ; à des dégâts des eaux ou encore liées à la présence humaine. Cette humidité, si elle n'est pas évacuée par un système de ventilation efficace, conduit à de la condensation sur les matériaux (Fisk et al., 2007). Cela concernerait près de 25 % des logements en Île de France (Host et al., 2010).

III. Problématique et objectifs

1. Problématique

Depuis plusieurs décennies, les autorités de santé publique se préoccupent de la qualité de l'air que nous respirons. Notre évolution nous amène à passer de plus en plus de temps en espace clos et c'est pourquoi nous nous intéressons dans ce manuscrit à la qualité biologique de l'air intérieur. Certaines raisons économiques et écologiques nous poussent à vivre dans un environnement toujours plus confiné. Ces changements apportent les conditions idéales aux acariens et aux micro-organismes dont les effets sur la santé sont de plus en plus présents dans notre quotidien. Les maladies respiratoires causées par cette pollution sont de plus en plus étudiées mais de nombreuses préoccupations restent aujourd'hui sans certitudes.

1) Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'air intérieur et risque allergique

De nombreux chercheurs s'intéressent à la mesure de l'exposition aux acariens et aux micro-organismes ainsi qu'aux effets sanitaires dus à cette exposition. Pendant longtemps, l'évaluation de l'exposition se faisait à partir de questionnaires ou sur le ressenti des patients eux-mêmes. Des observations visuelles et olfactives sont également régulièrement utilisées mais le constat majeur est le manque de mesure et de standardisation des méthodes actuellement utilisées. Divers techniques de prélèvement et d'analyse sont régulièrement utilisées pour l'évaluation de l'exposition aux acariens (poussière/ACAREX[®] test) ou aux micro-organismes (air/culture) mais l'évaluation de l'exposition nécessite l'utilisation d'outils communs.

Dans ce sens, un index a été utilisé de manière standardisée à partir des poussières issues des sacs d'aspirateur par une équipe américaine (Vesper et al., 2013). Il s'agit de l'ERMI (Environmental Relative Moldiness Index) qui s'intéresse aux concentrations de 36 moisissures présentes dans les logements et mesurées au moyen d'une méthode standardisée qui est la qPCR en utilisant la formule suivante ($ERMI = \sum \log \text{des concentrations du groupe 1} - \sum \log \text{des concentrations du groupe 2}$) (les séquences des cibles qPCR sont disponibles sur le site de l'Environmental Protection Agency (EPA) <http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm#primers>). Les 36 cibles sont divisées en deux groupes : 26 moisissures reconnues comme indicatrices de logements moisiss (groupe 1) et 10 moisissures communes de l'environnement (groupe 2). Cependant cet index ne prend pas en compte les concentrations en acariens, pourtant reconnus comme l'allergène le plus important,

ni les concentrations des autres micro-organismes (levures, actinomycètes, enterobactéries, mycobactéries non tuberculeuses) et les composés qu'ils émettent.

Une autre approche consiste en la détermination d'un indice de biodiversité à partir des moisissures et des bactéries. La somme des concentrations de huit cibles de qPCR (6 moisissures ou groupes de moisissures, 1 enterobactérie et 1 mycobactérie) a été étudiée par une équipe finlandaise en tenant compte également des endotoxines, des β -D-glucanes et de l'ergosterol (Karvonen et al., 2014). Les acariens et leurs allergènes ne sont pas pris en compte et cet indice ne retient pas les effets synergiques d'une multi-exposition aux polluants biologiques de l'environnement intérieur.

L'Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance (ELFE), réalisée en parallèle de cette thèse au laboratoire, a suivi la contamination en acariens, en moisissures et en bactéries de 3200 chambres à coucher de nouveaux-nés en utilisant des capteurs électrostatiques de poussière (CEP) placés 10 semaines et analysés par qPCR. Cette étude a permis l'établissement de 6 profils de contamination prenant en compte cette multi-exposition (S. Rocchi et al., 2015).

Afin de répondre au manque de qPCR spécifiques aux acariens domestiques, nous avons mis au point et validés, sur les poussières de 19 logements de patients allergiques, cinq couples de sondes et d'amorces permettant la détection et la quantification des acariens de la poussière domestique (article qPCR ACARIENS, Roussel et al., Env. Int. 2013).

La présence de polluants biologiques dans notre habitat représente un réel enjeu de santé publique. Les maladies respiratoires, en augmentation ces dernières décennies, touchent des centaines de millions de personnes à travers le monde et sont la résultante de prédispositions génétiques mais aussi d'une exposition aux facteurs environnementaux. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les acariens qui ont principalement des effets sanitaires de type allergique mais aussi les moisissures qui peuvent avoir des effets allergique et inflammatoire et les bactéries telles que les enterobactéries qui libèrent des endotoxines lors de la lyse de la membrane interne de leur paroi.

Différentes espèces d'acariens sont capables de coloniser les logements que ce soit au niveau de la literie (acariens de la poussière domestique) ou au niveau des denrées alimentaires (acariens de stockage). La présence des acariens de stockage dans notre

environnement est mal connue au regard des acariens de la poussière domestique et elle n'est pas ou peu prise en compte par les allergologues pour connaître la cause de l'allergie.

Afin de déterminer la diversité en acariens de notre environnement intérieur et notre exposition, nous avons amélioré la détection des acariens de la poussière domestique et développé la quantification des acariens de stockage par qPCR. Ces deux groupes d'acariens ont été recherchés et quantifiés dans 24 logements de patients allergiques aux acariens et 18 logements de sujets sains (article ACARI, Naegele et al., Insect Sci., soumis 2015).

Les acariens de la poussière domestique, les acariens de stockage, les moisissures et les bactéries ne sont pas les seules responsables d'effets cliniques. En effet, les allergènes provenant des phanères de chat ou de chien sont également reconnus pour leurs effets allergéniques même si leur rôle dans le développement de l'asthme reste controversé. Aujourd'hui, la mesure de l'exposition aux animaux domestiques se fait principalement par questionnaire sur la présence d'un animal au domicile. La présence de blattes, principalement dans les villes, est un témoin d'une humidité chronique du domicile et les effets de cette exposition ont été démontrés notamment chez les enfants développant des sifflements. L'évaluation de leur présence et leur dénombrement s'effectue par la mesure de cet antigène dans les poussières aspirées.

Dans le but de progresser dans l'évaluation de notre exposition aux allergènes à partir d'un outil commun et compléter notre panel d'antigènes quantifiables en environnement intérieur, nous avons évalué la détection de l'ADN de chat et de chien par qPCR et développé un nouveau système de quantification des blattes sur les poussières sédimentées de 24 logements possédant ou non des animaux domestiques (article qPCR ALLERGENES, Scherer et al., Int. J. Environ. Health Res., soumis 2015).

2) Influence des interactions acariens/moisissures sur l'exposition aux allergènes

Acariens et moisissures cohabitent au sein de notre habitat. Ces organismes interagissent mais le risque associé à cette relation reste largement méconnu. Pourtant leur présence concomitante pourrait avoir des conséquences écologiques et sanitaires. L'interaction acariens/moisissures pourrait modifier la contamination et ainsi influencer notre exposition aux allergènes dans l'habitat. En effet, lors de leur lutte pour la colonisation de notre habitat, les acariens se nourrissent des moisissures qui font partie de leur alimentation avec les squames de peau, les poils ou encore les débris alimentaires. Les acariens pourraient

donc jouer plusieurs rôles dans le développement des moisissures en les dégradant ou en les dispersant.

Selon les conditions d'humidité et de température, différentes espèces d'acariens et de moisissures peuvent coloniser nos logements. De part leurs choix alimentaires, les acariens sont susceptibles de sélectionner certaines espèces de moisissures (article PREFERENCES ALIMENTAIRES DES ACARIENS, Naegele et al., Int. J. Environ. Health Res. 2013) mais aussi de les transporter. Lors de la consommation des moisissures, les acariens peuvent charger des centaines de spores sur leur corps et leurs pattes et certaines moisissures restent viables même après digestion (article L'ACARIEN TRANSPORTEUR D'ALLERGENES, Naegele et al., Rev. Fr. Allergol. 2015).

D'un point de vue santé, la présence concomitante des acariens et des moisissures pourrait accroître la fréquence et la sévérité des crises d'asthme. En effet, la combinaison acariens/moisissures entrainerait des effets néfastes sur le plan respiratoire (au mécanisme allergique pourrait s'ajouter un effet toxique lié aux champignons dont les spores sont respirées). La connaissance des concentrations simultanées en ces organismes nous permettrait de mieux estimer notre exposition aux allergènes (INTERACTION ACARIENS/MOISSURES).

3) Influence du mode de vie sur la pollution biologique de l'air intérieur

Les agriculteurs, et en particulier les éleveurs laitiers, sont fortement exposés à un bioaérosol composé d'acariens et de micro-organismes. La prévalence de la BPCO est anormalement élevée dans cette profession et une part non négligeable de bronchite chronique ne peut pas être expliquée par le tabagisme. Cette maladie est sous-estimée et sous-diagnostiquée et pourrait devenir la troisième cause de mortalité à l'horizon 2020.

Afin de progresser sur les facteurs favorisant le développement de la BPCO, une enquête environnementale a été réalisée dans les logements de 60 patients atteints de cette maladie et de 60 témoins sains. Ces volontaires étaient pour moitié des éleveurs laitiers et pour chacun une analyse sérologique a été effectuée pour déterminer leur sensibilisation aux micro-organismes (article mic-BALISTIC, J. Med. Microbio., soumis 2015).

Divers facteurs sont susceptibles de favoriser la présence des acariens et des micro-organismes dans nos logements. L'humidité en est un des principaux tout comme la température et la présence de nutriments (Pauli and Bessot, 2013). Tout ces facteurs sont

susceptibles d'être réunis en cas de compostage domestique, qui pourrait être une source importante de contamination biologique. En effet, les conditions de stockage provisoire des déchets organiques, au niveau du bio-seau avant le transfert définitif dans le composteur, apportent les conditions idéales et soulèvent la question du développement des acariens, des moisissures, des levures et des bactéries. Cette pratique, favorisée par l'avènement du développement durable et le Grenelle de l'environnement, vise à réduire la quantité de déchets des logements.

Pour connaître l'impact du compostage domestique sur l'environnement intérieur, nous avons suivi la contamination biologique de 38 logements de volontaires pratiquant le compostage domestique et de 10 logements témoins durant 1 an et à trois distances du bio-seau (article ICODE, Naegelé et al., Indoor Air 2015).

2. Objectifs et intégration des études

Les objectifs de cette thèse étaient de documenter la diversité et les profils de contamination en acariens et en micro-organismes présents dans les logements de patients présentant des pathologies allergiques ou développant une BPCO ; de prendre en compte les interactions entre les différentes communautés organiques afin de progresser vers la détermination de seuils acceptables par rapport aux risques pour la santé ; d'apporter de nouvelles connaissances sur les facteurs influençant la pollution de l'air intérieur ; de promouvoir des conseils de prévention pour la population.

Dans un premier temps, un nouveau modèle de quantification des acariens domestiques mais aussi des animaux domestiques et des blattes par qPCR a été mis au point et validé sur les poussières des logements de patients allergiques et de témoins non allergiques. Puis, les interactions acariens/moisissures ont été observées à partir de dispositifs *in vitro* et l'influence du mode de vie a été mesurée dans les logements de producteurs laitiers et de personnes pratiquant le compostage domestique (Figure 1).

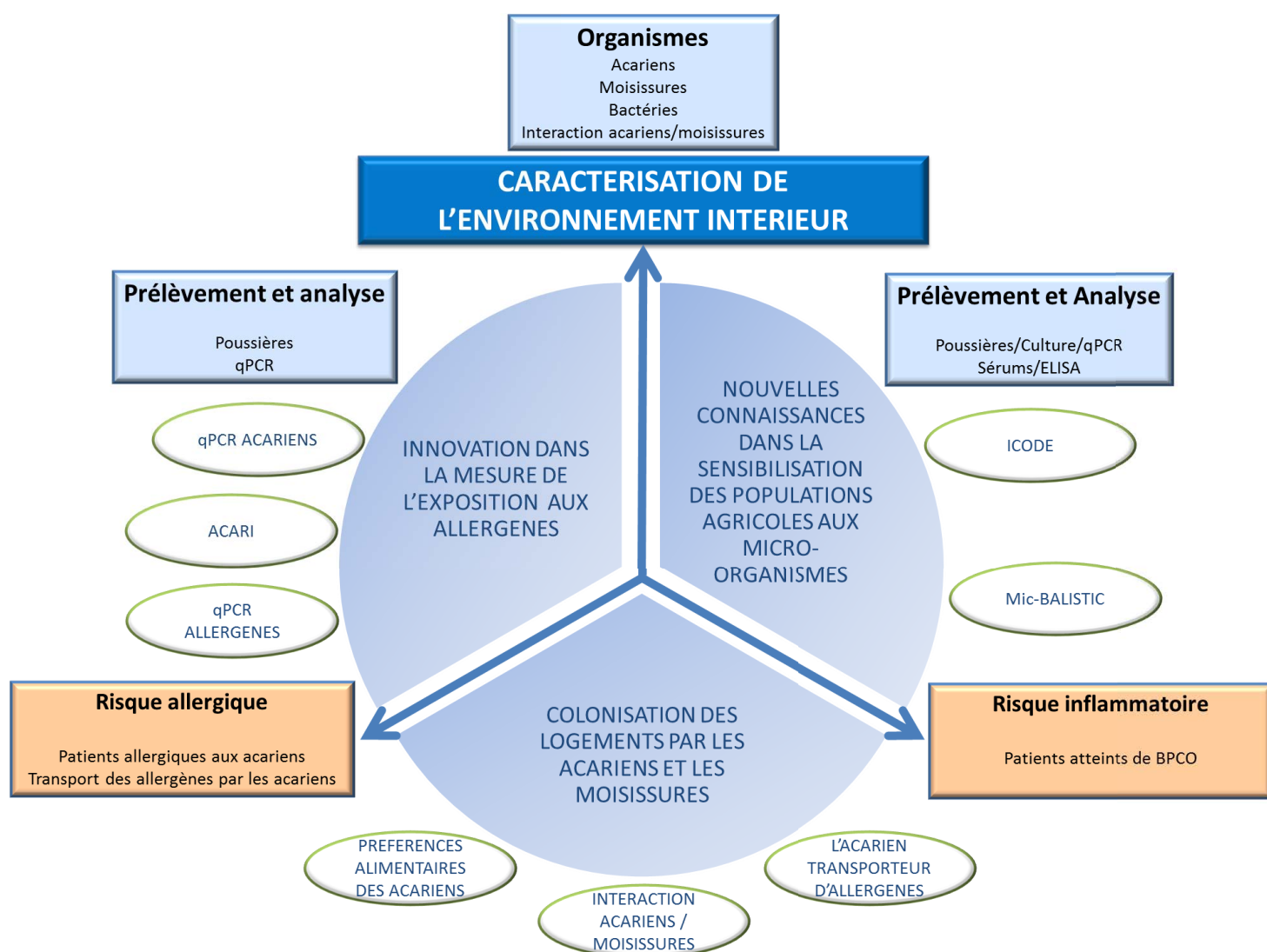


FIGURE 1 : SCHEMA DES DIFFERENTES ETUDES ET INTEGRATION DANS LE TRAVAIL DE THESE.

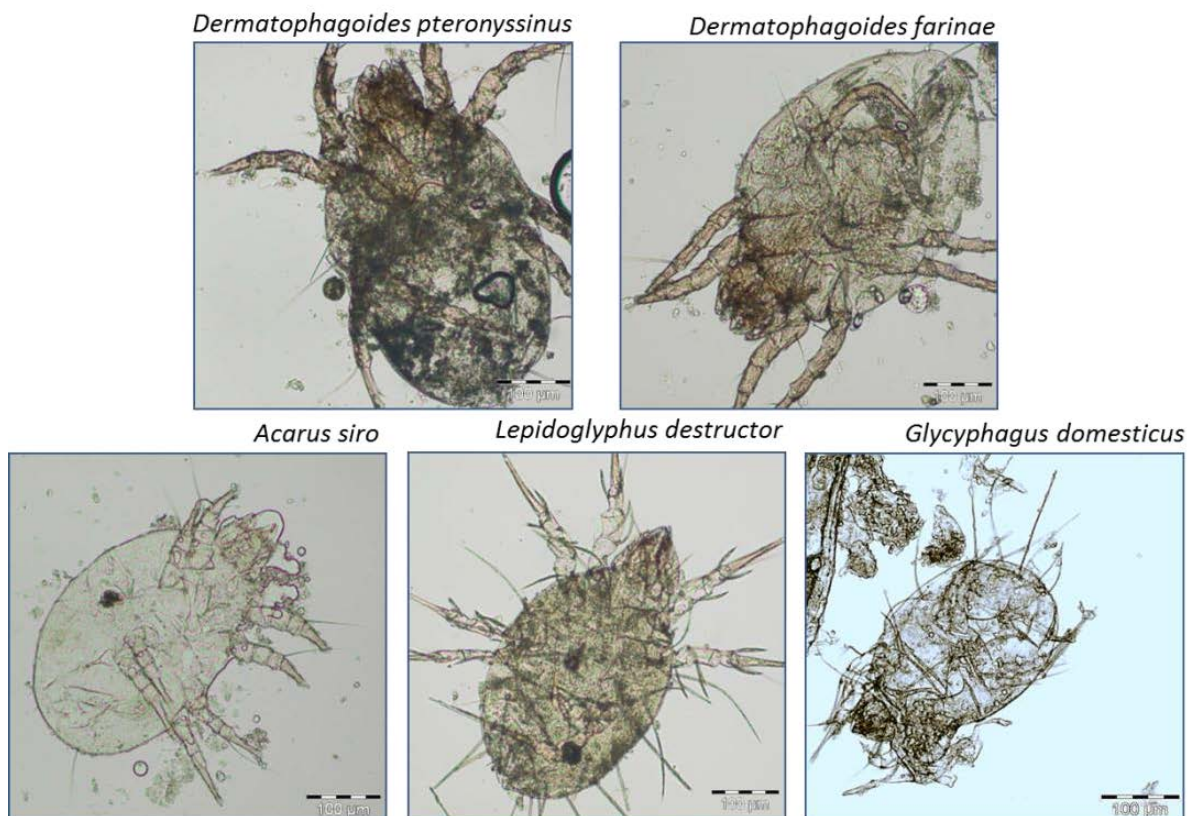
SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les acteurs de la pollution biologique de l'air intérieur

1. Les acariens

Les acariens sont des organismes microscopiques ne dépassant pas quelques dizaines de microns. Cosmopolites, il en existe plusieurs dizaines de milliers d'espèces. Originaires des nids d'oiseaux et des terriers des rongeurs, ils sont retrouvés en abondance en Europe et particulièrement dans l'habitat où ils colonisent les pièces de literie, les tissus d'ameublement, les tapis (genre *Dermatophagoides*) ainsi que les réserves alimentaires dans les cuisines et les caves (*Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Glycyphagus domesticus*, *Tyrophagus putrescentiae*) (Figure 2).



**FIGURE 2 : ACARIENS DOMESTIQUES OBSERVES AU MICROSCOPE (x100)
(PHOTOGRAPHIES ALEXANDRE NAEGELE).**

Morphologiquement, ils sont constitués d'un corps globuleux d'un seul tenant, d'un exosquelette chitineux formant une carapace et d'une cuticule variable selon les espèces. Octopodes, ils possèdent des pattes articulées munies sur le dernier article de griffes ou de ventouses qui constituent un système de fixation et d'accrochage et un gnathosome portant une paire de chélicères et une paire de palpes (Colloff, 1998).

1) Classification et cycle de vie des acariens

a. Classification zoologique

Les acariens sont de la famille des *Acaridae*. Ils sont issus du sous-ordre des *Astigmata*, eux-mêmes issus de la sous-classe des *Acari* et de la classe des *Arachnidae*. Cette classe provient des *Chélicerates*, sous-embranchement des *Arthropodes* (Figure 3). Dans l'environnement domestique, cinq familles d'acariens sont identifiées (*Pyroglyphidae*, *Acaridae*, *Glycyphagidae*, *Chortoglyphidae* et *Chaliyetidae*). Les acariens de la famille des *Pyroglyphidae* sont les acariens de la poussière domestique et mesure de 300 à 400 μm tandis que les acariens des autres familles, plus grands (environ 500 μm), sont communément appelés acariens de stockage (Jeong et al., 2012).

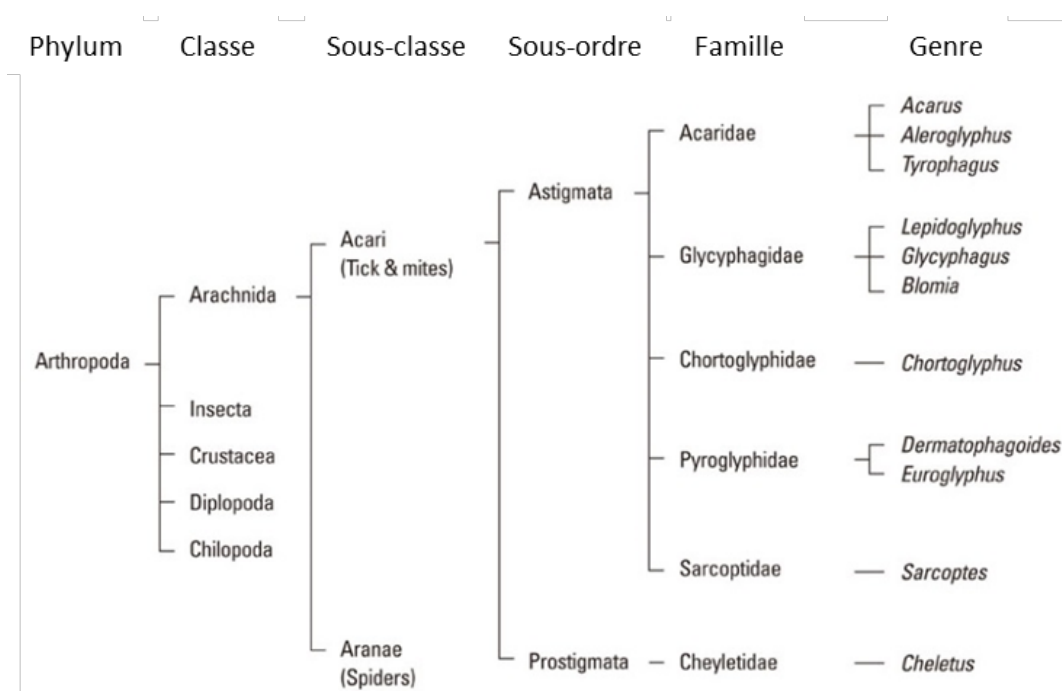


FIGURE 3 : CLASSIFICATION ZOOLOGIQUE DES ACARIENS (JEONG ET AL., 2012).

b. Cycle biologique des acariens

Les acariens *Pyroglyphidae* du genre *Dermatophagoides* ont un cycle biologique particulier. L'accouplement a lieu une ou deux fois dans la vie de l'acarien et donne lieu à la production de 20 à 40 œufs par la femelle. L'éclosion se fait au sixième jour après la ponte et s'en suit une larve hexapode qui évoluera vers une nymphe octopode. Celle-ci devient adulte après une dernière mue et est capable de se reproduire. L'évolution de l'œuf à l'adulte se fait en 25 jours et l'adulte vit en moyenne 2 à 3 mois et demi (Vialatte and Brunet, 1974).

Comme pour les acariens de la poussière domestique et en raison de leur carapace, le développement des acariens de stockage se fait graduellement par mues. Six stades successifs à partir de l'œuf : une prélarve, une larve, trois nymphes (protonympe, deuteronympe et trionympe) et un adulte. Les acariens de stockage ne vivent que 6 semaines mais se reproduisent à un rythme accéléré. Leur fécondité est 7 fois plus élevée que celle des acariens du genre *Dermatophagoides* (Bessot et al., 2011).

2) Ecologie des acariens en environnement intérieur et influence des facteurs environnementaux

a. Un facteur crucial : l'humidité

De nombreuses études ont montré que les conditions optimales étaient de 70 à 80 % d'humidité relative pour *Dermatophagoides pteronyssinus*, 60 % pour *Dermatophagoides farinae* et d'au moins 80 % pour les acariens de stockage mais l'humidité relative intérieure et la température sont liées. L'humidité relative critique en-dessous de laquelle les acariens ne peuvent pas survivre est en théorie de 73 % pour *D. pteronyssinus* et de 70 % pour *D. farinae*. Cependant, il est possible d'observer encore des acariens de la poussière domestique avec une humidité relative de 40 %.

Les *Dermatophagoides* peuvent alors coloniser des zones plus favorables car plus humides au niveau des parties plus denses du matelas. Les acariens adultes peuvent également se regrouper pour garder un niveau de température et d'humidité suffisante (Pauli and Bessot, 2013). Ce niveau d'humidité dépend du renouvellement de l'air par la ventilation et l'aération c'est pourquoi il est recommandé d'aérer le logement au moins 15 minutes par jour.

b. Un facteur important : la température

Les acariens sont capables de supporter des températures variant de -15°C à +40°C. Leur reproduction est cependant difficile en dessous de 15°C et au-dessus de 35°C. La température optimale pour leur développement est comprise entre 26°C et 32°C. La nuit, la simple présence humaine permet d'augmenter la température et l'humidité nécessaire aux acariens (Pauli and Bessot, 2013). Les acariens pyroglyphides se développent plus lentement dans les tapis ou les moquettes que dans les matelas. En ce qui concerne les acariens de stockage, ils ont besoin de températures proches des températures de développement des acariens de la poussière. Pourtant, *Acarus siro*, peut supporter une température de 4°C au niveau des réfrigérateurs ou des caves d'affinage de certains fromages.

c. *Un facteur nécessaire : la nourriture*

Parmi les aliments préférentiels des *D. pteronyssinus*, on retrouve les squames, les débris kératinisés, les poils et les cheveux. Quotidiennement, l'homme peut perdre environ 100 mg de squames qui peuvent nourrir des acariens pendant plusieurs mois. Pour *D. farinae*, le panel d'aliments est plus vaste allant des squames aux farines de seigle. *A. siro* consomme également les farines mais aussi les fromages tels que certaines tommes, la mimolette, le cantal (où ils sont ajoutés à la croute pour l'affinage). *L. destructor* est considéré comme acarien des silos à grain mais peut être retrouvé dans les poussières en Europe. *G. domesticus* est une espèce qui consomme les débris alimentaires. *T. putrescentiae* est décrit comme étant fongivore et est présent principalement en zone tropicale mais peut être retrouvé en zone tempérée tout comme *Blomia tropicalis* qui est considéré comme un véritable acarien des poussières domestiques (Pauli and Bessot, 2013).

La nourriture est cependant un facteur secondaire par rapport à l'humidité et la température. En effet, les acariens peuvent être présents dans les logements peu habités ne contenant que très peu de débris humains et être absents des logements situés en altitude où les températures et l'humidité sont plus basses.

3) Les composantes responsables d'effets cliniques : les allergènes

L'une des principales sources d'allergènes de la poussière domestique se situe au niveau des déjections des acariens. Celles-ci, mesurant 10 à 40 µm, sont également accumulées dans les poussières des logements. Ces fèces (Figure 4) contiennent de grandes quantités d'enzymes et de protéines, résultant de la digestion, qui sont des allergènes. Parmi celles-ci, nous retrouvons les peptidases, les glycosidases, les transférases ou encore les protéines musculaires ou les protéines de liaison lipidique.

Le premier allergène qui a été identifié et retrouvé principalement dans les fèces de *D. pteronyssinus* est Der p1. En laboratoire, une étude a montré que *D. pteronyssinus* produisait en moyenne 20 déjections par jour, qui contenait 100 pg de Der p1 chacune (Tovey et al., 1981). Des seuils de sensibilisation fixés à 2 µg/g de poussière ont été établis comme entraînant la production d'anticorps (Platts-Mills et al., 1997).

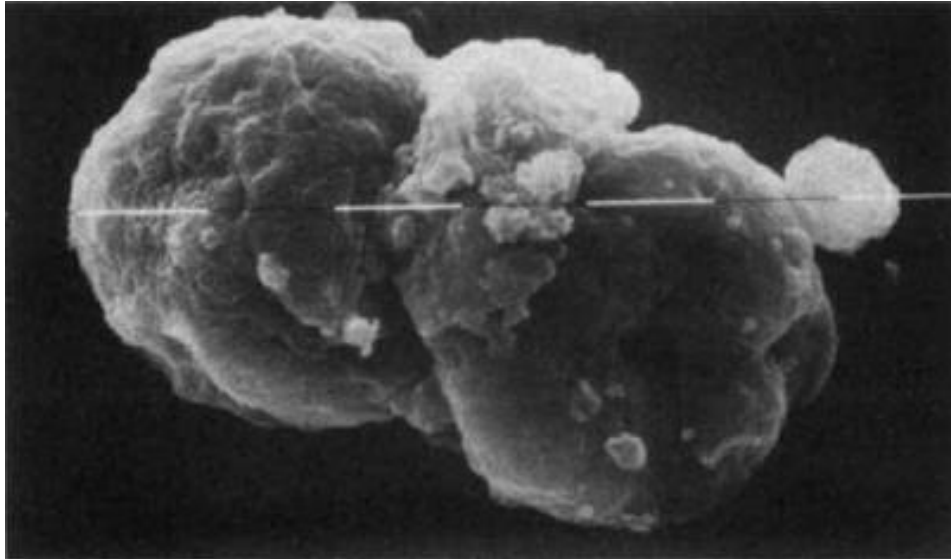


FIGURE 4 : DEUX FECES D'ACARIENS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN DIAMETRE COMPRIS ENTRE 10 ET 40 μ M. ECHELLE, 10 μ M. (TOVEY ET AL., 1981).

D'autres allergènes d'acariens peuvent avoir des conséquences cliniques. Ils sont classés selon le sous-comité de la standardisation et de la nomenclature des allergènes de l'Union International des Sociétés Immunologiques (UISI) avec les trois premières lettres du nom de genre et la première lettre du nom de l'espèce. Il y a ensuite un nombre indiquant le groupe de l'allergène : exemple Der p2. Ils sont classés en 21 groupes selon leur fonction et concernent 13 espèces d'acariens de la poussière domestique et d'acariens de stockage. Ces allergènes sont localisés principalement au niveau du tube digestif et des fèces mais peuvent également se situer au niveau des cellules musculaires ou au niveau intracellulaire. Les allergènes des principales espèces d'acariens domestiques sont présentés en fonction de la protéine (nom et fonction) et de sa localisation (Table 1) (Colloff, 2010).

TABLE 1 : FONCTION DE CHAQUE GROUPE D'ALLERGENES ET LOCALISATION AU SEIN DES ACARIENS. Df : *DERMATOPHAGOIDES FARINAE* ; Dp : *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* ; Em : *EUROGLYPHUS MAYNEI* ; As : *ACARUS SIRO* ; Tp : *TYROPHAGUS PUTRESCIENTIAE* ; Gd : *GLYCYPHAGUS DOMESTICUS* ; Ld : *LEPIDOGLYPHUS DESTRUCTOR* ; Bt : *BLOMIA TROPICALIS* (COLLOFF, 2010).

Groupe	Espèces d'acariens	Nom/Fonction	Localisation
1	Df, Dp, Em, Bt	Cystéine peptidase	Tube digestif/fèces
2	Df, Dp, Em, Tp, Gd, Ld, Bt	Protéine de liaison lipidique	Intracellulaire
3	Df, Dp, Em, Gd, Ld, Bt	Trypsine	Tube digestif/fèces
4	Dp, Em, Bt	Alpha-amylase	Tube digestif/fèces
5	Df, Dp, Gd, Ld, Bt	Protéine structurale	?
6	Df, Dp, Bt	Chymotrypsine	Tube digestif/fèces
7	Df, Dp, Gd, Ld, Bt	?	?
8	Dp, Gd, Ld, Bt	Glutathion-s-transférase	?
9	Df, Dp, Bt	Collagénase	Tube digestif/fèces
10	Df, Dp, Tp, Gd, Ld	Tropomyosine	Cellule musculaire
11	Df, Dp, Bt	Paramyosine	Cellule musculaire
12	Ld, Bt	Protéine de liaison de la chitine	Intracellulaire
13	Df, As, Tp, Gd, Ld, Bt	Protéine de liaison des acides gras	Intracellulaire
14	Df, Dp, Em, Bt	Vitellogenine: protéine de stockage du jaune d'œuf	Intracellulaire
15	Df, Dp	Chitinase	Intracellulaire
16	Df	Gelsoline : liaison de l'actine	Intracellulaire
17	Df	Protéine de liaison du calcium	Intracellulaire
18	Df, Dp, Bt	Chitinase	Intracellulaire
19	Bt	Peptide antimicrobien	Tube digestif/fèces
20	Dp	Arginine kinase	?
21	Bt, Dp	Protéine structurale	Tube digestif/fèces

Lorsque ces allergènes pénètrent dans notre organisme par inhalation, contacts cutanés ou ingestion, ils déclenchent une réponse immunitaire. Cette réponse peut être immédiate (IgE médiée) ou non (inflammatoire). Les aéro-allergènes inhalés pénètrent dans l'épithélium des voies aériennes et, chez des sujets prédisposés à l'allergie, stimulent la migration de cellules dendritiques vers les nodules lymphatiques. L'inflammation des voies aériennes est alors menée par les cellules dendritiques et par la stimulation des cellules médiées T_H2 de

l'immunité. Cette réaction immunitaire est critique et est connue pour être plus importante chez les patients allergiques aux acariens (Calderón et al., 2014).

4) Les effets sur la santé associés aux acariens

Les manifestations cliniques d'une sensibilisation aux acariens de la poussière domestique ou de stockage comportent classiquement, dans l'ordre d'apparition et de gravité: une rhinite perannuelle isolée d'intensité variable suivant la saison, puis une rhinite associée à des crises de bronchite, enfin un asthme pur bien caractérisé et beaucoup plus rarement une dermatite atopique. La littérature médicale mentionne également un rôle possible des acariens dans l'étiologie de la maladie de Kawasaki et l'existence d'une acariase des voies pulmonaires de l'homme dans les régions intertropicales ou chaudes.

a. Les effets allergiques

i. Rhinite allergique

La rhinite allergique perannuelle constitue un des cadres cliniques particulièrement fréquent des maladies allergiques mais son diagnostic est délicat en l'absence d'asthme associé. Elle concerne 5 à 30 % de la population et les enfants âgés de 6 à 14 ans sont les plus touchés (Asher et al., 2006). Elle comporte des éternuements, une rhinorrhée, une obstruction nasale et parfois des complications sinusiennes. Les circonstances de survenue des crises sont caractéristiques car elles apparaissent le plus souvent le matin au réveil lorsque le malade est encore dans son lit. D'autres facteurs, comme le ménage, le nettoyage de l'aspirateur, le secouement des draps, le tapage ou, le retournement des matelas, le changement occasionnel d'habitat, surtout chez les citadins qui se déplacent à la campagne dans une maison humide, sont assez évocateurs d'une allergie à la poussière qui constitue en fait une allergie aux acariens. Presque toujours le diagnostic est confirmé par la positivité de tests cutanés.

ii. Asthme allergique aux acariens de la poussière domestique

Il constitue l'essentiel des asthmes de l'enfant qui sont principalement d'origine allergique. L'origine allergique est évoquée lors de la multiplication de ces critères : début des sifflements précoces lors de l'enfance ; antécédents familiaux (rhino-conjonctivite, eczéma, asthme) ; antécédents personnels (eczéma, trachéite, rhino-conjonctivite). La responsabilité des acariens domestiques est mise en avant lors de crises nocturnes, à l'automne ou au printemps, qui disparaissent lorsque le sujet quitte son milieu naturel. Il existe, en plus d'une

réaction immédiate, une réaction tardive (plusieurs heures), plus grave, qui est caractéristique de l'asthme aux acariens (Calderón et al., 2014).

iii. Asthme allergique aux acariens de stockage

Les sujets allergiques aux acariens de stockage sont souvent polysensibilisés et sont sensibles également aux acariens de la poussière domestique (Morales et al., 2015). Certaines professions ou certains patients sont cependant atteints d'une allergie spécifique. C'est notamment le cas de certaines professions où l'exposition aux acariens de stockage est importante (boulangers, fromagers).

iv. Dermate atopique

Egalement appelée eczéma atopique, la dermite atopique est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Sa prévalence, mise en avant dans l'étude ISAAC est de 1 à 20 % et augmente continuellement (Asher et al., 2006). Tout comme l'asthme, la dermite atopique est fortement présente en Europe de l'Ouest contrairement à l'Europe de l'Est et le bassin méditerranéen. Chez les patients souffrant de dermite atopique, il est fréquent de trouver des tests cutanés positifs et un niveau d'IgE élevé.

b. Les effets non allergiques

Les acariens peuvent également être responsables d'effets cliniques non allergiques. C'est le cas d'une maladie où les acariens contaminent les voies aériennes ou le système digestif. Il s'agit de l'acariase. Elle peut être la cause de l'inhalation accidentelle d'acariens lors d'une exposition professionnelle importante à proximité des silos à grain ou le résultat d'une ingestion de nourriture contaminée. Les acariens ont également été évoqués comme potentiel responsables de la maladie de Kawasaki. Ils joueraient un rôle de réservoir ou d'agent de transfert de ce rétrovirus mais cette hypothèse n'a jamais été confirmée. Le rôle des acariens a aussi été suggéré dans le syndrome du bâtiment malsain (Sick building syndrome (SBS)) qui est associé à la qualité de l'air de bâtiments modernes. L'ensemble des polluants de l'air intérieur serait potentiellement responsable de cette maladie mais il n'existe pas de preuves tangibles du rôle des acariens dans ce syndrome (Colloff, 2010).

2. Les champignons

Les champignons sont des organismes microscopiques à croissance filamenteuse : les moisissures ou à croissance levuriforme : les levures. Ils comportent des milliers d'espèces et sont retrouvés par exemple sur des aliments stockés depuis un certain temps. Les moisissures sont de texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse tandis que les levures sont crémeuses mais toutes sont retrouvées de manière ubiquitaire.

1) Classification et cycle de vie des champignons

a. *Le règne fongique*

Les champignons sont des organismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires dont le matériel génétique est situé dans un noyau comme pour les plantes et les animaux. Ils sont dotés d'un certain nombre de caractéristiques qui leur permettent de faire partie d'un groupe à part :

- des parois contenant de la cellulose et de la chitine
- l'absence de chlorophylle
- l'absence de mobilité

Ce sont ces caractéristiques qui ont permis au taxonomiste de classer les champignons dans un règne distinct : celui des mycètes (Kendrick, 2001). Composés des macromycètes (champignons supérieurs), des levures, des mycobiontes, des mycoparasites et des moisissures, ce règne fongique est l'un des principaux composants des Eucaryotes avec plus de 1,5 million d'espèces.

b. *La phylogénie des champignons*

À l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis finalement, en genres et en espèces, ces deux derniers termes étant utilisés pour les désigner. La classification des moisissures, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq ordres des mycètes, soit les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes.

Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à des stades de multiplication asexuée, dits anamorphes, et sont alors classées d'après le mode de

production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes, ou *Fungi imperfecti*. Les moisissures qui prolifèrent sur les matériaux de construction et les surfaces à l'intérieur des résidences et des édifices se retrouvent fréquemment dans des circonstances de croissance favorisant uniquement le stade asexué, la majorité d'entre elles fait donc partie de ce cinquième ordre. Moins souvent, les moisissures retrouvées dans ces endroits font partie de groupes à reproduction sexuée, comme certains Zygomycètes, Ascomycètes et rarement, Basidiomycètes. En milieu intérieur, les sites très humides peuvent aussi favoriser la croissance de certaines levures.

Ces dernières années, de nouvelles études basées sur l'analyse multi-génétique (Hibbett et al., 2007), ont créé une nouvelle classification (Figure 5). Deux des phylums les plus importants (Ascomycètes et Basidiomycètes) sont regroupés au sein du sous-embranchement des Dikarya. La plupart des moisissures appartenant à l'ancien phylum des Deutéromycètes ont été classées à l'aide d'outils moléculaires dans les Ascomycètes qui représente plus de 65 % de la diversité fongique décrite.

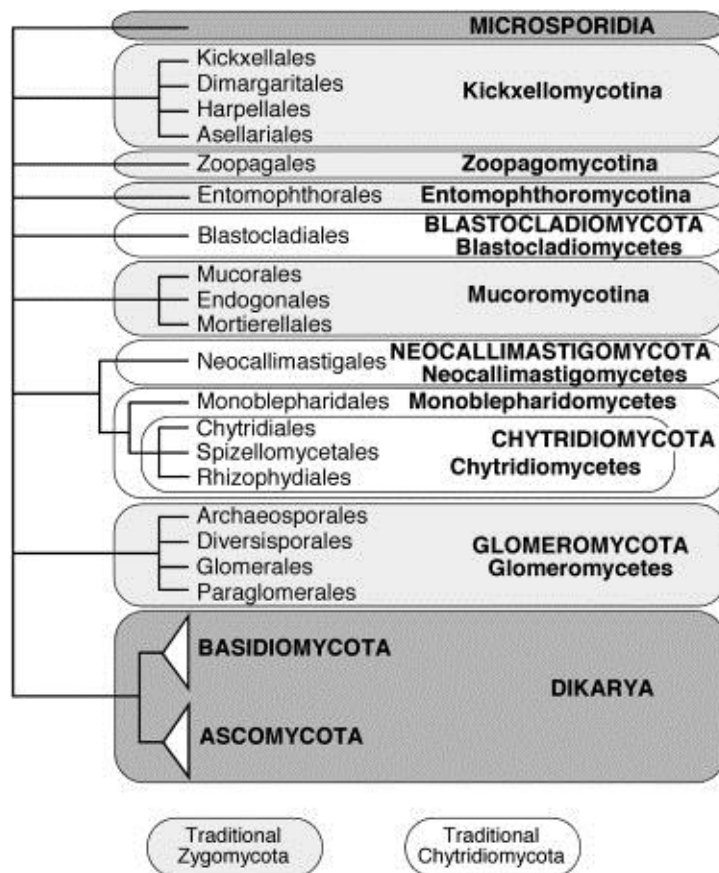


FIGURE 5 : PHYLOGENIE ET CLASSIFICATION DES MOISSURES (HIBBETT ET AL. 2007).

c. Principales caractéristiques biologiques

Le principal réservoir naturel des champignons se situe sur les végétaux, la matière organique en décomposition, la surface des eaux stagnantes ou encore les sols. A l'inverse des plantes, ils ne peuvent pas synthétiser leur matière organique à partir du CO₂ de l'atmosphère car ils sont dépourvus de chlorophylle. Ils puisent donc leur source d'énergie dans le milieu ambiant : eau, substances organiques et minérales. Ils sont hétérotrophes (Kendrick, 2001) et peuvent être de type saprophyte lorsqu'ils se développent sur de la matière organique inerte ou de type parasite s'ils se développent sur du vivant. Certains sont en symbiose avec d'autres organismes en tirant des bénéfices réciproques de leur association. Lorsque les moisissures arrivent à maturité en conditions idéales, elles produisent des spores qui peuvent être disséminées dans l'environnement intérieur par différents vecteurs : les courants d'air, les humains, les animaux, les arthropodes.

Ces spores de taille microscopique (2 à 250 µm), sont des structures de la reproduction qui assurent la dissémination des moisissures allant jusqu'à de grandes distances. Cette dissémination est l'étape clé du cycle de vie des moisissures (Figure 6). En milieu intérieur, le cycle de vie débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface offrant les conditions propices à sa croissance. La germination peut alors se faire sous l'action de l'eau et de divers facteurs comme l'intensité lumineuse, la température ou encore les éléments nutritifs. La germination donne naissance à un premier filament (hyphe) qui s'allonge pour former ensuite le mycélium et la propagation se fait au moyen des conidies produites en chaîne à partir de cellules spécialisées (les phialides). Si les conditions sont favorables à la sporulation, le mycélium peut créer des structures plus spécialisées et produire des spores asexuées (conidies) ou sexuées (ascospores) (Dantigny et al., 2005).

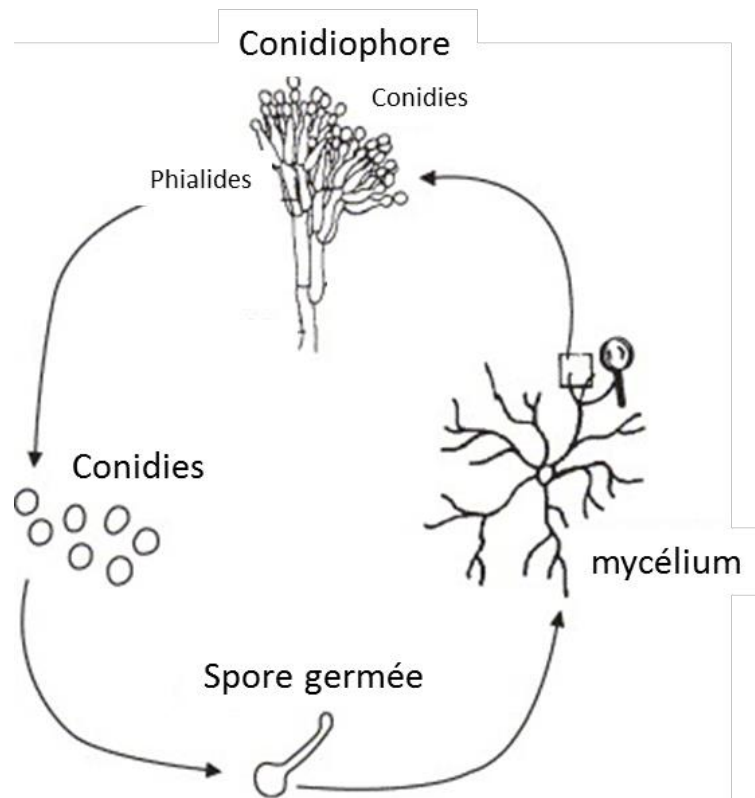


FIGURE 6 : CYCLE DE VIE DES MOISSURES, EXEMPLE DE *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* (CYCLE ASEXUE) (D'APRES DANTIGNY ET AL., 2005).

La production des spores en très grand nombre (sporée) présente un aspect poudreux et coloré en surface de la moisissure. D'un point de vue macroscopique, la taille, la forme et la couleur des spores sont espèces-dépendantes tandis qu'en microscopie, les spores d'une même espèce sont de couleur, de taille et de forme relativement identique.

2) Ecologie des moisissures en environnement intérieur

D'abord présentes dans l'air extérieur où on les retrouve à des concentrations comprises entre 10^3 et 10^4 spores/m³ (225 l d'air aspirés par une pompe et collectés dans une cassette) (Codina et al., 2008), les moisissures via les spores sont principalement aérosolisées par le vent mais peuvent également pénétrer dans les logements. Que ce soit par flux d'air et les systèmes de ventilation ou par les habitants, les spores peuvent tirer profit des niches écologiques naturellement présentes en environnement intérieur.

a. Influence des facteurs environnementaux

Le développement des espèces fongiques peut être influencé par divers facteurs biotiques (viabilité des spores, nature des champignons, compétition inter et intra-espèce) et abiotiques (pH, oxygène, lumière, température, nutriments, humidité).

i. La température

Les moisissures, présentes en environnement intérieur, sont pour la plupart mésophiles. En effet, leur température optimale de croissance se situe à des températures proches de la température ambiante des bâtiments. Cependant, certaines espèces peuvent avoir un delta de température de croissance allant de 10 à 52°C qui leur confère un avantage compétitif vis-à-vis des autres organismes présents au sein des logements.

ii. Les nutriments

Les moisissures, peu exigeantes en éléments nutritifs, se servent des matières organiques retrouvées au sein des aliments et des matériaux de construction (notamment à base de produits celluloseux) (Santucci et al., 2007). Certaines moisissures à croissance rapide (*Aspergillus* et *Penicillium*) utilisent les sucres simples tandis que d'autres, dégradent la cellulose ou la lignine. Lorsque les champignons colonisent les matériaux de construction, il se produit une dégradation de ceux-ci. Une part physique par la croissance des hyphes et une part chimique par la production de métabolites. Parmi les matériaux les plus utilisés (Placoplatre, papier-peint, bois aggloméré, ...), certains retiennent l'eau et sont facilement dégradables par les champignons (Gravesen et al., 1999).

iii. L'humidité

Les conditions présentes dans le milieu intérieur garantissent des éléments nutritifs en abondance et des températures modérées. Le facteur permettant ou non la germination des spores et la croissance des champignons est donc souvent la présence d'eau disponible. Le terme principalement utilisé pour décrire ce phénomène d'eau disponible est l'activité de l'eau (a_w). Il est le rapport entre la pression partielle de l'eau dans un matériau donné et la pression de vapeur saturée de l'eau pure à la même température. Un rapport supérieur à 0,60 permet la croissance des moisissures. Les espèces fongiques peuvent être classées en fonction de leur capacité de développement à différentes valeurs d'activité de l'eau (Li and Yang, 2004) :

- a_w inférieur à 0,8 : Xérophile (*Penicillium*, *Aspergillus*)
- a_w entre 0,8 et 0,9 : Mésophile (*Alternaria*, *Cladosporium*)
- a_w supérieur à 0,9 : Hydrophile (*Fusarium*, *Stachybotrys*)

L'eau peut donc être présente dans les logements sous forme liquide mais aussi sous forme de vapeur. Cette eau sous forme gazeuse est également importante pour le développement fongique. Elle est représentée par l'humidité relative (HR) qui est le rapport entre la quantité d'eau présente dans l'air et la quantité maximale d'eau que l'air pourrait contenir à la même température.

b. Diversité fongique

Les causes d'humidité dans les logements sont nombreuses et les procédés permettant son évacuation ne sont pas toujours présents et fonctionnels. De ce fait, il est possible de retrouver régulièrement une trentaine de genres fongiques au sein même de l'environnement intérieur. Parmi les plus fréquentes, il y a les genres *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* mais il n'est pas rare d'identifier d'autres genres tels que *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Stachybotrys*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* et *Wallemia* (Figure 7). Les concentrations en environnement intérieur sont variables mais restent globalement inférieures aux concentrations de spores de l'environnement extérieur. Certains milieux tels que les milieux agricoles et industriels sont particulièrement contaminés par les moisissures. En fonction des saisons, les concentrations sont également variables et les concentrations les plus élevées sont retrouvées durant l'été.

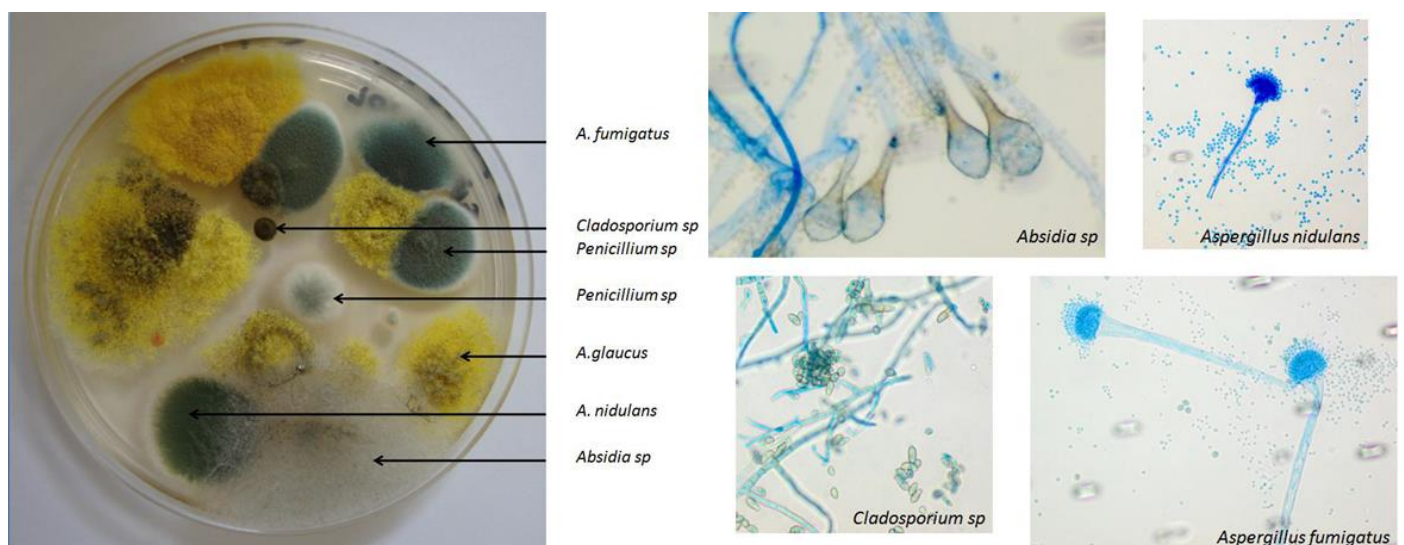


FIGURE 7 : MOISSURES OBSERVEES SUR MILIEU DG18 (A GAUCHE) ET AU MICROSCOPE (X400) (A DROITE) (PHOTOGRAPHIES STEFFI ROCCHI).

3) Les composantes responsables d'effets cliniques et leurs effets sur la santé

Les capacités d'aérosolisation des spores de moisissures, dues à la présence d'une couche superficielle de protéines hydrophobes (hydrophobines), permet leur présence en suspension dans l'air que nous respirons. L'exposition aux spores de champignons, au sein de l'environnement intérieur, peut donc se faire principalement par inhalation même s'il existe une exposition cutanée et par ingestion. Une fois présentes dans les voies aériennes, les spores étant de petite taille (2 à 10 μm), vont pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Eduard, 2009). En plus des spores, des fragments de différentes tailles vont pouvoir se déposer au niveau des voies aériennes. Les moisissures sont composées de multiples éléments responsables d'effets cliniques. C'est le cas de substances émises par les moisissures mais aussi de constituants des parois des spores et du mycélium. Parmi ces substances et éléments fongiques responsables d'effets sur la santé, il y a les glucanes, les allergènes, les composés organiques volatils d'origine microbienne (COVm) ainsi que les mycotoxines. Ceux-ci peuvent avoir des effets immunologiques, infectieux, irritatifs et toxiques. Cependant, les effets des moisissures sur la santé des habitants des logements sont fonction de l'exposition (mode et importance), de la nature de l'agent causal (allergènes, glucanes, mycotoxines, ...) ainsi que des individus exposés (santé, âge, ...).

a. Les effets immunologiques

Les moisissures peuvent être la cause de pathologies allergiques telles que l'asthme, la rhinite, la dermatite, la bronchite allergique, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Elles ont été mises en avant dans des allergies qu'elles soient immédiates (type IgE médiées) ou retardées (IgG). En effet, les logements présentant des problèmes d'humidité et donc de contamination aux moisissures sont associés à une augmentation significative des phénomènes respiratoires (Fisk et al., 2007). Diverses substances et éléments constitutifs des spores ont été identifiés comme allergènes dont des protéines, des polysaccharides et des lipopolysaccharides (Husman, 1996). Certains genres de moisissures, parmi les plus fréquents en environnement intérieur, comme *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium* sont connus comme potentiels producteurs d'allergènes. Une forte contamination en spores de moisissures dans l'habitat peut induire une augmentation des symptômes allergiques (sifflements, dyspnée, asthme) (Kasznia-Kocot et al., 2010) et l'allergie due aux moisissures toucherait jusqu'à 10 % de la population mondiale (Hamilos, 2010). En milieu industriel ou rural, une exposition chronique à des poussières organiques et à des moisissures peut aussi

induire la production d'anticorps spécifiques (IgG). Cette exposition peut causer une pneumopathie d'hypersensibilité (alvéolite allergique extrinsèque) telle le « poumon du fermier », qui est une maladie professionnelle connue dans le monde agricole (Reboux et al., 2001).

b. Les effets infectieux

Certaines moisissures environnementales peuvent être responsables d'infections comme les mycoses invasives touchant plus particulièrement les personnes immunodéprimées (leucémie, lymphome, greffe de moelle ou d'organes, ...). L'infection fongique invasive (IFI) la plus fréquente est l'aspergillose invasive. Faisant suite à une allogreffe principalement mais aussi à une autogreffe, celle-ci est en augmentation depuis le début des années 90 et est particulièrement présente en milieu hospitalier. Elle est causée par des moisissures thermophiles du genre *Aspergillus* telles qu'*Aspergillus fumigatus* qui est l'espèce pathogène la plus fréquente. D'autres *Aspergillus* peuvent également être impliqués (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, ...) ainsi que d'autres genres (*Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium*, *Acremonium*, ...) (Garcia-Vidal et al., 2008 ; Reboux et al., 2010). Ces espèces sont, dans ce cas, appelées opportunistes. Les conidies d'*Aspergillus* sont de petite taille (2 à 3 µm), hydrophobes (dispersibles dans l'air) et faiblement exigeantes en nutriments. Elles peuvent coloniser un patient immunodéprimé en atteignant les alvéoles pulmonaires. L'aspergillose invasive est mortelle dans 70 à 93 % des cas un an après le diagnostic (Upton et al., 2007) et la colonisation des voies aériennes a pour conséquence une obstruction pulmonaire qui est également fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose (Steffi Rocchi et al., 2015).

c. Les effets irritatifs et toxiques

Les moisissures, de par leur composition ou les produits qu'elles libèrent peuvent être la cause d'effets irritatifs et/ou toxiques.

Que ce soit au niveau des spores ou des fragments d'hyphes, la présence de glucanes (β-1,3-glucanes) peut avoir des conséquences d'un point de vue irritatif. Ces sucres complexes sont de haut poids moléculaire, sont non solubles, sont présents dans les parois de la plupart des moisissures et ont des effets irritatifs (C Tischer et al., 2011).

Les moisissures produisent des COVm qui sont associés à l'odeur dégagée par ces micro-organismes. Il en existe plus de 200 tels que les alcools, aldéhydes, esters, terpènes,

Du fait de leur forme volatile, ils sont capables de traverser les cloisons et les matériaux du bâtiment et ainsi affecter ses habitants. Une exposition aux COVm peut alors avoir des effets irritatifs sur les yeux, le nez et la gorge (Wålinder et al., 2008). Cependant, le milieu intérieur est complexe et l'interaction avec les COV des matériaux de construction rend le dosage des COVm difficile (Reboux et al., 2011). Le rôle inflammatoire des COVm a néanmoins été démontré chez la souris (Korpi et al., 1999).

Les moisissures produisent également des mycotoxines dans certaines conditions. Ces métabolites secondaires sont des composés chimiques de faible poids moléculaire. Parmi les moisissures émettrices de mycotoxines, on retrouve les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stachybotrys*, ... (Seltzer and Fedoruk, 2007). Elles sont retrouvées principalement dans les produits issus de l'agriculture (graines, céréales, viande, œufs, lait, ...). Une fois ingérées, elles peuvent entraîner des mycotoxicoses avec des effets néfastes (hépatotoxiques, neurotoxiques, mutagènes, tératogènes et carcinogènes). La moisissure connue pour causer des mycotoxicoses : *Stachybotrys charatrum*, est considérée comme l'une des plus toxigéniques.

3. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants microscopiques. Procaryotes, elles sont présentes dans tous les milieux. Le plus souvent unicellulaires, elles peuvent aussi être pluricellulaires (généralement filamenteuses) et former des colonies agglutinées (biofilm). Les bactéries sont présentes sous de nombreuses formes : sphériques (coques) ou en bâtonnets (bacilles) et il en existe près de 10 000 espèces connues. L'estimation réelle du nombre d'espèces se situerait entre 5 et 10 millions. La plupart de ces bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses. Parmi les bactéries présentes dans notre environnement et en particulier dans notre habitat, trois familles potentiellement responsables de pathologies respiratoires allergiques nous intéressent. Ce sont les familles des actinobactéries, des entérobactéries et des mycobactéries non tuberculeuses.

Les actinobactéries sont des bactéries gram positif que l'on retrouve principalement dans les sols. Elles forment, comme les moisissures, des spores et des mycéliums et on peut les retrouver également dans nos logements. Les actinomycètes tels que les genres *Streptomyces*, *Sacharopolyspora* ou *Saccharomonospora* (Figure 8) peuvent se développer

sur des supports de notre environnement et être détectés dans les poussières de nos logements (Rintala et al., 2004).



FIGURE 8 : ACTINOMYCETE THERMOPHILE (*SACCHAROMONOSPORA GLAUCA*) CULTIVE SUR MILIEU R8 (PHOTOGRAPHIE CAROLINE JAMET).

Les entérobactéries (*Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp.) sont des bactéries gram négatif omniprésentes dans notre environnement. Leur particularité est que leurs parois contiennent des endotoxines qu'elles sont susceptibles de libérer lors de leur dégradation. Les endotoxines, recherchées pour leurs effets toxiques et irritatifs pour les muqueuses des voies aériennes dans le cas des pneumopathies d'hypersensibilité (Eduard et al., 2012), ont été retrouvées dans nos logements où des corrélations avec les bactéries gram négatif ont été constatées (Adhikari et al., 2014).

La famille des mycobactéries possède un seul genre : *Mycobacterium*. Il est nécessaire de différencier les mycobactéries tuberculeuses telles que le bacille de Koch (agent de la tuberculose) et les mycobactéries à croissance rapide. Ces dernières peuvent être présentes dans des logements ayant des problèmes d'humidité et leurs effets néfastes d'un point de vue clinique ont été mis en avant pour *Mycobacterium immunogenum* dans le cas de la pneumopathie d'hypersensibilité dite du « poumon de mécanicien » (Roussel et al., 2011).

4. Interactions acariens/moisissures

Les acariens et les moisissures interagissent dans notre environnement et le rôle de cette relation dans le développement des maladies respiratoires reste peu étudié. Les acariens se nourrissent de spores et peuvent les transporter sur leur corps (McGinnis, 2007). Peu mise

en avant dans les logements, cette relation est plus étudiée dans le monde agricole et notamment le rôle de vecteur qu'auraient les acariens glycyphagydae dans la contamination des réserves céréalières (Hubert et al., 2003). Selon Colloff, l'interaction entre les acariens et les moisissures serait une vraie relation symbiotique (2010) (Figure 9).

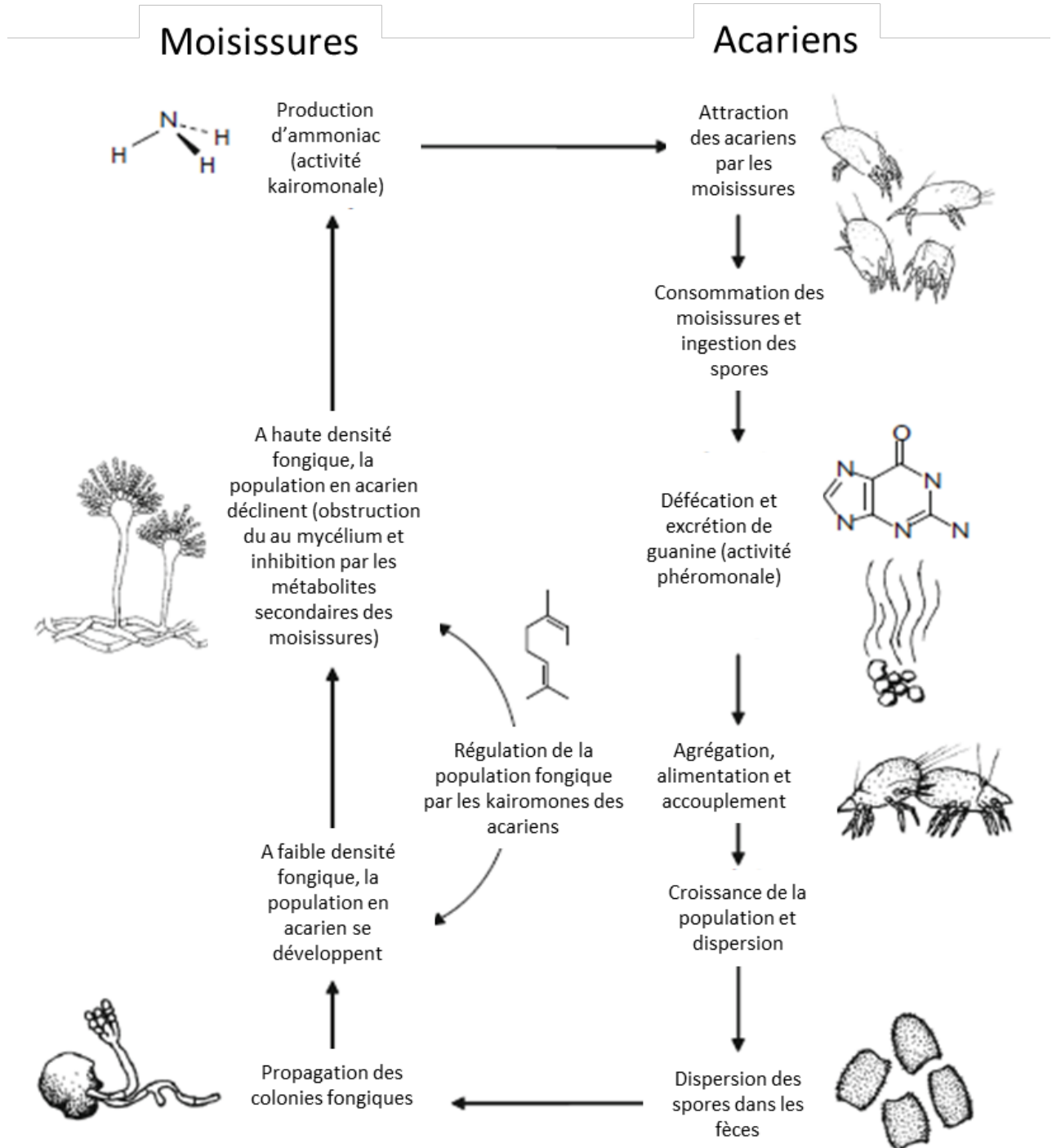


FIGURE 9 : MODELE CONCEPTUEL DE LA RELATION ENTRE LES ACARIENS DOMESTIQUES ET LES MOISSURES (COLLOFF, 2010).

1) Lieux de vie et conditions communs

Il existe plus de 50 000 espèces d'acariens et plus de 120 000 espèces de moisissures connues. Cependant, on ne retrouve qu'une vingtaine d'acariens (Colloff, 1998) et une centaine de moisissures dans nos logements. Les acariens pyroglyphidae *D. pteronyssinus* et *D. farinae* colonisent principalement la literie et les tapis où ils retrouvent des conditions d'humidité et de températures qui favorisent le développement des moisissures. En revanche, les acariens glycyphidae *A. siro*, *L. destructor* et *G. domesticus* colonisent surtout les réserves alimentaires de nos cuisines où les moisissures y trouvent des supports à leur croissance (fruits, céréales, déchets organiques) et des conditions hydriques favorables. Le microbiome des logements est constitué principalement des genres *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus*.

2) Aspect nutritionnel : sélection des moisissures et influence sur la vie des acariens

En se nourrissant des moisissures, les acariens sont susceptibles de les sélectionner. En effet, par leurs choix alimentaires, ils sont capables de s'orienter vers les moisissures leur apportant les nutriments essentiels à leur développement.

Selon Van Bronswijk, *Aspergillus amstelodami* prédigère les squames humaines et les tissus kératinisés et permet ainsi aux acariens d'utiliser les acides gras comme nutriments tout en facilitant leur digestion (VanBronswijk and Sinha, 1973). Ces acides gras, les acariens ont la capacité de les détecter dans les sources d'alimentation et certains de ces acides gras auraient même des propriétés phéromonales (Sato et al., 1993). Les lipides ont un rôle vital dans la vie des acariens mais ils sont souvent sous-estimés par la communauté scientifique. En effet, ils jouent un rôle au niveau de la communication, des hormones, du métabolisme, de la reproduction, de la réponse immunitaire, des phéromones et des kairomones, de l'imperméabilité de la cuticule, d'agents antimicrobiens ainsi que dans le stockage de l'énergie (Colloff, 2010).

Dans le cas des acariens de stockage *A. siro*, la consommation de moisissures va entraîner la libération de guanine au moment de la défécation. Cette guanine va avoir aussi un rôle de phéromone favorisant l'accouplement des acariens (Colloff, 2010). De Saint Georges-Grédelet a pu également mettre en avant les apports en vitamines B et D des moisissures dans l'alimentation des acariens de la poussière domestique (1987).

Les choix de consommation de certaines spores par les acariens pourraient également être liés à leurs qualités physiques (taille, résistance à la pression due à la chitine, mélanine) ou à la sécrétion de substances par les moisissures permettant leur défense. L'émission de COV_m reconnus comme néfastes pour les Drosophiles (Inamdar and Bennett, 2013) ou encore de mycotoxines joueraient probablement un rôle dans l'effet répulsif de certaines moisissures vis-à-vis des acariens. Ainsi *Stachybotrys* et *Aspergillus versicolor* sont connus pour leur capacité à émettre de puissantes mycotoxines. Dans l'autre sens, les moisissures produisent des composés ammoniaqués qui auraient une activité kairomonale. En effet, les acariens vont alors être attirés par les moisissures (Colloff, 2010).

3) Transports et dégradation des spores

Pendant longtemps, on pensait que les moisissures ne se propageaient que par les flux d'air. Mais en se nourrissant des spores, les acariens contribuent ainsi à la propagation ou à l'élimination des moisissures. En effet, lorsque les acariens traversent un « champ » de moisissures, les spores vont se coller au corps et aux pattes par dizaines et vont pouvoir ainsi être dispersées. On estime à plus de 50 spores (le plus souvent de 2 à 4 µm de diamètre) la capacité de transport d'un seul acarien (250 µm de long environ) pénétrant au sein d'une colonie fongique d'*Aspergillus* ou de *Penicillium*.

De plus, des spores viables vont également être retrouvées dans les fèces des acariens et compte-tenu du nombre d'acariens (jusqu' à plus de 1000/g de poussières de matelas) (Korsgaard, 1998), la consommation quotidienne de certaines espèces pourrait expliquer, en partie, un déséquilibre de la flore fongique dans certains logements. La lutte contre les acariens (suppression des tapis, et utilisation de housses anti-acariens) modifie l'environnement intérieur des patients allergiques et a, par conséquence, une incidence sur la composition de la flore fongique intérieure.

Ainsi, au début des années 2000, Hubert et ses collaborateurs ont montré qu'au sein des silos à grain, *Penicillium brevicompactum* est propagé par *A. siro* et *Tyrophagus putrescentiae*; *Aspergillus candidus*, *A. versicolor* et *Scopulariopsis brevicaulis* par *A. siro* et *L. destructor*; *Cladosporium cladosporoides* par *Cheyletus malaccensis* (Hubert et al., 2004).

Le fait que les acariens consomment les spores de moisissures a aussi un impact sur les colonies fongiques. Il a été montré, *in vitro*, que la présence d'acariens de stockage *A. siro*

avait un impact négatif sur la croissance de *Fusarium poae* après 21 jours (Nesvorna et al., 2012).

Cependant, l'influence des acariens sur la dispersion des spores est complexe. Elle est dépendante non seulement de l'espèce d'acarien (Hubert et al., 2003) mais aussi de la nature des moisissures et des composés émis (Van Asselt, 1999).

II. Les problèmes de santé publique liés aux acariens et aux micro-organismes

1. L'asthme

Comparé à d'autres maladies chroniques, l'asthme a un taux de létalité relativement faible. Cette maladie sévit dans tous les pays mais la plupart des décès qui lui sont imputables surviennent dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires. L'asthme ne se guérit pas facilement mais on peut limiter les troubles et assurer une qualité de vie satisfaisante à ceux qui en souffrent. De nos jours, on estime que 300 millions de personnes souffrent d'asthme dans le monde. En France, l'asthme touche en moyenne un enfant sur dix et engendre un coût très important pour la société, estimé à 1,5 milliard d'euros par an (Doz et al., 2013). Ces dernières décennies, la prévalence de l'asthme a continuellement augmenté et a doublé depuis les années 60 dans les pays industrialisés (Eder et al., 2006) (Figure 10).

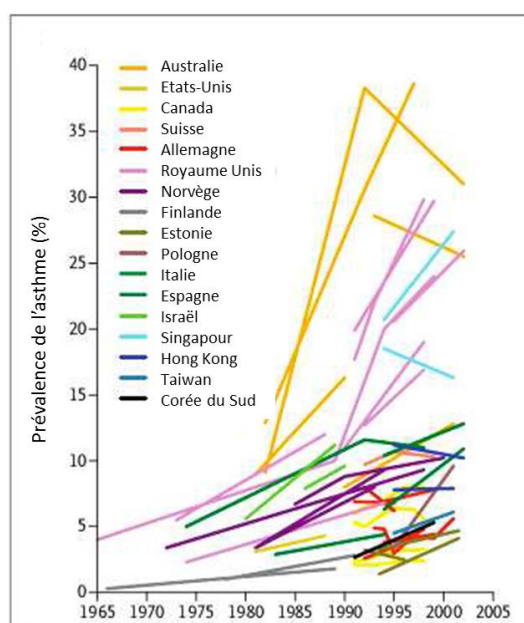


FIGURE 10 : ÉVOLUTION DE LA PRÉVALENCE DE L'ASTHME DANS LE MONDE CES DERNIÈRES DÉCENNIES (ÉDER ET AL., 2006).

1) Définitions

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'asthme est une maladie chronique dont la gravité et la fréquence varient d'une personne à l'autre. Cette maladie se caractérise par des crises récurrentes où l'on observe des difficultés respiratoires et une respiration sifflante ("OMS | Asthme,"). L'asthme n'est pas la cause d'un unique facteur. Il s'agit d'un syndrome multifactoriel pouvant se déclencher sous l'influence de facteurs variant d'un patient à l'autre et même chez un même patient à différents moments de sa vie. Par le passé, il existait deux types d'asthme : extrinsèque (allergique) et intrinsèque (non allergique). Aujourd'hui, on, parle de trois types d'asthmes : allergique IgE médié lorsqu'il est prouvé que les IgE sont à l'origine des réactions allergiques, allergique non IgE médié lorsque ce sont les lymphocytes T qui vont reconnaître l'antigène et induire la lyse de la cellule infectée et non allergique lorsqu'aucun mécanisme allergique n'est impliqué.

2) Symptômes

L'asthme peut s'exprimer de différentes manières. La plus fréquente est la crise avec sifflements se produisant à l'expiration. Elle est caractérisée par des épisodes de dyspnée sibilante survenant le soir ou dans la deuxième moitié de la nuit. Il s'agit d'une bradypnée expiratoire : l'expiration est difficile, lente et prolongée. La crise évolue en deux phases :

- La phase sèche est caractérisée par une bradypnée expiratoire qui réveille la personne brutalement par une impression d'étouffement. Au début de cette phase se crée un spasme de la musculature bronchique, un œdème de la muqueuse et une sécrétion d'un mucus épais et adhérent qui s'accumule dans les bronches. Il s'ensuit une obstruction des voies respiratoires. Tout l'air inspiré ne peut être expiré et reste dans les alvéoles. Le thorax est bloqué en inspiration.
- La phase humide catarrhale est le deuxième temps. Lorsque l'hypersécrétion des glandes muqueuses s'est déversée dans les bronches de petit calibre, les sibilants apparaissent. Ce sont des sifflements expiratoires facilement perçus par le malade.

Après un certain temps, avec ou sans traitement, la crise cesse et les sifflements persistent quelques heures.

La production d'un effort physique peut également provoquer un asthme. Cela peut être la seule manifestation de la maladie. La crise débute après la fin de l'exercice physique au

moment de la récupération et s'arrête en quelques minutes. Les causes peuvent être multiples : hyperventilation, libération des médiateurs chimiques, respiration d'un air froid et sec par la bouche.

3) Diagnostic

Le diagnostic de l'asthme est évoqué sur la clinique : toux, dyspnée aigüe sibilante, gêne thoracique et pose surtout des problèmes lors de la première crise d'asthme chez des personnes jusqu'alors épargnées. Le médecin va alors rechercher les antécédents familiaux d'allergie, d'asthme et d'eczéma, d'infections à répétition ayant entraînés une prescription d'antibiotiques, d'épisodes respiratoires stéréotypés, de crises lors d'expositions aux allergènes, d'amélioration après traitement.

Mais la variabilité de l'asthme, sa chronicité, et sa réversibilité nécessitent une exploration complémentaire indispensable : l'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). Les tests de provocation bronchique sont indispensables pour étudier les fonctions respiratoires et ainsi suivre l'évolution de la maladie années après années. Ces tests, rapides (20 minutes) et non invasifs ont pour but de mesurer différents volumes respiratoires à l'aide de spiromètres informatisés et permettent d'évaluer l'importance du déficit respiratoire, de rechercher les anomalies éventuelles, d'évaluer la réversibilité de l'obstruction et de suivre l'évolution de la maladie.

Il est proposé par la GINA (Global Initiative of Asthma) la valeur normale inférieure du rapport Volume Exploratoire Maximal à la première Seconde (VEMS)/Capacité Vitale Forcée (CVF) à 0,70-0,80 pour définir l'obstruction bronchique chez le patient asthmatique (GINA, 2006). L'EFR affirme clairement le diagnostic si elle montre un trouble ventilatoire obstructif réversible de 12 à 15% par rapport aux valeurs théoriques, d'au moins 180 ml en valeur absolue après un traitement par bêta-2 mimétiques de courte durée d'action. L'exploration fonctionnelle respiratoire n'est pas seulement utilisée pour le diagnostic mais est également recommandée pour le suivi médical des patients asthmatiques.

Un autre paramètre important dans le diagnostic et dans le suivi de l'asthme est le débit expiratoire de pointe (D.E.P.) ou *peak expiratory flow*. Le D.E.P. est mesuré par un débitmètre, simple d'utilisation, qui peut être utilisé chaque jour par le patient. Le D.E.P. mesure le souffle et est déterminé par rapport à l'âge, le sexe et la taille du patient. Une baisse

du D.E.P. par rapport à la norme théorique suggère une obstruction bronchique. La variabilité du D.E.P. définit la gravité de la crise d'asthme et la sévérité de l'asthme.

4) Traitements

La prise en charge de la maladie repose sur la prise en charge d'un certain nombre de médicaments. Le traitement de l'asthme comprend deux éléments :

- le traitement de la manifestation aiguë
- le traitement préventif de la survenue de la crise.

Les médicaments de la crise d'asthme doivent être actifs sur l'obstruction bronchique (broncho-dilatateurs) et sur l'inflammation des voies aériennes (anti-inflammatoires).

Les broncho-dilatateurs utilisés dans les cas d'asthme permettent le relâchement rapide du muscle lisse bronchique (famille des bêta-2-mimétiques). Pour traiter l'inflammation, les anti-inflammatoires utilisés sont des corticoïdes actifs dans le cadre d'un traitement préventif des asthmes allergiques.

Ces traitements sont utilisés seuls ou en association selon une stratégie basée sur les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) (HAS, 2004). Une fois le diagnostic de l'asthme fait, le médecin établit une prescription médicale individualisée, détaillée, qui permet au patient d'adapter ses traitements en cas de crise d'asthme. Le plan d'action est basé sur l'appréciation des symptômes ou sur la mesure du DEP.

Aux traitements médicamenteux de l'asthme s'associent des mesures d'éviction des allergènes présents dans l'environnement domestique du patient : élimination des poussières, diminution de la température ambiante, aération des pièces, éviction des animaux à poils (chiens ou chats), L'exposition à la pollution atmosphérique extérieure est un facteur parfois difficile à contrôler mais on conseille au patient asthmatique d'éviter de sortir pendant les pics d'ozone ou de ne pas faire d'efforts physiques importants. Le tabac et les substances irritatives contenues dans la fumée ont un effet néfaste et il est fortement déconseillé aux patients asthmatiques.

5) Mécanismes immunitaires

En réponse à un contact avec un élément étranger à l'organisme, le système immunitaire de chacun va réagir de manière différente. Ainsi, dans de nombreux cas,

l'organisme se défend contre les dysfonctions de ses cellules et les agressions par des processus qui ont pour conséquence de détruire des êtres vivants.

La présentation de l'allergène aux lymphocytes T *helper* est réalisée par les cellules présentant les épitopes. Lors de la première présentation d'un antigène, les lymphocytes Th0 appartiennent à une population lymphocytaire naïve vis-à-vis de la reconnaissance de cet antigène. Ces lymphocytes Th0 vont se différencier soit en suivant la voie Th1 soit la voie Th2 en fonction des cytokines présentes dans l'environnement cellulaire.

2. L'allergie

Les allergies respiratoires correspondent à un certain nombre de pathologies liées par des mécanismes immunologiques de divers types. Les plus fréquentes sont en rapport avec des mécanismes IgE-dépendants. Elles associent des manifestations aiguës (dégranulation des mastocytes en présence d'allergènes) et des manifestations chroniques (infiltration des muqueuses respiratoires par les cellules inflammatoires).

1) Définition

L'allergie consiste en une réaction anormale et excessive du système immunitaire de l'organisme suite à un contact avec un allergène qui est une substance d'origine protéique de l'environnement. Les allergènes sont des éléments de la vie quotidienne qui sont habituellement tolérés par la plupart des personnes. Lors d'un contact avec un allergène, l'organisme peut réagir excessivement : il s'agit alors d'allergie ou d'hypersensibilité.

Le terme « allergie » a été utilisé pour la première fois en 1906 par le pédiatre autrichien Clemens Von Pirquet qui a alors décrit le phénomène comme étant une réactivité spécifique altérée de l'organisme (Von Pirquet, 1906). Lors de cette première définition, il y inclut les réactions d'hypersensibilités et la baisse de réponse immunitaire qui deviendra obsolète par la suite car l'allergie est maintenant définie comme une hypersensibilité immunologique spécifique qui conduit à une maladie. Depuis 2004, l'organisation mondiale de l'allergie (World Allergy Organization) a proposé une nouvelle définition expliquant que « l'allergie est une réaction d'hypersensibilité provoquée par des mécanismes immunologiques. L'allergie peut être médiée par des anticorps ou par des cellules. Le plus souvent, les anticorps responsables appartiennent à la classe des IgE et les patients souffrent d'une allergie IgE-médiée. Les allergies associées aux IgE ne surviennent pas uniquement

chez les patients atopiques. Dans le cas d'allergies non IgE-médiées, les anticorps peuvent être des IgG. C'est le cas de l'anaphylaxie due aux complexes immuns contenant du dextran. L'intervention d'IgG est aussi notée aux cours des réactions dites de type III. Ainsi, on peut trouver à la fois des IgE et des IgG dans les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA). L'allergie de contact est représentative des allergies médiées par les lymphocytes » («World Allergy Organization | Allergic Diseases Resource Center»).

A la fin du XIXème siècle (découverte des mastocytes) et tout au long du XXème siècle (découverte de l'histamine, de la cortisone, des anti-IgE et définition de l'allergie, de l'atopie, ...), de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension de l'allergie.

2) Symptômes

Il existe plusieurs formes de symptômes de l'allergie :

- Les formes cutanées (eczéma, dermatite atopique, urticaire, ...)
- Les formes pulmonaires (asthme, pneumopathies)
- Les formes oculaires (conjonctivite, kératite)
- Les formes oto-rhino-laryngologiques (rhinite, sinusite)
- Les formes digestives (vomissement, diarrhée, douleur abdominale)
- Les formes hématologiques (anémie, thrombopénie, leucopénie, hyperéosinophilie)

Lors d'une crise allergique, il peut y avoir différents niveaux d'expression :

- Une gêne respiratoire avec ou sans éternuements
- Une sensation de malaise avec vertiges, syncopes et évanouissements
- De l'urticaire dû aux piqûres d'insectes, aux médicaments, du latex, certains produits de beauté
- Un œdème, un gonflement des lèvres, des paupières, des doigts ou des démangeaisons dans tout le corps
- Un choc anaphylactique qui est une réaction extrême et brutale pouvant entraîner la mort

3) Diagnostic

Les allergènes sont des antigènes responsables de réactions exagérées faisant intervenir les IgE et les IgG. Parmi les allergènes les plus fréquents, on retrouve la poussière, les pollens, les spores de moisissures ou encore les poils d'animaux. La réaction allergique ne

se produit que très rarement au premier contact. En effet, les cellules responsables de l'allergie deviennent hypersensibles même si le premier contact n'a pas entraîné de réactions visibles. Aux contacts suivants, l'allergène déclenchera une cascade de réactions aboutissant à une manifestation allergique. Au contact de ces allergènes, les mastocytes vont libérer des molécules chimiques comme l'histamine (vasodilatation, bronchoconstriction ou prurit), la sérotonine (augmentation de la perméabilité vasculaire et inflammation), les leucotriènes (vasodilatation et bronchoconstriction) et les prostaglandines (vasodilatation, bronchoconstriction et induction de la contraction des muscles lisses).

Il existe également un phénomène d'allergies croisées à des allergènes ayant une séquence d'acides aminés identique. Dans ce cas, la réaction de l'organisme peut se faire dès le premier contact sans qu'il y ait eu de sensibilisation préalable. Il peut donc notamment y avoir une réaction croisée entre les acariens, les escargots et les crevettes.

4) Traitements

Afin de lutter contre l'allergie, quatre types de traitements sont proposés aux patients :

- La première mesure pour lutter contre les manifestations allergiques est l'évitement. Ainsi, en fonction du calendrier et des pollens, il est possible d'utiliser un masque anti-pollens pour limiter le risque dû à l'exposition. Le fait d'aérer régulièrement les logements ou encore de privilégier la serpillère à l'aspirateur, d'éviter les moquettes et les tapis permet également de lutter contre les allergies aux acariens. Enfin, en cas d'allergie aux animaux domestiques, il est possible d'éviter tout contact avec ceux-ci ou alors de frotter le pelage chaque jour avec un chiffon humide.
- La prise d'antihistaminiques comme la cétirizine ou la méquitazine est conseillée dans certains cas d'allergie. Ils agissent directement sur le mécanisme de l'allergie en se fixant sur les récepteurs à histamine des cellules et en inhibant les effets vasodilatateurs de l'histamine.
- La prise d'anti-inflammatoires locaux permet aussi de traiter les symptômes. Dans les cas particulièrement préoccupants, il peut être prescrit des corticoïdes et en cas de choc anaphylactique ou d'œdème, de l'adrénaline.
- La désensibilisation peut aussi être envisagée afin d'induire une tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'allergène.

5) Mécanismes immunitaires

Comme évoquer dans le cas de l'asthme, le système immunitaire va réagir de manière différente selon chacun. La défense de l'organisme va alors s'orchestrer afin de lutter contre les agressions.

La première étape de la cascade d'évènements aboutissant à la manifestation allergique est la fixation de l'allergène à son récepteur spécifique sur la paroi de la cellule lymphocytaire T *helper* (Th). La poursuite de l'activation du système immunitaire nécessite une co-stimulation et la présence d'un ensemble de cytokines favorisant une orientation des sous-populations lymphocytaires (Th1, Th2, Th17 ou Treg).

3. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

La BPCO est une pathologie avec obstruction progressive des voies respiratoires. Selon les estimations de l'OMS en 2005, 80 millions de personnes avaient une BPCO modérée à sévère et plus de 3 millions de personnes en sont mortes, soit 5% de décès toutes causes confondues dans le monde ("OMS | Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)"). C'est la seule cause de mortalité en constante augmentation ces dernières décennies et 9 à 10 % des adultes de plus de 40 ans en seraient atteints dans le monde (Halbert et al., 2006). De plus, la population potentiellement à risque était initialement associée à des fumeurs de plus de 40 ans, mais elle pourrait s'étendre aux personnes de moins de 40 ans (de Marco et al., 2004). La BPCO reste sous-estimée, sous diagnostiquée et sous traitée. Elle a un effet majeur sur l'état de santé et les patients atteints de BPCO sont également sujets aux dépressions, maladies cardiovasculaires et infections (Sin et al., 2006). Cela contribue également à une morbidité et une mortalité élevée.

Du fait de sa prévalence importante et de son potentiel invalidant, la BPCO a un fort coût économique et social. Sa prise en charge est multifactorielle et le coût de prise en charge varie, en Europe, de 522 à 3196 \$ par patient et par an (Wouters, 2003). La morbi-mortalité de la BPCO va continuer d'augmenter dans les prochaines décennies et elle pourrait devenir la 3^e cause de mortalité dans les pays industrialisés à l'horizon 2020.

1) Définition

La BPCO est une "maladie évitable et traitable, caractérisée par une obstruction ventilatoire non complètement réversible, souvent progressive et associée à une réponse

inflammatoire anormale des bronches à des particules ou gaz nocifs” (“Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD,” 2015).

Cliniquement, la BPCO est définie à partir de résultats d’exploration fonctionnelle et/ou la présence de symptômes de toux et expectoration quotidienne, pendant trois mois et au moins deux années consécutives.

En épidémiologie, la BPCO est définie à partir des données d’exploration fonctionnelle, notamment le rapport du VEMS sur la capacité vitale (CV) ou encore la limite inférieure de la normale (LLN). La valeur du rapport VEMS/CV en dessous de laquelle une personne est considérée comme BPCO est controversée mais il se dégage néanmoins un standard avec la valeur rapport VEMS/CV <70% (“Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD,” 2015).

En absence de donnée d’exploration fonctionnelle, l’identification des BPCO peut se faire sur la présence des symptômes suivants : toux, expectorations et essoufflement. Les patients BPCO définis à partir de la présence des symptômes de toux et expectoration sont considérés comme des bronchites chroniques qui sont la phase initiale de la BPCO. Cependant, tous les patients atteints de bronchite chronique ne développent pas une BPCO.

2) Diagnostic

Les patients atteints de BPCO sont sujets à des troubles ventilatoires obstructifs non réversibles malgré la prise en charge.

En premier lieu, il s’agit de confirmer la BPCO via un diagnostic positif. Il repose, par une partie interrogatoire, sur la recherche de symptômes tels que la toux (chronique, quotidienne, matinale au début de la maladie puis journalière), les expectorations (chroniques, muqueuses à purulentes, peu abondantes) ou la dyspnée (persistante, progressive) ; la recherche de facteurs de risque (tabac, aérocontaminants, ...) ; la recherche des antécédents (bronchites répétées, familiaux) et sur l’examen physique.

Ensuite, en cas de BPCO, le diagnostic de sévérité va lui être plus complet. Il repose sur une évaluation de la dyspnée par questionnaire standardisé, un examen clinique (inspection du patient, auscultation et examen cardio-vasculaire), une imagerie (thorax, cœur, artères pulmonaires, trame, parenchyme et bronches) avec radiographie et scanner thoracique,

un examen biologique sanguin, une EFR (spirométrie), un bilan sanguin des gaz, un examen cardio-vasculaire et une épreuve d'effort.

Afin de déterminer l'obstruction bronchique, la spirométrie reste la meilleure solution. Le rapport VEMS/CV définit le syndrome obstructif et la valeur VEMS spécifie le degré d'obstruction. C'est à partir de ce degré d'obstruction qu'une classification est possible selon les stades de sévérité mais cette classification varie selon les définitions. Le standard actuel ("Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD," 2015), classe les patients en quatre stades de sévérité selon la valeur de leur VEMS :

- GOLD I (Faible) : VEMS/CV $< 0,70$ et VEMS $\geq 80\%$ prédite
- GOLD II (Moyen): VEMS/CV $< 0,70$ et $50\% \leq \text{VEMS} < 80\%$ prédite.
- GOLD III (Sévère): VEMS/CV $< 0,70$ et $30\% \leq \text{VEMS} < 50\%$ prédite.
- GOLD IV (Très sévère): VEMS/CV $< 0,70$ et VEMS $< 30\%$ prédite.

Cette classification reflète l'état de santé du patient mais ne prend pas en compte la fréquence et la sévérité des symptômes. C'est pourquoi des études recommandent la prise en compte de paramètres tels que l'âge, l'essoufflement, l'indice de masse corporelle, l'activité physique, le statut tabagique et les exacerbations (Celli et al., 2004; Jones et al., 2009).

3) Traitements

En cas de BPCO, le premier traitement est de limiter l'exposition aux aérocontaminants (arrêt du tabac, port d'un masque en cas d'exposition professionnelle). Afin de limiter l'impact de l'obstruction des bronches, des médicaments favorisant leur dilatation sont souvent prescrits. Des séances de kinésithérapies respiratoires peuvent aussi permettre une meilleure respiration en éliminant les sécrétions bronchiques et il est fortement conseillé de maintenir une activité sportive adaptée. En cas d'exacerbation, des antibiotiques peuvent être prescrits de manière à limiter le risque d'infection pulmonaire. Chez les patients en insuffisance respiratoire, l'oxygénothérapie peut permettre de maintenir un niveau d'oxygène suffisant pour l'organisme.

D'un point de vue purement médicamenteux, les médicaments visent à diminuer les signes de la maladie et non à en guérir. Parmi ceux-ci, on retrouve différentes classes de bronchodilatateurs et des corticoïdes.

Les bronchodilatateurs sont prescrits pour soulager les symptômes de la BPCO et appartiennent à deux familles de médicaments : les bêta-2-stimulants qui luttent contre la contraction des muscles des bronches et les anticholinergiques. Il existe des bronchodilatateurs à courte durée d'action pour les périodes d'aggravation de la gêne respiratoire et à longue durée d'action pour le traitement de fond de la BPCO.

Les corticoïdes sont destinés à diminuer l'inflammation des bronches. Dans le cas de la BPCO, ils sont toujours associés à la prise de bronchodilatateurs de type bêta-2-stimulant.

4) Mécanismes

Face à la quantité totale d'aérocontaminants inhalés par l'individu pendant sa vie, le système respiratoire dispose d'une capacité de réponse immune et inflammatoire, innée et adaptative (Hogg, 2004).

a. La réponse innée

Elle se manifeste par la toux et l'expectoration et elle est basée sur deux mécanismes :

- le tapis muco-ciliaire et le système monocyte/macrophage pour remonter les particules déposées
- la barrière épithéliale, avec ses jonctions étroites (tight junction) entre les cellules épithéliales, qui sépare les tissus et l'espace aérien

Lorsque la barrière épithéliale est lésée par l'exposition chronique aux aérocontaminants, cela induit une réponse inflammatoire. Les phagocytes vont alors migrer et détruire les particules étrangères. Parmi les cellules jouant un rôle dans la réponse innée, on retrouve les polynucléaires, les éosinophiles, les macrophages, cellules "natural killer" et les mastocytes.

b. La réponse adaptative

Elle conserve la mémoire précise des antigènes solubles ou particuliers inhalés dans le poumon.

Les antigènes peuvent pénétrer un épithélium intact au niveau des tissus lymphoïdes associés aux bronches ou au niveau d'une lésion. Les cellules dendritiques prennent ces antigènes et les transportent aux tissus lymphoïdes ou aux ganglions lymphatiques régionaux.

L'antigène y est présenté à des groupes séparés de lymphocytes B ou T. Le signal transmis d'un lymphocyte T CD4 à un lymphocyte B activé par le même antigène induit une prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps. Certaines de ces cellules B vont devenir des cellules mémoires et retournent au site de la lésion.

Il existe plusieurs sous-populations qui participent à ce mécanisme :

- Th2 des CD4 sécrètent l'interleukine 4 qui conduit les cellules B à fabriquer des IgE, le TGF- β (transforming growth factor) et l'interleukine 5 qui conduisent les cellules B à produire de l'IgA
- Th1 des CD4 sécrètent l'interféron- γ qui active les macrophages qui détruisent les particules phagocytées
- lymphocytes CD8 sécrètent l'interféron- γ qui active les macrophages
- lymphocytes CD8 cytotoxiques reconnaissent les cellules nucléées infectées par des pathogènes intra-cellulaires et les détruisent.

c. Un mécanisme complexe

Le TNF- α et l'interleukine 1 β sont deux cytokines importantes qui initient et orchestrent la réponse innée en stimulant les cellules B et T. Ces deux cytokines induisent une réaction inflammatoire locale importante. Le TGF- β est lui aussi important et joue un rôle dans la transition de la réponse immune inflammatoire au processus de réparation. En revanche, seule l'interleukine 1 β stimule le dépôt de collagène associé au processus de réparation (Curtis et al., 2007).

Dans les cas de BPCO, il est fréquent de continuer à observer, même après arrêt des facteurs de risque, une accumulation progressive des cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative au niveau des voies aériennes, avec une fibrose péribronchique et une hypersécrétion muqueuse.

5) Facteurs de risque

Le risque de développer une BPCO est lié à une interaction entre des facteurs environnementaux et la susceptibilité génétique de la personne (Mannino and Buist, 2007). La cigarette, l'inhalation de polluants ou des irritants de l'environnement, le déficit en α 1-antitrypsine et les expositions professionnelles sont des facteurs de risque de la BPCO.

Dans une moindre mesure, la pollution de l'air intérieur et extérieur, la pauvreté, les facteurs nutritionnels, tels que les antioxydants, les acides gras polyinsaturés et le sel ; le tabagisme passif, l'âge, les facteurs familiaux et génétiques ; l'hyperréactivité bronchique ; les infections de l'enfance, et, éventuellement, un niveau élevé d'IgE à un jeune âge sont des facteurs pronostics positifs de l'obstruction des voies respiratoires (Yach et al., 2004).

Le rôle du sexe comme facteur de risque de la BPCO reste toujours controversé. Dans le passé, la plupart des études ont montré que la prévalence de la BPCO était plus élevée chez les hommes. Plus récemment, des études suggèrent une prévalence de la maladie égale, reflétant probablement l'évolution des modes de consommation de tabac.

4. L'hypothèse hygiéniste et les effets controversés des acariens et des micro-organismes

Les effets des micro-organismes dans les pathologies infectieuses sont décrits et connus. Au niveau des pathologies allergiques, la responsabilité des acariens est fortement avancée mais celle des moisissures est mal connue (Nevalainen et al., 2015). Au niveau des logements, il n'existe pas de seuils établis concernant des concentrations associées à un risque. Les effets des micro-organismes, qu'ils soient allergiques, irritatifs ou toxiques sont de plus en plus documentés mais les mécanismes mis en jeu restent méconnus (Seltzer et Fedoruk 2007).

1) Le concept de l'hypothèse hygiéniste

Lors d'une étude épidémiologique sur les relations entre la taille de la fratrie et la prévalence de la rhinite allergique, Strachan a proposé, en 1989, que les infections de la petite enfance, transmises par les frères et sœurs ou acquises *in utero*, étaient des facteurs de prévention du développement des maladies allergiques (Strachan, 1989). Il est à l'origine de l'hypothèse hygiéniste qui permet d'expliquer l'augmentation des maladies allergiques au sein de sociétés où le jeune enfant évolue dans un environnement surprotégé et est donc moins exposé aux facteurs environnementaux. Cette hypothèse a reçu, au cours des dernières années, une attention de plus importante et un nombre croissant d'études épidémiologiques ont cherché à mettre en avant les facteurs protecteurs ou aggravants des maladies allergiques. Partant du principe que les enfants qui entrent en contact avec des agents microbiens infectieux ou avec les produits du métabolisme des champignons ou des bactéries lors des premières années de la vie sont protégés contre l'apparition de l'asthme et des allergies,

diverses études ont vu le jour apportant des éléments en faveur ou non de la théorie hygiéniste.

2) Éléments en faveur de l'hypothèse hygiéniste

Selon Von Mutius, les micro-organismes de l'environnement intérieur pourraient avoir des effets bénéfiques sur les pathologies respiratoires (von Mutius, 2007). La raison pourrait être dans le fait que le développement des poumons et du système immunitaire se passerait surtout *in utero* et dans les premières années de la vie. L'exposition lors de ces deux périodes aurait une influence et entraînerait la différenciation des lymphocytes en Th1 (au lieu de Th2), ce qui induirait une protection contre les réactions allergiques (Kasznia-Kocot et al., 2010).

Des études ont montré que des enfants ayant grandi dans l'environnement agricole (ferme, animaux, lait non pasteurisé, boissons fermentées) développaient moins d'asthme et de sensibilisation allergique (Vacheyrou et al., 2011; von Mutius, 2007) que ceux n'ayant pas vécu dans cet environnement. Les raisons de cet « effet de ferme » ne sont cependant pas complètement connues. D'autres, ont également suggéré que les enfants inscrits en crèche développaient moins d'asthme que les autres enfants (Kasznia-Kocot et al., 2010) ou que la présence de β -1,3-glucanes et de polysaccharides extracellulaires était inversement proportionnelle à l'apparition de symptômes respiratoires. Ceux-ci auraient des propriétés stimulantes sur le développement du système immunitaire dans la période prénatale (C Tischer et al., 2011).

3) Éléments limitants de l'hypothèse hygiéniste

Des auteurs ont montré que moins de 50% des cas d'asthme étaient liés à un terrain atopique (Pearce et al., 1999) ou à une infiltration des voies respiratoires par les éosinophiles (témoin d'une allergie) (Douwes et al., 2002). La théorie hygiéniste y est alors mise à mal car elle ne permet d'expliquer qu'une partie des cas d'asthme.

D'autres auteurs ont suggéré qu'une exposition régulière et prolongée tout au long de la vie aux facteurs protecteurs pourrait être nécessaire pour maintenir une protection contre la maladie (Douwes et al., 2004). Cela va à l'encontre de cette hypothèse insistant sur l'importance des premiers mois de la vie.

Finalement, seul l'aspect concernant la période d'exposition semble être remis en cause et aucune de ces études ne contredit complètement l'hypothèse hygiéniste. En revanche,

elle ne semble pas pouvoir expliquer à elle seule l'augmentation de la prévalence de l'asthme ces dernières décennies (Douwes and Pearce, 2008).

4) Les autres effets controversés

Malgré les études favorables au fait que les enfants vivant dans des logements humides et contaminés par les moisissures aient plus de risque de développer des pathologies respiratoires, il n'existe pas de relation reconnue entre les seuils d'exposition, les quantités inhalées et l'apparition des symptômes allergiques (Kasznia-Kocot et al., 2010).

Ce fait est notamment contesté par divers études telles que celle de Bush qui, rapporte que parmi les 10 % de la population possédant des IgE dirigées contre les moisissures inhalées les plus courantes, seulement 5 % ont des symptômes allergiques (Bush et al., 2006). Selon lui, il existerait même des effets confondants avec d'autres allergènes comme les pollens ou les poils d'animaux.

Les effets des mycotoxines sont également controversés. Celles de *S. chartarum* ont été évoquées chez les chevaux (Drobotko, 1945) ainsi que chez l'Homme avec des cas d'hémosidéroses pulmonaires dans les années 90 aux Etats-Unis. Cependant, ces effets ont été atténués et restent aujourd'hui non confirmés. De plus, selon Seltzer et Fedoruck, les doses auxquelles nous sommes exposés dans nos logements sont trop faibles pour entraîner des effets lors de leur inhalation (Seltzer and Fedoruk, 2007). Seule leur ingestion en plus fortes quantités avec les aliments semblerait avoir un impact confirmé sur la santé.

Un autre effet difficile de mettre en relation avec la présence d'acariens et de micro-organismes est le SBS. Souvent considéré comme un syndrome psychogène, le SBS pourrait aussi être la cause d'une exposition aux polluants biologiques et/ou chimiques. Il existe des éléments en faveur du côté psychogène telle que l'étude de Handal qui montre qu'une fois que les problèmes de contamination aux micro-organismes dans les écoles étaient médiatisés, la perception des symptômes chez les enfants augmentait (Handal et al., 2004). La seule caractéristique commune dans ces épidémies semble être l'association systématique de symptômes non spécifiques et la présence de personnes dans des bâtiments, les causes et la propagation du phénomène collectif restant inexpliqués (Marchand et al., 2010).

III. La mesure de l'exposition en acariens et en micro-organismes en environnement intérieur

L'exposition aux acariens et aux micro-organismes est à l'origine de plusieurs enjeux de santé publique. Afin d'en étudier le risque, il est nécessaire de quantifier l'exposition des occupants au sein des logements. Néanmoins, les besoins en termes de mesures diffèrent selon le contexte environnemental.

1. Les méthodes de prélèvements

Jusqu'à présent, la mesure de l'exposition en acariens et en micro-organismes se faisait surtout de manière opposée. En ce qui concerne les acariens, les poussières domestiques étaient collectées par aspiration du matelas ou des sols avec une « chaussette » en nylon adaptable au tuyau de l'aspirateur ou en utilisant directement de nouveaux sacs pour chaque prélèvement. Pour les moisissures et les autres micro-organismes, diverses techniques ont été utilisées allant des prélèvements d'air aux poussières sédimentées afin d'améliorer la mesure de l'exposition.

1) Les prélèvements d'air

Les prélèvements d'air, jugés représentatifs de ce qui est inhalable par les occupants des logements ont longtemps été privilégiés pour la détection des moisissures. Cependant, selon Flannigan et plusieurs études, ces prélèvements d'air sont souvent difficiles (Flannigan, 1997). Il existe une forte variabilité dans la mesure des concentrations en moisissures dans l'air qui peut être la cause de la libération des spores provenant des tapis, des murs, des tissus et des autres surfaces. Cette variabilité dépend fortement des occupants du logement et leurs activités.

Les différences de taille, de structure et donc de vitesse de sédimentation des spores affectent également la composition en moisissures que l'on peut retrouver dans l'air. Hunter a montré que les grandes spores d'*Ulocladium* provenant des murs sédimentent rapidement, et ne peuvent donc être retrouvées dans l'air que si le prélèvement a lieu à courte distance de la perturbation ayant provoqué la mise en suspension (Hunter et al., 1988).

Les prélèvements d'air sont pourtant très utilisés par les scientifiques pour évaluer les concentrations en spores fongiques dans les logements. Il existe d'ailleurs différents types de

prélèvements d'air et des particules biologiques qui s'y trouvent (bioaérosol). Le choix du mode de prélèvement, du temps d'échantillonnage ou du nombre de prélèvements nécessaires doit donc se faire en fonction de la contamination supposée, du milieu et du type d'analyse qui sera utilisée sur les échantillons.

Il n'y a pas de méthode unique applicable à toutes les études en environnement intérieur et les différentes méthodes couramment utilisées sont les suivantes :

- La sédimentation est une méthode ancienne de faible coût, qui expose de façon passive un support nutritif à la chute naturelle des spores sous l'effet de la gravitation. Elle a été abandonnée en raison de limites importantes : dessiccation du milieu, pas de mesure du volume d'air, prélèvement affecté par la taille et la forme des spores (les grandes particules se déposant plus facilement).
- L'impaction sépare les particules du flux d'air en utilisant leurs propriétés d'inertie. Les particules sont impactées directement sur les milieux de culture. Elle ne permet donc pas la mise en évidence des spores non vivantes, des spores non adaptées au milieu de culture choisi, et le « stress » provoqué par le prélèvement peut rendre certaines spores non cultivables. Cette méthode existe également avec un recueil en milieu liquide (impinger) et permet un nombre plus varié d'analyse.
- La filtration où les particules sont recueillies à travers un filtre (fibre de verre, cellulose, téflon) disposé dans un porte-filtre et associé à une pompe aspirante de faible débit. Le filtre peut ensuite être examiné au microscope, mis directement en culture ou être rincé avec un liquide stérile, qui sera alors utilisé comme échantillon avec la possibilité de détecter acariens et micro-organismes par biologie moléculaire. Les inconvénients majeurs sont la perte de viabilité, essentiellement par dessiccation, et l'efficacité non parfaite du rinçage. De plus, la dilution induit une sélection des espèces les plus présentes au détriment des espèces moins représentées dans l'échantillon.
- Le biocollecteur en milieu liquide est un échantillonneur d'air, basé sur la technologie cyclonique. Son principe consiste à aspirer à un fort débit l'air et les particules aéropartées. L'air est entraîné dans un mouvement tourbillonnant à l'intérieur d'un cône. Ce mouvement engendre la centrifugation des particules sur les parois du cône et la formation d'un vortex de liquide qui balaie ces parois. Le liquide peut ensuite être utilisé pour la culture ou l'analyse en biologie moléculaire pour la recherche des acariens et des micro-organismes. Grâce à un débit d'air élevé, cette technique permet

une durée de prélèvement moindre mais présente des problèmes d'évaporation du liquide de collection.

- Le capteur individuel de poussière est un appareil autonome destiné aux prélèvements de poussières en vue d'en évaluer les teneurs susceptibles d'être inhalées par l'homme. L'échantillonnage de l'air est assuré par la rotation d'une mousse dont les alvéoles engendrent un débit d'aspiration de 10 l/min, similaire au débit respiratoire de l'être humain. Ces prélèvements d'air sont réalisés sur des temps très courts (de 10 minutes à 1h le plus souvent, jusqu'à 24 heures) et peuvent donc ne pas être représentatifs de l'exposition chronique. De plus, la mousse utilisée peut être rincée et l'échantillon liquide peut être utilisé, comme précédemment, en biologie moléculaire.

2) Les prélèvements de surface

Les prélèvements de surface peuvent être effectués à l'aide d'adhésifs, qui seront ensuite analysés au microscope, ou d'écouvillons qui pourront être rincés et analyser par culture ou biologie moléculaire. En revanche, ces prélèvements ne prennent pas en compte la facilité du champignon à se remettre en suspension, et ne sont donc pas révélateurs des quantités de spores inhalées (McGinnis, 2007).

3) Les prélèvements de poussières

Les prélèvements de poussières sont couramment utilisés que ce soit pour la détection des acariens (Beroiz et al., 2014; Wijga et al., 2014) ou pour les micro-organismes (Lignell et al., 2008; Pitkäranta et al., 2008). Celles-ci peuvent être collectées à l'aide d'un aspirateur puissant. L'aspiration est standardisée en temps et en surface. Ce type de prélèvement peut être réalisé au niveau des sols ou au niveau des tissus rembourrés tels que les matelas ou les canapés. Cependant, ils ne permettent une évaluation de l'exposition au long terme qu'au niveau des tissus non lavés dans la mesure où la poussière déposée au sol est nettoyée, plus ou moins fréquemment, par les habitants. De plus, ils ne représentent pas la fraction d'acariens et de moisissures « respirés » et la composition de la poussière déposée peut être très différente de celle de l'air. C'est notamment le cas pour les moisissures (Flannigan, 1997).

Certains auteurs ont utilisé des dispositifs pour recueillir de la poussière de manière passive dans les logements afin de déterminer les moisissures de notre environnement intérieur mais pas les acariens. Würtz et al. utilisent un dispositif constitué d'un support couvert d'une feuille d'aluminium et protégé par une grille. Laisse en place durant 140 jours, il

permet de recueillir la poussière, qui peut alors être pesée et exploitée pour la mesure des moisissures cultivables de l'environnement. L'étude montre que le dispositif est utilisable pour l'évaluation de la concentration en spores fongiques cultivables (Würtz et al., 2005).

Ce type de dispositif a également été choisi pour l'évaluation de l'exposition chronique aux endotoxines (Noss et al., 2008) et constitue les prémices du capteur électrostatique de poussière (CEP) utilisé dans nos études au laboratoire. Ce capteur est constitué d'un boîtier type « DVD » re-fermable et d'une lingette électrostatique stérile, que l'on peut trouver dans le commerce, placés dans un sac en plastique zippé (Scherer et al., 2014) (Figure 11).



FIGURE 11 : CAPTEUR ELECTROSTATIQUE DE POUSSIERE (EDC).

Il permet un prélèvement peu coûteux, peu invasif, facile d'utilisation, ne nécessitant pas de déplacement avec un retour par voie postale possible (Frankel et al., 2012), représentatif de l'exposition chronique aux micro-organismes et unique pour l'ensemble des acariens et des micro-organismes de l'environnement avec une analyse par biologie moléculaire après rinçage (Scherer et al., 2014).

2. Méthodes d'analyse

1) Le comptage microscopique

Depuis la découverte des différentes espèces d'acariens, leur dénombrement ainsi que leur identification se sont fait par comptage microscopique ou par observation à la loupe binoculaire (Boquete et al., 2006). Les poussières domestiques obtenues par aspiration sont

scrutées de manière à observer le nombre et les différentes espèces d'acariens présentes. Des grilles d'identification taxonomiques ont été créées (Colloff, 1998) et permettent de renseigner sur les populations d'acariens peuplant nos logements que ce soit au niveau des pièces de literie, des poussières domestiques ou des denrées alimentaires.

Le comptage microscopique est également utilisé pour le dénombrement et l'identification sommaire des moisissures. Les prélèvements obtenus par adhésifs sont ensuite observés au microscope et les spores présentes sont comptées et identifiées. Cependant, la simple présence de spores ne permet pas une identification efficace de l'espèce fongique car elle se limite qu'à certains genres dont les spores sont morphologiquement reconnaissables (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Ustilago*) (Reboux et Nolard, 2007). De plus, la zone de prélèvement, qui est souvent au niveau d'une contamination fongique visible, n'est pas forcément représentative de la contamination réelle de l'air des logements.

2) Le dosage colorimétrique

Cette méthode de dosage est uniquement utilisée pour le dosage des acariens de l'environnement domestique et est commercialisée sous le nom d'ACAREX[®] test. Ce test a été mis au point par Bischoff et Schirmacher et correspond à une technique colorimétrique simple permettant l'extraction et la quantification de la guanine présente dans les excréments d'acariens (Kouao-Bile et al., 1991). Régulièrement recommandé et utilisé dans les études sur la présence des acariens et de ses allergènes dans notre environnement (Saijo et al., 2007), ce test est comparé aux autres méthodes de mesure de l'exposition aux acariens (comptage, dosage des allergènes par ELISA).

Ce test est pratiqué directement sur les poussières obtenues par aspiration des sols ou des matelas et filtrées. Cette poussière fine est mélangée à un réactif (liquide d'extraction alcalin d'alcool) et une bandelette colorimétrique (imprégnée de diazonium) permet la classification en 4 concentrations d'acariens (van der Brempt et al., 1991):

- Nulle, couleur jaune et % de guanine > 0,01
- Faible, couleur beige et % de guanine > 0,06
- Moyenne, couleur ocre et % de guanine > 0,25
- Forte, couleur rouge et % de guanine > 1

3) La culture

La culture est une méthode « traditionnelle » utilisée pour l'analyse des moisissures mais elle permet aussi celle des bactéries, des levures et des actinomycètes. Elle offre une vision globale de la contamination du logement en micro-organismes mais ne tient pas compte des compétitions inter-espèces ni de la viabilité des spores fongiques. Or, les spores mortes, mais également les fragments de filaments mycéliens, peuvent provoquer des effets sur la santé (Górny, 2004). De plus, il n'existe pas de milieu idéal pour toutes les espèces et la culture est dépendante des milieux de culture utilisés, ainsi que de la température d'incubation. Le temps de développement des moisissures est long, certaines espèces sans ornementation sont difficilement identifiables et des compétitions entre espèces et des exigences nutritives différentes peuvent entraîner la non détection de certaines espèces (Pitkäranta et al., 2008).

La culture ne permet pas non plus d'observer les bactéries, les moisissures et les acariens à partir du même prélèvement. Bien qu'elle ait ses limites, la culture reste toutefois une approche facilement utilisable pour évaluer la contamination microbiologique dans un logement. Elle reste également irremplaçable pour la mise au point des nouvelles techniques de biologie moléculaire par exemple, car les souches de micro-organismes sont nécessaires à la validation des méthodes.

4) La PCR et la qPCR

Le concept de PCR (polymerase chain reaction), découvert en 1983 par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993), est une méthode sensible et spécifique permettant l'amplification exponentielle de 2 brins d'un segment d'ADN. C'est au cours d'un cycle de température que se produisent alternativement la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces spécifiques de l'espèce étudiée, et l'élongation par une enzyme : l'ADN polymérase.

Les produits d'amplification, lorsqu'ils sont en quantité suffisante, peuvent être mis en évidence par électrophorèse. La présence et la taille des amplicons peuvent ainsi être testées.

L'identification peut être réalisée, par exemple, par séquençage, avec l'élaboration de la séquence en acides nucléiques. Cette séquence peut alors être comparée aux autres séquences présentes au sein de la base de données. Cette technique fournit un nombre considérable d'informations. Pitkäranta et al. l'ont utilisée pour étudier la composition de la

poussière intérieure. Elle a permis de mettre en évidence des espèces jamais retrouvées par les autres techniques, mais elle peut s'avérer de manipulation et d'interprétations délicates en raison de lacunes dans les bases de données (Pitkäranta et al., 2008).

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en détectant le produit de PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait, en utilisant l'augmentation de l'émission de fluorescence produite au cours de l'amplification (Higuchi et al., 1992). La quantité de produit de PCR double à chaque cycle, suivant théoriquement la relation suivante : $N = N_0 \cdot 2^n$ (où N est le nombre final de molécules amplifiées, N_0 le nombre initial et n le nombre de cycles).

Le principe de la PCR quantitative en temps réel (qPCR) repose sur la mesure de la quantité d'amplicons à chaque cycle grâce à la mesure de la fluorescence émise par une molécule « reporter » de fluorescence. Cette molécule s'hybride à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' de la sonde. L'ADN polymérase, par son activité 5'exo-nucléasique, hydrolyse la sonde lors de la phase d'élongation. Le reporter est alors libéré de l'environnement du quencher, il y a ainsi émission de fluorescence, qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde.

On peut ainsi déterminer un « cycle seuil »: Ct (cycle threshold). Ce Ct correspond au point où le signal de fluorescence sera statistiquement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al., 1996). Il est inversement proportionnel au logarithme du nombre N_0 (Tse and Capeau, 2003).

La qPCR présente de nombreux avantages :

- Rapide : résultats obtenus en 1h30
- Unique : recherche des acariens, des moisissures, des bactéries, des actinomycètes à partir d'un échantillonnage unique
- Sensible : mise en évidence d'une fraction d'acariens (Roussel et al., 2013) et de moisissures à des concentrations non retrouvées par culture (Millon et al., 2006)
- Spécifique : elle dépend toutefois des amorces utilisées et de l'espèce étudiée
- Répétable : technique automatisée du dépôt des échantillons à la lecture des plaques

Cependant, la qPCR ne permet pas une approche globale, mais limitée aux espèces que l'on choisira d'étudier.

5) La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie. Si les techniques conventionnelles d'identification des différents germes se basent sur leurs aspects phénotypiques, il est possible aujourd'hui d'identifier les micro-organismes en analysant directement leurs protéines (Cassagne et al., 2011). Cette technique, premièrement utilisée pour l'identification des bactéries d'intérêt médical, est désormais applicable aux bactéries et aux champignons filamenteux de l'environnement.

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent divers domaines (biotechnologies, pharmacologie, environnement, ...).

Il existe plusieurs types de spectromètres de masse pouvant séparer des molécules plus ou moins grandes et leurs méthodes ont toutes en commun les étapes suivantes :

- Préparation et introduction de l'échantillon
- Ionisation des molécules d'intérêt
- Séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge
- Détection et amplification du signal
- Analyse des données et identification de la souche

Les premiers spectromètres de masse datent du début du XX^{ème} siècle pour l'identification des isotopes des éléments chimiques mais la technologie MALDI-TOF ne s'est développée qu'à partir des années 80.

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight). La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides.

C'est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur. Les grosses molécules mettent plus de temps à atteindre le détecteur que les petites molécules. Elles sont ainsi séparées en fonction de leur rapport masse/charge. Le détecteur envoie ensuite les informations enregistrées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre.

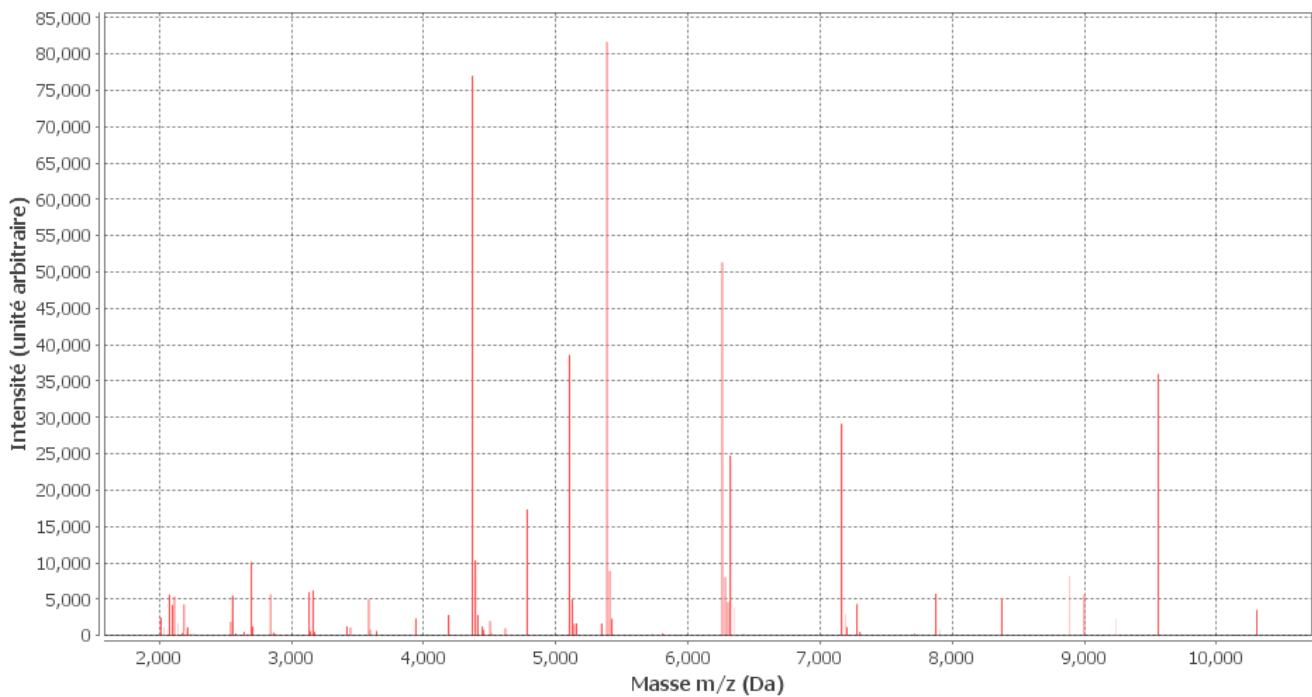


FIGURE 12 : SPECTRE MALDI-TOF.

Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule (Figure 12). L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique la taille de la molécule en Daltons.

L'appareil intègre les différents pics enregistrés et recherche dans la base de données (bactéries ou filamenteux) l'identification du micro-organisme correspondant.

Les avantages de cette technique sont nombreux (rapidité, simplicité, nécessité de petits volumes, faible coût) mais cette technique reste encore à améliorer (base de données incomplètes, et dépôt manipulateur dépendant).

6) La métagénomique

Plus récente, la métagénomique s'installe de plus en plus parmi les sciences du vivant. Il en existe plusieurs définitions : étude de l'ensemble des génomes issus d'un même milieu ou

encore étude des séquences d'acides nucléiques extraits d'un environnement donné, sans la connaissance des organismes dont elles proviennent. Le principe de la métagénomique étant d'analyser le pool génomique des communautés microbiennes sans avoir à isoler préalablement les micro-organismes, cette approche permet ainsi de mieux comprendre l'organisation des communautés microbiennes et le rôle écologique des micro-organismes qu'elles contiennent. Elle permet également de révéler les processus évolutifs des micro-organismes mettant parfois en évidence des événements de transferts horizontaux de gènes.

Aujourd'hui, la métagénomique s'appuie fortement sur les NGS (Next-Generation Sequencing pour séquençage de nouvelle génération) afin de réaliser du séquençage à très haut débit. Trois technologies NGS à haut débit sont apparues ces dernières années : le pyroséquençage (454 Life Sciences de Roche Diagnostics), le séquençage avec des terminateurs réversibles (HiSeq2000 Illumina/Solexa) et le séquençage par ligation (SOLiD™ Life Technologies). L'utilisation des NGS permet d'obtenir de plus en plus de données dans un laps de temps toujours plus court. Aujourd'hui, il est possible de générer des millions de nucléotides par jour contre 1000 dans les années 80 et les coûts liés au séquençage ont été divisés par 100 000 depuis 10 ans. L'augmentation considérable de la quantité de données pose ainsi de nouveaux challenges aux logiciels existants. Par exemple, calculer une simple similarité de séquence peut devenir très long pour de gros jeux de données.

Le processus permet, à partir des échantillons pris sur le terrain d'obtenir de longues séquences de nucléotides qui pourront être traitées et analysées. Ce processus passe par le séquençage et l'assemblage. Le séquençage s'effectue en trois étapes (préparation des banques de NGS, amplification clonale et séquençage en temps réel) et produit à partir des données physiques (les échantillons) des données numériques : les « reads » (jusqu'à 10^{12} bases séquencées) qui sont de courtes séquences de nucléotides (30-250 paires de base) qui se chevauchent et dont nous ne connaissons pas la provenance sur les génomes. L'assemblage produit quant à lui à partir des reads de longues séquences dites « contigs » (contiguous sequences). Il se fait par l'intermédiaire d'un logiciel qui va alors construire toutes les séquences possibles, évaluer leur chevauchement et enfin tenter de reconstituer la séquence complète. Une fois l'assemblage terminé, l'analyse du métagénome va renseigner sur les espèces présentes dans nos échantillons. Cela passe par la prédiction des gènes qui fait référence aux méthodes permettant d'identifier les régions du métagénome qui encodent des gènes : alignement des lectures sur un génome de référence (« mapping »). Le binning

consiste ensuite à estimer la diversité des espèces des métagénomes. Idéalement, il s'agit d'associer chaque read à son « bin » représentant son groupe taxonomique.

Cette technique peut, notamment, être utilisée au sein de l'environnement domestique où elle permet l'étude des communautés microbiennes du bioaérosol. Elle apporte des renseignements sur la composition globale de l'air que nous respirons et souligne notre exposition aux bactéries, champignons, virus, arthropodes, ... (Yooseph et al., 2013).

IV. Mesure de la sensibilisation aux acariens et aux micro-organismes

La mesure de la sensibilisation aux acariens et aux micro-organismes peut se faire directement au niveau de la peau du sujet à tester ou alors à partir de son sérum. La technique la plus répandue chez les médecins et allergologues est le test à lecture immédiate. Parmi les techniques sérologiques les plus couramment employées, on retrouve les tests d'immuno-précipitations telles que la double diffusion sur gel d'agarose (DD) et l'électrosynérèse sur acétate de cellulose (ES) ou les tests immuno-enzymatiques tels que la recherche des IgG par le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ces techniques permettent la mise en évidence du degré de sensibilisation du patient à un antigène donné en mesurant la réaction antigène/anticorps (Ag/Ac).

1) Les tests à lecture immédiate

Le principal test à lecture immédiate est le prick-test. Ce test existe pour un grand nombre d'allergènes de l'environnement : les allergènes saisonniers, les acariens, les insectes, les moisissures, les allergènes alimentaires, médicamenteux, Il est également facile d'utilisation.

Ce test témoigne des conséquences cutanées qu'entraîne l'application d'un allergène sur ou dans la peau (Bourrin, 2009). Lors de la mise en contact avec une substance exogène par un test cutané, il est possible de déclencher l'ensemble des réactions immunitaires possibles.

Son mécanisme est de provoquer la libération de l'histamine en mettant en présence un allergène en présence de ses IgE spécifiques fixées sur les mastocytes. Pour cela, ils sont réalisés sur la face intérieure des avant-bras ou sur le dos avec un dépôt d'une goutte d'extrait allergénique par une pointe plastique ou métallique. La lecture peut se faire après 15 minutes

et consiste à mesurer la taille de la papule en mm. Un témoin négatif permet la comparaison afin d'éviter les faux positifs et la taille requise par certains auteurs, comme seuil de positivité, doit être supérieure à 3 mm (Bourrin, 2009).

2) Les tests d'immuno-précipitations

Les tests d'immuno-précipitations regroupent la DD et l'ES. Ces tests permettent la recherche des anticorps sériques précipitants appelés précipitines (arcs de précipitines). Celles-ci sont composées principalement d'IgG. La DD est simple d'utilisation mais présente l'inconvénient de durer 5 jours et de ne fournir qu'un nombre d'arcs limité. L'ES est effectuée avec une migration active des antigènes et des anticorps dans un champ électrique (Figure 13). Elle permet d'obtenir, dans un laps de temps relativement court (4 heures), un nombre d'arcs de précipitines pouvant aller jusqu'à 8 dans le cas de la maladie du poumon de fermier (Reboux et al., 2007) et 12 pour la maladie du poumon de mécanicien (Tillie-Leblond et al., 2011).

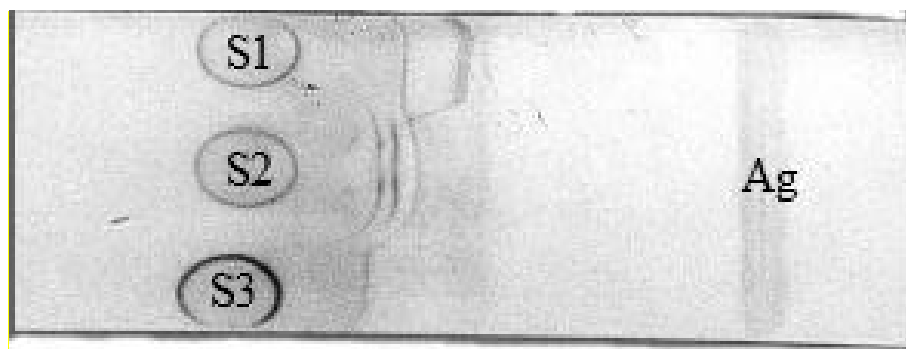


FIGURE 13 : EXEMPLE D'UNE BANDE D'ELECTROSYNERESE SUR ACETATE DE CELLULOSE. S1, S2, S3 CORRESPONDENT AUX TROIS SERUMS DE PATIENTS TESTES VIS-A-VIS D'UN ANTIGENE DONNE.

La valeur diagnostique des précipitines reste discutée et la sensibilité des tests varie fortement entre les différentes études. Le point le plus critiqué est le nombre de faux positifs. C'est pourquoi les précipitines seraient majoritairement considérées comme des marqueurs d'une exposition aux antigènes.

3) Les tests immuno-enzymatiques

Les tests immuno-enzymatiques regroupent différentes techniques qui permettent la quantification d'un antigène ou d'un anticorps par un anticorps secondaire. Parmi celles-ci, on retrouve la technique ELISA qui est très répandue et repose sur l'utilisation d'une enzyme pour déceler les complexes immuns. Elle permet une lecture automatisée non manipulateur

dépendant, rapide, reproductible, sensible mais moins spécifique (Reboux et al., 2007). La présence d'une corrélation entre les densités optiques obtenues par test ELISA et les arcs de précipitines obtenus par ES n'est pas systématique et reste discutée.

Il existe différentes variantes à la technique ELISA :

- La technique « indirect » classique est très utilisée dans l'évaluation de la sensibilisation aux micro-organismes et permet de connaître la dose d'Ac spécifique. Elle consiste à fixer, dans un premier temps, l'Ag sur la plaque de microtitration en plastique (coating), puis à mettre en contact des dilutions appropriées des sérums et fixer un Ac (antiglobuline) dirigé contre les immunoglobulines à doser. Cette antiglobuline est couplée à une enzyme qui réagit avec un substrat de l'enzyme lié à une substance chromogène. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'Ac spécifiques présents dans le sérum (Figure 14). L'absorbance est mesurée grâce à un spectrophotomètre. Différentes Immunoglobulines peuvent être dosées séparément (IgG, IgM, IgA, ...).

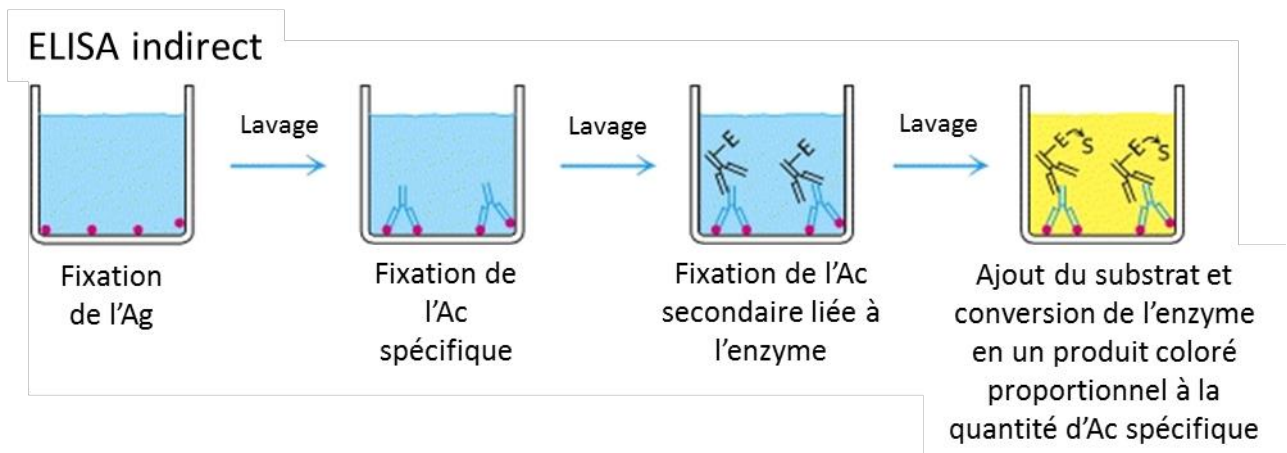


FIGURE 14 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISA INDIRECT.

- La technique dite du « sandwich » est l'une des plus utilisées en recherche (Berg et al., 2002). Elle permet notamment le dosage des allergènes dans un échantillon telles que les poussières des logements. Elle consiste à fixer, dans un premier temps, l'Ac sur la plaque de microtitration, puis à fixer un Ag lié à l'Ac. Cette Ac est couplé à une enzyme qui réagit avec un substrat de l'enzyme lié à une substance chromogène. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'Ag présents dans l'échantillon (Figure 15).

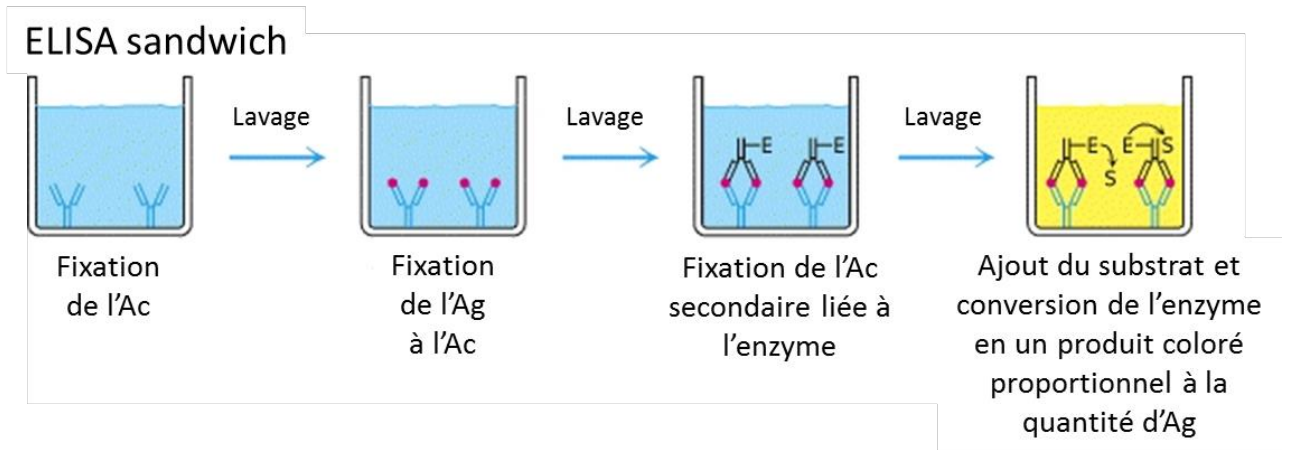


FIGURE 15 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISA SANDWICH.

CHAPITRE 1

Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'environnement intérieur et risque allergique

I. Détection et quantification des acariens dans la poussière domestique : une nouvelle application pour la qPCR

1. Contexte

Les acariens sont des organismes retrouvés en abondance en Europe et particulièrement dans l'habitat. En effet, les logements abritent quelques-unes des 50 000 espèces non seulement dans les pièces de literie, tissus d'ameublement, tapis (genre *Dermatophagoides*) mais également les réserves alimentaires dans les cuisines (*A. siro*, *L. destructor*, *G. domesticus*, *T. putrescentiae*) où ils sont dits acariens de stockage. Plus que la présence des acariens, ce sont leurs fèces et leur propre dégradation, libérant des protéines allergisantes (Tovey et al., 1981) qui peuvent provoquer asthmes, rhinites ou conjonctivites.

Différents outils existent pour la recherche des acariens dans les logements : le comptage des acariens par microscopie, le test ELISA qui est la méthode de quantification des allergènes d'acariens la plus répandue ou encore l'Acarex test[®] qui permet une détection de la guanine. Le comptage des acariens nécessite une forte connaissance en acarologie et est trop long pour être applicable à grande échelle, l'ELISA ne permet la détection que de certains allergènes du groupe 1 (Der p1 et Der f1) et l'Acarex test[®] est limité par un important taux de guanine ne provenant pas des acariens et fournit un résultat colorimétrique semi-quantitatif.

La qPCR est une méthode répandue pour la quantification des organismes dans l'environnement. Elle consiste en l'observation en temps réel, à chaque cycle, d'une fluorescence proportionnelle à la quantité de produit PCR amplifié. La construction de sondes et amorces spécifiques permet la détection et la quantification de l'ADN cible au sein de l'environnement et a déjà été développée pour la recherche des moisissures au sein des logements. L'avantage de la qPCR est de pouvoir quantifier les organismes ciblés au sein d'un environnement complexe à l'aide d'un seul et unique outil. Déjà utilisée pour étudier la relation entre exposition aux moisissures et développement de l'asthme (Reponen et al., 2012), la qPCR pourrait être utilisée pour mettre en évidence l'impact des acariens dans le développement de l'asthme allergique.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude étaient :

- Développer des qPCR permettant la détection et la quantification des acariens de la poussière domestique
- Evaluer la spécificité et l'efficacité des qPCR mises au point
- Valider la méthode de quantification de l'ADN d'acariens par qPCR sur des poussières de matelas

2) Mise au point des qPCR

Dix-huit séquences des gènes nucléaires d'ARN ribosomal des principales espèces d'acariens de l'environnement intérieur ont été alignées via le logiciel BioEdit afin de choisir la zone la plus appropriée pour la construction des amorces. Les sondes et amorces ont ensuite été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express[®] afin d'obtenir les conditions optimales pour la qPCR (températures d'hybridation, pourcentages de G et C, ...).

3) Application

Les poussières provenant de 19 logements de patients souffrant de rhinite et d'asthme allergique ont été collectées par aspiration du matelas durant 15 minutes suivant un protocole standardisé. L'Acarex test[®] a été effectué directement sur les poussières aspirées et, après filtration, l'ADN a été extrait en vue de l'analyse par qPCR et par test ELISA.

3. Principaux résultats

Les couples sondes et amorces dessinés ont permis l'amplification des espèces *D. pteronyssinus* (DpterF1/R1/P1) et *D. farinae* (DfariF1/R1/P1), du genre *Dermatophagoides* (DermaF1/R1/P1) et d'une majeure partie des acariens domestiques (MisppF1/R1/P1). La spécificité des qPCR, testée vis-à-vis des autres acariens, de la mite alimentaire *Ephestia kuehniella* et des moisissures, a montré que seules les espèces, genres ou groupes ciblés étaient détectés. La limite de détection des qPCR était située entre 1 et 0,1 pg/μl soit entre 1/1000 et 1/100000 d'équivalents acariens par microlitre d'extrait et l'efficacité des qPCR était comprise entre 63 et 85 %.

L'application sur les 19 échantillons de poussières, effectuée avec le couple sonde et amorces du genre *Dermatophagoides*, a montré des concentrations allant de 1 à 532 acariens par gramme de poussières avec une moyenne de 78 acariens par gramme.

L'Acarex test[®] a déterminé des quantités faibles dans 5 matelas, moyennes dans 10 matelas et fortes dans 4 matelas mais celles-ci n'étaient pas corrélées avec celles obtenues par qPCR. Les concentrations obtenues par le test ELISA (Der p1) étaient corrélées avec les quantités d'acariens déterminées par qPCR ($r^2 = 0,55$).

4. Article Environment International 2013



Detecting and quantifying mites in domestic dust: A novel application for real-time PCR

Sandrine Roussel ^{a,b,*}, Gabriel Reboux ^{a,b}, Alexandre Naegele ^b, Jorge Martinez ^c, Mallory Vacheyrou ^b, Emeline Scherer ^{a,b}, Laurence Millon ^{a,b,d}

^a Department of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, 3 Boulevard Fleming, 25030 Besançon, France

^b UMR/CNRS Chrono-Environnement 6249, University of Franche-Comté, 25030 Besançon, France

^c Laboratory of Parasitology and Immunoallergy, Center for Research and Advanced Studies "Lucio Lascaray", Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of Basque Country, Faculty of Pharmacy, Paseo de la Universidad, 7. 01006-Vitoria, Spain

^d Clinical Investigation Center (CIC Inserm), Besançon University Hospital, 25030 Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2012

Accepted 15 February 2013

Available online xxxx

Keywords:

Quantitative real-time PCR

Dermatophagoides

House dust mites

Allergen

Environment

1. Introduction

Real-time quantitative PCR (qPCR) is a widely used method to quantify the abundance of organism or gene expression in the environment. QPCR based analyses combine classical DNA amplification by PCR with real time counting of amplicons during each cycle of PCR amplification. Target specificity of qPCR assays is determined by the design of the primers and in some cases internal probes. Indeed, qPCR analyses have been developed to quantify species belonging to fungi and protista kingdoms, and are currently used in human environment investigations of allergies to assess allergen exposure (Haugland et al., 2004; Kaarakainen et al., 2011; Vesper et al., 2007b). The advantage of the qPCR approach is its ability to quantify numerous individual species in a complex mixed community with a single tool. QPCR to detect fungi was used to investigate the relationship between mold exposure and asthma (Reponen et al., 2012; Vesper et al., 2007a) but has not yet been developed for house dust mite quantification, although there is good evidence suggesting a causal relationship

between mite exposure and allergic disorders such as asthma (Cole Johnson et al., 2004; Lodge et al., 2011; Platts-Mills et al., 1997). Mites found in house dust causing the development of IgE antibody responses are mainly house dust mites (from the Pyroglyphidae family, e.g. *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras* and *Euroglyphus maynei*), storage mites (e.g. *Lepidoglyphus destructor*, *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae*) and other species such as *Blomia tropicalis* (Colloff and Spieksma, 1992; Platts-Mills et al., 1992). The ELISA was the most commonly used method for investigating allergens from these mites in the environment (Dunn et al., 2008; Krizkova-Kudlikova et al., 2007). In our study, we propose to broaden the use of qPCR assays to quantify mites in the environment. Primers and probes were designed to detect and measure amounts of nucleic acids from *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Dermatophagoides* species and, less specifically, from several mites present in domestic dust. Analytical characteristics (specificity, linear dynamic range, limit of detection and efficiency) were determined to b-validate each qPCR assay. QPCR was tested on 19 dust samples for mites and the results were compared to the results of Der p I quantification (ELISA) and to the results of guanine semi-quantification test (ACAREX® test).

2. Material and methods

2.1. Tested strains

D. pteronyssinus, *D. farinae*, *L. destructor*, *Glycyphagus domesticus* and *A. siro* (Mite collection, Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Basque Country, Vitoria, Spain) were used to test specificity. The strains were cultured on a 1:1 (wt:wt) autoclaved mixture of commercial mouse meal and dried yeast powder according to Cardona et al. (2004).

Individuals of *Ephestia kuehniella* were collected in a house using glue traps.

Fungal species used were those currently found in indoor dust samples. Stains are deposited in the fungal BCCM/IHEM collection (Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium): *Aspergillus versicolor* (BCCM/IHEM 22975), *Cladosporium sphaerospermum* (BCCM/IHEM 18883), *Penicillium chrysogenum* (BCCM/IHEM 22667), *Aspergillus*

* Corresponding author at: Department of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, 3 Boulevard Fleming, 25030 Besançon, France. Tel.: +33 381669029; fax: +33 381668914.

E-mail address: sroussel@univ-fcomte.fr (S. Roussel).

fumigatus (BCCM/IHEM 22670), *Alternaria alternata* (BCCM/IHEM 22669), *Eurotium amstelodami* (BCCM/IHEM 16286) and *Wallemia sebi* (BCCM/IHEM 16284). Fungi were cultured onto Sabouraud or Malt Agar media (Beckton Dickinson, New Jersey, USA) at 20 or 30 °C for two weeks. Spores were removed using sterile distilled water and were recovered by centrifugation (10 min at 6000 ×g).

2.2. DNA isolation

Two hundred microliters of DNA-free water containing almost 400 mites, 3 individuals of *E. kuehniella* or 10 mm² fungal suspension was placed into 2.0 ml conical-bottom screw-cap tubes (MagNA Lyser Green Beads, RocheDiagnostics GmbH, Germany) containing 1.4 mm ceramic beads and 400 µl of lysis buffer from the NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Germany). The tubes were shaken in a MagNA Lyser Instrument (Roche Applied Science®, Germany) three times for ten seconds at the maximum speed, with one cooling minute in the cooling block. The tubes were then heated in a boiling water bath for 10 min. The samples were placed on ice for 10 min, followed by centrifugation for 2 min at 6000 ×g. DNA was then purified with NucleoSpin Plant II kit according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration of each extract was determined by a dosage program (160 nm) with a spectrophotometer (ND-1000 Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.3. qPCR

PCR reactions contain 10 µl two-fold concentrated TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA), reverse and forward primers (final concentration 1 µM each) (Sigma-Aldrich, USA), a hydrolysis probe (final concentration 200 nM) (MWG Eurofins Operon, Germany), 5 µl of DNA sample and nuclease-free water to complete the 20 µl total volume of reaction mixture. Plates were centrifuged (one min at 1000 ×g) and PCR reactions were run and monitored using Applied Biosystems 7500 FAST Real-Time PCR System and 7500 Software v2.0.5. Sterile DNA-free water was extracted with samples and used as negative controls in each series of amplification. Thermal cycles consisted of 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

2.4. Design of probes and primers and analytical specificity

Eighteen rRNA sequences of the main mite species isolated indoors were retrieved from the GenBank database and were aligned using BioEdit Software (Tom Hall Ibis Biosciences, California) to choose the most appropriate areas for primer design. Aligned sequences were those of *D. pteronyssinus* (accession numbers: EU152579; DQ025512; DQ025511), *D. farinae* (GQ864309; EU152578; GQ864309), *Dermatophagoides evansi* (EU152577), *A. siro* (AF022023; EU152495), *L. destructor* (EF203771), and *T. putrescentiae* (DQ025510). Primers and probes were designed using Primer Express® 3.0 for Real-Time PCR software (Applied Biosystems). Parameters used to design primers and probes were chosen to ensure optimal conditions for qPCR. Indeed, the minimum and maximum melting temperatures (T_m) permitted for primers were 58 and 60 °C respectively. The minimum and maximum percentages of C and G contained by either primer were 30 and 80% respectively, with a maximum of two residues on the 3' end required to be a G or C. The optimal length allowed for each primer was 20 bases (9 bases minimum and 40 bases maximum). Minimum and maximum T_m allowed for probes were 68 and 80 °C respectively. The minimum and maximum percentages of G and C contained by the probes were 30 and 80% respectively for a length range of 13 to 30 bases. No more 3 G repeats were required in probe. The amplified region length permitted ranged from 50 to 150 bases.

Analytical specificity, which refers to the qPCR assay detecting the appropriate organism rather than the other, was tested against seven fungal and five mite DNA extracts at 1 pg/µl (Sections 2.1 and 2.2).

2.5. qPCR linear dynamic range, limit of detection and efficiency

To generate calibration curves, DNA extracts were adjusted at 100 pg/µl in the NucleoSpin Plant II kit elution buffer, and were then serially (1:10) diluted, resulting in a six point calibration curve range of 100 to 0.001 pg/µl. qPCR analysis was repeated three times for each concentration. For each qPCR assay, the calibration curve allowed us to calculate the linear dynamic range, the limit of detection (LOD) and PCR amplification efficiency. The linear dynamic range is the concentration range over which the quantification cycle (C_q) and concentration remain directly proportional to each other. Range interval and correlation coefficient (r^2 value) were then reported. The LOD was the lowest concentration at which DNA was detected in all three samples. PCR amplification efficiency was established as the slope of the log-linear portion of the calibration curve: PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$.

2.6. Applying qPCR assays on dust from mattresses

Dust from 19 mattresses belonging to people with allergic rhinitis or asthma was collected using nylon sampling socks that were designed to fit on a vacuum cleaner. The whole area of the mattress from which the sample was taken was cleaned for 15 min. The socks were then removed from the vacuum cleaner and closed.

The ACAREX® test (Dyn'R, France) was used according to the manufacturer's instructions directly after dust collection. A colorimetric scale can determine the amount of guanine in dust according to four levels: none, low, medium and high.

In the laboratory, dust samples were filtered (hole of 1 mm in diameter) and stored at −20 °C. To prepare the DNA extracts as described in Section 2.2, 15 mg of dust was mixed with 200 µl of DNA-free water. qPCR assays were performed for each target three times on different days and by different technicians, with the aim of calculating reproducibility expressed by the coefficient of variation from the three points after conversion in pg/µl using calibration curves.

Concentrations of Der p I in dust were determined by ELISA assays (Der p I Assay, Citeq Biologics, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Results were grouped into three categories according to calibration points: less than 0.05 µg Der p I per gram of dust, between 0.05 and 0.4 µg/g and more than 0.4 µg/g.

Table 1
Primers and probes^a list.

<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>			
Fwd	Dpter F1	TGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTG	
Rev	DpterR1	ATGCGATAATCTGCTCAGTATGACA	
Probe	DpterP1	CAGCTCATGTATGGCGGTCCACCTG	
<i>Dermatophagoides farinae</i>			
Fwd	DfariF1	TGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTG	
Rev	DfariR1	ATGCGATAATTCTGCTCAGCATGACA	
Probe	DfariP1	CAGCTCATGCATGGTGGTCCACTTG	
<i>Dermatophagoides spp.</i>			
Fwd	DermaF1	CCTCGTGGTGAGTGCAAT	
Rev	DermaR1	TCAGCTGCAGTTATCCAGAGTCA	
Probe	DermaP1	ATTAGACCAAGACCAAAGGTGGCAACACC	
<i>Mites</i>			
Fwd	MisppF1	GAGGTTCGAAGGCCATCAGA	
Rev	MisppR1	TTGCTGGTTGGCATCGTTTA	
Probe	MisppP1	ACCCGCTAGTTCTTA	

Fwd: forward primer; Rev: Reverse primer.

^a Labeled with FAM reporter and TAMRA quencher.

Table 2
Mean of threshold cycles (standard deviation) for the specificity study of qPCR.

Species extracts	DpterF1/ R1/P1	DfariF1/ R1/P1	DermaF1/ R1/P1	MisppF1/ R1/P1
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	35.10 (0.53)	Und.	36.84 (0.85)	37.59 (0.36)
<i>Dermatophagoides farinae</i>	Und.	35.35 (0.42)	36.15 (0.81)	37.31 (0.55)
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Und.	Und.	Und.	36.79 (0.55)
<i>Glycyphagus domesticus</i>	Und.	Und.	Und.	36.28 (0.98)
<i>Acarus siro</i>	Und.	Und.	Und.	39.99 (1.64)

Und. (undetermined): no amplification curve was obtained after 45 cycles of PCR.

3. Results

3.1. Design of primers/probes and analytical specificity

The alignment of mite sequences enabled us to choose areas for primer and probe designs. Primer and probe sequences are listed in Table 1. DpterF1/R1/P1 was designed specifically to amplify *D. pteronyssinus*; DfariF1/R1/P1 specifically to amplify *D. farinae*; and DermaF1/R1/P1 to amplify *D. pteronyssinus* and *D. farinae*. MisppF1/R1/P1 was designed in a conserved area in sequences, so as to detect several genera of mites.

Analytical specificity was first validated using BLAST searches, and then by qPCR assays against mites, *E. kuehniella* and fungal extracts. No fungal or insects DNA extracts were detected in qPCR assays using the four primers/probes designed. Mite extracts were amplified as reported in Table 2, showing a good analytical specificity: only the target species were detected. For MisppF1/R1/P1, we found 3.7 cycles of difference between *G. domesticus* and *A. siro* amplification, all tested at 1 pgDNA/μl. This suggests that there were differences in PCR efficiency or that target repetition was not the same for each of the two species.

3.2. Analytical characteristics of qPCR assays

Linear dynamic ranges and LOD of qPCRs were calculated using calibration curves of targeted organisms (Table 3). Linear dynamic ranges were between 100 pg/μl and 1 or 0.1 pg/μl depending on qPCR assays. Correlation coefficients were up to 0.99 for DpterF1/R1/P1, DfariF1/R1/P1 and DermaF1/R1/P1, showing a good linearity between logarithms for DNA concentration and Cq. A weaker correlation coefficient was obtained with the MisppF1/R1/P1 assay performed with the *D. pteronyssinus* calibration curve. The limit of detection ranged from 10^{-3} to 10^{-5} equivalent mites per microliter of extract.

Coefficients of variation for reproducibility, established on dust sample extracts, were higher for MisppF1/R1/P1 than for the three other qPCR assays. Coefficients of variation higher than 0.8 are not

acceptable in qPCR because they represent a very high dispersion of Cq values for the same DNA extract.

3.3. Applying qPCR to mattress dust

qPCR assays on the 19 dust extracts were performed using DermaF1/R1/P1 primers and probes. Quantities of *Dermatophagoides* ranged from 1 to 532 mites per gram of dust, with a mean of 78 mites per gram (standard deviation (SD) = 136).

Acarex® test results showed that the amount of contamination caused by mites was low in five mattresses, medium in ten mattresses and high in four mattresses. There was no correlation between the qPCR and Acarex® test results in mattress dust (Fig. 1).

ELISA Der p I results were correlated with the quantities of *Dermatophagoides* determined by qPCR assays ($r^2 = 0.55$) (Fig. 2). A mean quantity of four *Dermatophagoides*/g of dust (SD = 2) were determined by qPCR when Der p I was found to be less than 0.05 μg/g of dust, 13 *Dermatophagoides*/g (SD = 8) when Der p I in dust was 0.05 to 0.4 μg/g and 140 *Dermatophagoides*/g (SD = 168) when Der p I was more than 0.4 μg/g.

4. Discussion

We proposed and validated a method to quantify house dust mites using qPCR. Four primers/probes were designated to target *D. pteronyssinus* (DpterF1/R1/P1), *D. farinae* (DfariF1/R1/P1), *Dermatophagoides species* (DermaF1/R1/P1) and the main mites present in domestic dust (MisppF1/R1/P1). The qPCR experiments were validated following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). The specificity of targets was validated by tools for sequence aligning and by direct experimental assays. The linear dynamic ranges covered three or four orders of magnitude and was range to 3 or 2 log₁₀. Ideally, the linear dynamic range should be 5 log₁₀ but our assays were restricted by the limit of detection. We should thus have tested more concentrate DNA extracts to reach 5 log₁₀. The limit of detection for the qPCR experiments mainly ranged from 1 to 0.1 pg/μl, allowing us to detect 13 to 1 mites per gram of dust. This limit of detection is equivalent to those of the ELISA Der p I method (Lind, 1986) and is higher to those of the ELISA allowing detection of *A. siro* in grain (Krizkova-Kudlikova et al., 2007).

For the last twenty years, three methods have been used in environmental studies to estimate exposure to mites: mite counts, assays for specific mite allergens by ELISA, and measurements of guanine, the major nitrogenous excretory product of arachnids (Platts-Mills et al., 1992). These three methods are correlated with each other (Hallas et al., 1993; Hoyet et al., 1991; Lind, 1986; Van Bronswijk et al., 1989). Mite counts by microscopic analysis allow to specify the founding species and demonstrate a good correlation with group I allergen quantification (Platts-Mills et al., 1992). However, determining species requires expert knowledge and this method

Table 3
Performance of qPCR assays to detect specific mite strains extracted.

Targets		Linear dynamic range		Limit of detection		PCR efficiency in %	CV _{rep}
Primers/probes	DNA extract tested	Interval	r ²	In pg/μl	In mites/μl		
DpterF1/R1/P1	<i>D. pteronyssinus</i>	100 to 0.1 pg/μl	0.998	1	10 ⁻³	74	0.52
Dfari F1/R1/P1	<i>D. farinae</i>	100 to 1 pg/μl	0.990	0.1	10 ⁻⁴	73	0.41
DermaF1/R1/P1	<i>D. pteronyssinus</i>	100 to 1 pg/μl	0.995	1	10 ⁻³	70	0.43
DermaF1/R1/P1	<i>D. farinae</i>	100 to 1 pg/μl	0.996	0.1	10 ⁻⁴	79	0.40
MisppF1/R1/P1	<i>D. pteronyssinus</i>	100 to 1 pg/μl	0.974	0.1	10 ⁻⁴	63	0.59
MisppF1/R1/P1	<i>D. farinae</i>	100 to 1 pg/μl	0.997	0.1	10 ⁻⁴	78	0.77
MisppF1/R1/P1	<i>A. siro</i>	100 to 0.1 pg/μl	0.981	1	10 ⁻³	75	0.82
MisppF1/R1/P1	<i>L. destructor</i>	100 to 0.1 pg/μl	0.997	1	10 ⁻³	85	0.86
MisppF1/R1/P1	<i>G. domesticus</i>	100 to 1 pg/μl	0.999	0.01	10 ⁻⁵	81	0.90

CV_{rep}: coefficient of variation for reproducibility.

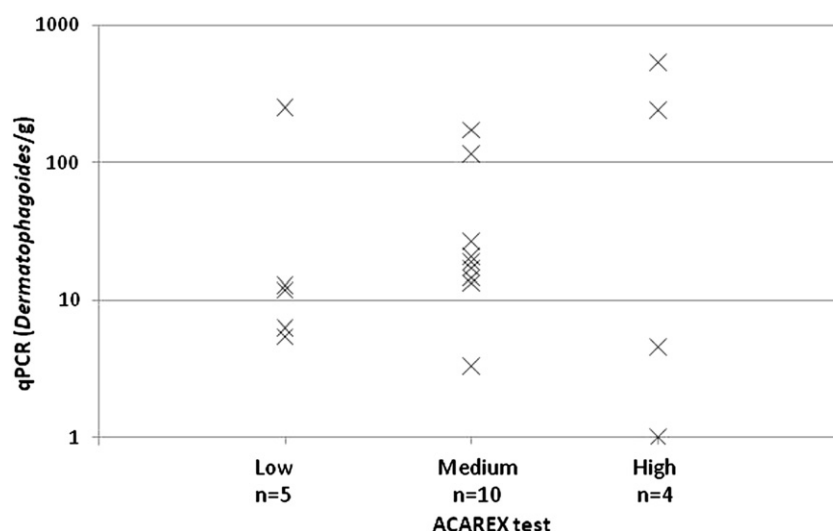


Fig. 1. Correlation between qPCR assays (DermaF1/R1/P1) and ACAREX® tests in mattress dust (n = 19).

takes too long to be applicable to a large number of samples. Guanine production of mites is also correlated with allergen Der p I and with mite counts (Koren et al., 2000). Quantification is limited by the amounts of guanine not originate to house dust mites (Hallas et al., 1993). The ELISA was the most commonly used method for investigating the human environment with species-specific monoclonal antibodies to bind group I (Der p I and Der f I) allergens. Measurements were usually performed on dust from floor and mattresses (Brunekreef et al., 2002; Gent et al., 2012). The generalized use of molecular biology has made it possible to propose new methods for quantifying mites in the environment.

The results of detection and quantification of *Dermatophagoides* species in dust by qPCR correlated with ELISA assays for Der p I quantification, as there is a correlation between mite counts and Der p I quantification (Lind, 1986). Quantities of dust necessary for assays are different for qPCR and ELISA tests: 100 mg of dust was needed to perform the ELISA whereas qPCR experiments were performed with 15 mg of dust. In qPCR experiments, a single dust extract allows us to quantify fungi and bacteria as well as house dust mites. The human environment is a complex biota in which these organisms interact (Naegel et al., 2012). The study of these interactions may be facilitated by a single method to quantify all organisms.

We did not show a clear relationship between the qPCR assay and ACAREX® test results. However, studies comparing ACAREX® and ELISA tests showed that ACAREX® was especially accurate in detecting negative results (level 0: none) and highly positive results (levels 2 and 3: medium and high) (Haouichat et al., 2000; Ridout et al., 1993). The ACAREX® test is simple to use in the domestic environment. It is used to identify sources of mites in houses. This colorimetric test has educational properties that can help involve the patient in finding remedies, but is not used to quantify allergen exposure.

Variation coefficients for reproducibility were better for assays specific to one or two species (DpterF1/R1/P1, DfariF1/R1/P1 and DermaF1/R1/P1) than those detecting a large range of species (MisppF1/R1/P1). Furthermore, the correlation coefficient of calibration curves and PCR efficiency were also lower for MisppF1/R1/P1. We thus recommend using the DpterF1/R1/P1, DfariF1/R1/P1 and DermaF1/R1/P1 specific targets for assessing environmental exposure.

5. Conclusions

New developments in molecular biology have enabled us to quantify organisms in the human environment quickly. QPCR is thus used in epidemiological studies on asthma and allergy to quantify fungi.

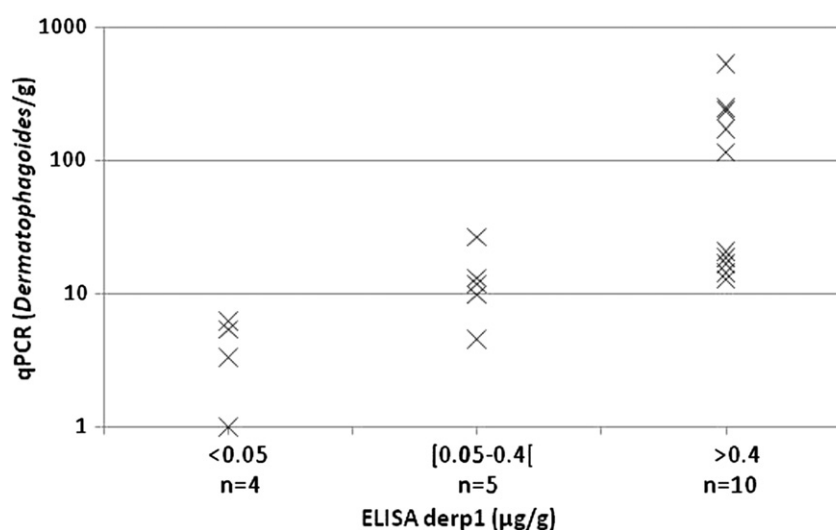


Fig. 2. Correlation between qPCR (DermaF1/R1/P1) and ELISA Der p1 assays in mattress dust (n = 19).

We validated new qPCR assays to quantify house dust mites that have an important role in asthma and in the development of other allergic diseases. It would be useful to measure levels of exposure in epidemiological studies on human health.

Acknowledgments

This work was part of a larger study entitled “Environnement biologique et risque allergique” (EBRA), supported by the ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail), reference number: EST 2010-40 and by the ELFE consortium (Etude Longitudinale Française depuis l’Enfance).

We thank the “Reseau d’Allergologie de Franche-Comte” (RAFT) for patient recruitment and mattress dust collection (MD JM RAME and H. AMARI). The authors are grateful to Frances Sheppard of the Clinical Investigation Center (Inserm) of Besancon for her editorial assistance.

References

- Brunekreef B, Smit J, de Jongste J, Neijens H, Gerritsen J, Postma D, et al. The prevention and incidence of asthma and mite allergy (PIAMA) birth cohort study: design and first results. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13:55–60.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- Cardona G, Eraso E, Serna LA, Guisantes JA, Martinez J. Analysis of the allergen expression of *Blomia tropicalis* and *Blomia kulagini* (Astigmata: Glycyphagidae) cultures. *J Med Entomol* 2004;41:1068–72.
- Cole Johnson C, Ownby DR, Havstad SL, Peterson EL. Family history, dust mite exposure in early childhood, and risk for pediatric atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:105–10.
- Colloff MJ, Spieksma FT. Pictorial keys for the identification of domestic mites. *Clin Exp Allergy* 1992;22:823–30.
- Dunn JA, Thind BB, Danks C, Chambers J. Rapid method for the detection of storage mites in cereals: feasibility of an ELISA based approach. *Bull Entomol Res* 2008;98:207–13.
- Gent JF, Kezik JM, Hill ME, Tsai E, Li DW, Leaderer BP. Household mold and dust allergens: exposure, sensitization and childhood asthma morbidity. *Environ Res* 2012;118:86–93.
- Hallas TE, Yi X, Schou C. Does guanine concentration in house-dust samples reflect house-dust mite exposure? *Allergy* 1993;48:303–5.
- Haouichat H, Pauli G, Ott M, Hedelin G, De Blay F, Vérot A, et al. Réévaluation de l’Acarex-test dix ans après. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000;40:783–92.
- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:198–210.
- Hoyet C, Bessot JC, Le Mao J, Quoix E, Pauli G. Comparison between Der p1 plus Der f1 content determinations and guanine measurements in 239 house dust samples. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:678–80.
- Kaarakainen P, Rintala H, Meklin T, Karkkainen P, Hyvarinen A, Nevalainen A. Concentrations and diversity of microbes from four local bioaerosol emission sources in Finland. *J Air Waste Manag Assoc* 2011;61:1382–92.
- Koren LGH, CHMMd Bruijn, JEMHv Bronswijk. Allergen Der p1 and guanine production of house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* in a semi-natural environment. Mites, asthma and domestic design. Otago University; 2000.
- Krizkova-Kudlikova I, Stejskal V, Hubert J. Comparison of detection methods for *Acarus siro* (Acari: Acarididae: Acarididae) contamination in grain. *J Econ Entomol* 2007;100:1928–37.
- Lind P. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of major excrement allergens of house dust mite species *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *D. microceras*. *Allergy* 1986;41:442–51.
- Lodge CJ, Lowe AJ, Gurrin LC, Hill DJ, Hosking CS, Khalafzai RU, et al. House dust mite sensitization in toddlers predicts current wheeze at age 12 years. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:782–8. (e789).
- Naegel A, Reboux G, Scherer E, Roussel S, Millon L. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *Int J Environ Health Res* 2013;23:91–5.
- Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1046–60.
- Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:S2–S24.
- Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, Vesper SJ, Levin L, Khurana Hershey GK, et al. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:639–44.
- Ridout S, Twiselton R, Matthews S, Stevens M, Matthews L, Arshad SH, et al. Acarosan and the Acarex test in the control of house dust mite allergens in the home. *Br J Clin Pract* 1993;47:141–4.
- Van Bronswijk JE, Bischoff E, Schirmacher W, Kniest FM. Evaluating mite (Acari) allergenicity of house dust by guanine quantification. *J Med Entomol* 1989;26:55–9.
- Vesper S, McKinstry C, Haugland R, Wymer L, Bradham K, Ashley P, et al. Development of an environmental relative moldiness index for US homes. *J Occup Environ Med* 2007a;49:829–33.
- Vesper SJ, McKinstry C, Haugland RA, Iossifova Y, Lemasters G, Levin L, et al. Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007b;17:88–94.

II. Quantification des acariens domestiques dans les logements de patients allergiques par qPCR

1. Contexte

L'environnement intérieur retient de plus en plus l'attention de la communauté scientifique car nous passons de 80 à 90 % de notre temps à l'intérieur (Yooseph et al., 2013). De plus, depuis la crise énergétique de la fin des années 70, les efforts fournis afin de limiter les pertes de chaleurs des logements a conduit à une diminution de l'aération et à une accumulation de l'humidité.

En parallèle, l'impact des maladies allergiques est croissant depuis 40 ans dans les pays occidentaux (Eder et al., 2006) et selon l'OMS, il y a aujourd'hui 235 millions d'asthmatiques à travers le monde. En France, chaque année l'asthme cause 1500 décès et son coût global est évalué à près de 1,5 milliards d'euros (Doz et al., 2013).

Parmi les allergènes impliqués, nous retrouvons les pollens, les moisissures ou encore les aliments mais les acariens sont les principaux allergènes de l'environnement intérieur (Bousquet et al., 2012). Parmi ceux-ci on retrouve les acariens de la poussière domestique (genre *Dermatophagoides*), qui sont reconnus comme étant les plus répandus dans les logements (Boquete et al., 2006), mais aussi les acariens de stockage qui colonisent nos denrées alimentaires principalement en milieu rural (Iraola et al., 2014). Le principal allergène est retrouvé principalement dans les fèces de *D. pteronyssinus* : il s'agit de Der p1. *D. pteronyssinus* produit en moyenne 20 déjections par jour contenant 100 pg de Der p1 chacune (Tovey et al., 1981). D'autres allergènes provenant de la même espèce : Der p2 ou alors d'autres acariens comme *D. farinae* : Der f1 et Der f2, *A. siro* : Aca s13, *L. destructor* : Lep d2, ont également été identifiés comme plus de 100 autres pour 13 espèces (Colloff, 2010).

Depuis 3 décennies, les problèmes d'allergies liées à l'habitat sont en constante augmentation mais il est difficile d'avoir une vision globale de l'environnement. La quantification des acariens de la poussière domestique par qPCR n'apparaît pas suffisante et il est également important de quantifier les acariens de stockage afin d'évaluer notre exposition globale aux allergènes de l'environnement domestique.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude étaient :

- Développer des qPCR spécifiques aux acariens de la poussière domestique et aux acariens de stockage
- Déterminer les espèces et les quantités d'acariens présentes dans les logements des patients allergiques et des témoins
- Evaluer les facteurs pouvant influencer la présence des acariens

2) Mise au point des qPCR

Les séquences des gènes mitochondriaux du Cytochrome B (acariens de la poussière domestique) et des gènes nucléaires d'ARN ribosomal (acariens de stockage) des principales espèces d'acariens de l'environnement intérieur ont été alignées via le logiciel BioEdit et les sondes et amorces ont ensuite été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express[®].

3) Application

Vingt-quatre logements de patients allergiques aux acariens ont été recrutés de Janvier à Mars 2014 par la mutualité de Bourgogne et le Réseau d'Allergologie de Franche-Comté ainsi que 18 logements de témoins non allergiques. Pour chacun, un questionnaire sur le logement en général, la cuisine, la chambre, les données médicales et une enquête environnementale ont été réalisés.

Trois CEP (20x17 cm) ont été placés 10 semaines aux domiciles des patients et des témoins. Le premier a été placé sur un meuble (> 1,5 m) de la chambre, le second sous le lit à même le sol et le troisième sur un meuble (> 1,5 m) dans la cuisine. Les poussières sédimentées ont ensuite été analysées par qPCR à l'aide des couples sondes et amorces déjà développés au laboratoire (Roussel et al., 2013) et ceux mis au point dans cette étude.

3. Principaux résultats

Les couples sondes et amorces dessinés ont permis l'amplification des espèces *D. pteronyssinus* (DpterCBF1/R1/P1) et *D. farinae* (DfariCBF1/R1/P1) et des acariens de stockages *A. siro*, *G. domesticus* et *L. destructor* (SMF1/R1/P1). La spécificité des qPCR,

testée vis-à-vis des autres acariens, de la blatte *Blattella germanica*, des moisissures, des actinomycètes, des levures, des mycobactéries, des entérobactéries, du chat et du chien a montré que seules les espèces ou groupes ciblés étaient détectés. La limite de détection des qPCR était située entre 0,1 et 0,01 fg/ μ l soit entre 1/10000 et 1/100000 d'équivalents acariens par microlitre d'extrait et l'efficacité des qPCR était comprise entre 94 et 101 %.

Les acariens de la poussière domestique et les acariens de stockage ont été détectés par qPCR respectivement dans 95 et 100 % des logements. Les concentrations allaient de 0 à 21000 fg/ μ l et étaient significativement plus importantes en acariens de stockage qu'en acariens de la poussière domestique. De plus, les concentrations en acariens de stockage sont significativement plus importantes dans les logements des patients allergiques que dans ceux des sujets sains et lorsque des traces d'humidité ont été observées. Seule une VMC permet de réduire significativement les concentrations en acariens de stockage dans les logements.

4. Article Science of the Total Environment (soumis)

Quantifying domestic mites in dwellings with quantitative PCR: are storage mite concentrations underestimated compared to house dust mite concentrations?

Alexandre Naegele ¹, Gabriel Reboux ^{1,2*}, Benoit Valot ¹, Emeline Scherer ^{1,2}, Sandrine Roussel ^{1,2}, Laurence Millon ^{1,2}

¹ UMR/CNRS 6249, Chrono-Environnement, University of Bourgogne-Franche-Comté Besançon, France; ² Department of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, France.

Abstract Dwellings are increasingly well insulated to save energy and this leads to an accumulation of damp that encourages mites. House dust mite antigens are the main allergens involved in atopic asthma. Different mite species are present in dwellings. Using quantitative PCR, we quantified house dust mites and storage mites, in the house dust of patients with allergies and healthy controls. We developed three new species-specific quantitative PCR methods for house dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*) and storage mites (*Acarus siro*/*Glycyphagus domesticus*/*Lepidoglyphus destructor*). We sampled dust with electrostatic dust collectors, in the bedrooms, under beds and in the kitchens of patients with allergies (n = 24) and healthy controls (n = 18). Mite quantification was carried out with the new quantitative PCR and that previously described for the *Dermatophagoides* genus. The quantitative PCRs were highly specific and efficient for house dust mites species and the storage mites group. Storage mites concentrations were greater than house dust mites concentrations and were higher in dwellings of patients with allergies. Damp is a major factor in storage mites development and the presence of an efficient controlled mechanical ventilation can reduce storage mites concentrations four-fold. Quantitative PCR is an efficient tool for evaluating mite exposure. Storage mites are particularly common in dwellings of patients with allergies and allergists should look for their antigens more thoroughly in dwellings. To limit exposure to dust mites, efficient controlled mechanical ventilation is essential and anti-house dust mites treatments should be used throughout dwellings and not only in patients' bedrooms.

Key words Allergy, dwellings, electrostatic dust collector, house dust mites, species-specific qPCR development, storage mites.

1. Introduction

The indoor environment is increasingly important to us because we spend 80 to 90 % of our time inside (Yooseph *et al.*, 2013). Since the energy crisis, efforts to limit heat loss often induce a decrease in aeration and an accumulation of damp. Unsatisfactory insulation leads to a deterioration in air quality.

In parallel, the prevalence of asthma has increased over the last 40 years worldwide (Eder *et al.*, 2006). According to the World Health Organization ("WHO, Chronic respiratory Diseases, 2014), 235 million people in the world are asthmatic. In France, asthma causes 1500 deaths a year and the overall cost is estimated at about 1.5 billion euros (Doz *et al.*, 2013).

The main allergenic particles involved are pollens, mites, animals, molds and insects (Bousquet *et al.*, 2012). House dust mites (HDMs) (genus *Dermatophagoides*) are the most abundant mites in indoor habitats (beds, carpets, etc.) but storage mites (SMs) (*Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Glycyphagus domesticus*) have also been identified in stored food in dwellings (Morales *et al.*, 2015; Thind and Clarke, 2001).

The mite's main allergen is found in *Dermatophagoides pteronyssinus* faeces: Der p1 (Tovey *et al.*, 1981). Other allergens from the same species are Der p2 and other HDMs such as *Dermatophagoides farinae*: Der f1 and Der f2, SMs such as *A. siro*: Aca s13 was also identified as well as more than 100 others from 13 mites species (Colloff, 2009). There are 33 groups of allergens.

Over the last three decades, allergies linked to our domestic environment have become more common (Eder *et al.*, 2006). It is difficult to have precise knowledge of the presence of domestic mites and the pathological consequences. The ELISA is the most commonly used method for investigating allergens from mites in the environment (Dunn *et al.*, 2008) and the ACAREX® test has educational properties that can help involve the patient in finding remedies. However, these tests cannot quantify mites species. It is therefore necessary to use a species-specific standard method to detect and quantify domestic mites.

Our study aims are to develop a combination of three qPCR assays targeting *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *A. siro*/*G. domesticus*/*L. destructor* in the dwellings of patients with allergies and healthy controls and establish the environmental factors which may influence the relationship between different species of mites.

2. Material and methods

2.1. Development of HDM and SM species-specific qPCR

2.1.1. Tested strains

D. pteronyssinus, *D. farinae*, *L. destructor*, *G. domesticus* and *A. siro* (Mite collection, Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Vitoria, Spain) are commonly described in dwellings and can cause respiratory disorders. We used them to test specificity. The strains were cultured on a 1:1 (wt:wt) autoclaved mixture of commercial mouse meal and dried yeast powder according to Cardona *et al.* (2004).

Individuals of *Blattella germanica* were obtained from the “Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation” (Faculty of Sciences, University of Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France).

The thirty-eight filamentous fungi, four actinomycetes, four yeasts, two mycobacteria and one enterobacteria (Supplemental data) used were those currently isolated from indoor dust samples. Microorganisms were cultured onto Sabouraud (Beckton Dickinson, New Jersey, USA), Malt Agar (Beckton Dickinson, New Jersey, USA), Dichloran Glycerol 18% (DG18) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom), Actino Difco® (BD®, Le Pont-de-Claix, France) and R8 media (Amner *et al.*, 1989) at 20, 30 or 52° C for seven days.

DNA from *Felis domesticus* and *Canis familiaris* was obtained from ear tip and testes tissue respectively.

2.1.2. DNA isolation

Two hundred microliters of DNA-free water containing almost 400 mites, five young individuals of *B. germanica* or 10 mm² of fungi, actinomycetes, yeasts, mycobacteria and enterobacteria suspension was placed into 2.0 ml conical-bottom screw-cap tubes (MagNA Lyser Green Beads, RocheDiagnostics GmbH, Germany) containing 1.4 mm ceramic beads and 400 µl of lysis buffer from the NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Germany). The tubes were shaken in a MagNA Lyser Instrument (Roche Applied Science®, Germany) three times for ten seconds at the maximum speed, with one cooling minute in the cooling block. The tubes were then heated in a boiling water bath for 10 min. The samples were placed on ice for 10 min, followed by centrifugation for 2 min at 6000 ×g. DNA was then purified with NucleoSpin Plant II kit according to the manufacturer's instructions. DNA from *Felis catus* and *Canis familiaris* was obtained with the High Pure PCR Template Preparation Kit as recommended by the manufacturer (Roche Applied Science®, Mannheim, Germany). The DNA concentration of each extract was determined by a dosage program (160 nm) with a spectrophotometer (ND-1000 Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.1.3. Design of probes and primers

Mitochondrial Cytochrome B genus (HDMs) and rRNA (SMs) sequences of the main mite species found in dwellings were retrieved from the GenBank database and were aligned using BioEdit Software (Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, Ca, USA) to choose the most appropriate areas for primer design.

Primers and probes were designed using Primer Express® 3.0 for Real-Time PCR software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Parameters used to design primers and probes were chosen to ensure optimal specificity and efficiency for qPCR as described by Roussel *et al.* (2013).

2.1.4. QPCR, linear dynamic range, limit of detection and efficiency

PCR reactions contain 10 µl two-fold concentrated TaqMan® Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, USA), reverse and forward primers (Table 2) (final concentration 1 µM each) (Sigma-Aldrich, USA), a hydrolysis probe (Table 2) (final concentration 200 nM) (MWG Eurofins Operon, Germany), 5 µl of DNA sample and nuclease-free water to complete the 20 µl total volume of reaction mixture. Plates were centrifuged (one min at 1000 ×g) and PCR reactions were run and monitored using Applied Biosystems 7500 FAST Real-Time PCR System and 7500 Software v2.0.5. Sterile DNA-free water was extracted with samples and used as negative controls in each series of amplification. Thermal cycles consisted of 3 min at 95° C, followed by 45 cycles of 15 s at 95° C and 1 min at 60° C.

To generate calibration curves, DNA extracts were adjusted at 100 fg/µl with NucleoSpin Plant II kit elution buffer (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and were then serially diluted (1:10),

resulting in a five point calibration curve range of 100 to 0.01 fg/μl. For each qPCR assay, the calibration curve allowed us to calculate the linear dynamic range (LDR), and PCR amplification efficiency. The LDR is the concentration range over which the quantification cycle (Cq) and concentration remain directly proportional to each other. The range interval and correlation coefficient (R² value) were then reported. Amplification was repeated seven times for each concentration and the limit of detection (LOD) was the lowest concentration at which DNA was detected in all seven samples. PCR amplification efficiency was established as the slope of the log–linear portion of the calibration curve: PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$.

2.1.5. Analytical specificity

Analytical specificity, which refers to the qPCR assay detecting the appropriate organism and no others was tested against five mites, thirty-eight filamentous fungi, four actinomycetes, four yeasts, two mycobacteria, enterobacteria, cockroach, cat and dog DNA extracts. DNA concentration was adapted to 10 fg/μl to test analytical specificity and each DNA extract was tested using each of the combination of the three qPCR assays.

2.2. Applying novel qPCR on dust collected from dwellings of patients with allergies and controls

2.2.1. Recruitment and questionnaires

Twenty four dwellings of patients with allergies (allergies confirmed by cutaneous prick-tests) and 18 dwellings of controls (without allergies) were selected in early 2014 (January to March). Patient recruitment was conducted by the Medical Indoor Environment Counsellor (MIEC) of the “Mutualité de Bourgogne” and the “Réseau d’Allergologie de Franche-Comté” at the request of the allergist. For each dwelling, an environmental investigation was carried out and two questionnaires were distributed. The first was designed for the patients, the dwelling, the kitchen and the bedroom and the second involved clinical data.

2.2.2. Electrostatic dust collection

Three electrostatic dust collectors (EDC) (cloth surface: 20 cm x 17 cm) were placed in each dwelling for ten weeks. The first one was placed at a height of one meter in the bedroom, the second on the floor under the bed and the third at a height of one meter in the kitchen.

EDCs are electrostatic wipes that are able to capture dust. This device has already been used for analysis with real time quantitative PCR (qPCR) (Scherer *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2011). Once they were returned by mail, the EDC wipes were placed in a plastic bag with 20 ml of a solution of Tween 80 to 0.1 % and washed in Stomacher™ for 10 minutes. Nine ml of rinsing liquid was then collected.

2.2.3. Sample analysis

DNA extraction was performed from the centrifuged washing liquid (8000 g, 10 min.) using mechanical and thermal lysis as previously described by Scherer *et al.* (2014). In each extraction series, a sterile distilled water sample was included as a negative control and negative and positive controls were added to each qPCR reaction.

Primers and hydrolysis probes were used in the qPCR analyses. Four specific qPCR targets were used as distributed as follows:

- 1 HDM genus: *Dermatophagoides* spp. using primers and probes developed in our laboratory (Roussel *et al.*, 2013) (Table 1).
- 2 HDM species: *D. pteronyssinus* and *D. farinae*, and 1 SM group: *A. siro*/*L. destructor*/*G. domesticus* using the three new specific qPCRs described in Table 2.

Table 1: Primers and probe ^a list described by Roussel al. (10)

<i>Dermatophagoides</i> spp.		
Fwd	DermaF1	3'-CCTCGTGGTGGAGTGCATT-5'
Rev	DermaR1	3'-TCAGCTGCAGTTATCCAGAGTCA-5'
Probe	DermaP1	3'-ATTAGACCAAGACCAAAGGTGGCAACACC-5'
Fwd: forward primer; Rev: reverse primer		

^a Labeled with FAM reporter and TAMRA quencher

2.2.4. Expression of qPCR results in the environment

QPCR results were expressed in fg/μl, using species-specific DNA standard calibration curves. A known number of *D. farinae* (Mite collection, Department of Parasitology-Mycology, University Hospital, Besancon, France) used with the DNA standard calibration curve allows us to express our results in thousandth of equivalent mite/μl. One, two, four, eight and sixteen mites are respectively the equivalent of 1102, 2032, 3887, 8008 and 15832 fg/μl. Therefore, 1 fg/μl is the equivalent of one thousandth of mite per microliter. This calculation was made for *D. farinae* and extrapolated for the other groups (HDMs and SMs) and species (*D. pteronyssinus*).

2.3. Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program R (version 3.2.2) with packages lme4 (version 1.1.7), MASS (version 7.3.43) and pbkrtest (0.4.2) (R Development Core Team, Vienna, Austria).

The dwelling characteristics of patients with allergies and controls were compared using the Chi-square test (qualitative variables) and the student T test (quantitative variables). The comparisons of concentrations at three locations in the dwellings of the allergy and control groups were performed with a linear mixed-effect model. From this model, location effects were removed to obtain one concentration value by dwellings for each species. Species evaluations according to dwelling characteristics and concentrations of mites in dwellings were carried out using a linear model. The dwellings characteristics were automatically selected for each species using a stepwise model selection by AIC.

HDMs / SMs and *D. pteronyssinus* / *D. farinae* concentrations were compared with a paired Student T test and the domestic mite relationship was determined with a Pearson correlation test.

3. Results

3.1. Development of HDM and SM species-specific qPCR

3.1.1. Design of primers/probes

The alignment of mite sequences enabled us to choose areas for primer and probe designs. Primer and probe sequences are listed in Table 2. DpterCBF1/R1/P1 was designed specifically to amplify *D. pteronyssinus*, DfariCBF1/R1/P1 specifically to amplify *D. farinae* and SMF1/R1/P1 specifically to amplify the three main SM species *A. siro*, *L. destructor* and *G. domesticus*.

Table 2: Primers and probes ^a list.

<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
Fwd	DpterCBF1	3'-CATCCAACCAGAGTGGTATTTCC-5'
Rev	DpterCBR1	3'-GCTATTGCGCATACTCCACCTA-5'
Probe	DpterCBP1	3'-TATGCAATCCTTCGGGCTATCCCATCA-5'
<i>Dermatophagoides farinae</i>		
Fwd	DfariCBF1	3'-CACACATTCAACCAGAGTGGTACTT-5'
Rev	DfariCBR1	3'-GGCTAACACTCCCCCTAGTTTAGA-5'
Probe	DfariCBP1	3'-CGCTTACGCGATCCTACGAGCCATT-5'
Storage mites (<i>Acarus siro</i> / <i>Glycyphagus domesticus</i> / <i>Lepidoglyphus destructor</i>)		
Fwd	SMF1	3'-CGCAAACGTGGTGCGAGTA-5'
Rev	SMR1	3'-GCTCCTTGGTCCGTGTTTCA-5'
Probe	SMP1	3'-TCGGTCTCCACCCGACCCGTC-5'

Fwd: forward primer; Rev: reverse primer

^a Labeled with FAM reporter and TAMRA quencher

3.1.2. Analytical specificity

Analytical specificity was first checked using BLAST searches, and then validated by qPCR assays against mites, fungi, actinomycetes, yeasts, mycobacteria, enterobacteria, and cockroach, cat and dog extracts. No positive result was observed in qPCR assays using the three primers/probes designed (Supplemental data). Mite extracts were amplified as reported in Table 3, showing a good analytical specificity: only the target species were detected.

Table 3: Mean of threshold cycles (standard deviation) for the qPCR specificity study

Species extract (10 fg/μl)	DpterCBF1/R1/P1	DfariCBF1/R1/P1	SMF1/R1/P1
<i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>	28.87 (0.05)	Und.	Und.
<i>Dermatophagoïdes farinae</i>	Und.	26.21 (0.15)	Und.
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Und.	Und.	28.26 (0.21)
<i>Glycyphagus domesticus</i>	Und.	Und.	29.38 (0.22)
<i>Acarus siro</i>	Und.	Und.	27.20 (0.16)

Und. (undetermined): no amplification curve was obtained after 45 cycles of PCR.

3.1.3. Analytical characteristics of qPCR assays

The LDR of qPCRs were calculated using calibration curves of targeted organisms (Table 4). The LDR was between 100 fg/μl and 0.01 fg/μl. The correlation coefficient was up to 0.96 for the three targets, showing a good linearity between logarithms for DNA concentration and Cq. The LOD ranged from 10⁻⁴ to 10⁻⁵ mites per microliter of extract. Coefficients of variation for reproducibility were lower than 0.5.

Table 4: Performance of qPCR assays to detect specific mite strains extracted.

Targets		Linear dynamic range		Limit of detection		PCR efficiency in %	CV _{rep}
Primers/probes	DNA extract tested	Interval	R ²	In fg/μl	In mites/μl		
DpterCBF1/R1/P1	<i>D. pteronyssinus</i>	100 to 0.01 fg/μl	0.985	0.1	10 ⁻⁴	101	0.3
DfariCBF1/R1/P1	<i>D. farinae</i>	100 to 0.01 fg/μl	0.994	0.01	10 ⁻⁵	94	0.4
SMF1/R1/P1	<i>A. siro</i>	100 to 0.01 fg/μl	0.968	0.1	10 ⁻⁴	98	0.3

CV_{rep}: coefficient of variation for reproducibility

3.2. Applying novel qPCR on dust from dwellings of patients with allergies and controls

3.2.1. Dwelling characteristics and clinical information

Dwellings were recruited from eastern France, which has a continental climate with maximum average temperatures of 5° C and an average hygrometry of 88% in winter.

The dwelling profiles, observed in this study, were mainly houses equipped with controlled mechanical ventilators. They had gas heating and were aired every day. The kitchen walls were painted and the floors tiled, whereas the bedroom walls were decorated with wallpaper and had parquet floors. Evidence of damp (visible molds, mildew smell, blistered paint, and unstuck wallpaper) was observed in 25% of dwellings. The inhabitants were mainly non-smokers but the number of square-meters per inhabitant was significantly higher in the dwellings of controls (Student T test, *P* = 0.04). The patients with allergies used significantly more anti-HDM treatment than controls (Chi-square test, *P* = 0.04). Dwelling characteristics and the comparison between the dwellings of patients with allergies and those of controls are presented in Table 5.

The twenty four patients selected for this study were chronic allergy sufferers (seasonal allergies excluded) with a hypersensitive response to domestic mites (prick-test positive for *D. pteronyssinus* or *D. farinae*) but also to pollens (7), cats (3), molds (3), dogs (2) and cockroaches (1). Nineteen had rhinitis, fifteen asthma, twelve conjunctivitis, two chronic nasal dysfunction and one atopic dermatitis.

Table 5: Dwelling characteristics and comparison between dwellings of patients with allergies and those of controls using the Chi-square test (qualitative variables) and the student T test (quantitative variables) (* $P < 0.05$).

Questions		Patients with positive prick-tests (n=24)		Healthy controls (n=18)		Statistical analyses
Dwelling	Area	Rural (10)	Urban (14)	Rural (4)	Urban (14)	0.18
	Location	Apartment (5)	House (19)	Apartment (5)	House (13)	0.78
	Potted plants	Yes (20)	No (4)	Yes (16)	No (2)	0.77
	Pets	Yes (13)	No (11)	Yes (7)	No (11)	0.30
	Use of plant-health products	Yes (14)	No (10)	Yes (8)	No (10)	0.27
	Type of heating	Gas (12)	Other ^a (12)	Gas (5)	Other ^a (13)	0.18
	Damp evident	Yes (4)	No (20)	Yes (6)	No (12)	1.16
	m ² /inhabitants	Median (30)		Median (47)		0.04*
Kitchen	Ventilation	Yes (18)	No (6)	Yes (14)	No (4)	0.48
	Floor covering	Tile (18)	Other ^b (6)	Tile (15)	Other ^b (3)	0.77
	Wall covering	Paint (9)	Other ^c (15)	Paint (10)	Other ^c (8)	0.57
	Indoor compost	Yes (11)	No (13)	Yes (7)	No (11)	0.77
	Aeration frequency	Median (every day)		Median (every day)		0.79
Bedroom	Anti-HDM treatments	Yes (7)	No (17)	Yes (1)	No (17)	0.04*
	Floor covering	Parquet (13)	Other ^b (11)	Parquet (13)	Other ^b (13)	0.77
	Wall covering	WallPaper (11)	Other ^c (13)	Paper (10)	Other ^c (8)	0.39
	Aeration frequency	Median (every day)		Median (every day)		0.79
Inhabitants	Smokers	Yes (9)	No (15)	Yes (3)	No (15)	0.35

^aelectricity, fuel, wood

^blinoleum, parquet

^cpaper, paint, fiber

3.2.2. Contamination profiles of the dwellings of allergy patients and controls

With EDC, HDMs and SMs were detected by qPCR in 95% to 100% of dwellings. The abundance of targets ranged from 0 to 21 000 fg/μl (0 to 21 000 thousandth of equivalent mite per microliter) and contamination in the dwellings of patients with allergies and controls are presented in Fig. 1.

The quantity of HDMs was similar in the dwellings of patients with allergies and those of controls. By contrast, SM concentrations from the dwellings of patients with allergies were greater than those of controls (Student t-test, $P = 0.00004$).

SM concentrations were similar in bedrooms, under beds and in kitchens. The highest concentrations of HDMs were found under beds, regardless of whether the dwellings belonged to patients with allergies (Linear mixed-effect-model, $P = 0.0006$) or controls ($P = 0.03$). There were significant differences in HDM concentrations between the EDC locations for *D. farinae* (under beds/in kitchens, Linear mixed-effect-model, $P = 0.003$ and $P = 0.01$ for dwellings of patients with allergies and controls respectively) but not for *D. pteronyssinus*, in spite of greater concentrations under beds.

3.2.3. Factors influencing the HDM and the SM contamination

The statistical analysis (Linear model with Stepwise selection by AIC) showed that SM concentration increased when damp was observed ($P = 0.03$) and decreased with the presence of CMV ($P = 0.0004$) (reduced four-fold). These factors did not seem to influence the HDM concentrations (*Dermatophagoides* spp., *D. pteronyssinus* or *D. farinae*). However, the anti-HDM treatment (dust mite-proof, chemical treatment of bedding part) effects were limited to a slight and non-significant reduction in HDM (*Dermatophagoides* spp., *D. pteronyssinus* or *D. farinae*) and SM concentrations throughout the dwellings.

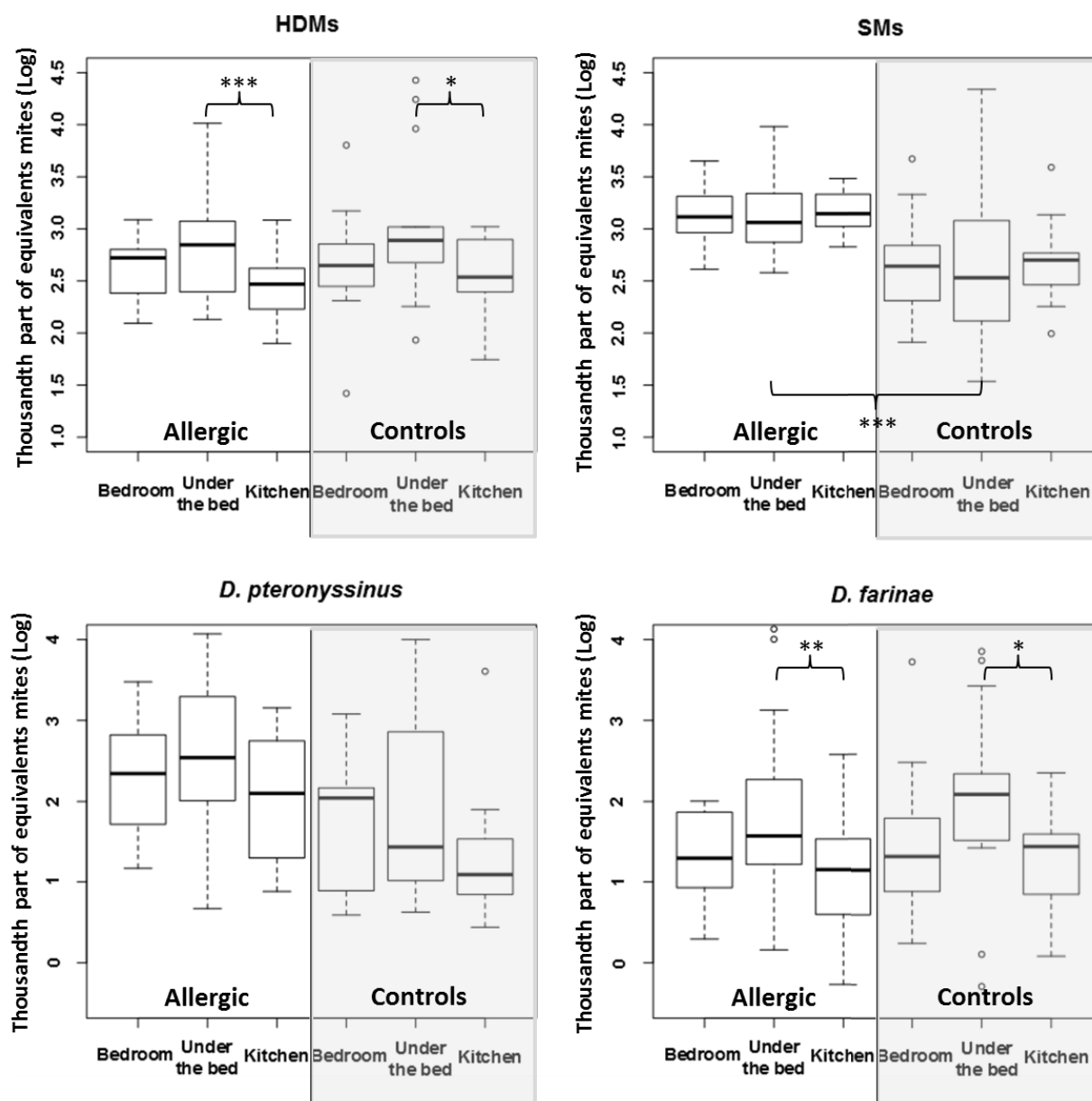


Fig. 1: Contamination at the three sites in the dwellings of patients with allergies and controls. ***: $P < 0.005$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$. Concentrations denominated in log thousandth of equivalent mite.

3.2.4. Relationship between contamination and mites

When we compared the HDM and SM concentrations, we observed that the SM concentrations were significantly greater than the HDM concentrations (Paired Student T test, $P = 0.0001$) (Fig. 2A). These concentrations were not significantly correlated (Fig. 2B). Indeed, high HDM concentrations did not lead to high SM concentrations and vice versa.

As far as the two main HDM species are concerned, the concentrations of *D. pteronyssinus* were significantly greater than those of *D. farinae* (Paired Student T test, $P = 0.0003$) (Fig. 3A) and these concentrations are significantly correlated (Pearson correlation test, $P = 0.006$; $R^2 = 0.3$) (Fig. 3B). The greater the quantity of *D. pteronyssinus*, the larger and more significant the *D. farinae* concentrations.

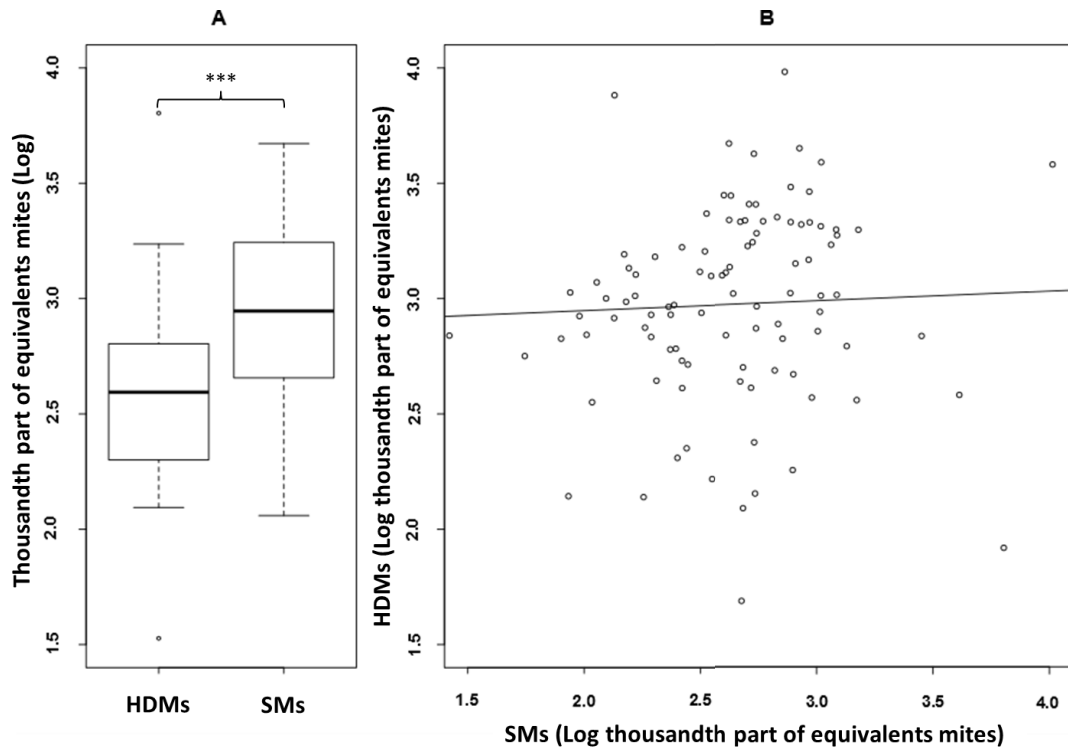


Fig. 2: Relationship between HDM and SM concentrations (A) and their correlation (B). ***: $P < 0.005$. Concentrations denominated in log thousandth of equivalent mite.

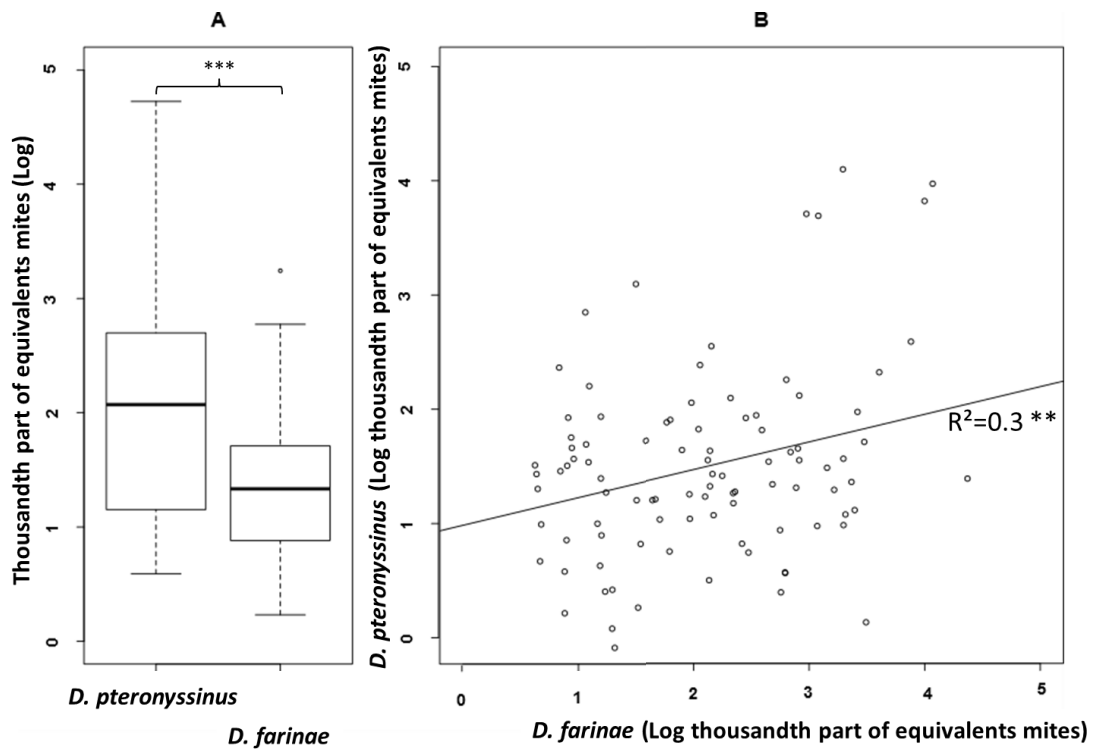


Fig. 3: Relationship between *D. pteronyssinus* and *D. farinae* concentrations (A) and their correlation (B). ***: $P < 0.005$, **: $P < 0.01$. Concentrations denominated in log thousandth of equivalent mite.

4. Discussion

Three novel species-specific qPCR methods can be used to quantify *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *A. siro*/*G. domesticus*/*L. destructor*. Comparatively, SM concentrations are greater than HDM concentrations and are higher in dwellings of patients with allergies than dwellings of controls. SM and HDM concentrations are entirely independent and damp is a factor encouraging SM development, but the presence of a controlled mechanical ventilators reduces SM concentrations.

The new primers and probes obtained for the HDM target *D. pteronyssinus* and *D. farinae* can only detect the targeted species and reduce the LOD to 10^{-4} and 10^{-5} versus 10^{-3} and 10^{-4} equivalent mites per microliter respectively in our previous study (Roussel *et al.*, 2013).. The new qPCR target can detect the three main SM species in the internal environment: *A. siro*, *G. domesticus* and *L. destructor*, with a low LOD (10^{-4} equivalent mites per microliter). ACAREX® test is simple to identify sources of mites in houses (Haouichat *et al.*, 2000) but in qPCR experiments, a single dust extract of 15 mg (vs 100 mg for ELISA test or ACAREX test) allows us to quantify HDM, SM, fungi and bacteria.

Domestic mites were detected in all dwellings in this study. The strong presence of HDMs and their effects on health are recognized by the medical community (Boquete *et al.*, 2006).. SMs were present in larger concentrations in dwellings of patients with allergies but their implications for health have not been thoroughly explored. The SM concentrations were similar in bedrooms and kitchens, whereas HDM concentrations were greater in bedrooms, particularly under beds. SMs feed on food waste and colonize foodstuffs such as flour and cheese. Mattress conditions are ideal for HDMs due to the damp and heat (caused by human sweat) and food (skin, keratinized fragments) (Boor *et al.*, 2014). HDMs and SMs are detected in bedrooms and kitchens because air circulates from the main rooms (bedrooms, living rooms) towards kitchens and bathrooms. CMV extracts the air polluted by kitchens and bathrooms and new air enters the dwelling through air vents above windows in living rooms and bedrooms. Furthermore, inhabitant movements allow air to flow within the dwelling. Mites are able to move quickly (7 mm/min.), and this movement plays a role in dwelling invasion (Naegelé *et al.*, 2013).

Our results demonstrate a significant decrease in SM concentrations with the presence of an efficient CMV. However, the observation of damp is linked to an increase in SM concentrations. Damp is one of the main factors in mite development.

A variety of mite species can be found in dwellings depending on the percentage of relative humidity. A rate of relative humidity range of between 50-60% (*D. farinae*) and 70-80% (*D. pteronyssinus*) will encourage the presence of HDMs (Crowther *et al.*, 2006) whereas a high upper rate of 85% will promote SM development (Aspaly *et al.*, 2007). Other factors such as temperature and food availability could modify the potential of each species to develop in dwellings. HDMs require a temperature between 26° C and 32° C but can survive at 15° C (Arlan *et al.*, 1990). However, SMs can withstand lower temperatures (as low as 4° C) (Nesvorna *et al.*, 2012). When the conditions are not optimal, SMs are able to block or prolong their stage of development (Wharton, 1976). These behavioral adaptations could be the cause of the proliferation of SMs in dwellings in our study.

Included in the MIEC recommendations are removing carpets, lowering the temperature, airing more regularly and for longer and anti-HDM treatments (mattress covers, miticide spray). These physical and chemical treatments led to a slight decrease in HDM and SM concentrations in this study. Indeed, anti-HDM treatments are only effective locally, whereas allergens are aerosolized throughout dwellings.

Exposure to allergens can lead to conjunctivitis, rhinitis and asthma (Lin *et al.*, 2012). Dust allergens were among the first pollutants to be associated with respiratory effects (Blanc *et al.*, 2005). Mites' faeces are a major allergen in domestic dust. *D. pteronyssinus* produced, on average, 20 excrements a day containing 100 pg of Der p1 each (Tovey *et al.*, 1981). Thresholds of sensitization fixed at 2 µg/g of dust were found to lead to antibody production (Calderón *et al.*, 2015).

The Global Allergy and Asthma European Network suggests a panel of allergens (Pollen, animals, molds, insects and HDM) to be tested but the SM allergens are not listed (Bousquet *et al.*, 2012). *D. pteronyssinus* and *D. farinae* are the only HDM allergens suggested by this network. According to Høst *et al.* (2003), HDM allergens should also be tested and SM allergens are not mentioned despite the fact that tests for SM allergens (*A. siro*, *L. destructor*, *G. domesticus*) are available (Phadia® Laboratory System, Uppsala, Sweden). However, the clinical effects of *A. siro* (allergen Aca s13) are well known (van Hage-Hamsten and Johansson, 1998) and this species has been associated with indoor respiratory allergy, mainly in rural areas (Iraola *et al.*, 2014). SMs of the *Acarus* genus are a major cause of deterioration in stored food and are found all over the world.

In conclusion, it is essential to use a quantitative tool (qPCR) that is sensitive and highly specific in order to quantify allergen exposure. SMs are particularly common in dwellings of patients with allergies but quantities of them are underestimated and their effects on health are probably not sufficiently acknowledged by allergists. To limit our exposure to HDMs and SMs, an effective CMV should be set up and anti-HDM treatment used throughout dwellings and not only in patients' bedrooms.

Acknowledgments

The authors thank the MIEC, Ms. Laure Blanchon and Ms. Martine Bochaton from the "Mutualité de Bourgogne" (directed by Mr. Guillaume Gardin), and Ms. Habiba Amari from the "Réseau d'Allergologie de Franche-Comté" (co-ordinated by Dr. Jean-Marc Rame), for recruiting patients with allergies and sedimented dust sampling. We thank Ms. Claire Labartette from the "ATMO Franche-Comté" (directed by Dr. Francis Schweitzer), for recruiting control dwellings, and Ms. Frances Thivet of the Thivet Language Services for her editorial assistance.

References

- Amner W, Edwards C, McCarthy AJ. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:2669–74.
- Arlian LG, Rapp CM, Ahmed SG. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J Med Entomol* 1990;27:1035–40.
- Aspaly G, Stejskal V, Pekár S, Hubert J. Temperature-dependent population growth of three species of stored product mites (Acari: Acaridida). *Exp Appl Acarol* 2007;42:37–46.
- Blanc PD, Eisner MD, Katz PP, Yen IH, Archea C, Earnest G, Janson S, Masharani UB, Quinlan PJ, Hammond SK, Thorne PS, Balmes JR, Trupin L, Yelin EH. Impact of the home indoor environment on adult asthma and rhinitis: *J Occup Environ Med* 2005;47:362–72.
- Boor BE, Spilak MP, Corsi RL, Novoselac A. Characterizing particle resuspension from mattresses: chamber study. *Indoor Air* 2014;25:441–56.
- Boquete M, Iraola V, Fernández-Caldas E, Arenas Villaroel L, Carballada FJ, González de la Cuesta C, López-Rico MR, Núñez Orjales R, Parra GA, Soto-Mera MT, Varela S, Vidal C. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:169–76.
- Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, Canonica GW, Carlsen KH, Cox L, Haahtela T, Lodrup Carlsen KC, Price D, Samolinski B, Simons FER., Wickman M, Annesi-Maesano I, Baena-Cagnani CE, Bergmann KC, Bindslev-Jensen C, Casale TB, Chiriac A, Cruz AA, Dubakiene R, Durham SR, Fokkens WJ, Gerth-van-Wijk R, Kalayci O, Kowalski ML, Mari A, Mullol J, Nazamova-Baranova L, O'Hehir RE, Ohta K, Panzner P, Passalacqua G, Ring J, Rogala B, Romano A, Ryan D, Schmid-Grendelmeier P, Todo-Bom A, Valenta R, Woehrl S, Yusuf OM, Zuberbier T, Demoly P. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012;67:18–24.
- Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, Demoly P. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:38–48.
- Cardona G, Eraso E, Serna LA, Guisantes JA, Martínez J. Analysis of the allergen expression of *Blomia tropicalis* and *Blomia kulagini* (Astigmata: Glycyphagidae) cultures. *J Med Entomol* 2004;41:1068–1072.
- Colloff MJ. Dust mites allergens. *Dust Mites* (eds Springer), pp. 273–328. Dordrecht, Netherlands, 2009.
- Crowther D, Wilkinson T, Biddulph P, Oreszczyn T, Pretlove S, Ridley I. A simple model for predicting the effect of hygrothermal conditions on populations of house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Exp Appl Acarol* 2006;39:127–48.
- Doz M, Chouaid C, Com-Ruelle L, Calvo E, Brosa M, Robert J, Decuypère L, Pribil C, Huerta A, Detournay B. The association between asthma control, health care costs, and quality of life in France and Spain. *BMC Pulm Med* 2013;13:15.
- Dunn JA, Thind BB, Danks C, Chambers J. Rapid method for the detection of storage mites in cereals: feasibility of an ELISA based approach. *Bull Entomol Res* 2008;98:207–13.
- Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006;355:2226–35.
- Haouichat H, Pauli G, Ott M, Hedelin G, De Blay F, Vérot A. [Réévaluation de l'Acarex-test dix ans après]. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000;40:783–92.
- Høst A, Andrae S, Charkin S, Diaz-Vázquez C, Dreborg S, Eigenmann PA, Friedrichs F, Grinstead P, Lack G, Meylan G, Miglioranza P, Muraro A, Nieto A, Niggemann B, Pascual C, Pouech MG, Rancé F, Rietschel E, Wickman M. Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 2003;58:559–69.

- Iraola V, Prados M, Pinto H, Morales M, Leonor JR., Carnés J. Allergological characterization of the storage mite *Acarus gracilis* (Acari: Acaridae). *Allergol Immunopathol* 2014;48:332–8.
- Lin S, Jones R, Munsie JP, Nayak SG, Fitzgerald EF, Hwang SA. Childhood asthma and indoor allergen exposure and sensitization in Buffalo, New York. *Int J Hyg Environ Health* 2012;215:297–305.
- Morales M, Iraola V, Leonor JR, Bartra J, Rodríguez F, Boquete M, Huertas AJ, Paniagua MJ, Pinto H, Carnés J. Different sensitization to storage mites depending on the co-exposure to house dust mites. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015;114:36–42.
- Naegele A, Reboux G, Scherer E, Roussel S, Millon L. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *Int J Environ Health Res* 2013;23:91–5.
- Nesvorna M, Gabrielova L, Hubert J. Suitability of a range of *Fusarium* species to sustain populations of three stored product mite species (Acari: Astigmata). *J Stored Prod Res* 2012;48:37–45.
- Roussel S, Reboux G, Naegele A, Martinez J, Vacheyrou M, Scherer E, Millon L. Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR. *Environ Int* 2013;55:20–4.
- Scherer E, Rocchi S, Reboux G, Vandentorren S, Roussel S, Vacheyrou M, Raherison C, Millon L. QPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. *Sci Total Environ* 2014;466-467:716–24.
- Thind BB and Clarke PG. The occurrence of mites in cereal-based foods destined for human consumption and possible consequences of infestation. *Exp App Acarol* 2001;25:203–15.
- Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TE. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* 1981;289:592–3.
- van Hage-Hamsten M, Johansson E. Clinical and immunologic aspects of storage mite allergy. *Allergy* 1998;53:49–53.
- Wharton GW. Review Article: House dust mites. *J Med Entomol* 1976;12:577–621.
- Yamamoto N, Shendell DG, Peccia J. Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR. *Indoor Air* 2011;21:521–30.
- Yooseph S, Andrews-Pfannkoch C, Tenney A, McQuaid J, Williamson S, Thiagarajan M, Bami D, Zeigler-Allen L, Hoffman J, Goll JB, Fadrosch D, Glass J, Adams MD, Friedman R, Venter JC. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PloS One* 2013;8:e81862.

III. Mesure de l'exposition aux animaux domestiques et aux blattes dans les logements par qPCR et évaluation globale du risque allergique

1. Contexte

Parmi les maladies allergiques, l'asthme représente un réel enjeu de santé publique et est aujourd'hui la maladie chronique de l'enfance la plus répandue dans les pays industrialisés (Eder et al., 2006). De causes multifactorielles, l'asthme résulte des interactions entre prédispositions génétiques et exposition environnementale durant les premières années de la vie aux polluants de l'air intérieur : acariens domestiques, moisissures, animaux domestiques et blattes.

La qPCR est un outil universel utilisé pour la détection de nombreux organismes. Après les micro-organismes, les acariens de la poussière domestique et les acariens de stockage, cette technique pourrait également être utilisée pour la détection d'autres organismes de l'environnement intérieur responsables de ces effets cliniques tels que les animaux domestiques (Pyrhönen et al., 2015) et les blattes (Gaffin et al., 2014).

Les difficultés rencontrées pour établir un lien entre exposition et développement de la maladie sont liées aux caractéristiques multifactorielles de l'asthme et à la multitude de méthodes utilisées pour la caractérisation de la qualité de l'air intérieur. Entre le recours aux questionnaires et l'échantillonnage, entre les prélèvements actifs et passifs de poussières et les prélèvements d'air, entre la quantification par culture, par qPCR et la mesure des antigènes dans les poussières, il est difficile de conclure sur les risques encourus aux domiciles.

Habituellement déterminée par questionnaire pour les animaux domestiques ou par mesures des allergènes pour les blattes, la quantification de ces organismes par qPCR présenterait de nombreux avantages : efficace, sensible et reproductible. De plus, à partir d'un unique échantillonnage des poussières sédimentées par CEP, il serait alors possible de quantifier à la fois les acariens domestiques, les moisissures, les animaux domestiques, les blattes et ainsi progresser dans l'évaluation globale de notre exposition aux allergènes dans les logements.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude étaient :

- Evaluer les qPCR spécifiques aux animaux domestiques sur les poussières sédimentées
- Développer une qPCR spécifique aux blattes
- Progresser dans l'évaluation globale de l'exposition aux allergènes

2) Mise au point des qPCR

Les couples sondes et amorces spécifiques de l'ADN du chat (*Felis catus*) et du chien (*Canis lupus familiaris*) ont été développés au laboratoire pour l'identification des fèces de carnivores avec une haute sensibilité (Knapp et al., 2015 en préparation). Ceux spécifiques des blattes germaniques (*Blattella germanica*) ont été obtenus à partir des séquences des gènes nucléaires d'ARN ribosomal à l'aide du logiciel Primer Express®.

3) Application

Vingt-quatre logements ont été recrutés dans la région Franche-Comté sans critères environnementaux ou médicaux. Pour chacun, un questionnaire sur le logement en général, la présence et les habitudes des animaux domestiques et la présence de blattes ont été réalisés.

Un CEP (20x17 cm) a été placé dans une des pièces de l'habitation en hauteur durant six semaines. Les poussières sédimentées ont ensuite été analysées par qPCR à l'aide des couples sondes et amorces déjà développés au laboratoire (Knapp et al., 2015 en préparation) et ceux mis au point dans cette étude.

3. Principaux résultats

Les couples sondes et amorces utilisés ont permis l'amplification des animaux domestiques *Felis catus* et *Canis lupus familiaris* et de la blatte *B. germanica*. La spécificité des qPCR, testé vis-à-vis des acariens, des moisissures, des actinomycètes, des levures, des mycobactéries, des entérobactéries, a montré que seules les organismes ciblés étaient détectés. La limite de détection des qPCR était située aux alentours de 5 fg/μl pour le chien et la blatte et inférieure à 5 fg/μl pour le chat.

Les résultats obtenus par qPCR étaient positifs dans 50 % des logements pour le chat et 87,5 % pour le chien. L'ensemble des logements de personnes déclarant être en contact avec un ou plusieurs chats/chiens était positif et les concentrations en ADN de chat/chien étaient significativement corrélées avec la présence de l'animal. Pour les blattes, aucun résultat positif n'a été obtenu mais aucun des participants n'a déclaré la présence de blattes à domicile.

4. Article International Journal of Environmental and Health Research (en révision)

Quantification of pets and cockroaches in homes using qPCR: a new tool to evaluate exposure and risk of allergies

Emeline Scherer^{a,b}, Benoit Valot^a, Mallory Vacheyrou^a, Alexandre Naegele^a, Jenny Knapp^a, Steffi Rocchi^{a,b}, Sandrine Roussel^{a,b}, Laurence Millon^{a,b}, Gabriel Reboux^{a,b*}.

^aUMR/CNRS 6249, Chrono-Environnement, University of Bourgogne-Franche-Comté Besançon, France

^bDepartment of Parasitology-Mycology, University Hospital of Besançon, France.

Abstract Contradictory results are found in the literature concerning fungi, bacteria, pet and cockroach exposure and the risk of developing asthma. All these allergens have been thoroughly studied separately in cohort studies, and a variety of sampling and analytical methods are used. It is already possible to characterize fungi, mites and bacteria by qPCR. The aim of our study is to evaluate qPCR systems to quantify the presence of cats, dogs and cockroaches in homes. Twenty-four houses were sampled with an Electrostatic Dust Collector which was analyzed by qPCR. Questionnaires were completed on the presence of pets or cockroaches in homes. The results from qPCR were correlated for real presence of cats and dogs, and highlighted indirect exposure. No participants reported the presence of cockroaches in their homes and this was confirmed by the results of cockroach qPCR. This study validated a screening tool that will be used in future in the ELFE cohort study.

Key words qPCR, Housing, Cat, Dog, Cockroach, Antigens.

Introduction

Asthma has become the most common chronic childhood disease in the industrialized world (Eder et al. 2006). Asthma is described as an environmental disease resulting from the interaction between genetic predisposition and environmental exposure to pets, house dust mites (HDM) and molds, particularly indoor pollution, during the early years of life.

Many studies have attempted to explain environmental involvement in the development of allergic diseases. Real-time quantitative PCR (qPCR) technologies have highlighted a number of fungi involved in allergy or sensitization (Vesper et al. 2008) but their precise involvement remains inconclusive. Although some teams have identified some fungi species that are correlated with a high risk of developing asthma (Reponen et al. 2012, Sharpe et al. 2015), the role of the different agents and mechanisms is unknown. Cohort studies have reached different conclusions. The difficulty in reaching conclusions is related to the multifactorial characteristics of asthma, and to the heterogeneity of the methods used for indoor characterization. Questionnaires may be used instead of sampling; samples may include active dust, passive dust or air. These samples may be quantified in culture or with PCR, or through antigen measurements. It is also difficult to time these measurements accurately, as samples may vary considerably at different stages of a child's life, and may be taken once or repeatedly. Therefore, the available data cannot be compared and the conclusions of the different studies are often incomplete because they are so diverse.

qPCR is a useful technique for environmental micro-organism characterization and quantification and has recently been used in numerous cohort studies. The main advantages are accurate quantification, efficacy, sensitivity and reproducibility. qPCR has been used by several teams (Karakainen et al. 2009; Karakainen et al. 2011; Yamamoto et al. 2011; Reponen et al. 2012; Méheust et al. 2012; Vesper et al. 2013) but in all these studies, qPCR was restricted to detection and quantification of molds and bacteria.

The ELFE study (Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance), which started in 2011, consists of a 20 000 birth cohort study conducted on a multidisciplinary basis. Several working groups have been established, one of them focusing on asthma and allergic respiratory diseases. This particular group required a tailored system for taking measurements.

In the first step of this study, ten specific qPCR targets (six fungal species, one family and two genera of bacteria, one house dust mite) were used to analyze the microorganism composition of an electrostatic dust fall collector (EDC) from 3193 dwellings in the Elfe cohort study. Multivariate analyses showed that the microbial composition of dwellings could be expressed in clusters, which seems promising for the evaluation of allergy risk (Rocchi et al. 2015). These profiles, which synthesize microorganism diversity (regardless of which type of living organism) and reflect the complexity and interaction of a panel of microorganisms in dwellings, could enhance our knowledge of the relationship between the microbiological environment and allergic diseases.

Because our results so far are so encouraging, it would be useful to improve these profiles by adding other allergenic agents which do not come from micro-organisms, i.e. pets and cockroaches.

The relationship between exposure to dogs and cats in early childhood and the incidence of allergies is still controversial (Chen et al. 2010; Lodge et al. 2012). It has been suggested that contact with pets increases the risk of allergic diseases and sensitization (Pyrhönen et al. 2015), or protects against them (Gaffin et al. 2012). Allergen measurements correlated with the presence of animals at home (Almqvist et al. 2003), and questionnaires are the current methods used to determine pet exposure in cohort studies (Crawford et al. 2015). Cockroaches, particularly *Blattella germanica*, can be found in inner cities and their presence may indicate chronic damp in homes (Crawford et al. 2015). Exposure has been shown to increase the risk of wheezing in children of atopic and non-atopic parents (Gaffin et al. 2014) but this exposure has only been quantified by measuring antigens on vacuum dust.

The aim of our study was to assess qPCR techniques that were previously developed to detect cat and dog DNA in samples of feces containing parasitological diseases (Knapp et al. 2015). We intended to measure exposure to pets in dwellings by obtaining quantitative results that can be integrated in the profile model previously used to measure environmental conditions in dwellings from the ELFE cohort. The second objective was to design a new qPCR system to quantify cockroaches, to complete the panel of potential allergens to be quantified in dwellings.

The final step would be to establish a unique result in the form of a profile synthesizing the allergen mixture of each dwelling. This will include micro-organisms, mites, pets and cockroaches, all of which could be related to health data of children from the ELFE Cohort.

Materials and methods

qPCR development

qPCR system for pets

The system was developed to identify carnivore feces using the high sensitivity of the real-time PCR technique. Probes and primers were previously designed for dogs and cats using the Primer Express 3.0 for the host fecal test (Knapp et al. 2015), shown in Table 1.

qPCR system for cockroaches

Probes and primers were designed for these studies on the 18s DNA, using the Primer Express 3.0. VIC TAM-RA labeling was used because duplex QPCR quantification was required for the ELFE study (Table 1).

Table 1. Primers and hydrolysis probes designed to identify cats, dogs and cockroaches by qPCR.

Target	Primers & probe	Sequence (5'-3')	Reference
Cat (<i>Felis catus</i>)	Forward primer	CCCTTCTAGGAGTCTGCCTAATCTT	Knapp et al., sub. paper
	Reverse primer	CGGTTATTGTGTCTGATGTGTAGTGT	
	Probe	(FAM)AAATCCTCACCGGCCTCTTTTGGC(TAMRA)	
Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Forward primer	CCACCCACTAGCCAAAATTGTT	Knapp et al., sub. paper
	Reverse primer	AAGTTCCATCAAGCAGAGATGTTAGA	
	Probe	(VIC)ATAACTCATTGACCTCCCAGCGCC(TAMRA)	
Cockroach (<i>Blattella germanica</i>)	Forward primer	TTCGTGTGGACGTCCTGTTG	
	Reverse primer	GGCAGACGGAATCCAGACA	
	Probe	(VIC)TGGCCTTTTCCGAGCTGTGTCCTTC(TAMRA)	

Efficacy, limit of detection and specificity

DNA from the epipidym and ear tip was extracted using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostic, Penzberg, Germany), as recommended by the manufacturer and was used to define the calibration scale of dogs and cats respectively. The concentration of the first calibration point was 50 pg/μL.

DNA from *Blattella germanica* was obtained from specimens provided by the “Centre des sciences du gout et de l'alimentation” (faculty of Sciences, Dijon, France). Extraction was performed using mechanical lysis (runs in MagNA Lyser Instrument) (Roche Applied Science®, Mannheim, Germany), and then using the same kit, as recommended by the manufacturer. The concentration of the first calibration point was 50 pg/μL.

For each of these targeted species, DNA extract was diluted from 50 000 to 0.5 fg/μL. Each calibrating point was run seven times. Limit quantification is defined as the smallest amount of DNA in which seven successful detections are observed in seven qPCR trials (Hospodsky et al. 2010).

Specificity was tested using DNA extract from 52 indoor micro-organisms currently found in houses and belonging to groups of mold (n=38), actinomycetes (n=4), yeasts (n=4), mycobacteria (n=2), enterobacteria (n=1) and dust mite (n= 3). DNA concentration in the sample tested was 500fg/μL, except for dust mites (10fg/μL). Cultivable micro-organisms were cultivated on adapted media at the correct temperature and extraction was performed as previously described (Scherer et al. 2014).

qPCR analysis

qPCR reaction was performed in a final volume of 20μL, containing 10μL of Hydrolysis Gene Expression Master mix 2X (Applied Biosystem, Foster City, CA), 1000nM primers et 200nM probe and 5μL of DNA extract. The amplification protocol was as follows: two minutes at 50°C, ten min at 95 °C for the activation, followed by 45 cycles for 15 s at 95 °C for template denaturation and one min at 60 °C for primer and probe annealing and extension. PCR reactions and absolute quantification were run and monitored using Applied Biosystems® 7500 Fast System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sterile distilled water samples were used as negative controls in each series of amplification. The results are expressed with the Quantification Cycle, Cq. Negative results are expressed as Cq=45.

Application of qPCR on dwellings with and without pet occupation

Sampling and qPCR Analysis of dwellings

Twenty-four houses were recruited in eastern France (Franche-Comté region). No environmental or medical criteria for selecting the type of dwellings were used. An Electrostatic Dust Collector (EDC) was exposed to the air on a horizontal surface between 1.60 m and 1.80 m above the floor in an occupied room. Dust was allowed to settle over a six week period in winter. A questionnaire on the type of housing, pets and the presence of cockroaches was given to the participants. Participants returned the questionnaires and the EDC at the end of the sampling period.

DNA extraction from the EDC was performed as previously described (Scherer et al. 2014). DNA from cats, dogs and cockroaches was amplified using the qPCR assays described above.

Estimation of real exposure to pets in homes

Participants had to respond not only to questions about the presence of cats or dogs in their homes, but also about the number of pets and the frequency of the pets' presence in the house and in the room tested (Direct Exposure). Using all of this information, three categories of exposure were determined. The cat(s) or dog(s) was identified with the letter P if the animal was often in the tested room, and with the letter A if the pet was never in the tested room. In cases where animals were often in the house but rarely in the tested room, the letter M was used.

Participants also had to give information about regular contact with relatives who had a cat or dog at home (considered as Indirect Exposure (Almqvist et al. 2003)).

Statistical analysis

Non-parametric tests (Wilcoxon rank sum test and Kruskal–Wallis test) were used to investigate possible differences in Cq results, the presence or absence of pets at home and type of exposure, and the category of exposure. Statistical analyses were performed using R 2.13.1 (R Development Core Team, 2012).

Results

qPCR efficacy

Repeatability is expressed by the Cq standard deviation (Bustin et al. 2009). For each species targeted, mean Cq, Cq Standard Deviation (SD Cq), and the number of successful trials are reported (Table 2). The lowest concentration, with seven successful trials and SD Cq<1 was considered as the limit of quantification. The quantification limit was about 5fg DNA/ μ L for *Blatella germanica* and dogs, corresponding to Cq =39.8 and 39.0, respectively. For cats, we considered Cq=39.5 as the limit of detection because the sample with 5fg/ μ L was detected in the 5/7 run, and the sample with 0.5 fg was not detected at all.

qPCR specificity

The results of qPCR analyses using the primers and probes designed for cat, dog and cockroach detection were negative (Cq > 40 cycles) when applied to DNA extract from the 52 micro-organisms analyzed in specificity tests.

Table 2: Detection limits and repeatability of the three targets used in qPCR; correlation coefficient of the scale (r^2), mean of the Quantification Cycle obtained (Cq mean), Standard Deviation of these Cq (SD Cq), number of successful trials (n=7) for each species. In bold are the concentrations chosen for limit of quantification. (nd = absence of signal)

Concentration (fg/ μ L)	Dog ($r^2=0.992$)			Cat ($r^2=0.997$)			Cockroach ($r^2=0.942$)		
	Cq mean	Cq SD	Number of success	Cq mean	Cq SD	Number of success	Cq mean	Cq SD	Number of success
50000	25.2	0.02	7	26.3	0.02	7	26.0	0.09	7
5000	28.7	0.08	7	29.6	0.05	7	29.2	0.12	7
500	32.2	0.07	7	33.0	0.21	7	35.7	0.21	7
50	35.5	0.30	7	36.5	0.39	7	36.8	0.27	7
5	39.0	0.98	7	39.5	0.47	5	39.8	0.82	7
0.5	39.8	1.93	2	nd	nd	0	40.5	0.01	2

Dwelling recruitment

Eighteen houses were in urban areas, and six in rural areas. The mean time of exposure was 45 days (minimum 24 days, maximum 60 days).

Of the participants, 46% declared having at least one cat, 42% at least one dog, 21% a cat and a dog. The number of dogs is divided into five categories, and the number of cats into six categories (Table 3).

None of the participants lived in inner city areas, and none reported cockroaches in their homes.

Table 3: Distribution of housing according to categories of exposure: number of each pet, completed by A=pet never in tested room, M= presence at home but rarely in tested room, P= frequent presence in tested room.

Exposition category	0	1A	1M	1P	2M	2P	3M	3P
Cat (Number of dwellings)	13	0	1	7	1	1	0	1
Dog (Number of dwellings)	14	3	1	5	0	0	1	0

qPCR on dwelling samples

Correlation between qPCR results and presence of pets in homes

The number of animals, exposure category and Cq results are shown for each sample in Table 4.

Cat qPCR was positive in 50% of houses, and dog QPCR was positive in 87.5% of houses. All houses with cats were cat qPCR-positive (Cq \leq 39,5 cycles).

Table 4: Number of animals, exposure category and Cq results for each of the 24 samples. Grey cases correspond to sample with positive signal without the pet concern contact, “*” identify the sample where indirect exposure has been reported.

Sample	Declared Number of cats	Exposure category of cat	Mean Cq for cat qPCR	Declared number of dogs	Exposure category of dog	Mean Cq for dog qPCR	Mean Cq for cockroach qPCR
H1	0	0	45.0	0	0	45.0	45.0
H2	0	0	45.0	0	0	*36.7	45.0
H3	0	0	45.0	1	1P	35.5	45.0
H4	1	1P	36.3	1	1M	34.9	45.0
H5	1	1P	39.5	1	1A	39.4	45.0
H6	2	2M	35.1	3	3M	34.9	45.0
H7	0	0	45.0	0	0	40.6	45.0
H8	0	0	45.0	1	1P	29.4	45.0
H9	1	1M	38.8	0	0	40.6	45.0
H10	1	1P	36.9	0	0	45.0	45.0
H11	1	1P	36.6	0	0	*38.1	45.0
H12	1	1P	34.9	0	0	39.2	45.0
H13	0	0	45.0	0	0	40.6	45.0
H14	0	0	45.0	1	1P	33.7	45.0
H15	0	0	45.0	0	0	*36.3	45.0
H16	2	2P	32.8	0	0	39.7	45.0
H17	0	0	*37.7	0	0	*37.5	45.0
H18	3	3P	33.4	1	1P	32.3	45.0
H19	1	1P	37.2	1	1P	31.6	45.0
H20	1	1P	35.4	0	0	*39.2	45.0
H21	0	0	45.0	0	0	45.0	45.0
H22	0	0	45.0	0	0	*36.9	45.0
H23	0	0	45.0	1	1A	37.0	45.0
H24	0	0	45.0	1	1A	39.2	45.0

A higher DNA concentration (i.e. lower Cq in qPCR) was measured in houses with the highest number of cats. Cat qPCR Cq was highly correlated with the presence or absence of cats (p-value= <0.0001) (Figure 1), and with the category of exposure (p-value< 0.005) (Figure 3). The qPCR signal was significantly higher (p-value < 0.01) when more than one cat was present (Figure 2).

Only one house without a cat presented a positive qPCR signal (H 17; Cq = 37.7), but indirect exposure was reported by frequent visits to and from family with cats and dogs.

All houses with dogs were dog-qPCR positive. The Dog-Cq is highly correlated with the presence or absence of dogs (p-value <0.005) (Figure 4). Kruskal–Wallis was used to test the difference between categories of exposure in dog owners. The difference was statistically significant between Dog-Cq when dogs were present in the room (1P) compared to when they were never in the room (1A) (Figure 5).

In 11 cases, a positive qPCR signal was detected when no dogs were reported in the home. In six cases, the Cq was lower than 39 (our previously determined limit of quantification) but indirect exposure was reported. In the five other cases, Cq was higher than 39.2. The difference between dog QPCR signal when indirect exposure or no exposure was reported was statistically significant (p-value<0.01) (Figure 6).

Cockroach results

Cockroach qPCR was negative in all the houses and no participants reported seeing cockroaches in their homes.

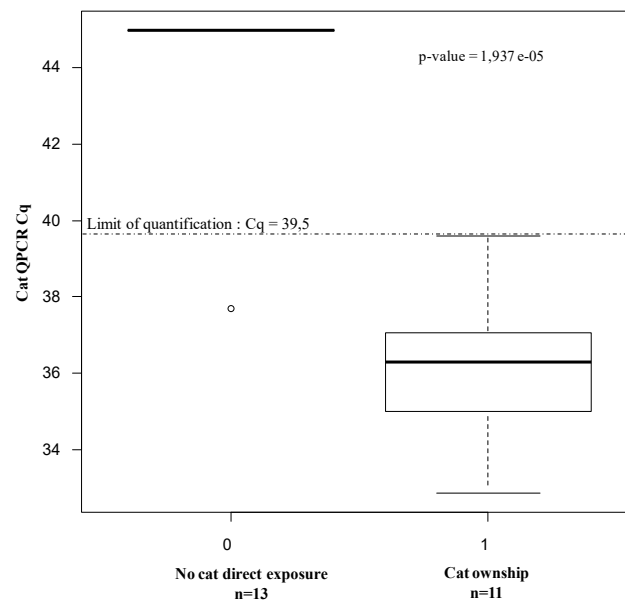


Figure 1: Boxplot with Cat qPCR results according to presence (1) or absence (0) of cat in the dwelling.

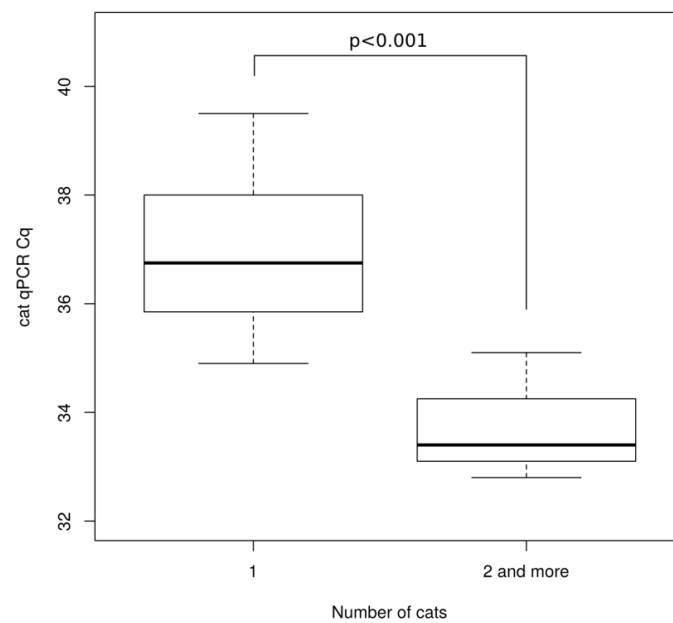


Figure 2: Boxplot with Cat qPCR results according to number of cats.

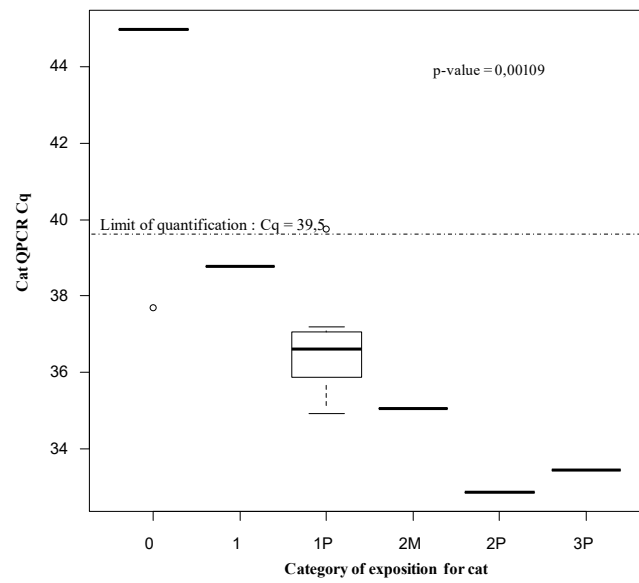


Figure 3: Boxplot with Cat qPCR results (in Cq – Inversly proportional to the concentration) according to the category of exposure (M=rarely in the room; P= often present in the room).

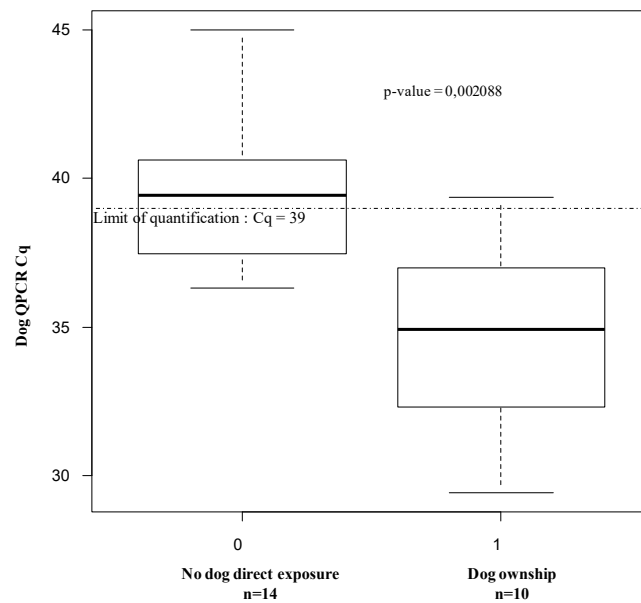


Figure 4: Boxplot with Dog qPCR results according to presence (1) or absence (0) of dogs in the dwelling.

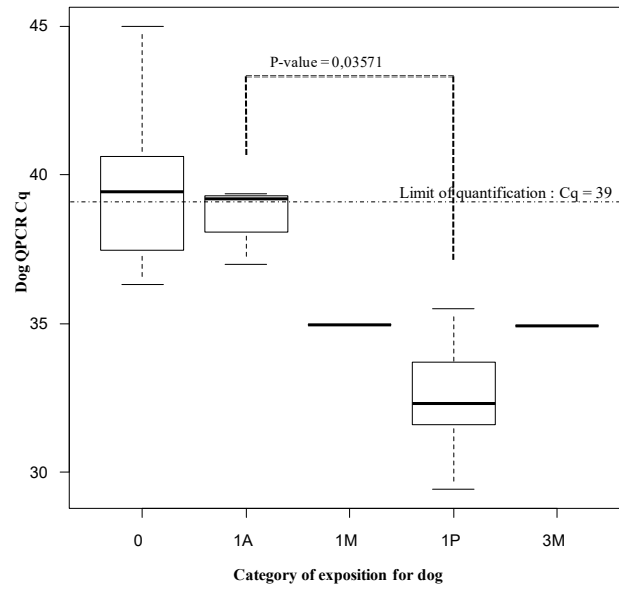


Figure 5: Boxplot with Dog qPCR results (in Cq – Inversely proportional to the concentration) according the category of exposure (A=never in the room; M=rarely in the room; P= often present in the room).

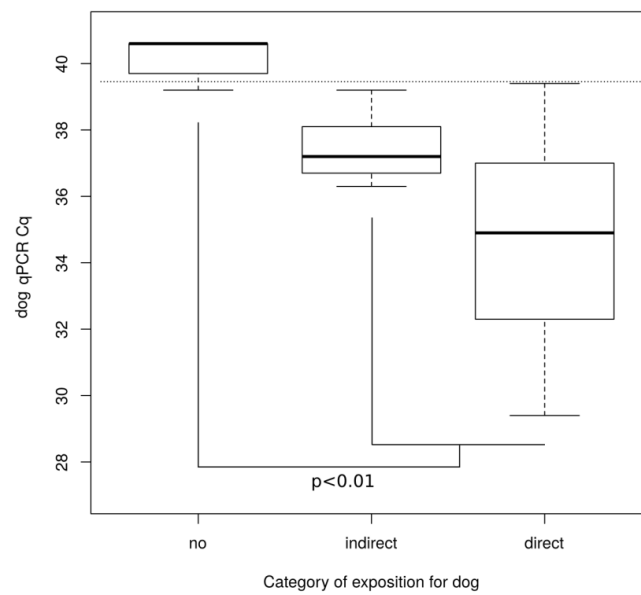


Figure 6: Boxplot with positive Dog qPCR results (in Cq – Inversely proportional to the concentration) according the type of exposure: no, indirect (outside contact but no dog residing permanently in the dwelling) direct (dog residing permanently in the dwelling).

Discussion

When used together with EDC sampling, qPCR is a simple and accurate technique that can be applied to large numbers of samples. In this study, we confirmed the usefulness of qPCR techniques to quantify exposure to dogs and cats in houses, and we developed a cockroach qPCR assay. If we associate these new assays with fungi, bacteria and mite qPCR as previously described (Scherer et al. 2014), we will provide a new tool to quantify the overall allergenic risk in housing with the same sampling and analytical methods. The results will also be expressed in the same way.

The primers and probes system performed well, as shown by the analytical results. The quantification limit is set by seven out of seven successful detections, so it is strict in relation to the complex environmental situation. If we apply this limit ($C_q = 36.5$; DNA concentration = $50\text{fg}/\mu\text{L}$) to cats, many of the results from houses would have been interpreted as unquantifiable, even though it corresponded to real exposure. The analytical limits of the method must be understood, but it is important to adapt these to the environmental situation. When results are between 36.5 and 39.5 cycles, in 5/7 cases, the real amount of cat DNA is successfully quantified. We therefore accept a limit of quantification $C_q = 39.5$ (DNA concentration = $5\text{fg}/\mu\text{L}$), knowing that the results from some houses may be false negatives.

The limit of quantification is $5\text{fg}/\mu\text{L}$ ($C_q=39$) for dog qPCR reaction, which seemed to correspond to the limit in terms of contact with dogs (direct and indirect) and a background signal, which could be an unquantifiable but detectable real signal.

The qPCR signal is correlated with the presence of animals at home, and with gradation linked to frequency of presence in the tested room and with the number of animals in the home. The correlation between the qPCR cat signal and category of exposure, the significant difference between having a dog indoors or outdoors and the ability to detect indirect dog exposure are convincing results. They show that this tool is effective for quantification and provides more detailed information than a questionnaire alone.

There seems to be a background dog qPCR signal. This background also exists when allergens are measured (Almqvist et al. 2003). In the Arbes study, 100% and 99.9% of houses tested positive for dog and cat allergen respectively (Arbes et al. 2004). He suggests that the social environment is a major source of dog and cat allergen due to the transport of allergens. Indeed, this is what we observe with a positive qPCR signal when indirect pet contact is reported. When the limit of quantification was higher, the signal usually highlighted a low presence of dog particles, lower than with known indirect exposure. This should be interpreted as a positive result with no quantification. This is why it is essential to take measurements; questionnaires alone cannot accurately evaluate pet exposure.

It is unsurprising that we did not detect *Blattella*. Participants were recruited from all over Besançon and the city center, but not in inner city areas. Selection criteria were not used. *Blattella* was never observed by the volunteer participants, the houses were modern and we did not expect to find a signal.

We have developed a new tool which allows us to quantitatively measure pets and cockroach exposure with a unique sampling and analytical technique. Associated with fungi, bacteria and mite qPCR as previously described, it provides a multi-parameter profile of the houses. This overall evaluation is needed to better understand the implications of chronic exposure, and to analyze the synergistic role of different micro-organisms and other allergens in the development of children's allergies. Another advantage of the proposed tool is that sampling can be done using EDC, which is very cheap and easy to use and does not require investigator intervention. Therefore, sampling can be repeated to better analyze early childhood and later on in childhood in longitudinal studies (Gaffin et al. 2014; Pyrhönen et al. 2015).

Despite the small number of houses, these results are encouraging. The quantification of animals was well correlated with real exposure (unquantifiable by the questionnaire) and the analysis of these data, associated with other data on fungi, bacteria and house dust mites could explain the interaction between the different organisms in the environment and help to understand the relationship between complex exposure and allergic diseases. The ELFE cohort study is collecting measurements from the dwellings of many children. The EDC has already been used once when the children were newborns and these children will be followed until they are aged 18. Another round of EDC sampling will be performed when the children are aged five. These new targets described in this article will be tested in the first frozen samples. Further investigations will be made to collect homogenous and quantitative data on allergenic exposure in dwellings.

References

- Almqvist C, Egmar A-C, Hedlin G, Lundqvist M, Nordvall SL, Pershagen G, Svartengren M, van Hage-Hamsten M, Wickman M. 2003. Direct and indirect exposure to pets - risk of sensitization and asthma at 4 years in a birth cohort. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 33:1190–1197.
- Arbes SJ, Cohn RD, Yin M, Muilenberg ML, Friedman W, Zeldin DC. 2004. Dog allergen (Can f 1) and cat allergen (Fel d 1) in US homes: results from the National Survey of Lead and Allergens in Housing. *J Allergy Clin Immunol*. 114:111–117.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55:611–622.
- Chen C-M, Tischer C, Schnappinger M, Heinrich J. 2010. The role of cats and dogs in asthma and allergy--a systematic review. *Int J Hyg Environ Health*. 213:1–31.
- Crawford JA, Rosenbaum PF, Anagnost SE, Hunt A, Abraham JL. 2015. Indicators of airborne fungal concentrations in urban homes: understanding the conditions that affect indoor fungal exposures. *Sci Total Environ*. 517:113–124.
- Eder W, Ege MJ, von Mutius E. 2006. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 355:2226–2235.
- Gaffin JM, Kanchongkittiphon W, Phipatanakul W. 2014. Perinatal and early childhood environmental factors influencing allergic asthma immunopathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 22:21–30.
- Gaffin JM, Spergel JM, Boguniewicz M, Eichenfield LF, Paller AS, Fowler JF, Dinulos JG, Tilles SA, Schneider LC, Phipatanakul W. 2012. Effect of cat and daycare exposures on the risk of asthma in children with atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc Off J Reg State Allergy Soc*. 33:282–288.
- Hospodsky D, Yamamoto N, Peccia J. 2010. Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Appl Environ Microbiol*. 76:7004–7012.
- Kaarakainen P, Rintala H, Meklin T, Kärkkäinen P, Hyvärinen A, Nevalainen A. 2011. Concentrations and diversity of microbes from four local bioaerosol emission sources in Finland. *J Air Waste Manag Assoc* 1995. 61:1382–1392.
- Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T. 2009. Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci Total Environ*. 407:4673–4680.
- Knapp J, Umhang G, Poulle ML, Garcia C, Millon L. 2015. Real time PCR copro-diagnosis for identification of the carnivore species and the environmental contamination by *Toxocara* spp. associated to *Echinococcus multilocularis*. *Prep*.
- Lodge CJ, Allen KJ, Lowe AJ, Hill DJ, Hosking CS, Abramson MJ, Dharmage SC. 2012. Perinatal cat and dog exposure and the risk of asthma and allergy in the urban environment: a systematic review of longitudinal studies. *Clin Dev Immunol*. 2012:176484.
- Méheust D, Gangneux J-P, Reponen T, Wymer L, Vesper S, Le Cann P. 2012. Correlation between Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values in French dwellings and other measures of fungal contamination. *Sci Total Environ*. 438:319–324.
- Pyrhönen K, Näyhä S, Läärä E. 2015. Dog and cat exposure and respective pet allergy in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. 26:247–255.

- Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, Vesper SJ, Levin L, Khurana Hershey GK, Zheng S, Ryan P, Grinshpun SA, Villareal M, Lemasters G. 2012. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol.* 130:639–644.e5.
- Rocchi S, Reboux G, Frossard V, Scherer E, Valot B, Laboissière A, Zaros C, Vacheyrou M, Gillet F, Roussel S, et al. 2015. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. *Sci Total Environ.* 505:1026–1035.
- Scherer E, Rocchi S, Reboux G, Vandentorren S, Roussel S, Vacheyrou M, Raherison C, Millon L. 2014. qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. *Sci Total Environ.* 466-467:716–724.
- Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, Husk K, Osborne NJ. 2015. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol.* 135:110–122.
- Vesper S, Barnes C, Ciaccio CE, Johanns A, Kennedy K, Murphy JS, Nunez-Alvarez A, Sandel MT, Cox D, Dewalt G, Ashley PJ. 2013. Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values measured in homes of asthmatic children in Boston, Kansas City, and San Diego. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma.* 50:155–161.
- Vesper S, McKinstry C, Haugland R, Neas L, Hudgens E, Heidenfelder B, Gallagher J. 2008. Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children. *Sci Total Environ.* 394:192–196.
- Yamamoto N, Shendell DG, Peccia J. 2011. Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR. *Indoor Air.* 21:521–530.

IV. Conclusion

Les articles développés dans ce chapitre ont permis de progresser dans la mesure de notre exposition globale et particulièrement aux acariens domestiques avec un nouveau système de qPCR, de déterminer les espèces et les quantités présentes dans notre environnement et d'évaluer les facteurs favorisant leur développement.

Dans un premier temps, le développement de la qPCR a permis la détection et la quantification des deux principales espèces d'acariens de la poussière domestique. Comparée aux autres méthodes principalement utilisées (le comptage microscopique, la quantification des allergènes par test ELISA et l'Acarex test[®]), la qPCR est plus simple, moins consommatrice en poussière et plus précise. Ensuite, ce développement s'est poursuivi par l'amélioration de l'efficacité de cette qPCR ainsi que par le développement d'une qPCR spécifique aux principales espèces d'acariens de stockage. Puis, l'évaluation des couples sondes et amorces spécifiques aux animaux domestiques et le développement de la qPCR destinée aux blattes a permis leur quantification dans les poussières. L'ensemble des qPCR mises au point était spécifique des cibles recherchées et efficaces pour la quantification des acariens domestiques, des animaux domestiques et des blattes

Grâce à cette nouvelle méthode, on a pu observer la présence des acariens domestiques non seulement dans la chambre mais aussi dans la cuisine témoignant de la circulation des acariens à travers l'ensemble du logement. Contrairement aux attentes liées aux nombreux travaux s'intéressant uniquement aux acariens de la poussière domestique, les acariens de stockage ont pu être quantifiés en des concentrations supérieures aux acariens de la poussière domestique. Présents dans la quasi-totalité des logements analysés, ces acariens, liés au milieu rural et aux produits issus de l'agriculture, ont aussi été quantifiés de manière plus abondante dans les logements des personnes allergiques aux acariens. Plus sensible à de forts taux d'humidité, ils étaient présents en des concentrations significativement plus importantes lorsque des traces d'humidité ont été rapportées par les habitants eux-mêmes. Seule une VMC efficace était associée à une diminution des concentrations en acariens de stockage.

Peu pris en compte dans l'évaluation de notre exposition aux allergènes d'acariens, les acariens de la poussière domestique paraissent sous-estimés dans notre environnement. Ne faisant pas partie des allergènes à tester par les allergologues, il serait important d'évaluer la sensibilisation des patients allergiques à ces acariens de stockage.

CHAPITRE 2

Influence des interactions acariens/moisissures sur l'exposition aux allergènes

I. Préférences alimentaires des acariens *Dermatophagoides farinae* : sélection et dispersion des moisissures

1. Contexte

Les acariens et les moisissures cohabitent dans les logements et semblent favoriser par des conditions de température et d'humidité semblables. Au sein de ce microbiome, les acariens se nourrissent de spores et peuvent les transporter sur leur corps (McGinnis, 2007). En effet, lorsqu'ils consomment les spores de moisissures, ils se déplacent dans un véritable champ microscopique et se chargent de plusieurs dizaines de spores. Certains acariens contribuent ainsi à la dégradation ou à la dispersion des moisissures (Hubert et al., 2014). Pour certaines expérimentations, les acariens ont été lavés par flottaison pour différencier les spores ingérées de celles transportées sur leurs corps (Lustgraaf, 1978). Des spores viables sont retrouvées dans leurs fèces confirmant leur consommation par les acariens.

Les moisissures sont équipées d'un arsenal de substances qui leurs permettent de se défendre. L'émission de COV_m dont on connaît l'effet délétère sur les *Drosophiles* (Inamdar and Bennett, 2013) et de mycotoxines par les moisissures pourrait jouer un rôle dans l'effet répulsif de certaines moisissures vis-à-vis des acariens. Ainsi *Stachybotrys* et *A. versicolor* sont connus pour leur capacité à émettre de puissantes mycotoxines. Par ailleurs, il est également probable que les choix de consommation de certaines spores par les acariens soient liés à leurs qualités physiques (taille, résistance à la pression due à la chitine, mélanine). De plus, les levures et certains *Penicillium* fourniraient aux acariens des vitamines (B et D) nécessaires à leur développement. *Aspergillus amstelodami* jouerait un rôle dans la prédigestion des squames humaines et permettrait ainsi aux acariens d'utiliser les acides gras comme nutriments.

La consommation quotidienne de certaines espèces pourrait expliquer un déséquilibre de la flore fongique dans certains logements. La lutte contre les acariens (suppression des tapis, et utilisation de housses anti-acariens) modifie l'environnement intérieur des patients allergiques et aurait, par conséquence, une incidence sur la composition de la flore fongique intérieure. Mettre en place un dispositif *in vitro* pour observer les préférences alimentaires des acariens confirmerait les interactions entre acariens et moisissures et renseignerait sur l'évolution de l'exposition aux allergènes dans les logements.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude étaient :

- Mettre au point un dispositif *in vitro* adapté à la taille des acariens et à leur capacité de déplacements
- Observer les choix alimentaires des acariens vis-à-vis de six moisissures de l'environnement intérieur
- Déterminer les moisissures attractives et répulsives pour les acariens

2) Mise au point des dispositifs *in vitro*

Dans une boîte de Pétri de 85 mm de diamètre contenant de la gélose (agar à 2 %), un, deux et six secteurs périphériques de mêmes dimensions (35 mm x 10 mm) reliés à un secteur central (15 mm de diamètre) ont été préparés en découpant et en retirant la gélose. A l'intérieur du ou des emplacement(s) périphérique(s), 500 µl d'eau gélifiée, pauvres en éléments nutritifs afin de limiter la croissance des moisissures, ont été disposés de façon à obtenir une gélose lenticulaire permettant la culture de moisissures en des zones bien délimitées.

3) Application

La ou les gélose(s) périphérique(s) a (ont) alors étéensemencée(s) par 100 µl de solution de spores calibrée à 10^7 spores/ml de six espèces de moisissures (*A. alternata*, *C. sphaerospermum*, *W. sebi*, *P. chrysogenum*, *A. versicolor* et *S. chartarum*) et placées à 30°C pendant 7 jours. Après 7 jours, 10 individus *D. farinae* ont été déposés au centre de la boîte de Pétri. Les déplacements des acariens vers la ou les moisissure(s) ont été observés à la loupe binoculaire à $t = 10, 20, 30, 60, 120, 180$ minutes.

3. Principaux résultats

Sur les 10 acariens déposés, 2 ont choisis en moyenne *A. alternata*, 1,3 *C. sphaerospermum*, 0,8 *W. sebi* et aucun n'a été attiré par les trois dernières espèces (*P. chrysogenum*, *A. versicolor* et *S. chartarum*).

Ces premiers résultats dans l'attraction ou la répulsion ont également été testés en opposant une espèce choisie et une fuie par les acariens. Sur les 10 acariens, en moyenne, 4,8 ont choisis *A. alternata*, 2,8 *C. sphaerospermum*, 3,6 *W. sebi*, 0,9 *P. chrysogenum*, 1,2 *A. versicolor* et 1,3 *S. chartarum*. En n'exposant les acariens qu'à une seule espèce, sur les 10 déposés seuls ceux allant se nourrir des moisissures ont été comptés : 3,1 ont choisis *A. alternata*, 3,6 *C. sphaerospermum*, 2,4 *W. sebi*, 0,7 *P. chrysogenum* et *S. chartarum* et 0,3 *A. versicolor*.

4. Article International Journal of Environmental and Health Research 2013

Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal

Alexandre Naegele^{a,b}, Gabriel Reboux^{a,b,*}, Emeline Scherer^{a,b,c}, Sandrine Roussel^{a,b} and Laurence Millon^{a,b}

^aDepartment of Parasitology–Mycology, University Hospital J. Minjoz, Besançon, France;

^bDepartment of Chrono-environnement (UMR/CNRS 6249), University of Franche-Comté, Besançon, France; ^cClinical Investigation Center (Inserm CIT 808), University Hospital J. Minjoz, Besançon, France

(Received 8 February 2012; final version received 30 April 2012)

House dust mite (HDM) feces and molds are the main allergens involved in allergic asthma. Differences exist between the housing fungal biome of allergic patients and standard or unhealthy housing. House dust mite (HDM) feed off spores and transport them on their bodies, but do they have fungal food preferences? We observed *Dermatophagoïdes farinae* *in vitro* with 16 mold menus and repeated the experiment 10 times. This observation led us to define *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, and *Wallemia sebi* as “tasty” molds and *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, and *Stachybotrys chartarum* as “repulsive” molds. The food preferences of *D. farinae* may play a role in the following two phenomena: a decrease in spore numbers due to HDM consumption and a scattering of spores that stick to the bodies of HDMs. The extent of these two phenomena should be estimated in future studies for other common domestic HDM species.

Keywords: *Dermatophagoides farinae*; fungi; spores; selection; dispersal

Introduction

House dust mite (HDM) feces and molds are the main allergens involved in IgE-mediated allergic asthma (Vandentorren et al. 2003; Fisk et al. 2007). *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) and *Dermatophagoïdes farinae* (Hughes) are present in dwellings in variable proportions. *Dermatophagoides farinae* is found in mattresses, carpets, and soft furnishings, whereas *D. pteronyssinus* is found most frequently in mattresses. The concomitant presence of HDMs and molds increases the frequency and severity of asthma attacks (Prescott 2003). The level of total IgE is significantly higher in children exposed to both fungi and HDMs (Su et al. 2005). House dust mites (HDMs) contribute to mold transportation (McGinnis 2004). Differences exist between the housing fungal biome of allergic patients and unhealthy housing (Vesper et al. 2006; Bellanger et al. 2009; Reboux et al. 2009). House dust mites (HDMs) may modify patient exposure to allergens in dwellings by selecting and transporting some molds in the same way as astigmatic mites do in stored grain silo (Van Asselt 1999).

*Corresponding author. Email: gabriel.reboux@univ-fcomte.fr

This study aimed to determine the food preferences of *D. farinae* between six fungal species commonly found in housing and responsible for allergic diseases.

Materials and methods

HDMs

Dermatophagoides farinae were identified according to morphological and genotypical characteristics and by sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions. House dust mites (HDMs) were bred at 21°C and relative humidity at 45%. House dust mites (HDMs) were fed *Saccharomyces boulardii*, fish food, and beard hair (Unpublished data supplied by Christian Bories (Assistant Professor, University of Paris 11, Chatenay Malabry, France)).

Molds

Six common indoor molds were used as food for HDMs: *Alternaria alternata*, *Wallemia sebi*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium chrysogenum*, and *Aspergillus versicolor*, respectively, registered in the BBCM-IHEM collection (22669, 16284, 18883, 22672, 22667, 22671).

Device and protocols

In a Petri dish, six “corridors” (35 mm × 10 mm) connected with a central sector (diameter: 15 mm), were cut from agar (agar 2%) (thickness: 2 mm) (Figure 1). At the corridor extremity, 500 µl of agar was arranged to obtain six lenticular domes

Figure 1. Six mold devices and HDMs eating *Wallemia sebi* spores. This device consists of six corridors cut from a gelose (Agar 2%) with six molds scattered on six lenticular domes and a central section for HDMs.

(diameter: 8 mm). Calibrated suspensions of 10^7 spores/mL were prepared for the six mold species. The domes were then seeded with 100 μ l of spore solution and incubated at 30°C for 7 days. Ten *D. farinae* individuals were then placed in the center of the device. House dust mites (HDMs) were observed in mold cultures through a binocular microscope with cold light (Leica S6D, Solms, Germany) after 180 min. This time span was determined by a preliminary test to establish HDM movement speed (7 mm/min.). Movement was preceded by an adaptation time due to the environmental change (breeding/Petri dish). Dust mites have to adapt to the space to turn to the tasty mold.

Each of the following tests was repeated 10 times (160 observations in all with 10 HDMs for each test). Only HDMs that were seen to consume mold were included in the analysis.

First, six molds were presented to HDMs in each device (Figure 1), in order to divide molds into two groups: “tasty fungi” and “repulsive fungi”. Molds chosen at least once were considered tasty and those not chosen were considered repulsive.

Second, each tasty fungus (*Alternaria*/*Cladosporium*/*Wallemia*) was placed alongside each repulsive fungus (*Penicillium*/*Stachybotrys*/*Aspergillus*) in a different dish (nine dish combinations in total).

Third, the movement of *D. farinae* was studied with each of the six isolated molds. *Dermatophagoides farinae* chose whether or not to eat the mold.

Results

The results are summarized in Table 1.

The first experiment (six molds) ($n = 10$) enabled us to divide molds into two groups: tasty: 20% of deposited HDMs chose *A. alternata*, 13% *C. sphaerospermum*, 8% *W. sebi* – and repulsive: 0% for the other three species (*P. chrysogenum*, *A. versicolor*, and *S. chartarum*).

The second experiment (with two molds) ($n = 30$) confirmed this classification: 48% of HDMs chose *A. alternata*, 35% *C. sphaerospermum*, 33% *W. sebi*, 9.3% *P. chrysogenum*, 12% *A. versicolor*, and 13% *S. chartarum*.

The third experiment ($n = 60$) showed that this choice was “deliberate”: 31% chose *A. alternata*, 36% *C. sphaerospermum*, 24% *W. sebi*, 7% *P. chrysogenum*, 3%

Table 1. Choice of molds consumed by *D. farinae*.

Mold species	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Wallemia</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Stachybotrys</i>
Experiments	<i>alternata</i>	<i>sphaerospermum</i>	<i>sebi</i>	<i>chrysogenum</i>	<i>versicolor</i>	<i>chartarum</i>
6 molds ($n = 10$)	2 (1.8)	1.3 (1.1)	0.8 (0.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Tasty fungi			Repulsive fungi		
2 molds ($n = 90$)	4.8 (0.7)	3.5 (0.7)	3.3 (0.7)	0.9 (0.3)	1.2 (0.2)	1.3 (0.3)
1 mold ($n = 60$)	3.1 (0.7)	3.6 (0.4)	2.4 (0.8)	0.7 (0.4)	0.3 (0.4)	0.7 (0.4)

Notes: n : test for each device. In bold: mean number of *D. farinae* choosing the fungi species of 10 individuals. In brackets: standard deviation.

A. versicolor, and 7% *S. chartarum*. When offered these latter three species, more than 90% of the HDMs preferred to go without food.

Discussion

Our observation of *D. farinae* *in vitro* together with 16 menus consisting of six molds, repeated 10 times, led us to define *A. alternata*, *C. sphaerospermum*, and *W. sebi* as “tasty” and *P. chrysogenum*, *A. versicolor*, and *S. chartarum* as “repulsive” molds. Only certain mold species were consumed by *D. farinae*.

House dust mites (HDMs) moved towards “tasty” mold species, ate them and disseminated the spores attached to their body during movements (Figure 2) as has been shown in astigmatid mites (*Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae*) (Hubert et al. 2004). In their study, the preferred mold species were *A. alternata*, *C. sphaerospermum*, and *W. sebi*. *Dermatophagoides farinae* were able to detect repulsive fungal species at a considerable distance: 45 mm (equivalent to 7 min of movement) and move further away. This suggests that *D. farinae* actively select molds.

A study on stored grain shows that tasty fungi as a food source for stored mites are more commonly dispersed than those not chosen. Fungal dispersions caused by mites depend on mite species (Hubert et al. 2003). This is also the case for plants (Gamliel-Atinsky et al. 2010), possibly through dispersal by an insect vector (Roets et al. 2009). However, the ability of mites to disperse specific fungal propagules remains questionable because it was not possible to prove selective eating and dissemination through the fecal pellets (Renker et al. 2005). The astigmatid mites degrade around 50% of spores. It is hard to determine if it is the eating or dispersal due to astigmatid mites which play the more important role (Nesvorna et al. 2012).

The large proportion of HDMs – more than 100 HDMs per grams of dust and more than 2 million per mattress (Korsgaard 1998) – suggests a potentially significant influence on fungal biome. The behavior of HDMs towards molds is modulated by the nature of fungi and the compounds they emit.

Figure 2. Observation of a *Dermatophagoides farinae* before (A) and after (B) consumption of *Wallemia sebi* spores and the girdle formed around the legs and body of the dust mites (Arrow) ($\times 40$, binocular microscope with cold light, Leica S6D[®], Solms, Germany).

An HDM prevention program (removing carpets, using anti-dust mite covers) modifies the indoor environment of allergic patients.

It is true that other factors are involved in the dispersal of fungi spores such as airflow, temperature, damp, and sometimes flooding. Research into mold exposure in asthma patients should examine the extent of the role of HDMs in destroying and dispersing mold colonies compared to the role of environmental factors.

References

- Bellanger AP, Reboux G, Roussel S, Grenouillet F, Didier-Scherer E, Dalphin JC, Millon L. 2009. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 49:260–266.
- Fisk WJ, Lei-Gomez Q, Mendel MJ. 2007. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air.* 17: 284–296.
- Gamliel-Atinsky E, Freeman S, Maymon M, Belausov E, Ochoa R, Bauchan G, Skoracka A, Pena J, Palevsky E. 2010. The role of eriophyoids in fungal pathogen epidemiology, mere association or true interaction? *Exp Appl Acarol.* 51: 191–204.
- Hubert J, Jarosik V, Mourek J, Kubatova A, Zdarkova E. 2004. Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridia): comparisons in laboratory experiments. *Pedobiologia.* 48: 205–214.
- Hubert J, Stejskal V, Kubatova A, Munzbergova Z, Vanova M, Zd'Arkova E. 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain. *Exp Appl Acarol.* 29: 69–87.
- Korsgaard J. 1998. House-HDM and asthma. A review on house-HDM as a domestic risk factor for mite asthma. *Allergy.* 53: 77–83.
- McGinnis MR. 2004. Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Med Mycol.* 42: 107–117.
- Nesvorna M, Gabrielova L, Hubert J. 2012. Suitability of a range of *Fusarium* species to sustain populations of three stored product mite species (Acari: Astigmata). *J Stored Prod Res.* 48: 37–45.
- Prescott SL. 2003. Early origins of allergic disease: a review of processes and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3: 125–132.
- Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Sornin S, Piarroux R, Dalphin JC, Millon L. 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air.* 19: 446–453.
- Renker C, Otto P, Schneider K, Zimdars B, Maraun M, Buscot F. 2005. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: study of mite-associated fungal species. *Microb Ecol.* 50: 518–528.
- Roets F, Crous PW, Wingfield MJ, Dreyer LL. 2009. Mite-mediated hyperphoretic dispersal of *Ophiostoma* spp. from the infructescences of South African *Protea* spp. *Environ Entomol.* 38: 143–152.
- Su HJ, Wu PC, Lei HY, Wang JY. 2005. Domestic exposure to fungi and total serum IgE levels in asthmatic children. *Mediat Inflamm.* 14: 167–170.
- Van Asselt L. 1999. Interactions between domestic mites and fungi. *Indoor Built Environ.* 8: 216–220.
- Vandentorren S, Baldi I, Annesi MI. 2003. Long-term mortality among adults with or without asthma in the PAARC study. *Eur Respir.* 21: 462–467.
- Vesper SJ, McKinstry C, Yang C, Haugland RA, Kerscsmar CM, Yike Y, Schluchter MD, Kirschner HL, Sobolewski J, Allan TM, et al. 2006. Specific molds associated with asthma in water-damaged homes. *J Occup Environ Med.* 48: 852–858.

II. Dispersion des allergènes par les acariens

1. Contexte

Plus de 50 000 espèces d'acariens et 120 000 espèces de champignons sont identifiées, pourtant seules une vingtaine d'acariens (Colloff, 1998) et une centaine de moisissures sont susceptibles de coloniser les logements. Le microbiome des logements est constitué principalement des genres *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus*. Cependant, la flore fongique des logements de patients allergiques n'est pas identique à celles des logements standards ou insalubres (Reboux et al., 2009).

Les déjections d'acariens et les moisissures sont les principaux allergènes impliqués dans l'asthme allergique. Longtemps, seuls les flux d'air ont été considérés comme moyens de propagation des micro-organismes. Cependant, au sein des silos à grain, différents acariens de stockage *A. siro*, *T. putrescentiae*, *L. destructor* ou *C. malaccensis* sont capables de propager certaines moisissures telles que les genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Hubert et al., 2004). Au niveau des logements, on estime à plus de 2000 acariens de la poussière domestique par gramme de poussière de matelas (Korsgaard, 1998) et à plus de 50 spores (le plus souvent de 2 à 4 μm de diamètre) la capacité de transport d'un seul acarien (250 μm de long environ) pénétrant au sein d'une colonie fongique d'*Aspergillus* ou de *Penicillium*. De plus, la présence importante des acariens de stockage a été évoquée principalement en milieu rural (Iraola et al., 2014). La question du rôle du transport des spores par les acariens, ainsi que les modifications induites sur la composition en micro-organismes des logements s'est alors posée.

2. Présentation de l'étude

Un bilan des connaissances sur le transport des allergènes a été réalisé à la fois à partir des données disponibles dans la littérature mais aussi sur nos propres résultats obtenus au laboratoire.

Différents axes de questionnement ont été mis en avant afin de comprendre notre exposition aux allergènes dans notre habitat :

- Quelles espèces d'acariens et de moisissures sont présentes dans nos logements ?
- Comment ces espèces colonisent notre habitat ?
- Quelles conditions favorisent le développement de ces espèces ?

3. Principaux résultats

Deux grands groupes d'acariens colonisent nos logements : les acariens de la poussière domestique (genre *Dermatophagoides*) et les acariens de stockage (*A. siro*, *G. domesticus*, *L. destructor*). Ces acariens, en consommant les spores de moisissures, se chargent de plusieurs dizaines de spores qu'ils vont transporter et disséminer au sein des logements.

En consommant certaines espèces plutôt que d'autres, les acariens vont sélectionner, par leurs choix alimentaires, certaines moisissures. Ces choix peuvent être dus aux caractéristiques physiques des spores de moisissures (taille, résistance à la pression due à la chitine, mélanine, ...), à leur capacité à émettre des substances toxiques (mycotoxines, composés organiques volatils d'origine microbienne, ...) ou à leur qualité nutritionnelle (vitamines, acides gras, ...).

Les différentes espèces d'acariens sont également en compétition au sein de nos logements. Selon les conditions de températures, d'hygrométrie et de ressources alimentaires, ce ne sont pas les mêmes espèces qui se développeront.

En vue de l'évaluation de notre exposition aux allergènes, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des micro-organismes présents dans les logements : acariens de la poussière domestique, acariens de stockage et moisissures. Le rôle de vecteur des acariens doit également être mesuré afin de modéliser le devenir de la contamination et donc de l'exposition.

4. Article Revue française d'allergologie 2015



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

Revue française d'allergologie xxx (2015) xxx–xxx

REVUE FRANÇAISE
D'
Allergologie

Revue générale

L'acarien transporteur d'allergènes

Mites carrier of allergens

A. Naegelé^{a,b}, S. Roussel^{a,b}, G. Reboux^{a,b,*}

^a Service de parasitologie-mycologie, CHRU de Besançon, 25030 Besançon, France

^b UMR/CNRS 6249 chrono-environnement, université de Bourgogne-Franche-Comté, 25030 Besançon, France

Reçu le 30 juin 2015 ; accepté le 27 juillet 2015

Résumé

Les acariens et les moisissures cohabitent dans les logements. Ils sont les principaux allergènes impliqués dans l'asthme allergique. Dans les silos à grains et les archives, les acariens transportent des spores et contaminent leurs environnements. Les acariens, par leurs choix alimentaires, sélectionnent certaines espèces. Sous l'action de spores, la libération de la guanine et d'acides gras favorisent l'accouplement des acariens. La compétition intervient également entre les acariens pour la colonisation de leur habitat. Les acariens présentent des tailles et des capacités de déplacement variables et certaines espèces peuvent donc s'imposer au détriment d'autres. Les conditions de température jouent un grand rôle dans leur vitesse de déplacement et de réaction et, par conséquent, sur leurs capacités de défense. D'autres facteurs comme le taux d'humidité, la disponibilité alimentaire, la présence de substances anti-acariens modifient les potentialités de chaque espèce de prendre le contrôle de son habitat, notamment par l'augmentation ou l'affaiblissement de leur fécondité. La question de la modification de la composition en micro-organismes des logements induite par le transport des spores par les acariens se pose. La balance « propagation des spores/ingestion comme aliment » est probablement en faveur de la propagation, résultante d'une véritable symbiose entre acariens et moisissures.

© 2015 Publié par Elsevier Masson SAS.

Mots clés : Acariens ; Capacité de transport ; Moisissures ; Préférence alimentaire ; Compétition

Abstract

Mites and molds, the main source of allergens involved in allergic asthma, co-habit the same housings. When present in grain silos and other depots, mites transport mold spores and contaminate their environment. Simultaneously, certain species of spores are selected by the mites' feeding habits. Mites' ingestion of spores also induces the liberation of guanine and fatty acids that favor their mating. Additionally, there is competition between mites for habitat colonization. Mites exist in different sizes and they have different capacities of movement, meaning that some mite species thrive better than others. The temperature plays a main role in their movements and other reactions and consequently affects their defense capacities. Factors such as humidity and the availability of food and various chemical substances can modify the potential of each mite species to control its habitat, in particular, by increasing or reducing their fertility. Considering all these facts, it is important to recognize the impact of mites in the dispersion of mold spores. We hypothesize that the ratio between the propagation and the ingestion of mold spores probably favors their propagation, which suggests a true symbiotic relationship between mites and molds.

© 2015 Published by Elsevier Masson SAS.

Keywords: Mites; Carrying capacity; Molds; Food preference; Competition

* Auteur correspondant. Service de parasitologie-mycologie, CHRU J.-Minjot, 2, boulevard Fleming, 25030 Besançon cedex, France.

Adresse e-mail : gabriel.reboux@univ-fcomte.fr (G. Reboux).

1. Introduction

Les déjections d'acariens et les moisissures sont les principaux allergènes impliqués dans l'asthme allergique. De plus, acariens et moisissures cohabitent dans les logements. Longtemps, seuls les flux d'air ont été considérés comme moyens de propagation des micro-organismes. Cependant, d'autres vecteurs pourraient permettre le transport des allergènes. Dans les sols, les scarabées peuvent transporter certains acariens eux-mêmes vecteurs de moisissures [1,2] ou favorisant l'introduction de micro-organismes [3]. Au sein des silos à grain, *Penicillium brevicompactum* est propagé par *Acarus siro* et *Tyrophagus putrescentiae*; *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor* et *Scopulariopsis brevicaulis* par *A. siro* et *Lepidoglyphus destructor*; *Cladosporium cladosporioides* par *Cheyletus malaccensis* [4]. Dans son étude, Trovao et al. montrent que les arthropodes participent de manière significative à la propagation de *C. cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *A. versicolor* et *Alternaria alternata* dans des archives universitaires [5]. La question du rôle du transport des spores par les acariens, ainsi que les modifications induites sur la composition en micro-organismes des logements s'est alors posée.

2. Quelles espèces colonisent les logements ?

Plus de 50 000 espèces d'acariens et 120 000 espèces de champignons sont identifiées, pourtant seules une vingtaine d'acariens [6] et une centaine de moisissures sont susceptibles de coloniser les logements. *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis* dans les climats chauds et humides (acariens de la poussière domestique) colonisent la literie et les tapis, tandis que *A. siro*, *L. destructor* et *Glycyphagus domesticus* (acariens de stockage) colonisent principalement les réserves alimentaires. Le microbiote des logements est constitué principalement des genres *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus*. Cependant, la flore fongique des logements de patients allergiques n'est pas identique à celles des logements standards ou insalubres [7,8]. Les acariens se nourrissent de spores et peuvent les transporter sur leur corps [9]. En effet, dans leur frénésie alimentaire, ils se frayent un chemin dans une véritable forêt microscopique et se chargent de plusieurs dizaines de spores. Ils contribuent ainsi à la propagation ou à l'élimination des moisissures. Pour certaines expérimentations, les acariens ont été lavés par flottaison pour différencier les spores ingérées de celles transportées sur leurs corps [10]. Des spores viables sont retrouvées dans leurs fèces et l'on estime à plus de 50 spores (le plus souvent de 2 à 4 µm de diamètre) la capacité de transport d'un seul acarien (250 µm de long environ) pénétrant au sein d'une colonie fongique d'*Aspergillus* ou de *Penicillium*.

3. Lutttes pour la colonisation d'un territoire

Les acariens, par leurs choix alimentaires, sélectionnent certaines espèces. Dans cette optique, l'observation de *D. farinae* a été effectuée à l'aide de trois dispositifs différents (160 observations avec 10 acariens pour chacun des

tests). Le premier dispositif ($n=10$) exposait les acariens à 6 moisissures dans le but de les classer en moisissures « attractives » (au moins choisies une fois par les acariens) et « répulsives » (non choisies). Cette observation a permis de classer *A. alternata* (choisie par 20 % des acariens), *C. sphaerospermum* (13 %), *Wallemia sebi* (8 %) en moisissures « attractives » et *P. chrysogenum*, *A. versicolor*, *Stachybotrys chartarum* en moisissures « répulsives » (non choisies) [11]. Dans le second dispositif, les acariens étaient confrontés à deux moisissures ($n=30$). Chaque espèce « attractive » était isolée face à une espèce « répulsive » dans des dispositifs différents (soit 9 combinaisons au total). Les résultats obtenus confirmaient cette classification. En effet, les acariens choisissaient en priorité *A. alternata* (48 %), *C. sphaerospermum* (35 %), *W. sebi* (33 %), puis *P. chrysogenum* (9,3 %), *A. versicolor* (12 %) et *S. chartarum* (13 %). Le troisième dispositif ($n=60$) permettait d'étudier le comportement de *D. farinae* lorsqu'il est en présence d'une seule des 6 moisissures étudiées. L'acarien avait alors le choix de consommer ou non la moisissure présente. Trente-et-un pourcent d'entre eux choisissaient délibérément *A. alternata*, 36 % *C. sphaerospermum*, 24 % *W. sebi*, 7 % *P. chrysogenum*, 3 % *A. versicolor* et 7 % *S. chartarum*. Face aux espèces « répulsives », plus de 90 % des acariens faisaient le choix du jeûne. Il semblerait donc que *D. farinae* soit capable de se détourner de certaines espèces fongiques distantes de 45 mm (soit l'équivalent de près de 7 minutes du déplacement de *D. farinae*) et inversement de propager d'autres espèces dont il se nourrit.

Dans la compétition qui se développe au sein de l'habitat entre les moisissures, les bactéries et les insectes, les moisissures sont équipées d'un arsenal de substances qui leur permettent de se défendre. L'émission de composés organiques volatils d'origine microbienne (COVm) dont on connaît le rôle délétère sur les drosophiles [12] et de mycotoxines par les moisissures, jouent probablement un rôle dans l'effet répulsif de certaines moisissures vis-à-vis des acariens. L'imprégnation de substances nutritives avec différents COV ou mycotoxines permettrait de classer les substances en fonction de leur pouvoir répulsif. Ainsi, *Stachybotrys* et *A. versicolor* sont connus pour leur capacité à émettre de puissantes mycotoxines [13]. Par ailleurs, il est également probable que les choix de consommation de certaines spores par les acariens soient liés à leurs qualités physiques (taille, résistance à la pression due à la chitine, présence de mélanine) ou leurs qualités nutritives. Selon Van Bronswijk et Sinha, *Aspergillus amstelodami* prédispose les squames humaines et permet aux acariens d'utiliser les acides gras comme nutriments [14]. Ces acides gras, aux propriétés phéromonales [15], sont susceptibles d'être détectés par les acariens et jouent un rôle vital dans leur développement [16]. Pour *A. siro*, la consommation des moisissures libère de la guanine qui joue aussi un rôle de phéromone en favorisant l'accouplement des acariens. De plus, les moisissures produisent des composés ammoniacés qui attirent les acariens [16]. Les levures et certains *Penicillium* fournissent également aux acariens des vitamines (B et D) nécessaires à leur développement [17]. Ces connaissances sur les besoins nutritifs des acariens ont permis la préparation d'une alimentation type en laboratoire pour la culture des acariens : poils de barbe, levure de

boullanger, aliments pour poisson (Daphnies) susceptibles d'être colonisés par *Penicillium* car non stérilisés.

Compte tenu du nombre d'acariens (2000/g de poussières de matelas) [18], la consommation quotidienne de certaines espèces pourrait expliquer un déséquilibre de la flore fongique dans certains logements. La lutte contre les acariens peut être physique ou chimique. L'utilisation de sprays ou de pièces de literie traitées contre les acariens permet de ralentir la colonisation des logements. En privant les acariens des apports hydriques, calorifiques ou nutritionnels par une housse anti-acariens et en supprimant les tapis et les tissus rembourrés, on retire les principales niches des acariens présentes au sein de notre habitat. Cette lutte est susceptible de modifier l'environnement intérieur des patients allergiques et pourrait avoir, par conséquence, une incidence sur la composition de la flore fongique intérieure.

4. La pénurie « alimentaire » déclenche-t-elle des migrations dans le logement ?

L'influence des acariens sur la dispersion des spores est complexe. Elle dépend de l'espèce d'acariens [19] et de la nature des moisissures et des composés qu'elles émettent [20]. La balance « propagation des spores/ingestion comme aliment » est probablement en faveur de la propagation, résultante d'une véritable symbiose entre acariens et moisissures. Elle peut donc contribuer à une surabondance des populations de certains acariens autour des zones de développement favorables.

Ainsi, l'étude Icode, sur l'Impact du compostage domestique sur l'environnement intérieur, mesure l'impact du seau de compostage provisoire (bio-seau) des déchets organiques sur la qualité biologique de l'air des cuisines. Cette étude a permis de suivre la contamination en micro-organismes de 48 logements pratiquant ou non le compostage que ce soit dans le temps

(12 mois) ou dans l'espace (0,5 à 3 mètres du bio-seau). Des capteurs électrostatiques de poussières (CEP) ont été placés à proximité (0,5 mètre) et à distance (3 mètres) du bio-seau et ont été collectés après 2, 4, 7 et 12 mois. C'est à partir des liquides de rinçages de ces CEP qu'il a été possible de détecter et de quantifier par PCR quantitative en temps réel (qPCR) les ADN spécifiques des acariens de stockage : *A. siro*, des acariens de la poussière domestique : *Dermatophagoides*, des moisissures : *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. alternata*, *C. sphaerospermum*, *W. sebi* et des entérobactéries. La cinétique des concentrations des espèces a montré un accroissement de la population des acariens de stockage, tout au long de l'année, mais exclusivement au niveau des surfaces dans le périmètre immédiat du bio-seau (0,5 m) [21].

5. Les acariens féroces entre eux

La compétition intervient également entre les acariens. Ainsi, les *Cheyletus* qui sont des prédateurs des *Dermatophagoides* au sein des matelas aspirent entièrement leurs corps pour n'en laisser que la carapace. Plus généralement, les acariens présentent des tailles et des capacités de déplacement variables et certaines espèces peuvent donc s'imposer au détriment d'autres (Tableau 1). Les conditions de température jouent un grand rôle dans leur vitesse de déplacement et de réaction. Ainsi, dans la compétition entre *Dermatophagoides* et *A. siro*, une baisse de température affaiblira les capacités de défense du premier vis-à-vis du second. D'autres facteurs comme le taux d'humidité, la disponibilité alimentaire, la présence de substance anti-acariens modifient les potentialités de chaque espèce de prendre le contrôle de l'environnement notamment par l'augmentation ou l'affaiblissement de leur fécondité.

Tableau 1

Comparaison des principales caractéristiques des acariens de la poussière domestique et des acariens de stockage.

Familles	Acariens de la poussière domestique (Pyroglyphidae)	Acariens de stockage (Acaridae, Glycyphagidae)
Principales espèces	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> <i>Dermatophagoides farinae</i>	<i>Acarus siro</i> <i>Lepidoglyphus destructor</i> <i>Glycyphagus domesticus</i>
Taille	De 300 à 400 µm	De 400 à 600 µm
Fécondité	De 20 à 40 œufs par femelle	De 200 à 300 œufs par femelle
Durée de vie	2 à 3 mois	1 à 2 mois
Humidité optimale	<i>D. farinae</i> > 60 % <i>D. pteronyssinus</i> ~ 80 %	> 80 %
Température optimale	Optimale → acariens s'alimentent 5 fois plus 26 à 32 °C (Maintien entre 15 °C et 35 °C)	Optimale → acariens s'alimentent 5 fois plus 20 à 30 °C (Maintien entre 4 °C et 35 °C)
Alimentation principale	<i>D. pteronyssinus</i> : squames, débris kératinisés, poils, cheveux <i>D. farinae</i> : squames, farines de seigle Nourriture = facteur secondaire	<i>A. siro</i> : farines, fromages <i>L. destructor</i> : silos à grains <i>G. domesticus</i> : débris alimentaires Nourriture = facteur secondaire
Consommation de moisissures	En faibles quantités Moisissures = nutriments essentiels	En grandes quantités Moisissures = indicateur de disponibilité en aliments
Capacité d'adaptation	Les acariens se regroupent pour limiter les variations de température et d'humidité	Les acariens modifient leurs stades de vie (allongement du stade nymphe) et augmentent leur résistance aux fortes variations de température et d'humidité

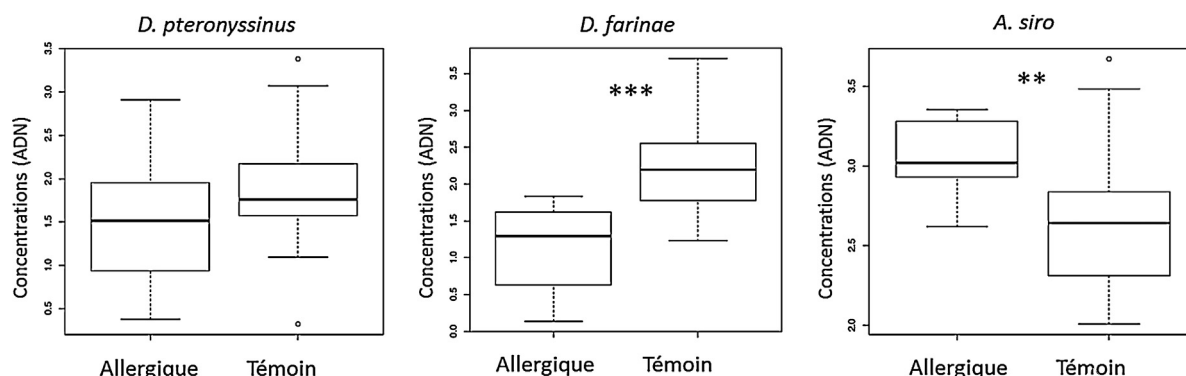


Fig. 1. Comparaisons des concentrations en acariens dans les logements de patients allergiques avec prick-test positif aux acariens ($n = 24$) et dans les logements de témoins non allergiques ($n = 18$). Les concentrations sont exprimées en équivalents ADN (log fg/μL).

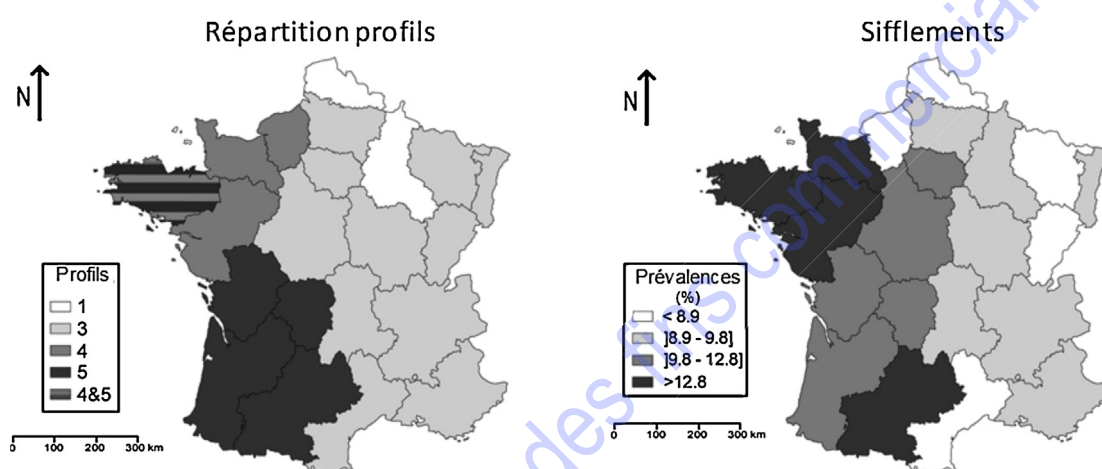


Fig. 2. Répartition des profils des 3193 logements [24] et la répartition des sifflements chez 20 000 enfants [25]. 1. Très peu contaminé. 2. Bactéries. 3. Bactéries + *A. alternata*. 4. Bactéries + Acariens. 5. Bactéries + Acariens + *A. alternata*.

Récemment dans un travail préliminaire réalisé en Bourgogne Franche-Comté sur les Acariens et les allergies en environnement intérieur (ACARI), il a été possible de quantifier par qPCR [22] à partir de prélèvements standardisés des poussières sédimentées (CEP) [23] une espèce d'acariens de stockage : *A. siro*, deux espèces d'acariens de la poussière domestique : *D. pteronyssinus* et *D. farinae*, dix espèces de moisissures et les entérobactéries. Dans ce but, 3 CEP ont été placés 10 semaines simultanément dans la chambre (sous le lit et en hauteur) et dans la cuisine (en hauteur) de patients allergiques aux acariens ($n = 24$) et de sujets non allergiques ($n = 18$). Les résultats ont montré que les concentrations de *D. pteronyssinus* semblaient diminuer alors que, parallèlement, les concentrations d'*A. siro* augmentaient chez les patients allergiques (Fig. 1). Cette tendance pourrait être due à la lutte anti-acariens menée dans les chambres des patients asthmatiques. (données personnelles non publiées).

6. Occupation de territoire à l'échelle des régions

L'étude Environnement biologique et risque allergique (EBRA) récente concernant les profils microbiologiques de 3193 logement français de la cohorte Étude longitudinale française depuis l'enfance (ELFE) a montré que *D. pteronyssinus*

se retrouvait en des concentrations élevées et de façon significatives dans les régions de l'Ouest de la France au niveau de la façade Atlantique [24] et que ces régions correspondaient à 85 % à celles où l'étude de Delmas avait déterminé la plus grande prévalence d'enfants avec des sifflements pulmonaires, parmi 21 140 enfants de maternelle (Fig. 2) [25]. L'adaptation aux conditions climatiques et environnementales de certaines espèces d'acariens pose la question de leurs répartition territoriales. On peut légitimement se poser la question des espèces susceptibles d'occuper les régions où *D. pteronyssinus* est moins présent. La question des allergènes qu'ils transportent peut éclairer d'un jour nouveau les disparités des effets sur la santé au niveau français.

7. Conclusion

Désormais, il faudra définir les espèces et les concentrations auxquelles les patients sont réellement exposés. Au-delà des acariens, il est nécessaire de faire un bilan des micro-organismes colonisant les logements que ce soit des bactéries (actinomycètes, mycobactéries non tuberculeuses, entérobactéries) ou des moisissures. C'est désormais possible de déterminer un profil de contamination en utilisant un outil d'analyse commun : la qPCR [24]. L'impact relatif du transport des spores et/ou de leur

consommation par les acariens devra être évalué pour d'autres espèces d'acariens domestiques. La prise en compte du nombre de spores transportées et du volume consommé par les acariens permettra de modéliser la progression de la contamination en micro-organismes à l'échelle d'un logement.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Klepzig KD, Moser JC, Lombardero FJ, Hofstetter RW, Ayres MP. Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi and mites. *Symbiosis* 2001;30:83–96.
- [2] Renker C, Otto P, Schneider K, Zimbars B, Maraun M, Buscot F. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: study of mites-associated fungal species. *Microbial Ecol* 2005;50:518–28.
- [3] Hoffstetter RW, Dempsey TD, Klepzig KD, Ayres MP. Temperature-dependant effects on mutualistic, antagonistic, and commensalistic interactions among insects, fungi and mites. *Comm Ecol* 2007;8:47–56.
- [4] Hubert J, Jarosik V, Mourek J, Kubatova A, Zdarkova E. Astigmatid mite growth and fungi preference (*Acarid: Acaridia*): comparisons in laboratory experiments. *Pedobiologia* 2004;48:205–14.
- [5] Trovao J, Mesquita N, Paiva DS, Paiva de Carvalho H, Avelar L, Portugal A. Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. *Int Biodeter Biodeg* 2013;79:49–55.
- [6] Colloff MJ. Taxonomy and identification of dust mites. *Allergy* 1998;53(Suppl. 48):7–12.
- [7] Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Sornin S, Piaroux R, et al. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* 2009;19:446–53.
- [8] Vesper SJ, McKinstry C, Yang C, Haugland RA, Kerscsmar CM, Yike Y, et al. Specific molds associated with asthma in water-damaged homes. *J Occup Environ Med* 2006;48:852–8.
- [9] McGinnis MR. Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Med Mycol* 2004;42:107–17.
- [10] Lustgraaf B. Ecological relationships between xerophilic fungi and house-dust mites (*Acarida: Pyroglyphidae*). *Oecologia* 1978;33:351–9.
- [11] Naegele A, Reboux G, Scherer E, Roussel S, Millon L. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *Int J Environ Health Res* 2013;23:91–5.
- [12] Inamdar AA, Bennett JW. Volatile organic compounds from fungi isolated after hurricane katrina induce developmental defects and apoptosis in a *Drosophila melanogaster* model. *Env Toxicol* 2015;30:614–20.
- [13] Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:144–72.
- [14] Van Bronswijk JEMH, Sinha RN. Role of fungi in the survival of dermatophagoides (*Acarina: Pyroglyphidae*) in house-dust environment. *Environ Entomol* 1973;2:142–5.
- [15] Sato M, Kuwahara Y, Suzuki T. Chemical ecology of astigmatid mites: XXXVII. Fatty acid as food attractant of astigmatid mites, its scope and limitation. *Appl Entomol Zool* 1993;28:565–9.
- [16] Colloff MJ. Dust mites. Springer Science & Business Media; 2010, 592 pp.
- [17] De St Georges Grیدهlet D. Vitamin requirements of the European house dust mite, dermatophagoides pteronyssinus (*Acarid: Pyroglyphidae*), in relation to its fungal association. *J Med Entomol* 1987;24:408–11.
- [18] Korsgaard J. House-HDM and asthma. A review on house-HDM as a domestic risk factor for mite asthma. *Allergy* 1998;53:77–83.
- [19] Hubert J, Stejkal V, Kubatova A, Munzbergova Z, Vanova M, Zdarkova E. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Exp Appl Acarol* 2003;29:69–87.
- [20] Van Asselt L. Interactions between domestic mites and fungi. *Indoor Built Environ* 1999;8:216–20.
- [21] Naegele A, Reboux G, Vacheyrou M, Valot B, Millon L, Roussel S. Indoor composting and microbiological consequences. *Indoor Air* 2015, <http://dx.doi.org/10.1111/ina.12242> [in press].
- [22] Roussel S, Reboux G, Naegele A, Martinez J, Vacheyrou M, Scherer E, et al. Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR. *Environ Int* 2013;55:20–4.
- [23] Scherer E, Rocchi S, Reboux G, Vandentorren S, Roussel S, Vacheyrou M, et al. Dust sampling and qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dwellings in the elfe study. *Sci Total Environ* 2014;466–467:716–24.
- [24] Rocchi S, Reboux G, Frossard V, Scherer E, Valot B, Laboissière A, et al. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. *Sci Total Environ* 2015;505:1026–35.
- [25] Delmas MC, Guignon N, Leynaert B, Annesi-Maesano I, Com-Ruelle L, Gonzalez L, et al. Prévalence et contrôle de l'asthme chez le jeune enfant en France. *Rev Mal Respir* 2012;29:688–96.

III. Corrélation acariens/moisissures dans les logements

1. Contexte

Que soit au niveau des silos à grains pour les acariens de stockage (Hubert et al., 2003) ou au niveau des logements pour les acariens de la poussière domestique, les acariens consomment les spores de moisissures et les dispersent au sein de leur environnement (McGinnis, 2007; Naegele et al., 2013). Les interactions entre acariens et moisissures sont cependant espèces dépendantes (Hubert et al., 2003) et cette relation est décrite comme une vraie relation symbiotique (Colloff, 2010). En effet, les moisissures apportent aux acariens vitamines et nutriments nécessaires et les acariens participent à la dissémination des moisissures dans l'espace. La présence concomitante des acariens et des moisissures pourrait également avoir des répercussions au niveau de la santé des occupants. Cette multiple exposition pourrait accroître la fréquence et la sévérité des crises d'asthme. En effet, la combinaison acariens/moisissures pourrait entraîner des effets néfastes sur le plan respiratoire où au mécanisme allergique pourrait s'ajouter un effet toxique lié aux champignons dont les spores sont respirées.

Les différentes études, menées dans les logements de personnes pratiquant le compostage (ICODE), de patients allergiques aux acariens ou des sujets sains (ACARI), nous ont apporté des renseignements sur les concentrations en acariens et en moisissures. Les conditions de température et d'hygrométrie au sein des logements sont susceptibles de favoriser à la fois le développement des acariens et des moisissures. Mais est-ce que ceux-ci sont présents ensemble dans les mêmes logements ? Est-ce que de fortes concentrations en acariens favorisent le développement des moisissures et si oui de quelles moisissures ? Pour répondre à ces questions, nous avons testé statistiquement les corrélations entre les différentes espèces d'acariens domestiques et les principales moisissures présentes dans nos logements.

2. Matériel et méthodes

1) Recrutement

Au travers de deux études menées au laboratoire (ACARI et ICODE), 90 logements ont été recrutés en Franche-Comté :

- 24 logements de patients allergiques aux acariens (étude ACARI)

- 28 logements de sujets sains sans antécédents de troubles respiratoires (18 logements de l'étude ACARI et 10 logements de l'étude ICODE)
- 38 logements de sujets sains pratiquant le compostage domestique (étude ICODE)

2) Prélèvements

Pour chacun des logements de l'étude ACARI, 3 CEP (20x17 cm) ont été placés 10 semaines dans la chambre en hauteur et sous le lit à même le sol ainsi que dans la cuisine. Pour ceux de l'étude ICODE, 8 CEP (21x5 cm) ont été placés de 2 à 12 mois à proximité et à distance du seau de compostage provisoire des déchets organiques (bio-seau).

3) Analyses

Après un retour par voie postale, les lingettes électrostatiques des CEP ont été placées dans un sac en plastique avec 20 (étude ACARI) ou 5 ml (étude ICODE) de solution de Tween 80 à 0,1 % et rincées dans un Stomacher™ pendant 10 minutes. Neuf (étude ACARI) ou 3 ml (étude ICODE) de liquide de rinçage ont été collectés.

L'extraction de l'ADN a été effectuée par chocs mécanique et thermique en utilisant un volume initial d'échantillon de 200 µl. Les échantillons ont été placés dans des tubes à bille à fond conique de 2.0 ml (MagNALyser Green Beads, Roche Applied Science®, Mannheim, Allemagne) contenant 1,4 mm de bille de céramique et 200 µl de bouillon cœur cerveau (BBL™, Becton Dickinson®, Sparks, NJ USA). Les tubes ont été agités 3 fois durant 10 secondes à vitesse maximale dans un instrument MagNALyser (Roche Applied Science®, Mannheim, Germany) avec 1 minute dans un bloc froid entre chaque agitation. Les tubes ont ensuite été chauffés pendant 10 minutes dans un bain-marie à 100°C puis placés dans la glace pour 10 minutes. Après centrifugation (8000 g, 2 minutes) à température ambiante, le supernatant a été prélevé et conservé à 4°C en vue des analyses par qPCR. Pour chaque série d'extraction, un échantillon d'eau distillée stérile a été inclus comme témoin négatif.

Les sondes et amorces spécifiques des acariens de la poussière domestique (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*), des acariens de stockage (*A. siro*/*G. domesticus*/*L. destructor*) et des moisissures (*A. alternata*, *A. fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *Lichtheimia corymbifera*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*, *Trichoderma viride*, *W. sebi*) ont été utilisées pour l'analyse par qPCR.

Les résultats de qPCR sont exprimés en équivalents ADN (fg/µl) en utilisant une courbe de calibration spécifique standard.

Les concentrations moyennes entre les trois emplacements (chambre en hauteur, chambre sous le lit, cuisine en hauteur) de l'étude ACARI et entre les deux emplacements (à proximité et à distance du bio-seau) de l'étude ICODE ont été utilisées. Ces concentrations obtenues ont été testées statistiquement afin de déterminer les corrélations entre les différentes espèces d'acariens et les différentes espèces de moisissures (test de corrélation de Spearman)

3. Résultats

1) Corrélation entre acariens et moisissures dans les logements de l'étude ACARI

a. Corrélation entre acariens de la poussière domestique et moisissures

Les concentrations des deux espèces d'acariens de la poussière domestique (*D. pteronyssinus* et *D. farinae*) ont été comparées aux concentrations de 10 moisissures (*A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *L. corymbifera*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*, *T. viride*, *W. sebi*).

Plus les concentrations en *D. pteronyssinus* étaient importantes, plus les concentrations en *A. alternata* (test de corrélation de Spearman, $p = 0,012$) et en *C. sphaerospermum* ($p = 0,007$) étaient significativement élevées (Figure 16).

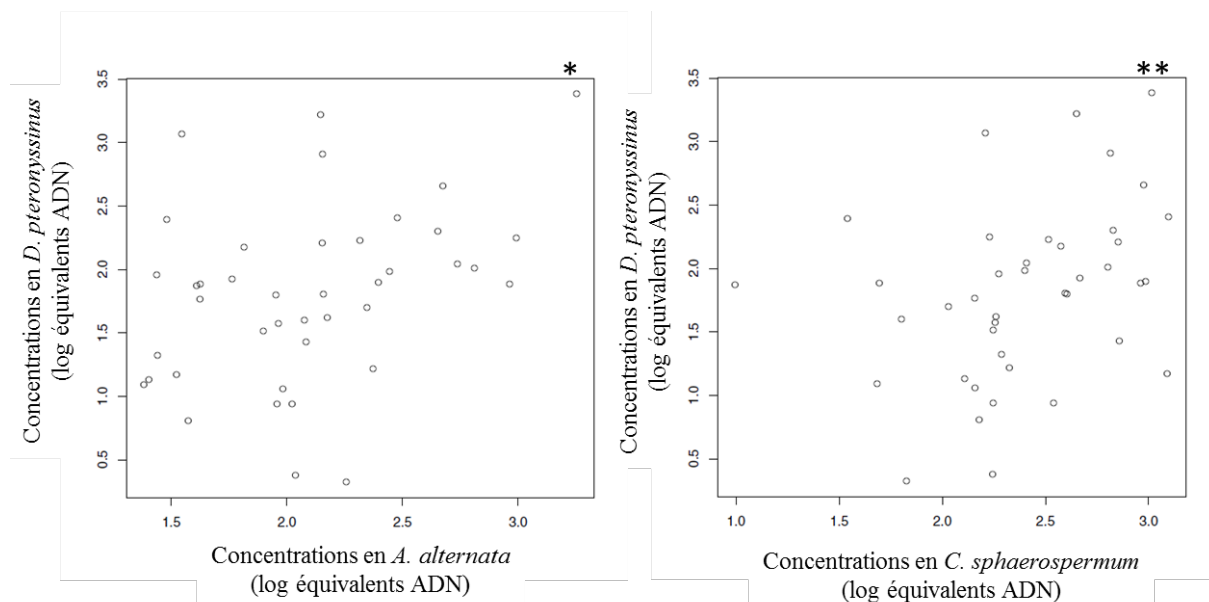


FIGURE 16 : CORRELATIONS SIGNIFICATIVES ENTRE LES CONCENTRATIONS EN *D. PTERONYSSINUS* ET LES CONCENTRATIONS EN *A. ALTERNATA* ET *C. SPHAEROSPERMUM*. CONCENTRATIONS EN ACARIENS ET EN MOISSURES EXPRIMEES EN LOG EQUIVALENTS ADN. ** : $P < 0,01$; * : $P < 0,05$.

Plus les concentrations en *D. farinae* étaient importantes, plus les concentrations en *S. chartarum* (test de corrélation de Spearman, $p = 0,001$) étaient significativement élevées (Figure 17).

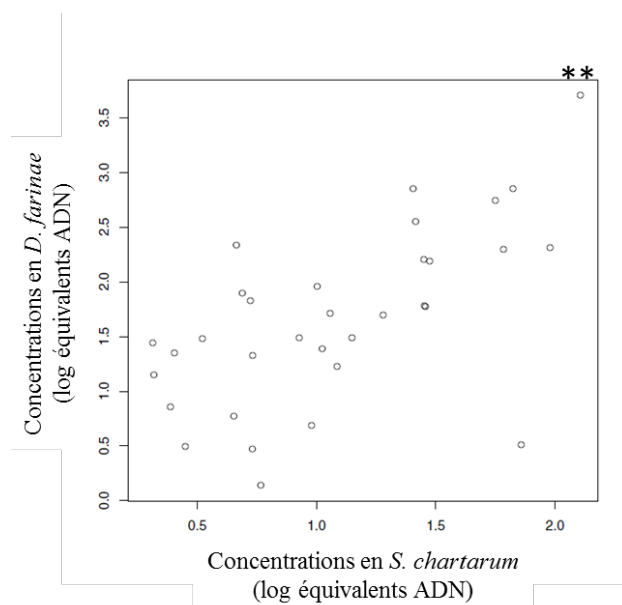


FIGURE 17 : CORRELATIONS SIGNIFICATIVES ENTRE LES CONCENTRATIONS EN *D. FARINAE* ET LES CONCENTRATIONS EN *S. CHARTARUM*. CONCENTRATIONS EN ACARIENS ET EN MOISSURES EXPRIMEES EN LOG EQUIVALENTS ADN. ** : $p < 0,01$.

Il n'y avait pas de corrélations significatives pour les autres espèces fongiques.

b. Corrélations entre acariens de stockage et moisissures

Les concentrations en acariens de stockage (*A. siro*/*G. domesticus*/*L. destructor*) ont été comparées aux concentrations des 10 moisissures.

Plus les concentrations en acariens de stockage étaient importantes, plus les concentrations en *A. glaucus* (test de corrélation de Spearman, $p = 0,0005$), en *A. versicolor* ($p = 0,004$), en *C. sphaerospermum* ($p = 0,001$) et en *W. sebi* ($p = 0,00002$) étaient significativement élevées (Figure 18).

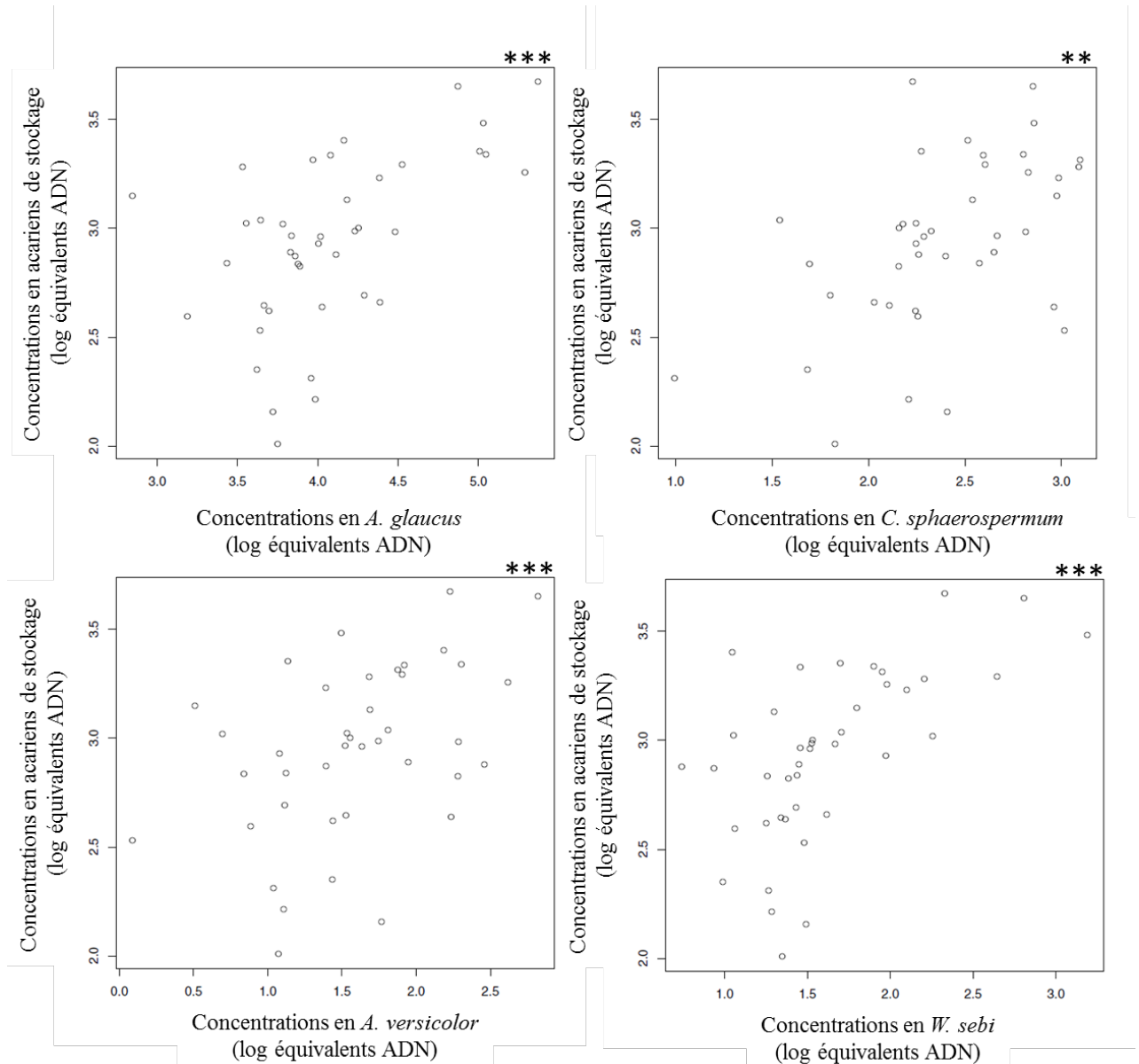


FIGURE 18 : CORRELATIONS SIGNIFICATIVES ENTRE LES CONCENTRATIONS EN ACARIENS DE STOCKAGE ET LES CONCENTRATIONS EN *A. GLAUCUS*, *A. VERSICOLOR*, EN *C. SPHAEROSPERMUM* ET EN *W. SEBI*. CONCENTRATIONS EN ACARIENS ET EN MOISSURES EXPRIMEES EN LOG EQUIVALENTS ADN. * : $p < 0,005$; ** : $p < 0,01$.**

Il n'y avait pas de corrélations significatives pour les autres espèces fongiques.

2) Corrélation entre acariens et moisissures dans les logements de l'étude ICODE

Les concentrations en acariens de stockage (*A. siro*/*G. domesticus*/*L. destructor*) ont été comparées aux concentrations de 6 moisissures (*A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. chrysogenum*, *W. sebi*).

Plus les concentrations en acariens de stockage étaient importantes, plus les concentrations en *A. versicolor* (test de corrélation de Spearman, $p = 0,0001$), en *C. sphaerospermum* ($p = 0,041$) et en *W. sebi* ($p = 0,0001$) étaient significativement élevées (Figure 19).

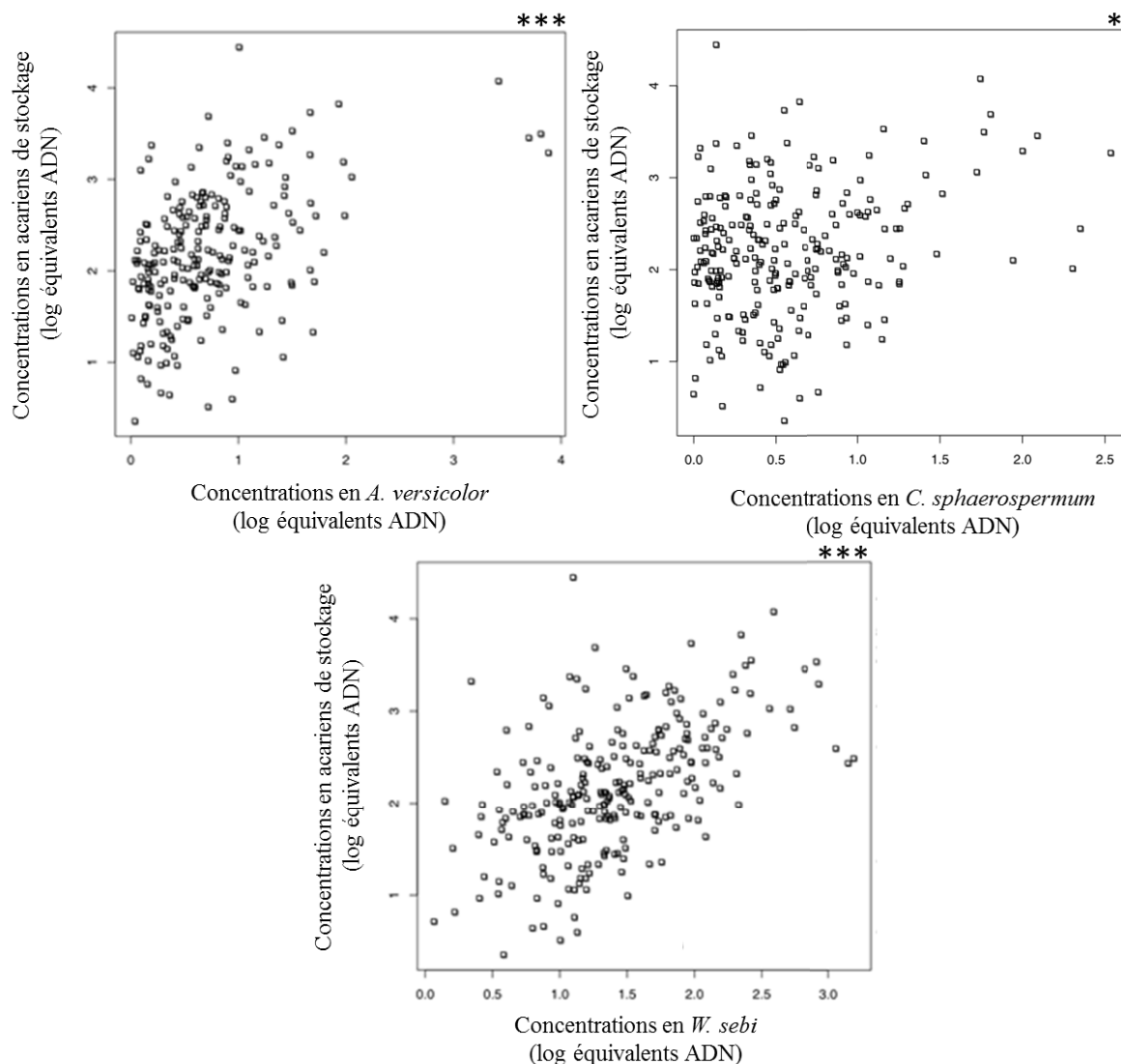


FIGURE 19 : CORRELATIONS SIGNIFICATIVES ENTRE LES CONCENTRATIONS EN ACARIENS DE STOCKAGE ET LES CONCENTRATIONS EN *A. VERSICOLOR*, EN *C. SPHAEROSPERMUM* ET EN *W. SEBI*. CONCENTRATIONS EN ACARIENS ET EN MOISSURES EXPRIMEES EN LOG EQUIVALENTS ADN. * : $P < 0,005$; * : $P < 0,05$.**

Il n'y avait pas de corrélations significatives pour les autres espèces fongiques.

IV. Conclusion

L'observation des interactions entre les acariens et les moisissures a apporté de nouvelles connaissances sur les moisissures consommées par les acariens, sur l'impact de cette relation acariens/moisissures dans la colonisation de l'habitat et sur la présence concomitante des acariens et des moisissures dans nos logements.

La mise au point de dispositifs d'observation du comportement des acariens vis-à-vis des moisissures a confirmé que les acariens étaient friands de spores de champignons. Lorsqu'ils sont exposés à des moisissures de caractéristiques variables, ils sont capables de sélectionner les moisissures ou au contraire de s'en détourner. Il a donc été possible de classer les moisissures en deux groupes : « attractives » et « répulsives ». De plus, lors de la consommation des spores, les acariens se retrouvent au milieu de la colonie fongique et se chargent de plusieurs dizaines de spores. Ils transportent donc ces spores lors de leurs déplacements que l'on a pu estimer à 7 mm par minutes.

Le bilan des connaissances sur les interactions entre les acariens et les moisissures nous a montré que ceux-ci tiraient profits de l'un et de l'autre. Il s'agit donc d'une relation symbiotique vraie où les acariens sont un vecteur de dissémination des moisissures dans l'environnement et où les moisissures fournissent les nutriments essentiels au développement des acariens. En fonction des conditions de températures et d'humidité, différentes espèces d'acariens vont pouvoir se développer au détriment des autres. Favorisés par de forts taux d'humidité, les acariens de stockage vont pouvoir coloniser l'environnement intérieur grâce à une fécondité dix fois plus importante que celle des acariens de la poussière domestique malgré une durée de vie moindre. En fonction des espèces présentes, l'impact sur les moisissures ne sera pas le même car les choix alimentaires des acariens de la poussière domestique ne semblent pas être identiques à ceux des acariens de stockage.

L'observation des corrélations entre les concentrations en acariens et les concentrations en moisissures souligne un « lien » différent entre les acariens de la poussière domestique, les acariens de stockage et les moisissures. Les différents acariens sont donc susceptibles de favoriser différentes espèces fongiques et ainsi modifier notre exposition aux moisissures. Cette co-exposition acariens/moisissures pourraient également jouer un rôle sur la fréquence et la sévérité des troubles respiratoires notamment allergiques.

CHAPITRE 3

***Influence du mode de vie sur la
pollution biologique de l'air
intérieur et risque inflammatoire***

I. Impact des micro-organismes de l'habitat sur le développement de la BPCO chez les éleveurs laitiers

1. Contexte

La BPCO est une maladie inflammatoire chronique, dont le principal facteur de risque est le tabagisme. Selon les experts de l'OMS, elle deviendra la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde en 2020 (Rabe et al., 2007). En France, elle est responsable chaque année de 100 000 hospitalisations et de près de 16 000 décès (Roche et al., 2007).

Le développement d'une BPCO est le plus souvent secondaire à l'exposition à des substances toxiques inhalées. L'exposition à la fumée de tabac est le principal facteur de risque identifié : 80 à 90 % des patients diagnostiqués avec une BPCO fument ou ont fumé (Jouneau et al., 2012). Cependant, certaines professions, parce qu'elles exposent à des aéro-contaminants, sont associées à un risque accru de BPCO. C'est notamment le cas des agriculteurs (Eduard et al., 2009).

Une diminution accélérée des tests fonctionnels respiratoires a été décrite chez des producteurs laitiers (Jouneau et al., 2012) mais la diversité des activités professionnelles et la multiplicité des aéro-contaminants en milieu agricole rendent difficile l'étude des risques respiratoires et l'analyse du rôle respectif des différentes nuisances.

Cliniquement, le retentissement de la BPCO « agricole » sur la qualité de vie, la fréquence des exacerbations et les modalités de prise en charge thérapeutique ne sont pas précisément définies, d'où la mise en place de l'étude BALISTIC en 2011 (Degano et al., 2012). Comme bien souvent les agriculteurs ne se plaignent de symptômes respiratoires que lorsqu'ils ont atteint un stade avancé de la maladie, l'étude BALISTIC vise, en outre, à définir une stratégie de dépistage précoce de la BPCO afin de mettre en place des mesures de prévention et de ralentir l'altération des fonctions respiratoires.

Dans le contexte des patients atteints de BPCO, le rôle des infections fongiques dans les exacerbations et la dégradation de la fonction pulmonaire est peu documenté. Une étude montre que les patients atteints de BPCO sont non seulement un groupe à risque d'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante mais également d'aspergillose pulmonaire invasive (API) (Guinea et al., 2010).

L'isolement d'*A. fumigatus* dans les prélèvements respiratoires est fréquent chez les patients atteints de BPCO mais le rôle étiologique d'une exposition fongique importante dans le développement de la maladie n'a à ce jour jamais été exploré.

Alors que la contribution diagnostique de la sérologie en cas de pathologies respiratoires telles les pneumopathies d'hypersensibilité (IgG précipitants) ou l'asthme (IgE totales) est largement reconnue, ce type d'analyse n'est pas couramment utilisé dans le cadre du diagnostic des BPCO. La littérature scientifique est très pauvre sur le sujet. Or, les patients travaillant en milieu agricole de type production laitière sont exposés à de fortes concentrations d'antigènes fongiques et bactériens, il est donc probable qu'une partie d'entre eux s'y sensibilise et qu'une réponse humorale immédiate (IgE) ou retardée (IgG) puisse être mise en évidence.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude mic-BALISTIC étaient :

- Caractériser l'exposition microbienne (bactérienne et fongique) de patients BPCO issus du milieu de la production laitière
- Mettre en évidence le rôle étiologique d'une exposition microbienne dans le développement de la BPCO dans le milieu de la production laitière
- Identifier des marqueurs biologiques discriminants des BPCO issues du milieu de la production laitière à partir des analyses sérologiques IgG spécifiques.
- Avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu en réponse à l'exposition microbienne chronique lors du développement de BPCO

2) Recrutement

Dans le cadre du projet BALISTIC, le recrutement est réalisé en Franche-Comté par le service de Pneumologie du centre Hospitalier Universitaire de Besançon. L'étude mic-BALISTIC est basée sur les analyses microbiologiques et sérologiques réalisées sur 30 producteurs laitiers souffrant de BPCO, 30 patients BPCO sans activité agricole, 30 producteurs laitiers sains et 30 sujets sains sans activité agricole.

3) Prélèvements

Lors de la visite d'inclusion dans BALISTIC des prélèvements sanguins sont collectés pour analyse sérologique et un CEP est distribué au patient, qui est informé des analyses sérologiques et microbiologiques prévues. Le collecteur est placé dans la chambre et est renvoyé par voie postale au laboratoire de Parasitologie-Mycologie au bout de 10 semaines. Les sérums décantés et les liquides de rinçage des CEP ont été collectés prospectivement et conservés à -80°C au laboratoire de parasitologie-mycologie.

4) Analyses

L'analyse par culture a été réalisée au moyen de quatre milieux : Malt salé incubé à 20°C, DG18 à 30°C, Actino à 30°C et R8 à 52°C. Les moisissures et les actinomycètes ont été comptés et identifiés sur des critères morphologiques.

L'extraction de l'ADN des microorganismes a été effectuée par chocs mécanique et thermique et pour l'analyse par PCR quantitative (qPCR), 9 espèces de moisissures et 3 actinomycètes ont été sélectionnées pour leur présence dans les logements, en milieu agricole et pour leurs effets pathogènes (Kaarakainen et al., 2009; Reboux et al., 2009): *A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *L. corymbifera*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*, *W. sebi* et *Streptomyces* *mésophiles*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris*. Un acarien de la poussière domestique a été choisi pour sa forte présence dans les logements et pour son pouvoir allergénique (Heinrich, 2011): *Dermatophagoides* spp..

Dix antigènes somatiques de moisissures et d'actinomycètes ont été produits pour l'analyse sérologique : *A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *L. corymbifera*, *S. chartarum*, *W. sebi*, *S. rectivirgula* et *T. vulgaris*. Le dosage des IgG a ensuite été réalisé par test ELISA.

3. Principaux résultats

Par culture, 25 microorganismes différents ont été isolés dans les 120 logements de producteurs laitiers et de sujets sans exposition professionnelle malades ou non. Cinq moisissures et 3 actinomycètes, représentant plus de 95% des espèces détectées, ont permis de sélectionner les cibles qPCR suivantes : 9 moisissures (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*,

Lichtheimia corymbifera, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* et *Wallemia sebi*), 3 actinomycètes (*Streptomyces mesophilic*, *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*) et un acarien de la poussière domestique (*Dermatophagoides* spp.).

Les concentrations en microorganismes obtenues par culture et par qPCR dans les 120 logements ont montré des concentrations significativement plus importantes en *A. glaucus*, *L. corymbifera*, *W. sebi*, *Streptomyces mesophilic*, *S. rectivirgula* et *T. vulgaris* chez les producteurs laitiers qu'ils soient malades ou non. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations des logements de patients et ceux des sujets sains.

L'analyse sérologique, réalisée par un dosage des Immunoglobulines G par test ELISA vis-à-vis de 10 antigènes issus de moisissures et d'actinomycètes isolés dans les logements, a montré une réponse immunologique à *W. sebi* significativement plus importante chez les producteurs laitiers souffrant de BPCO que chez les autres groupes.

4. Article Environmental Research (en révision)

Role of chronic microbial exposure on COPD development in dairy farmers (nested study from the BALISTIC cohort)

Alexandre Naegele,¹ Gabriel Reboux,^{1,2} Matthieu Veil-Picard,³ Anne-Pauline Bellanger,^{1,2} Martial Botebol,⁴ Jean-Jacques Laplante,⁵ Isabella Annesi-Maesano,⁶ Nicolas Roche,⁷ Bruno Degano,⁸ Sandrine Roussel,^{1,2} Laurence Million,^{1,2} and Jean-Charles Dalphin^{1,3}

¹UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement, University of Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

²Department of Parasitology-Myecology, University Hospital, Besançon, France

³Department of Pneumology, University Hospital, Besançon, France

⁴Federation of Health Institutes of the Franche Comté Region (FEMASAC), Beurre, France

⁵Social and Agricultural Mutuality (MSA) of the Doubs, Besançon, France

⁶Epidemiology of Allergic and Respiratory Diseases UMR-S 707 Inserm/UPMC, Paris6, France

⁷Department of Pneumology, Military Hospital of Val de Grace, Paris, France

⁸Department of Functional Explorations, Besançon, France

Key words: COPD, Dairy Farmers, Dwellings, Microorganisms, *Wallemia sebi*.

ABSTRACT Dairy farming is associated with a higher risk of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) than unexposed subjects. However, the role of microbial exposure is as yet unknown.

We therefore aimed to quantify and characterize the microbial exposure in dwellings of dairy farmers suffering from COPD and to assess the etiological role of microbial exposure in the development of COPD in dairy farmers.

Dust samples were obtained from dwellings from 30 dairy farmers with COPD paired with 30 healthy dairy farmers and from 30 subjects not involved in farming activity with COPD paired with 30 healthy subjects not involved in farming activity. Dust was collected by electrostatic dust collector over a ten week period and was analyzed by culture and by quantitative PCR. For each patient and subject, serological analysis was tested by IgG ELISA with ten antigens representative of the farming environment.

Culture and quantitative PCR results showed higher concentrations of molds (*Aspergillus glaucus*, *Lichtheimia corymbifera* and *Wallemia sebi*) and actinomycetes (mesophilic *Streptomyces*, *Saccharopolyspora rectivirgula* and *Thermoactinomyces vulgaris*) in the house dust of dairy farmers. These species are specific to the farming environment and this suggests they can be transported from stables to dwellings in high quantities. Microorganism concentrations were not statistically higher in dwellings of COPD patients but their immunological responses were more important for the antigen of *W. sebi*.

Although microbial exposure was higher in dairy farmers than in unexposed subjects, exposure was similar in COPD and healthy farmers. Our preliminary results suggest that immunological response to *W. sebi* could be associated with the development of COPD in dairy farmers.

INTRODUCTION

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a preventable and treatable disease, characterized by persistent airflow limitation that is usually progressive. The most important etiological factor of COPD is tobacco smoking but many other factors can trigger lung inflammation leading to COPD. Occupational exposures to vapors, gas, dust or fumes are part of these other factors and account for 15-20% of COPD in developed countries. Exposure to organic dusts has been shown to be associated with an increased risk of obstructive lung diseases, especially in dairy farmers (Guillien et al., 2015).

In the farming environment, exposure to microorganisms is particularly great and some microorganisms are specific to stables. These species are recognized as etiological agents for hypersensitivity pneumonitis (Reboux et al., 2001) but the role of exposure to them in COPD development has never been investigated. Recent studies show that COPD patients are at risk of developing invasive pulmonary aspergillosis (IPA) (Guinea et al., 2010).

Serology has been used to diagnose respiratory diseases such as hypersensitivity pneumonitis (HP) and asthma, but not COPD. However, dairy farmers (DFs) are exposed to high concentrations of fungi and bacteria and may be sensitized to these microorganisms.

The aim of this study was to characterize the microbial exposure in dwellings (bacteria and fungi) of DFs with COPD, to assess the etiological role of chronic microbial exposure in COPD development in DFs, and to identify discriminating biological markers of COPD in dairy production from serological analyses.

METHODS

Recruitment

COPD patients and healthy subjects (controls (C)) were recruited through the BalistiC study (Degano et al., 2012). Briefly, DF from the Franche-Comté region were invited to attend a free health check-up organized by the Social and Agricultural Mutuality (MSA) in a premise close to the subjects' homes. In parallel, subjects without any farming exposure were invited to perform a spirometry at their general practitioner's office. DF and unexposed subjects (non-farmers (NF)) had a spirometry (MedGraphics®, MSE, Strasbourg, France) and a bronchodilation test performed by administering 400 µg of the short-acting β₂-agonist salbutamol (Ventoline®, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France). Spirometry outcomes included forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) and forced vital capacity (FVC). COPD was defined according to the GOLD cut-off criterion (FEV₁/FVC <0.70), based on the ECSC equations (Quanjer et al., 1993). Healthy subjects with normal spirometry were paired with COPD patients according to 5 criteria: to be or to have been a DF (vs. NF); age (+/- 5 years), sex (male/female); tobacco (non-smoker/ex-smoker/current smoker; +/- 5 pack/year) and geography.

For each individual, an environmental investigation was carried out in their dwelling and blood samples were collected for serological analysis.

Environmental investigations

Dust sampling

One electrostatic dust collector (EDC) (cloth surface: 20x17 cm) was placed in the bedroom of each dwelling for ten weeks. EDCs are electrostatic wipes that collect dust passively. This device has already been used for analysis with real time quantitative PCR (qPCR) (Rocchi et al., 2015; Scherer et al., 2014; Yamamoto et al., 2011). Once they were returned by mail, the EDC wipes were placed in a plastic bag with 20 ml of a solution of Tween 80 to 0.1% and washed in Stomacher™ for ten minutes. Nine ml of rinsing liquid was then collected.

Microbiological analysis and identification

Culture

Culturing was carried out on a single set of four media: 3 % Malt Agar (AES, Bruz, France) 10 % salt and 0.5 % chloramphenicol incubated at 20 °C, Dichloran glycerol 18% (DG18) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) at 30 °C, Difco actinomycetes isolation agar (BD®, Le Pont-de-Claix, France) at 30 °C and R8 (Amner et al., 1989) at 52 °C. Fifty µl of liquid samples from the EDC wipes were plated onto the four media. Cultures were checked after three and seven days of incubation. Fungal and actinomyces species were identified by macroscopic and microscopic examination.

qPCR

DNA extraction was performed from the centrifuged washing liquid (8000 g, 10 min.) using mechanical and thermal lysis as previously described by Scherer *et al.* (2014). In each extraction series, a sterile distilled water sample was included as a negative control and negative and positive controls were added to each qPCR reaction.

Specific DNA was quantified by qPCR using primers and Taqman™ probes previously described for molds (Haugland et al., 2004), actinomycetes (Betelli et al., 2013; Schäfer et al., 2011) and mites (Roussel et al., 2013).

Nine targeted fungi species were selected after the microbiological identification by culture, because they are commonly detected in indoor air (Reboux et al., 2009) and because of their distinct infectious, allergenic or toxic pathogenic effects: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Lichtheimia corymbifera*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* and *Wallemia sebi*.

Three actinomycetes species detected by culture in the dwellings included in this study and responsible for health disorders (Betelli et al., 2013; Schäfer et al., 2011) were chosen: mesophilic *Streptomyces*, *Saccharopolyspora rectivirgula* and *Thermoactinomyces vulgaris*.

One house dust mite (HDM) genus (*Dermatophagoides* spp.) which is very common in domestic dust and a major factor in allergic diseases (Heinrich, 2011) was targeted.

Serology

Collection of sera

From blood samples, sera were obtained by decantation and conserved at – 80 °C.

Production of antigens

The protein fractions were prepared from ten reference strains of molds and actinomycetes of the farming environment. Strains were deposited in the fungal BBCM/IHEM collection (Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium): *A. alternata* (IHEM 22669), *A. fumigatus* (IHEM 22670), *A. glaucus* (IHEM 16286), *A. versicolor* (IHEM 22671), *C. sphaerospermum* (IHEM 6976), *L. corymbifera* (IHEM 3809), *S. chartarum* (IHEM 20352), *W. sebi* (IHEM 16284) and in the microorganism collection (Leibniz Institute DSMZ, Leibniz, Germany): *S. rectivirgula* (DSMZ 43747), *T. vulgaris* (DSMZ 43016). Antigens were obtained as previously described by Roussel et al. (2011)

Enzyme linked immunosorbent assay

Specific Immunoglobulin G (IgG) antibodies were detected by direct ELISA as described by Roussel et al. (2011) with the ten antigens described above in the previous section. Sera were used diluted at 1/100 and the ten antigens described above were used at different concentrations: 0.5 µg/ml (*T. vulgaris*), 1 µg/ml (*A. alternata*, *S. chartarum*, *S. rectivirgula*), 5 µg/ml (*A. fumigatus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *W. sebi*) and 10 µg/ml (*A. glaucus*, *L. corymbifera*).

On each ELISA plate, 12 sera from the four groups of the BALISTIC cohort were tested as a reference. The three optical density values (OD) were blank-corrected and averaged, and a standard deviation and variation coefficient were calculated. If the variation coefficient was higher than 20%, outliers were deleted. The values were normalized based on the mean of the OD values obtained for the 12 sera of reference.

Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program R (version 3.2.2) (R Development Core Team, Vienna, Austria).

Microorganism concentrations were expressed as a mean in colony-forming units (CFU) per EDC for those obtained by culture and in DNA equivalents (fg/µl) for those obtained by qPCR. Comparisons between subject exposure and sensitization were made as follows: COPD-DF compared to C-DF, COPD-NF compared to C-NF, COPD-DF compared to COPD-NF and C-DF compared to C-NF.

Qualitative variables were compared with the chi-square test and quantitative variables with analysis of variance. The usual threshold for statistical significance of 0.05 was used.

Means of IgG index were used for statistical analysis by receiver operating characteristic curves (ROC). Sensitivity and specificity were calculated for each IgG index value and the value which showed the best percentage of correctly classified cases and controls was chosen as the threshold. When several thresholds were equivalent, the one with the best sensitivity was chosen. ROC allowed us to compare antigens by examining the area under the curve (AUC).

RESULTS

Subject characteristics

Thirty COPD-DF, 30 COPD-NF, 30 C-DF and 30 C-NF were recruited in Franche-Comté region between November 2011 and April 2013. Subject characteristics are summarized in Table 1. DFs and NFs were mainly males (85% and 80% respectively) aged about 59. Fewer DFs were smokers in comparison with NFs. A lower pack/year figure was reported in DF smokers in comparison with NF smokers (26 pack/year and 34 pack/year

respectively). Matching criteria were respected and no statistical differences in age, sex ratio or smoking was found between COPD-DF and C-DF or between COPD-NF and C-NF.

Table 1: Subject characteristics according to the matching criteria for dairy farmers (DFs) and non-farmers (NFs). Matching was carried out between COPD-DF and C-DF and between COPD-NF and C-NF.

		COPD-DF		COPD-NF		C-DF		C-NF	
		Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men
Sex		15 %	85 %	21 %	79 %	14 %	86 %	20 %	80 %
Age (SD)		64 (8)	59 (9)	62 (7)	61 (7)	61 (10)	58 (8)	60 (6)	59 (6)
Smoking (PY)	No	50 %	47 %	30 %	7 %	80 %	50 %	40 %	12 %
	Ex	20 % (3)	32 % (22)	20 % (19)	45 % (25)	12 % (2)	30 % (19)	10 % (18)	44 % (25)
	Current	30 % (25)	21 % (24)	50 % (35)	48 % (37)	8 % (31)	20 % (23)	50 % (35)	44 % (31)

SD: standard deviation, PY: pack/year

Environmental investigations

Twenty-five different species of molds, actinomycetes and yeasts were detected with EDC by culture in the 120 dwellings. The species found most often or in high concentrations were five mold species (*A. glaucus*, *A. versicolor*, *Lichtheimia* spp., *Penicillium* spp. and *W. sebi*) and three actinomycetes species (mesophilic *Streptomyces*, *S. rectivirgula* and *T. vulgaris*). Other species (corresponding to less than 5% of all microorganisms) were detected only occasionally or in low concentrations: molds (*A. alternata*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *S. chartarum* and *Trichoderma* spp.), actinomycetes (*Streptomyces thermophilic*, *Saccharomonospora azurea*, *Saccharomonospora viridis*, *Laceyella sacchari*) and yeasts (pink and white colonies). From the 25 microorganism species detected by culture (detection frequency and clinical effects), the DNA of thirteen qPCR targets was analyzed. Molds were detected in between 50% (*S. chartarum*) and 97% (*A. glaucus*, *W. sebi*), actinomycetes in between 74% (*T. vulgaris*) and 90% (*Streptomyces* mesophilic) and HDMs in 90% of dwellings.

Mean concentrations obtained by culture and qPCR for the 13 predominant species in each group are presented in Table 2.

Table 2: Microorganism concentrations expressed in CFU/EDC (340 cm²) for culture results and in DNA equivalents for qPCR results. *** or ‡‡‡: $P < 0.001$, ** or ‡‡: $P < 0.01$, * or ‡: $P < 0.05$.

Species	COPD-DF		COPD-NF		C-DF		C-NF	
	Culture	qPCR	Culture	qPCR	Culture	qPCR	Culture	qPCR
<i>A. alternata</i>	1	176	0	240	0	207	0	319
<i>A. fumigatus</i>	0	549	2	62	1	2674	0	132
<i>A. glaucus</i>	321***	249715**	23	10382	232	185803	137	24792
<i>A. versicolor</i>	31	155	8	60	37	113	42	92
<i>C. sphaerospermum</i>	3	742	0	1504	0	659	0	1753
<i>Lichtheimia</i> spp. (<i>L. corymbifera</i>)	33***	132***	0	2	15	110‡‡‡	3	3
<i>Penicillium</i> spp. (<i>P. chrysogenum</i>)	87	2	45	2	51	1	87	1
<i>S. chartarum</i>	0	13	0	4	1	14	0	6
<i>W. sebi</i>	17**	1390***	2	125	11	1019‡‡‡	2	258
<i>Streptomyces</i> mesophilic	452**	1	36	1	458	2	129	2
<i>S. rectivirgula</i>	904**	29	34	42	673‡‡	117	112	15
<i>T. vulgaris</i>	197*	1	88	1	70	13	96	2
<i>Dermatophagoïdes</i> spp.	ND	2179	ND	1933	ND	1607	ND	2196

#: COPD-DF vs C-DF

‡: COPD-NF vs C-NF

*: COPD-DF vs COPD-NF

‡: C-DF vs C-NF

No significant statistical difference was observed between the dwellings of COPD-DF and C-DF. Similarly, no significant statistical difference was observed between the dwellings of COPD-NF and C-NF. In contrast, a significant statistical difference was observed between the dwellings of COPD-DF and COPD-NF, with higher concentrations in the dwellings of DFs compared to the dwellings of NFs of three molds: *A. glaucus* (321 vs 23 CFU/EDC, $P=0.0003$), *Lichtheimia* spp. (33 vs 0 CFU/EDC, $P=0.001$), *W. sebi* (17 vs 2 CFU/EDC, $P=0.025$) and three actinomycetes: *Streptomyces* mesophilic (452 vs 1 CFU/EDC, $P=0.001$), *S. rectivirgula* (904 vs 29 CFU/EDC, $P=0.002$) and *T. vulgaris* (197 vs 1 CFU/EDC, $P=0.048$).

Significantly higher concentrations of mold species were detected by qPCR in the dwellings of DFs: *A. glaucus* (249715 vs 10382 DNA equivalents, $P=0.001$), *L. corymbifera* (132 vs 2 DNA equivalents, $P=0.0001$) and *W. sebi* (1390 vs 125 DNA equivalents, $P=0.0005$). A significant statistical difference was also observed between the dwellings of C-DF and C-NF, with higher concentrations in the dwellings of DFs of the actinomycetes species *S. rectivirgula* by culture (673 vs 112 CFU/EDC, $P=0.002$) and of two molds by qPCR, *L. corymbifera* (110 vs 3 DNA equivalents, $P=0.00001$) and *W. sebi* (1019 vs 258 DNA equivalents, $P=0.002$).

Immunological responses

Detecting specific IgG antibodies by direct ELISA, allowed us to obtain an IgG index for each of the four groups. Mean and standard deviations of the IgG index for each group and for each antigen tested are detailed in Fig. 1. All the subjects in the study were sensitized to the ten antigens tested. COPD-DF presented a significantly higher immunological response to the *W. sebi* antigen than C-DF (IgG index 0.84 vs 0.38, $P = 0.002$) and COPD-NF (IgG index 0.84 vs 0.54, $P = 0.004$). In contrast, no statistical difference in sensitization was observed between either COPD-NF and C-NF or C-DF and C-NF.

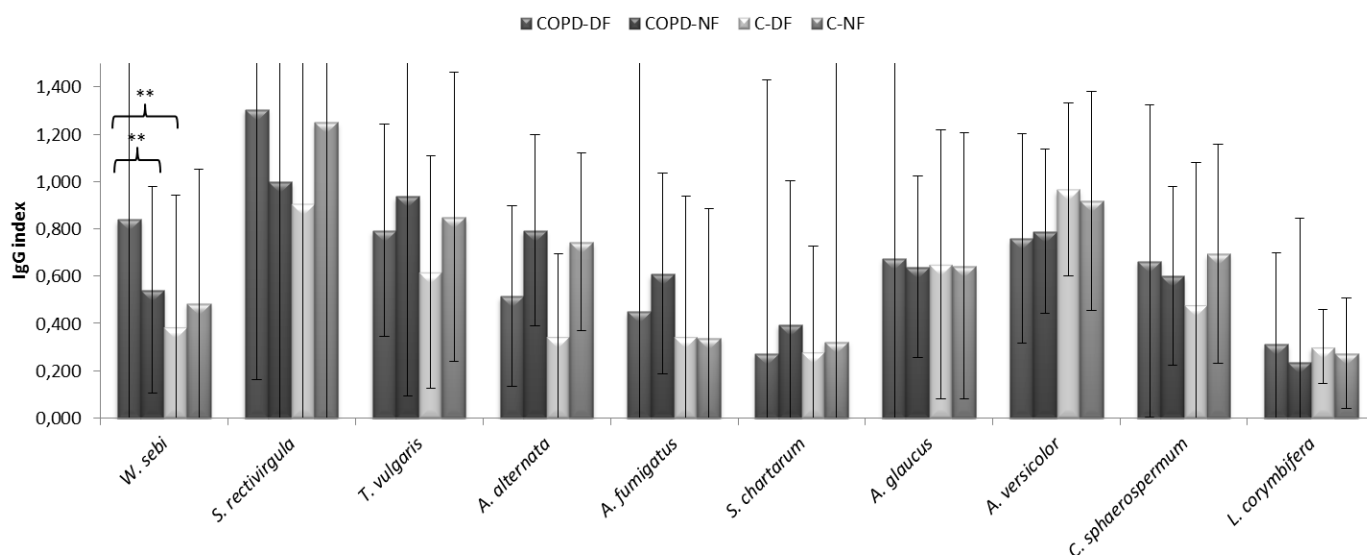


Figure 1: Mean and standard deviation of IgG index for each of the four groups and for each of the ten antigens tested. **: $P < 0.005$.

COPD and IgG dosage

To compare the four groups, AUC was obtained by statistical analysis of the ROC curves. We observed AUC from 0.46 (*A. versicolor*) to 0.74 (*W. sebi*) between COPD-DF and C-DF, from 0.40 (*C. sphaerospermum*) to 0.66 (*A. fumigatus*) between COPD-NF and C-NF, from 0.40 (*A. alternata*) to 0.68 (*W. sebi*) between COPD-DF and COPD-NF, and from 0.31 (*A. alternata*) to 0.55 (*L. corymbifera*) between C-DF and C-NF.

The AUC obtained from DFs with the antigen of *W. sebi* (0.74) allowed us to calculate the positive threshold of the IgG index (cutoff = 0.481). The antigen of *W. sebi* was the only one of the ten tested presenting a high sensitivity for the COPD-DF and a good specificity for the COPD controls.

The correlation between microbial sensitization and microbial exposure to *W. sebi* is presented in Fig. 2. Subjects sensitized to *W. sebi* were not exposed to higher concentrations of *W. sebi* in dwellings. No relationship between exposure and sensitization was observed in any of the ten antigens of molds or actinomycetes tested.

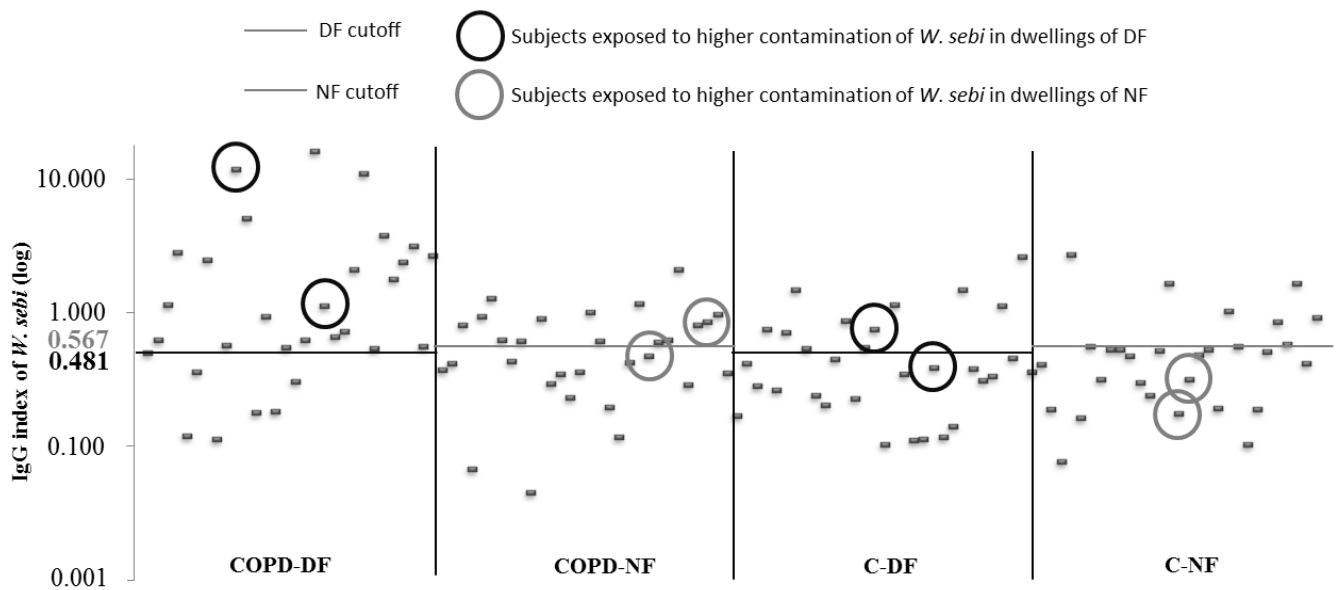


Figure 2: Relationship between exposure and sensitization to *Wallemia sebi*. The IgG index of 120 subjects represents the immunological response. Higher exposure to *Wallemia sebi* corresponds to concentrations higher than $\frac{1}{2}$ log compared to the mean.

DISCUSSION

Culture and qPCR results showed higher mold and actinomycetes concentrations in the dwellings of DFs. However, microorganism concentrations were not significantly higher in the dwellings of COPD patients. The immunological response of the COPD patients showed greater sensitization to the antigen of *W. sebi* whereas there was no relationship between exposure and sensitization.

The EDC collected microorganisms in dwellings for a period of ten weeks. This settled dust from the EDC is the most representative of all airborne dust (Frankel et al., 2012). It is generally recognized that culture assays encourage the development only of viable microorganisms and that competition between species may occur (Crawford et al., 2015). The culture method was useful in acquiring information about common contamination in the dwellings recruited. The qPCR target selection was partly based on the results of culture and took into account the competition issues as well as the high allergenicity potential of some species (such as *Alternaria*, for example). In contrast to culture methods, qPCR analyses detect viable and unviable fragments that may be involved in clinical manifestations (Tischer et al., 2011). Another advantage of qPCR is its precise quantification and the same standards operational procedure (SOP) for different microbial agents (molds, actinomycetes and domestic mites).

COPD patients were no more exposed than healthy subjects (C-DF and C-NF). On the other hand, DFs were more exposed than the NF group. Microorganisms, which are detected in dwellings, are known for their role in Farmers' Lung Disease (Bellanger et al., 2010; Pepys et al., 1990). This high exposure is specific to the farming environment. The frequent detection and high concentrations of *A. glaucus*, some Mucorales (*L. corymbifera*) and some mesophilic (mesophilic *Streptomyces*) or thermophilic (*S. rectivirgula*, *T. vulgaris*) actinomycetes in DF dwellings suggest they are transported from the stables to dwellings in high quantities. This transportation may be caused by air flow to dwellings close to stables, by farmers' movements or by contaminated cloths taken into the dwelling. This airflow or these aspects of farmers' lifestyles may modify the microbial flora and increase the microbial exposure of the DFs in their dwellings. The common fungal genera isolated in dwellings in the same area (Franche-Comté region) are *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus* (Reboux et al., 2009), but dwellings were mainly contaminated by *A. glaucus*. Indeed, this species is more representative of the farm environment and of the feed distribution for cattle (Roussel et al., 2005).

Although DF exposure was higher in comparison with overall population exposure, COPD patients (COPD-DF and COPD-NF) were not statistically more exposed than healthy controls (C-DF and C-NF). No correlation between exposure and disease was found and this is probably because COPD is caused by multiple factors including individual factors, smoking or by some toxic or inflammatory substances secreted by the microorganisms (mycotoxins) or issued from them (endotoxins). However, the prevalence of smoking in DFs is

low (Blair and Freeman, 2009). Mycotoxins are present in agricultural products (seeds, cereals, meat, eggs, milk, etc.) and DFs are potentially exposed to these molecules. *Penicillium*, *Aspergillus* and *Stachybotrys* are among the main mold species which produce mycotoxins (Seltzer and Fedoruk, 2007). However, no connection with COPD has yet been reported in the literature. Endotoxins are a component of the external membrane of gram-negative bacteria and are released during the growth or the lysis of bacteria. Highly present in bioaerosols used in pig farming (Vogelzang et al., 1998), endotoxins are either not dosed or under-dosed in dairy production (Barnig et al., 2013) and could also play a major role in COPD development.

HDM concentrations were not statistically different between the dwellings of DFs and NFs. COPD patients were no more exposed to *Dermatophagoides* than controls and this genus of HDM does not seem to be linked to the agricultural environment.

High exposure to microorganisms does not lead to strong sensitization and NFs are also sensitized. Indeed, the immunological response of DFs and NFs to the ten antigens tested was similar. Only the *W. sebi* antigen showed statistical differences between the immunological response of COPD-DF and COPD-NF or C-DF. COPD-DF were more sensitized to *W. sebi* than the other patients or the controls. The genus *Wallemia* is xerophilic and tolerates reduced water activity ($a_w=0.65$). The Basidiomycota *Wallemia sebi* has been isolated from air soil, dried food (causing spoilage) and salt. *W. sebi* has a world-wide distribution and is common in indoor and agricultural environments. *W. sebi* produces extremely tiny spores that are reported to be highly allergenic. Their small size allows them to invade the respiratory system efficiently and some strains of *Wallemia* produce mycotoxins such as wallemine, tryptophol, tryptophol acetate, phenylacetic acid and wallimidione recently discovered (Desroches et al., 2014). This mold species is, contrary to hydrophilic molds and actinomycetes, evidence of an environment with very little damp, and grows when little water is available ($a_w=0.65$) (hay dries or ventilated farm). The progress made in farming techniques affects microbial flora and thus DF exposure (Reboux et al., 2006). It may lead to *W. sebi* development to the detriment of other hydrophilic species ($a_w>0.80$), which are also often thermophilic.

Conclusion

COPD may be caused by multiple factors but DFs are more exposed to microorganisms in dwellings, and the COPD-DF are particularly sensitized to *W. sebi*. Further studies with more than 120 subjects are required to understand the relationship between exposure and COPD and the role of this basidiomycete (*W. sebi*) in COPD development.

Acknowledgments

The authors thank the “Mutualité Sociale Agricole” of the Doubs and the “Fédération des Maisons de Santé Comtoises” for recruiting dairy farmers and subjects in the general population. We thank Ms. Frances Thivet of the ThiveT Language Services for her editorial assistance.

Competing interests: None declared.

Funding: Novartis Pharma

Patient consent Obtained

Ethics approval Recruitment was carried out according to the ethical research committee n°11/617.

REFERENCES

- Amner, W., Edwards, C., McCarthy, A.J., 1989. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2669–2674.
- Barnig, C., Reboux, G., Roussel, S., Casset, A., Sohy, C., Dalphin, J.-C., de Blay, F., 2013. Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. Lett. Appl. Microbiol. 56, 161–167.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Botterel, F., Candido, C., Roussel, S., Rognon, B., Dalphin, J.-C., Bretagne, S., Millon, L., 2010. New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. Med. Mycol. 48, 981–987.

Betelli, L., Duquenne, P., Grenouillet, F., Simon, X., Scherer, E., Géhin, E., Hartmann, A., 2013. Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. J. Microbiol. Methods 92, 25–32.

Blair, A., Freeman, L.B., 2009. Epidemiologic Studies of Cancer in Agricultural Populations: Observations and Future Directions. J. Agromedicine 14, 125–131.

Crawford, J.A., Rosenbaum, P.F., Anagnost, S.E., Hunt, A., Abraham, J.L., 2015. Indicators of airborne fungal concentrations in urban homes: understanding the conditions that affect indoor fungal exposures. Sci. Total Environ. 517, 113–124.

Degano, B., Bouhaddi, M., Laplante, J.-J., Botebol, M., Annesi-Maesano, I., Marescaux, A., Roux, P., Thaon, I., Wolf, J.-P., Regnard, J., Dalphin, J.-C., 2012. [BPCO des producteurs laitiers : dépistage, caractérisation et constitution d'une cohorte. Étude BALISTIC]. Rev. Mal. Respir. 29, 1149–1156.

Desroches, T.C., McMullin, D.R., Miller, J.D., 2014. Extrolites of *Wallemia sebi*, a very common fungus in the built environment. Indoor Air 24, 533–542.

Frankel, M., Timm, M., Hansen, E.W., Madsen, A.M., 2012. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. Indoor Air 22, 405–414.

Guillien, A., Puyraveau, M., Soumagne, T., Guillot, S., Rannou, F., Marquette, D., Berger, P., Jouneau, S., Monnet, E., Mauny, F., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., Degano, B., 2015. Prevalence and risk factors for COPD in farmers: a cross-sectional controlled study. Eur. Respir. J.

Guinea, J., Torres-Narbona, M., Gijón, P., Muñoz, P., Pozo, F., Peláez, T., de Miguel, J., Bouza, E., 2010. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16, 870–877.

Haugland, R.A., Varma, M., Wymer, L.J., Vesper, S.J., 2004. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. Syst. Appl. Microbiol. 27, 198–210.

Heinrich, J., 2011. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 1–25.

Pepys, J., Jenkins, P.A., Festenstein, G.N., Gregory, P.H., Lacey, M.E., Skinner, F.A., 1990. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. 1963. Allergy Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc. 11, 101–102, discussion 97–99.

Quanjer, P.H., Tammeling, G.J., Cotes, J.E., Pedersen, O.F., Peslin, R., Yernault, J.C., 1993. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. Eur. Respir. J. Suppl. 16, 5–40.

Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C., Millon, L., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. Indoor Air 19, 446–453.

Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnnet, K., Dalphin, J.C., 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163, 1534–1539.

Reboux, G., Reiman, M., Roussel, S., Taattola, K., Millon, L., Dalphin, J.-C., Piarroux, R., 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. Ann. Agric. Environ. Med. AAEM 13, 267–273.

Rocchi, S., Reboux, G., Frossard, V., Scherer, E., Valot, B., Laboissière, A., Zaros, C., Vacheyrou, M., Gillet, F., Roussel, S., Raherison, C., Millon, L., Elfe team, 2015. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. Sci. Total Environ. 505, 1026–1035.

Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.-C., Laplante, J.-J., Piarroux, R., 2005. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. Ann. Agric. Environ. Med. AAEM 12, 217–221.

Roussel, S., Reboux, G., Naegele, A., Martinez, J., Vacheyrou, M., Scherer, E., Millon, L., 2013. Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR. Environ. Int. 55, 20–24.

Roussel, S., Rognon, B., Barrera, C., Reboux, G., Salamin, K., Grenouillet, F., Thaon, I., Dalphin, J.-C., Tillie-Leblond, I., Quadroni, M., Monod, M., Millon, L., 2011. Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. Int. J. Med. Microbiol. IJMM 301, 150–156.

Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U., 2011. Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative real-time PCR. Ann. Occup. Hyg. 55, 612–619.

Scherer, E., Rocchi, S., Reboux, G., Vandentorren, S., Roussel, S., Vacheyrou, M., Raherison, C., Millon, L., 2014. qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. Sci. Total Environ. 466-467, 716–724.

Seltzer, J.M., Fedoruk, M.J., 2007. Health Effects of Mold in Children. Pediatr. Clin. North Am., Children's Health and the Environment: Part II 54, 309–333.

Tischer, C., Chen, C.-M., Heinrich, J., 2011. Association between domestic mould and mould components, and asthma and allergy in children: a systematic review. Eur. Respir. J. 38, 812–824.

Vogelzang, P.F., van der Gulden, J.W., Folgering, H., Kolk, J.J., Heederik, D., Preller, L., Tielen, M.J., van Schayck, C.P., 1998. Endotoxin exposure as a major determinant of lung function decline in pig farmers. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157, 15–18.

Yamamoto, N., Shendell, D.G., Peccia, J., 2011. Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR. Indoor Air 21, 521–530.

II. Impact du compostage domestique sur l'environnement intérieur

1. Contexte

Depuis quelques années, les logements ont vu se banaliser certaines pratiques favorisant l'apparition de niches écologiques pour les micro-organismes. Avec l'avènement du développement durable, de nombreuses campagnes de sensibilisation ont vu le jour concernant la réduction des déchets et le recyclage des déchets organiques ménagés séduit de plus en plus la population.

Les conditions de dégradation de ces déchets (températures supérieures à 20°C et hygrométrie supérieure à 60%) sont idéales pour la microfaune et l'émergence de particules animales, végétales et microbiologiques (bactéries, actinomycètes, moisissures, virus, parasites, acariens) (Domingo and Nadal, 2009). Les professionnels de la collecte des déchets organiques sont exposés à de fortes quantités de bio-aérosols (Dutkiewicz, 1997) et à proximité des composteurs industriels, les concentrations en moisissures sont plus importantes et suffisantes pour que des effets sur la santé soient mesurés (Poulsen et al., 1995).

Lors de l'utilisation du récipient de stockage provisoire (bio-seau), la dégradation des déchets peut provoquer le développement de micro-organismes. Ces derniers sont alors susceptibles d'être aérosolisés lors des ouvertures successives du couvercle. La qualité biologique de l'air pourrait être altérée par cette nouvelle source de polluants organiques.

2. Présentation de l'étude

1) Objectifs

Les objectifs de l'étude ICODE étaient :

- Caractériser la qualité de l'air intérieur des logements pratiquant le compostage
- Evaluer les concentrations en micro-organismes (moisissures, bactéries et acariens) à proximité et à distance du bio-seau
- Suivre l'évolution des concentrations en micro-organismes durant un an

2) Recrutement

Quarante-huit logements de volontaires pratiquant (n=38) ou non (n=10) le compostage ont été recrutés de janvier à avril 2012 via le Syndicat Mixte de Besançon et de sa

Région pour le Traitement des Déchets (SYBERT). Trente-quatre questions concernant le logement, la cuisine, les habitants et leurs pratiques ont été posées.

3) Prélèvements

Seize prélèvements d'air et de poussières ont été réalisés à trois distances du bio-seau (0,5, 1 et 3 m) et à cinq temps (0, 2, 4, 7 et 12 mois). Une recherche de gaz (CO₂, NH₃, O₂ et H₂S) a été effectuée aux trois distances et à deux temps (0 et 12 mois).

Les prélèvements d'air ont été effectués via deux techniques : l'impaction (250 litres d'air) et la collecte des particules (14400 litres d'air). La collecte des poussières sédimentées a été effectuée par CEP découpés en quatre bandes (21x5 cm).

4) Analyses

L'analyse par culture a été réalisée au moyen de trois milieux : DG18 incubé à 30°C, Actino à 30°C et R8 à 52°C. Les espèces fongiques ont été comptées et identifiées sur des critères morphologiques. Les *Penicillium* ont été identifiés à l'espèce par séquençage (gène codant pour la bêta-tubuline) et par spectrométrie de masse.

L'extraction de l'ADN des micro-organismes a été effectuée par chocs mécanique et thermique et pour l'analyse par PCR quantitative (qPCR), 6 espèces de moisissures ont été sélectionnées pour leurs présences dans les composteurs industriels et pour leurs effets pathogènes: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Alternaria alternata*, *Wallemia sebi*. Les entérobactéries ont été choisies comme marqueur d'endotoxines (Bouillard et al., 2005). La sonde choisie amplifie les entérobactéries des genres *Serratia* et *Klebsiella*. Un acarien de stockage, présent dans les produits issus de l'agriculture (Nesvorna et al., 2012) et un acarien de la poussière domestique reconnu pour être le principal facteur responsable de l'asthme (Heinrich, 2011) ont été retenus : *A. siro* et *D. pteronyssinus*.

3. Principaux résultats

Les résultats des prélèvements d'air ne montrent pas d'influence significative du bio-seau sur la qualité biologique de l'air intérieur des cuisines : la biodiversité est équivalente à celle d'un logement standard et les concentrations dans l'air ne sont pas significativement supérieures à celles mesurées chez les personnes ne pratiquant pas le compostage.

Les concentrations en acariens de stockage et en moisissures (*A. versicolor*, *C. sphaerospermum* et *W. sebi*) sont significativement plus importantes à proximité du bio-seau dans les poussières sédimentées.

D'un point de vue prévention du risque, l'impact du bio-seau sur la qualité de l'air intérieur est limité dans l'espace (< 1 m) et un nettoyage régulier du bio-seau et des surfaces à proximité suffiront.

Cette étude a également permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les CEP qui ont rapidement séduit pour leur simplicité, leur faible coût et leur possibilité de mesurer l'exposition sur plusieurs semaines. Ils se généralisent et tendent à devenir la norme dans les études épidémiologiques. C'est la première fois que la cinétique des concentrations dans la poussière déposée sur ces CEP est étudiée. Les résultats ne montrent pas une augmentation linéaire des concentrations dans le temps mais des interactions inter-organismes et une influence des saisons.

L'étude des pratiques individuelles n'a pas permis de mettre en évidence de facteurs clairement liés à une augmentation de la contamination autour du bio-seau en raison d'un respect quasi systématique des recommandations. L'analyse des questionnaires montre que les personnes ont des pratiques assez similaires qui diffèrent selon la saison.

4. Article Indoor Air 2015

Microbiological consequences of indoor composting

Abstract Recycling of organic waste appeals to more and more people. The aim of this study was to evaluate the microbiological contamination around organic waste bins at three distances over a 12-month period. Contamination near the customary trash of control households was evaluated at the beginning to ensure that there is no recruitment bias. Air samples using the MAS 100 impactor were carried out in 38 dwellings that do household waste composting and in 10 dwellings of controls. Collection of particles by CIP 10 rotating cup sampler and dust samples collected by electrostatic dust collector cloths were acquired in dwellings that do household waste composting. Samples were analyzed by culture and by real-time quantitative PCR. Information about dwelling characteristics and inhabitant practices was obtained by a standardized questionnaire. The genera most often isolated were *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Streptomyces*. Near the organic waste bins, bioaerosol samples showed an increase of *Acarus siro* ($P = 0.001$). Sedimented dust analyses highlighted an increase of *A. siro*, *Wallemia sebi*, *Aspergillus versicolor*, and *Cladosporium sphaerospermum* concentrations after a 12-month survey compared to the beginning. Composting favors microorganism development over time, but does not seem to have an effect on the bioaerosol levels and the surface microbiota beyond 0.5 m from the waste bin.

**A. Naegele¹, G. Reboux^{1,2},
M. Vacheyrou¹, B. Valot¹,
L. Millon^{1,2}, S. Roussel^{1,2}**

¹UMR/CNRS 6249 Chrono-Environnement, University of Bourgogne – Franche-Comté, Besançon, France,

²Laboratory of Parasitology-Mycology, University Hospital, Besançon, France

Key words: Composting; Electrostatic dust collector; Indoor air; Molds; Mites; Waste bin.

S. Roussel
Parasitology-Mycology Department
UMR CNRS 6249, University Hospital
Bd Fleming
25030 Besançon
France
Tel.: +333 81 669029
Fax: +333 63 082232
e-mail: sandrine.roussel@univ-fcomte.fr

Received for review 10 April 2015. Accepted for publication 15 August 2015.

Practical Implications

The conditions of waste degradation provide ideal temperatures (up to 20°C) and hygrometry (up to 60% RH) for microbiota. In general, there is a public fear concerning the aerosolization of microorganisms. Air and dust analyses of 48 dwellings showed that—at the beginning of the study—the biodiversity and microorganism concentrations are not statistically different between households with or without an organic waste bin. After 1 year of survey, we observed that indoor composting is associated with an increase of storage mites and mold concentrations near the waste bin but has no negative influence on indoor air quality beyond 0.5 m from the waste bin.

Introduction

In response to many campaigns to promote waste reduction, more and more people recycle their organic waste, including those living in city apartments.

Unlike industrial composting, in homes with temperatures up to 20°C and hygrometry as high as 60% relative humidity (RH), conditions are conducive to bioaerosol emergence (Domingo and Nadal, 2009). When a waste bin is used for temporary storage of organic waste in homes, degradation can favor the development of microorganisms, which, in turn, could be aerosolized during successive lid openings and the depositing of new waste. These conditions are also ideal for the proliferation of domestic mites and

particularly storage mites that are common in agricultural products (e.g., cheese, cereals). The biological quality of air in dwellings could be altered by this new source of organic pollutants.

The potential effects of fungi on human health, related to the various components of a bioaerosol, are clearly a cause for concern. Effects involve four mechanisms: infectious (i.e., aspergillosis), inflammatory (β -glucans), toxic (mycotoxins), and allergic (molds) (Fischer and Dott, 2003).

Moreover, domestic mites [house dust-mites (HDM) and storage mites], their feces, and their own degradation have clinical implications because they release allergenic enzymes and proteins (Thomas, 2010). Among the mite allergens studied, those of the

Dermatophagoides genus and of *Acarus siro* are of greatest concern.

The concomitant presence of molds and domestic mites in organic waste bins could bring about respiratory disorders. In addition to the allergic mechanism, inhaling mold spores could be toxic.

The aim of this study was to evaluate the microorganism and mite contamination of kitchens with organic waste bins and the classic trashes of controls households. An initial evaluation was made to compare all households. Then, over a 12-month period, microorganisms and mites were collected at various distances of waste bins with different sampling methods.

Material and methods

Recruited dwellings

Thirty-eight dwellings of volunteers using a composter since autumn 2011 and 10 controls without composters were recruited during January to April 2012; there were 26 apartments and 22 individual houses. Thirty-four questions were asked concerning the dwelling itself (address, location, surface area, construction date, number of rooms, type of heating), the kitchen (ventilation, floor and wall coverings, aeration time, location of the waste bin), the residents (number, age, number of smokers, type of food), and their composting practices (waste bin, waste type, removal frequency, cleaning, distance from the composter).

Sampling

Air was sampled by impaction near the organic waste bin or near the trash for controls at the beginning. Bioaerosol particles were sampled by filtration, and dust was sampled by means of electrostatic dust collectors (EDC) at the beginning, during the study, and after 12 months.

Air sampling. Air sampling was carried out by two methods, as follows:

- Impaction at three distances (0.5, 1 and 3 m) and at the beginning with a MAS 100 impactor (Merck®, Darmstadt, Germany), for 2.5 min/sample (250 L air) using three culture media: Dichloran glycerol 18% (DG18) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) incubated at 30°C, Actino Difco® (BD®, Le Pont-de-Claix, France) (Actino) at 30°C, and R8 (Amner et al., 1989) at 52°C.
- Bioaerosol sampling near the organic waste bin (0.5 m distance) at two time intervals (0 and 12 months) with a CIP 10™ personal rotating cup sampler equipped with a foam for retaining particles (Arelco®, Fontenay sous Bois, France) and utilized

for 24-h periods, sampling 14 400 L of air. The foam was washed with 3 mL of 0.1% Tween 80 solution (Merck®, Darmstadt, Germany). Two millilitre of liquid was collected using a syringe.

Dust sampling. An EDC consists of electrostatic wipes able to passively capture airborne dust (Scherer et al., 2014). This device had previously been used for cultivable fungi (Wurtz et al., 2005), and wipes were also used for qPCR (Yamamoto et al., 2011). Wipes were cut into four strips (21 × 5 cm), sterilized (at 124°C for 30 min), and attached to a disinfected tray (Surfanios™, Anios®, Lille-Hellemmes, France). Trays were placed near the organic waste bin (0.5 m) and at a further distance from it (3 m). Strips were collected sequentially after 2, 4, 7, and 12 months and immediately placed in a zipped sterile plastic bag for transport and storage.

Electrostatic dust collectors wipes were transferred in a dedicated Stomacher bag with 5 mL of 0.1% Tween 80 solution (Merck®, Darmstadt, Germany) and washed in a Stomacher (AES Stomacher™ mix2, BioMérieux®, Marcy L'étoile, France) for 10 min. Three millilitre of liquid was collected.

Microbiological analysis and identification

Culture. Culturing was carried out on a single set of 3 media: DG18 incubated at 30°C, Actino at 30°C, and R8 at 52°C. Impactions were directly performed on culture media, and 250 µL of liquid samples from the CIP 10 sampler and the EDC wipes were plated onto the three media. Cultures were checked after 3 and 7 days of incubation. Fungal and actinomyces species were identified by macroscopic and microscopic examination from reference books (De Hoog et al., 2000; Domsch et al., 1980; Klich, 2002; Samson et al., 2010) and counted.

Quantitative PCR. Rapid DNA extraction and PCRs were performed as previously described (Scherer et al., 2014). Specific DNA molds were quantified by qPCR using primers and Taqman™ probes previously described for molds (Haugland et al., 2004), mites (Roussel et al., 2013), and enterobacteria (*Serratia* sp., *Enterobacter* sp., and *Klebsiella* sp.; Sen and Asher, 2001).

Six targeted fungi species were selected because they are commonly detected in indoor air (Reboux et al., 2009) and because of their distinct infectious, allergenic, or toxic pathogenic effects: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Alternaria alternata*, *Wallemia sebi*. Enterobacteria were chosen as an endotoxin tracer (Bouillard et al., 2005).

One storage mite (*Acarus siro*) able to colonize kitchens, present in agricultural products, and responsible

for health disorders (Nesvorna et al., 2012) was chosen.

One HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus*) very common in domestic dust and a major factor of allergic diseases (Heinrich, 2011) was targeted.

Mass spectrometry. *Penicillium* was isolated in the air and dust samples by culture, and the MALDI-TOF-MS-based method was used for species identification (Microflex®, Brücker, Germany), as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program R (version 2.15) with package lme4 (version 0.999999; R Development Core Team, Vienna, Austria).

The dwelling characteristics, with and without organic waste bins, were compared using chi-square test (qualitative variables) and Student's *t*-test (quantitative variables). The comparisons of air concentrations were performed with the Wilcoxon rank-sum test (bin houses and no-bin houses) and the Wilcoxon signed-rank test (at the three distances, at the beginning and after 12 months). We used maximal values in every sample to determine the concentrations of microorganisms by culture.

Species evaluations according to dwelling characteristics and air concentrations of microorganisms in dwellings with or without waste bins were carried out using a canonical correlations analysis (CCA). The Shannon indexes of biodiversity were determined for the dwellings with and without organic waste bins and were compared with the Student *t*-test.

Quantitative PCR results were expressed in DNA equivalents (pg/μL for mites and fg/μL for molds) using a standard curve and a log transformation. Evaluation of distance effect for each species was performed by a paired Student's *t*-test. Only time points containing positive results at each distance were saved. Time course evaluation was performed on normalized data. Quantitative PCR quantities were the mean of the two distances for each time point and centered at dwelling level. The usual threshold for statistical significance of 0.05 was used.

Results

Characterization of dwellings with or without organic waste bin

At the beginning of the study, the dwellings of 48 volunteers were compared. The volunteers' answers to questionnaires allowed us to estimate the various characteristics of the domestic/home environment. The air samples by impaction, at 3 distances, made it possible to establish a profile of specific contamination in every kitchen by culture.

Dwellings, kitchens, and inhabitants. The main answers are referenced in Table 1 and determine the typical dwelling, whether or not composting is done.

The typical dwelling profile observed in this study was as follows: apartment or house, 35 years old, mainly situated in an urban area with gas heating, and containing four rooms for 2 inhabitants. Kitchens are equipped with controlled mechanical ventilation (CMV), and windows are open daily. Walls are painted, and the floor is tiled. The inhabitants are mainly non-smokers and have on average two meals per day in their dwelling. However, the control households are smaller (72 instead of 107 m²). For dwellings that do composting, the waste bin is placed next to the trash (87%).

Housing, with or without organic waste bins, is not fundamentally different. That allows for a comparison of the microbiological contamination, considering that these are similar environments.

Microbiological contamination. To determine microorganism contamination in kitchens, three air samples by impaction were taken in each dwelling at three distances (0.5, 1 and 3 m) from the organic waste bin or the trash. At 0.5 m, results were in mean 144 CFU/m³, at 1 m 139 CFU/m³, and at 3 m 138 CFU/m³. The small differences in air contamination at the three distances were not statistically significant (Wilcoxon signed-rank test: *P* [0.5 m vs. 1 m] = 0.23; *P* [0.5 m vs. 3 m] = 0.35; *P* [1 m vs. 3 m] = 0.98; Figure 1).

To identify factors that can have an impact on air quality, other questions were asked about area

Table 1 Characteristics of dwellings, kitchens, and inhabitants with waste bins and controls

Questions		Waste bin (n = 38)		Control (n = 10)		Statistical analyses, <i>P</i>
Dwellings	Area	Rural (13%)	Urban (87%)	Rural (20%)	Urban (80%)	0.51
	Location	Apartment (47%)	House (53%)	Apartment (80%)	House (20%)	0.06
	Type of heating	Gas (66%)	Other (34%)	Gas (70%)	Other (30%)	0.87
	Surface area	Median (107 m²)		Median (72 m²)		0.03
	Construction year	Median (1978)		Median (1980)		0.82
	Number of rooms	Median (4)		Median (4)		0.91
	Number of inhabitants	Median (2)		Median (2)		0.90
	Ventilation	Yes (87%)	No (13%)	Yes (90%)	No (10%)	0.78
Kitchens	Floor covering	Tile (85%)	Other (15%)	Tile (60%)	Other (40%)	0.09
	Wall covering	Paint (40%)	Other (60%)	Paint (40%)	Other (60%)	0.99
	Aeration frequency	Median (every day)		Median (every day)		0.91
Inhabitants	Smokers	Yes (18%)	No (82%)	Yes (40%)	No (60%)	0.12
	Number of meals	Median (2) per day		Median (2)		0.91

Bold values correspond to *P* < 0.05.

($P = 0.09$), location ($P = 0.52$), plants ($P = 0.71$), pets ($P = 0.66$), number of inhabitants ($P = 0.86$), aeration frequency ($P = 0.79$), how often the waste bin was emptied and cleaned ($P = 0.49$) and analyzed with a canonical correspondence analysis (CCA). We did not notice any correlation with the microorganism concentrations at the beginning of the study. Forty different species of molds, actinomycetes, and yeasts were detected by culture with impaction (0.5, 1, and 3 m) and bioaerosol sampling (0.5 m) at the beginning of the study (see Table S1). The species found most often or in high concentrations are referenced in Figure 2. Among them, we isolated nine molds (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus glaucus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *W. sebi*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp., *A. alternata*) and three groups of actinomycetes (mesophilic and thermophilic *Streptomyces*, *Saccharopolyspora rectivirgula*).

With the MALDI-TOF-MS-based identification, for the *Penicillium* genus, we identified 58 strains of 9 species of *Penicillium* among the 119 strains analyzed. They were 30 *P. chrysogenum* (52%), 13 *P. glabrum* (22%), 7 *P. brevicompactum* (12%), 3 *P. expansum* (5%), 1 *P. digitatum*, 1 *P. roqueforti*, 1 *P. coryphilum*, 1 *P. dierckxii*, and 1 *P. italicum*.

Other species (corresponding to less than 5% of all microorganisms) were detected only occasionally or at low concentration: molds (*Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* spp., *Lichtheimia corymbifera*, *Paecilomyces* spp., *Rhizopus* spp., *Stachybotrys chartarum*, *Trichoderma* spp., *Ulocladium chartarum*); actinomycetes (*Laceyella sacchari*, *Saccharomonospora viride*, *Thermoactinomyces vulgaris*); and yeasts (pink and white colonies).

Penicillium spp. and *A. glaucus* were present in all kitchens in concentrations sometimes greater than 400 CFU/m³ for *Penicillium* spp. (10% of dwellings). *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, and ‘mesophilic’ *Streptomyces* were detected in the majority of kitchens with waste bins. *W. sebi*, *A. niger*, *Mucor* spp., *A. alternata*, ‘thermophilic’ *Streptomyces*, and *S. rectivirgula* were observed in fewer than half of the housing units.

When we compare microorganism concentrations obtained by culture with impaction at the three distances in housing with waste bins (molds: 134 CFU/m³; actinomycetes: 8 CFU/m³) or without (molds: 147 CFU/m³; actinomycetes: 8 CFU/m³), we do not obtain statistically significant differences in contamination (Wilcoxon rank-sum test, molds: $P = 0.42$, and actinomycetes: $P = 0.78$).

The Shannon indexes of biodiversity were determined for the kitchens with and without organic waste bins. On average, they were, respectively, 1.45 and 1.35. No significant difference was established between these indexes (Student’s *t*-test: $P = 0.65$).

Comparison of microbiological contamination after 1 year of composting and at the beginning of the study

When the study began, volunteers’ dwellings with organic waste bins had been composting for only a few months and all received the same new waste bin model. We wanted to identify the air contamination near the waste bin (0.5 m) after 1 year. Air samples obtained by the particle collector (CIP 10) were analyzed by qPCR, which allowed us to compare microorganism concentrations at the beginning and after 1 year (Figure 3).

Among six targets, we observed that only the concentrations of storage mites (*A. siro*) were greater

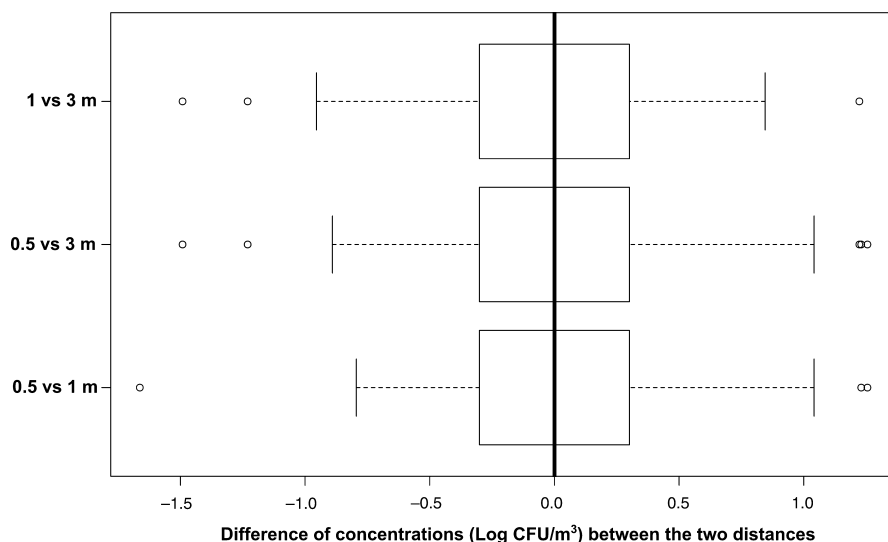


Fig. 1 Difference of microbiological contamination between the three different distances for the dwellings with waste bins measured by culture with impaction ($P < 0.05$). Zero corresponds to the absolute difference between the values at the first distance and at the second distance

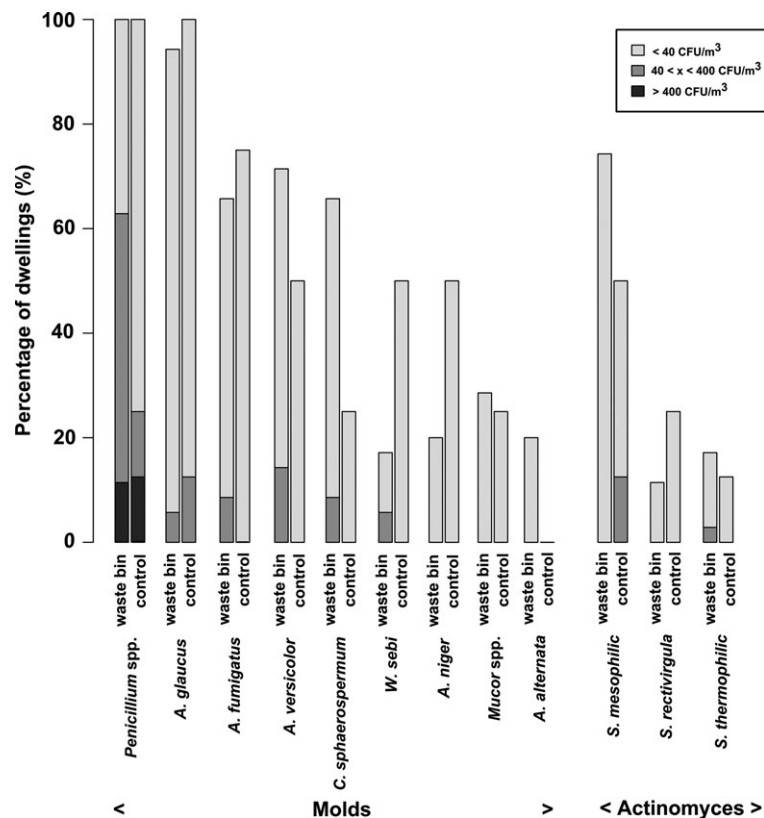


Fig. 2 Contamination by the twelve most prevalent microorganisms in the air of dwellings with waste bins or controls obtained by impaction on DG18 or Actino medium at the beginning of the study

after 1 year of composting (Wilcoxon signed-rank test: $P = 0.001$). The concentrations of *A. fumigatus* ($P = 0.08$), *A. versicolor* ($P = 0.17$), *P. chrysogenum* ($P = 0.89$), *Dermatophagoïdes* spp. ($P = 0.39$), and Enterobacteria ($P = 0.59$) were not significantly different between the beginning of the study and after one year.

Evolution of microbiological contamination over 1 year sampled by EDC and measured by qPCR

The evolution of the concentrations of nine microorganisms was followed by qPCR in space (nearby: 0.5 m and remotely: 3 m from the organic waste bin or the trash) and in time (2, 4, 7, and 12 months after the beginning of the study).

In space. Four microorganisms found in EDC samples analyzed by qPCR were found in larger concentrations near the waste bin (0.5 m) than at a distance (3 m) during the 12-month study period [*A. siro* ($P = 0.001$), *A. versicolor* ($P = 0.01$), *C. sphaerospermum* ($P = 0.008$), and *W. sebi* ($P = 0.01$); paired Student's *t*-test].

The five other targets were present in similar concentrations near and at a distance from the waste bin: *A. fumigatus* ($P = 0.63$), *A. alternata* ($P = 0.76$), *P. chrysogenum* ($P = 0.07$), Enterobacteria ($P = 0.76$), and *Dermatophagoïdes* spp. ($P = 0.13$).

Quantitative PCR analyses from the dust samples point to storage mite concentrations five times greater near the waste bin as compared with the samples at 3-m distance after 12 months (1608 instead of 301 DNA equivalents). The biological material of three molds (*A. versicolor*, *C. sphaerospermum* and *W. sebi*) was also found to be in higher concentration near the organic waste bin versus far after 12 months (respectively, 173, 153, and 203 instead of 7, 3, and 17 DNA equivalents).

In time. The same nine targets were monitored throughout the study with EDC (average values at 0.5 and 3 m). The resulting qPCR showed a moderate evolution in concentrations (Figure 4).

For some mold species (*A. alternata*, *A. fumigatus*, *C. sphaerospermum*, and *P. chrysogenum*), there was slightly or no accumulation on EDC even after 12 months. For the other molds (*A. versicolor* and *W. sebi*), enterobacteria, HDM (*Dermatophagoïdes* spp.), and storage mites (*A. siro*), slight increases were observed throughout the 12 months.

Discussion

The survey of dwellings during this study shows that, after 1 year of household waste composting, only the

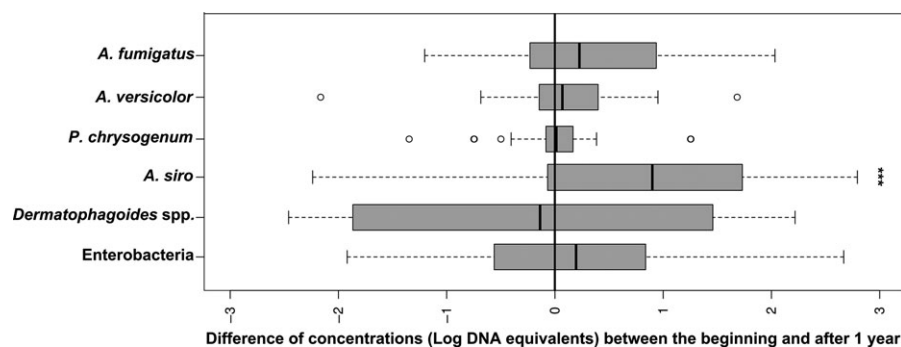


Fig. 3 Difference of microbiological contamination at the beginning of the study and after 1 year for the dwellings with waste bins measured by qPCR with bioaerosol sampling at 0.5 meter (***: $P < 0.05$). 'Zero' corresponds to the absolute difference between the values at the beginning of the study and at the end after 1 year

concentrations of the storage mite *A. siro* increased and only within a limited range of 0.5 m around the organic waste bin.

Because the different mold species do not have the same sedimentation speed (density, shape, aggregation) or the same ability to adhere to the substrate (dry or wet spores), their presence in the air could appear low. Consequently, it is important to use diverse sampling methods (air impaction, collection of particles by cyclonic effect, or dust sampling by EDC) at various moments and various distances, and to use several analysis techniques to obtain the best representation of both the quantitative and qualitative bioaerosol composition (Karvonen et al., 2014). Culture methods with various media and incubation at different temperatures, along with specific molecular tools (qPCR) for microorganisms (Scherer et al., 2014), and HDM and storage mite quantification (Roussel et al., 2013) are all needed to assess the concentration variation over an extended time period.

Air sampling by impaction detects spores present at a short sampling time without opening the organic waste bin. These samples, at three distances from the waste bin, show equivalent concentrations of molds, actinomyces, and yeasts. This finding could be explained by the presence of perpetual airflow (induced by ventilation, inhabitants' movements, air circulation between rooms, etc.).

According to their composition, not all molds grow on culture media. With various temperatures of incubation, it is possible to observe mesophilic and thermophilic species.

Various factors could influence air contamination. Indeed, some practices or housing equipment may favor microorganism development: the kind of geographic area (urban or rural; Lanier et al., 2010), the lack of ventilation (Bornehag et al., 2004), and the presence of plants (Bessot et al., 1997) or pets (Gehring et al., 2001; Rocchi et al., 2015) would be linked to higher concentrations of microorganisms. Among all the variables examined in this study, none demonstrated a clear effect on air concentrations.

The 40 observed molds, actinomyces and yeast species and their air concentrations are not significantly different in dwellings with or without organic waste bins. Moreover, the comparison of bin and no-bin dwellings, at the beginning of the study, shows that there is no recruitment bias. Microorganism biodiversity and concentrations are close to those usually found inside dwellings in the east of France: 32 dwellings with low concentrations (below 170 CFU/m³) and 6 with moderate concentrations (between 170 and 560 CFU/m³; Reboux et al., 2009).

Species identification of *Penicillium* via mass spectrometry does not allow the identification of all strains. Indeed, only half of *Penicillium* analyzed was precisely identified. Actually, the problem could be due to a limited number of taxa in the database.

Particle collection provides a 24-h view including normal use of the kitchen. The comparison of mold and enterobacteria concentrations in the air at the beginning of the study and after 1 year does not show a significant increase. The fact that the organic waste bins are emptied and cleaned regularly could explain this finding.

Acarus siro is mainly found near the waste bin both in the air and on surfaces. The conditions within the waste bin (up to 25°C, up to 60% RH and nutrients) favor storage mite development. However, the results for the control dwellings show similar levels suggesting that ordinary (non-composting) trash could also favor the presence of storage mites.

Aspergillus versicolor, *C. sphaerospermum*, and *W. sebi*, usually found in dwellings, are 25 times more prevalent on average around the organic waste bin in concentrations higher than in the other areas of the kitchen. This finding suggests that the waste bin is potentially the source of contamination and that mold spores become aerosolized during the successive lid openings.

Electrostatic dust collectors use allows spore collection in the kitchen for a period of 12 months. This settled dust from the EDC is the most representative of all airborne dust (Frankel et al., 2012). The kinetics of

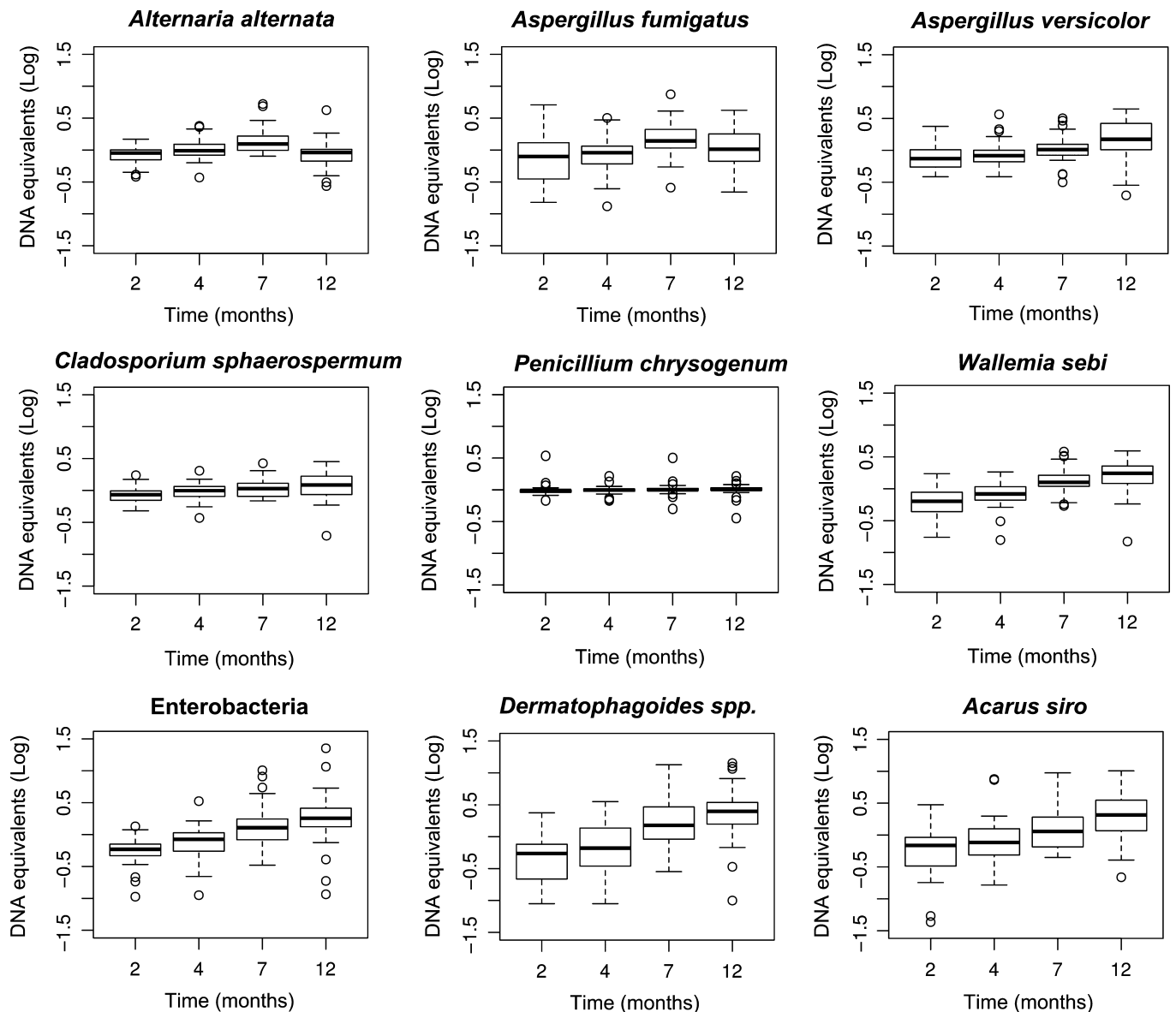


Fig. 4 Kinetics of the relative abundance of the nine qPCR targets during the 12-month period. Average concentrations near the waste bin denominated in log (centered values in DNA equivalents: pg/ μ L for mites and fg/ μ L for molds) for the four time intervals of dust sampling

relative abundance is probably the result of a simple accumulation of microorganisms.

Nevertheless, some species detected in dwellings doing household waste composting may present clinical risks for hypersensitive users. These risks can be allergic (*A. glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *Penicillium* spp., *A. fumigatus*, *Streptomyces* spp.), infectious (*A. fumigatus*), and toxic (*A. ochraceus*, *A. versicolor*; Kuhn and Ghannoum, 2003; Reboux et al., 2009). Russell et al. (2008) reported a case of a patient who died after regular handling of garden compost. The patient's death was said to be due to invasive aspergillosis after inhaling a large number of *A. fumigatus* spores. That study clearly shows the dangers of mold exposure favored by composting. For some

species, an individual must be exposed for several years at high concentration ($>10^5$ spores) before the respiratory disease can be observed (Eduard, 2009).

However, molds are not the main factor responsible for allergies. The strong presence of storage mites on the surface around the waste bin represents a risk for allergic users. Indeed, mites, and particularly their faeces, are the main allergens. This is true for both HDM (*Dermatophagoides* genus) and storage mites (*A. siro*).

Contrary to the public fear aroused by the presence of microorganisms near the waste bin, no notable contamination was found in kitchens. During the 12-month survey, there was an increase of storage mites and mold concentrations exclusively in the environment close to the organic waste bin. Simple

precautions of hygiene, such as the regular cleaning of the waste bin and of close surfaces, should be enough to limit contamination.

Acknowledgements

This study was supported by ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) within the framework of the National Research Program in Environment, Health and Occupation of the ANSES (APR, 2011, contrat No 1106C0025). The authors thank Isabelle Deportes from ADEME for her suggestions, the 'Syndicat de Besançon et de sa Région pour le Traitement des Déchets' (SYBERT) for user recruit-

ment and the donation of new waste bins, and Pamela Albert of the 'Centre de Linguistique Appliquée' (CLA) University of Franche-Comté, Besançon, for her editorial assistance.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 List of the 40 different species of molds, actinomycetes and yeasts detected by impaction at 0.5, 1 and 3 meters at the beginning of the study and their average concentrations in dwellings at the three distances in CFU/m³.

References

- Amner, W., Edwards, C. and McCarthy, A.J. (1989) Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **5**, 2669–2674.
- Bessot, J., Stenger, R. and Pauli, G. (1997) Allergies respiratoires chez les vignerons, *Rev. Fr. Allergol.*, **37**, 732–740.
- Bornehag, C.G., Sundell, J. and Sigsgaard, T. (2004) Dampness in buildings and health (DBH): report from an ongoing epidemiological investigation on the association between indoor environmental factors and health effects among children in Sweden, *Indoor Air*, **14**, 59–66.
- Bouillard, L., Michel, O., Dramaix, M. and Devleeschouwer, M. (2005) Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **12**, 187–192.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. and Figueras, M.J. (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, Utrecht, Amer. Society for Microbiology.
- Domingo, J.L. and Nadal, M. (2009) Domestic waste composting facilities: a review of human health risks, *Environ. Int.*, **35**, 382–389.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. (1980) *Compendium of soil fungi*, New York, Academic press.
- Eduard, W. (2009) Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting, *Crit. Rev. Toxicol.*, **39**, 799–864.
- Fischer, G. and Dott, W. (2003) Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene, *Arch. Microbiol.*, **179**, 75–82.
- Frankel, M., Timm, M., Hansen, E.W. and Madsen, A.M. (2012) Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure, *Indoor Air*, **22**, 405–414.
- Gehring, U., Douwes, J., Doeckes, G., Koch, A., Bischof, W., Fahlbush, B., Richter, K., Wichmann, H.E. and Heinrich, J. (2001) Beta (1→3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds, *Environ. Health Perspect.*, **109**, 139–144.
- Haugland, R.A., Varma, M., Wymer, L.J. and Vesper, S.J. (2004) Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species, *Syst. Appl. Microbiol.*, **27**, 198–210.
- Heinrich, J. (2011) Influence of indoor factor in dwellings on the development of childhood asthma, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **214**, 1–25.
- Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Rintala, H., Korppi, M., Täubel, M., Doeckes, G., Gehring, U., Renz, H., Pfefferle, P.I., Genuet, J., Keski-Nisula, L., Remes, S., Lampi, J., von Mutius, E. and Pekkanen, J. (2014) Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study, *Allergy*, **69**, 1092–1101.
- Klich, M.A. (2002) *Identification of common Aspergillus species*, Utrecht, Centraal bureau voor Schimmelcultures.
- Kuhn, D.M. and Ghannoum, M.A. (2003) Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective, *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 144–172.
- Lanier, C., Richard, E., Heutte, N., Picquet, R., Bouchard, V. and Garon, D. (2010) Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oil-seed cakes in agricultural environment, *Atmos. Environ.*, **44**, 1980–1986.
- Nesvorna, M., Gabrielova, L. and Hubert, J. (2012) Suitability of a range of *Fusarium* species to sustain populations of three stored product mite species (Acari: Astigmata), *J. Stored Prod. Res.*, **48**, 37–45.
- Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C. and Millon, L. (2009) Indoor mold concentration in Eastern France, *Indoor Air*, **19**, 446–453.
- Rocchi, S., Reboux, G., Frossard, V., Scherer, E., Valot, B., Laboissière, A., Zaros, C., Vacheyrou, M., Gillet, F., Roussel, S., Raherison, C., Millon, L. and the Elfe team (2015) Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children, *Sci. Total Environ.*, **505**, 1026–1035.
- Roussel, S., Reboux, G., Naegele, A., Martine, J., Vacheyrou, M., Scherer, E. and Millon, L. (2013) Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR, *Environ. Int.*, **55**, 20–24.
- Russell, K., Broadbridge, C., Murray, S., Waghorn, D. and Mahoney, A. (2008) Gardening can seriously damage your health, *Lancet*, **371**, 2056.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. and Andersen, B. (2010) *Food and Indoor Fungi*, Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Scherer, E., Rocchi, S., Reboux, G., Vandentorren, S., Roussel, S., Vacheyrou, M., Raherison, C. and Millon, L. (2014) qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies, *Sci. Total Environ.*, **466–467**, 716–724.
- Sen, K. and Asher, D.M. (2001) Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood, *Transfusion*, **41**, 1356–1364.

Microbiological consequences of indoor composting

- Thomas, W.R. (2010) Geography of house dust mite allergens, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, **28**, 211–224.
- Wurtz, H., Sigsgaard, T., Valbjorn, O., Doekes, G. and Meyer, H.W. (2005) The dustfall collector, a simple passive tool for long-term collection of airborne dust: a project under the Danish Mould in Buildings program (DAMIB), *Indoor Air*, **15**, 33–40.
- Yamamoto, N., Shendell, D.G. and Peccia, J. (2011) Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipes sampling and quantitative PCR, *Indoor Air*, **21**, 521–530.

III. Conclusion

Nos modes de vie peuvent moduler notre exposition aux acariens et aux micro-organismes au sein de nos logements. Dans ce chapitre, nous nous sommes premièrement intéressés aux producteurs laitiers qu'ils soient atteints de BPCO ou non. Nous avons pu caractériser leur exposition, évaluer la relation entre exposition et développement de la maladie et déterminer leur réponse immunologique vis-à-vis des micro-organismes présents de leurs logements. Dans un second temps, nous avons caractérisé la qualité biologique de l'air intérieur des cuisines de personnes pratiquant le compostage domestique en évaluant les concentrations en acariens et en micro-organismes à proximité et à distance bio-seau et en suivant l'évolution de ces concentrations dans le temps.

Dans leurs logements, les producteurs laitiers sont plus exposés à des moisissures et des actinomycètes caractéristiques de l'environnement de la ferme confirmant un transport des micro-organismes vers le logement. Pourtant, ceux développant une BPCO ne semblent pas plus exposés que les sujets sains montrant que d'autres facteurs interviennent dans la relation exposition/maladie (facteurs individuels, autres expositions). Cette plus forte exposition des producteurs laitiers ne provoque pas systématiquement une forte sensibilisation à ces micro-organismes mais les producteurs laitiers semblent avoir néanmoins une réponse immunologique plus importante à une moisissure liée aux bonnes conditions du stockage du fourrage.

La comparaison des logements utilisant ou non un bio-seau pour le stockage provisoire de leurs déchets organiques montre que les espèces fongiques et bactériennes détectées dans l'air des cuisines, leurs concentrations et leur diversité ne semblent pas être différentes. Le suivi de l'évolution des concentrations met en avant le développement des acariens de stockage sur les surfaces à proximité du bio-seau. Mais l'impact du compostage domestique sur la qualité biologique de l'air reste limité dans l'espace. De simples précautions d'hygiène devraient suffire à prévenir toute contamination.

La contamination biologique de l'air intérieur peut trouver sa source en dehors de nos logements et nous sommes, avec les flux d'air, un vecteur important des micro-organismes.

DISCUSSION GENERALE

Déjà utilisée pour la quantification des micro-organismes, la qPCR permet la détection et la quantification des acariens de la poussière domestique et des acariens de stockage mais aussi des animaux domestiques et des blattes dans les poussières et dans l'air des logements. Sensibles et spécifiques, les qPCR mises au point dans ce travail de thèse, confirment la forte présence des acariens de la poussière domestique dans la quasi-totalité des logements que ce soit au niveau de la chambre ou au niveau de la cuisine. Moins connue, la colonisation de nos logements par les acariens de stockage, et en particulier ceux des patients allergiques, a pu être mise en avant non seulement dans les cuisines mais aussi dans les chambres que ce soit en milieu rural ou urbain.

Les acariens domestiques se nourrissent non seulement de nos squames de peau, de nos débris kératinisés et de nos restes alimentaires mais aussi des spores de moisissures présentes dans les mêmes niches écologiques (matelas, tissus rembourrés, réserves alimentaires, bio-seau, ...). En les consommant, les acariens domestiques sont susceptibles de sélectionner certaines moisissures plutôt que d'autres et de les disperser au sein des logements. Présents au sein des mêmes microbiomes, acariens et moisissures peuvent se développer grâce à une vraie relation symbiotique.

Certains modes de vie ont une influence sur la pollution biologique de l'air intérieur. En effet, dans leurs logements, les producteurs laitiers sont plus exposés à certaines moisissures associées au développement de la PHS du poumon de fermier et semblent même plus sensibilisés à l'une d'entre elle. Une autre pratique suscitait les craintes des autorités de santé : le compostage domestique. Mais ces personnes ne semblent pas plus exposées que les autres et son impact sur la qualité biologique de l'air de la cuisine reste limité aux surfaces proches du bio-seau.

I. Mesure de l'exposition aux polluants biologiques de l'environnement intérieur

Chaque jour nous sommes exposés à un mélange complexe d'acariens, de micro-organismes et de composés microbiens dans les environnements intérieurs. Même si le rôle des acariens de la poussière domestique dans les pathologies allergiques est reconnu et documenté (Blanc et al., 2005; Bousquet et al., 2012; Calderón et al., 2014; Thomas, 2010; Tovey et al., 1981), les connaissances sur les effets des acariens de stockage et des agents fongiques sur la santé humaine restent cependant limitées. Le manque de méthode valide et

standardisée pour évaluer l'exposition aux acariens et aux micro-organismes freine les avancées dans ce domaine.

Les particules organiques présentent dans l'air des logements possèdent différentes vitesses de sédimentation. Leur présence dans l'air peut ainsi varier selon ces conditions et il est donc préférable d'utiliser divers techniques de prélèvements pour obtenir la meilleure représentation de la qualité biologique de l'air intérieur (Karvonen et al., 2014). Pourtant les contraintes de l'échantillonnage ne permettent pas systématiquement de multiplier les méthodes de prélèvements et le choix d'un outil unique pour la détection et la quantification paraît indispensable dans l'évaluation de notre exposition aux acariens et aux micro-organismes.

Contrairement au prélèvement d'air par impaction ou au prélèvement de poussières par aspiration, le prélèvement des poussières sédimentées par CEP n'est pas affecté par les variations temporelles des concentrations dans l'air, et il permet de standardiser la surface de collecte et la durée d'accumulation des poussières. Il est également peu coûteux et ne nécessite pas nécessairement de déplacement à domicile. En effet, il peut être envoyé et retourné par voie postale et sa facilité d'utilisation permet à l'utilisateur de le placer lui-même dans son logement. Témoin de l'exposition chronique et peu invasif, ce type de prélèvement par sédimentation est également plus représentatif de ce qui est inhalable au cours du temps par le patient (Frankel et al., 2012) tandis que les prélèvements par aspiration de la poussière de matelas représentent un historique de la contamination au cours des années précédentes.

Parmi les différents types d'analyse existant pour la quantification des micro-organismes, la culture reste la plus utilisée. Selon leur composition, les micro-organismes ne se développent pas sur les mêmes milieux de culture. Il est nécessaire d'utiliser divers milieux spécifiques à différentes températures d'incubation de manière à observer les espèces mésophiles et thermophiles. Seule une partie des micro-organismes va pouvoir se développer en raison de compétitions inter et intra-espèce et de leur viabilité (Crawford et al., 2015). Cela pourrait expliquer des différences entre les faibles fréquences de détection de *S. chartarum* obtenues par culture et celles obtenues par qPCR (près de 50 % des logements dans l'étude mic-BALISTIC). De plus, la culture ne permet pas de détecter les acariens dans notre environnement.

Pour la détection et la quantification des acariens, le comptage microscopique a longtemps été utilisé mais il nécessite une forte connaissance en acarologie et est trop long et

méticuleux pour être applicable à grande échelle. Le dosage enzymatique des allergènes est également régulièrement utilisé sur les poussières de matelas (Gent et al., 2012) mais l'ELISA nécessite 100 mg de poussière contre seulement 15 mg pour la qPCR. Enfin, l'Acarex test[®] est utilisé pour sa praticabilité et son rôle pédagogique mais il est limité par un important taux de guanine ne provenant pas des acariens (Hallas et al., 1993) et fournit un résultat colorimétrique utilisateur dépendant et semi-quantitatif : classement de la contamination en 4 catégories (nulle, faible, moyen et fort).

Les trois méthodes utilisées principalement sont corrélées entre elles (Hallas et al., 1993; Hoyet et al., 1991; Lind, 1986; Van Bronswijk et al., 1989). Pourtant, les résultats obtenus par qPCR (article qPCR ACARIENS) ne sont pas en accord avec ceux de l'Acarex test[®] et permettent d'aller plus loin dans l'interprétation avec une quantification plus précise des acariens de la poussière domestique et des acariens de stockage.

Les qPCR, mises au point pour les acariens de la poussière domestique, les acariens de stockage, les animaux domestiques et les blattes ainsi que celles déjà développées pour les moisissures et les bactéries, permettent la détection des acariens, des micro-organismes et des autres organismes allergisants ciblés au sein d'un environnement complexe à l'aide d'un seul et unique outil. Sensible, spécifique et rapide (1h30), la qPCR détecte les espèces viables mais aussi les cellules non viables pourtant potentiellement responsables d'effets cliniques (C. Tischer et al., 2011).

Malgré bon nombre d'avantages, la qPCR ne permet de détecter que les organismes ciblés. Lors de la construction des couples sondes et amorces et de l'alignement des séquences nucléotidiques, il peut être difficile de cibler une zone suffisamment spécifique pour permettre uniquement l'amplification de l'espèce ciblée. Dans le cas des acariens de stockage, il n'a pas été possible de ne détecter uniquement l'espèce *A. siro* et la qPCR amplifie également deux autres espèces d'acariens de stockage : *G. domesticus* et *L. destructor* qui sont principalement retrouvés dans les silos à grain mais aussi occasionnellement dans les poussières des logements.

A l'inverse, une forte spécificité pourrait ne pas permettre de détecter toutes les souches d'une même espèce en cas de variation intra-espèce. Cette question, nous nous la sommes posés dans le cas de la qPCR spécifique à *P. chrysogenum*. En effet, cette espèce a été faiblement retrouvée en qPCR dans les logements des différentes études de cette thèse alors que *P. chrysogenum* est souvent définie comme étant une des moisissures les plus

fréquemment isolées dans les logements. Notre question était alors de savoir si cette qPCR permettait bien de détecter tous les *P. chrysogenum* (les tests de spécificité et sensibilité n'étant validés qu'avec un isolat de référence) ou si *P. chrysogenum* est surévalué en culture où il pourrait être plus résistant lors des prélèvements par impaction et/ou présenterait des avantages compétitifs par rapport aux autres espèces sur les milieux de culture. L'identification des *Penicillium* par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a montré que plus de 50 % des souches testées étaient des *P. chrysogenum* (article ICODE). L'utilisation des nouvelles techniques de séquençage (NGS) en cours de développement au laboratoire devrait nous permettre de répondre avec plus de certitudes à la question de la sous-évaluation de cette espèce par qPCR ou à sa surévaluation par culture.

Quelques soient les études menées lors de cette thèse pour la quantification des acariens, des micro-organismes, des animaux domestiques et des blattes (ACARI, qPCR ALLERGENES, BALISTIC ou ICODE) la contamination n'a pas pu être appréhendée uniquement via le biais de questionnaires. En effet, les concentrations en acariens de stockage étaient plus importantes lorsque des preuves d'une humidité importante étaient observées dans les logements (peinture cloquée, papier-peint décollé, ...) mais aucun effet sur les moisissures n'a pu être mis en évidence. Pourtant, il a été démontré que l'humidité favorisait le développement des moisissures mais la présence de moisissures n'est pas toujours reliée à une humidité excessive au sein des logements. Les mesures à domicile semblent donc essentielles pour évaluer l'exposition des personnes dans leur environnement intérieur et, à ce jour, les visites des CEI, qui ont surtout lieu dans le cas de pathologies allergiques, ont déjà montré leur efficacité en termes de réduction des allergènes et de diminution des symptômes (Morgan et al., 2004).

II. Pollution biologique de l'air intérieur et risques sanitaires

Les acariens de la poussière domestique sont présents en surabondance dans les chambres au niveau des matelas où ils rencontrent les conditions idéales à leur développement : humidité et chaleur (apportées par l'Homme) et nourritures (squames de peau et débris kératinisés) (Boor et al., 2015) mais aussi dans les cuisines. A l'inverse, les acariens de stockage sont naturellement liés au milieu rural (Iraola et al., 2014) et au stockage de nos denrées alimentaires dans les cuisines mais on les retrouve également en de fortes concentrations dans les chambres que ce soit à la campagne ou à la ville. En plus de la

multiplicité des niches écologiques favorisant leur développement, les acariens domestiques et leurs allergènes peuvent être transportés par les flux d'air (circulation de l'air des pièces de vie aux pièces techniques via les VMC), par leurs propres déplacements et par les habitants eux-mêmes. Les résultats obtenus (article ACARI) pour les acariens domestiques nous indiquent, comme pour les moisissures lors d'une étude sur 128 logements insalubres (Roussel et al., 2008), qu'il n'y a pas de différence de contamination globale de l'air et des surfaces entre les pièces.

Les acariens de la poussière domestique sont reconnus comme étant les principaux acariens présents dans nos logements (Boquete et al., 2006). Pourtant, les acariens de stockage sont présents dans la totalité des logements étudiés dans le cadre de cette thèse et leurs concentrations sont même significativement plus importantes que celles des acariens de la poussière domestique (article ACARI). Ils sont donc très présents mais leurs allergènes ne font pas partie de ceux suggérés comme étant à tester par le réseau d'excellence de l'Union Européenne GA²LEN (Global Allergy and Asthma European Network) (Bousquet et al., 2012) ni par la littérature (Høst et al., 2003) contrairement aux acariens de la poussière domestique. D'un point de vue clinique, les effets d'un des principaux acariens de stockage (*A. siro*) sont peu connus mais ont déjà été décrits (van Hage-Hamsten and Johansson, 1998) et associés à des troubles respiratoires allergiques principalement en milieu rural (Iraola et al., 2014).

Les acariens domestiques et leurs allergènes ne sont pas les seuls organismes ayant potentiellement des effets cliniques présents dans les logements et une approche multi organismes (acariens, bactéries, moisissures, animaux domestiques, blattes) que ce soit dans l'étude des maladies allergiques ou des pathologies inflammatoires semble aujourd'hui primordiale. Mais cette approche multifactorielle du risque sanitaire devra aller encore plus loin. En effet, le parallèle fait entre la cartographie de la France tenant compte de l'exposition aux acariens de la poussière domestique (S. Rocchi et al., 2015) et celles de la distribution des sifflements chez les enfants (Delmas et al., 2012) montre l'importance des facteurs géographiques. De plus, différents facteurs environnementaux, les infections virales, le tabagisme et la pollution environnementale de l'air favoriseraient la pénétration des allergènes dans les voies respiratoires (Ceylan et al., 2013). L'effet des endotoxines serait aussi modifié par une co-exposition à la nicotine et au dioxyde d'azote (Matsui et al., 2013).

Acariens et moisissures cohabitent dans les logements et il existe une vraie relation symbiotique entre ces organismes (Colloff, 2010). En consommant les spores, les acariens sont susceptibles de sélectionner et de disperser certaines espèces de moisissures (*A. alternata*, *C. sphaerospermum* ou encore *W. sebi*) plutôt que d'autres (*A. versicolor*, *P. chrysogenum*, *S. chartarum*) (article PREFERENCES ALIMENTAIRES DES ACARIENS). Le rôle de vecteur des acariens est plus connu au niveau des silos à grain pour les acariens de stockage (Hubert et al., 2003) mais il est également décrit au niveau de l'environnement intérieur pour les acariens domestiques (Van Asselt, 1999). La présence des moisissures dans les logements favorise le développement des acariens en apportant les vitamines nécessaires (B et D) (de Saint Georges-Grèdelet, 1987) et en participant à la dégradation des squames de peau humaine (libération des acides gras) (VanBronswijk and Sinha, 1973).

Le développement simultané des acariens et des moisissures est observé pour les acariens de stockage avec *A. glaucus*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *W. sebi* et pour les acariens de la poussière domestique avec *A. alternata*, *C. sphaerospermum* (INTERACTION ACARIEN/MOISSURES). Cette présence concomitante des acariens et des moisissures est dépendante des espèces d'acariens (Hubert et al., 2003), mais aussi de la composition des moisissures et des composés qu'elles émettent, et pourrait modifier notre exposition aux allergènes. En effet, il peut y avoir près de 2000 acariens par gramme de poussière de matelas et jusqu'à 2 millions d'individus par matelas (Korsgaard, 1998). Cela suggère une influence significative sur la composition fongique des logements. La lutte contre les acariens dans les logements des patients allergiques peut être physique (suppression des tapis, housse anti-acariens, aérations prolongées de la chambre) ou chimique (utilisation de sprays, de pièce de literie traitée). Celle-ci pourrait non seulement diminuer le nombre d'acariens domestiques mais aussi limiter le développement des moisissures en les privant d'un de leur vecteur.

Notre exposition aux allergènes est nettement favorisée par l'humidité. C'est pourquoi il est important de prévenir ces problèmes d'humidité qui sont une des causes les plus importantes favorisant le développement des acariens, des moisissures et des bactéries dans les environnements intérieurs. Que ce soit aux Etats-Unis, au Canada ou en Europe, 4 à 40 % des logements apparaissent affecter par des problèmes d'humidité (Dallongeville et al., 2015). En France, il y a eu ces dernières années une prise de conscience des pouvoirs publics qui placent désormais la qualité de l'air intérieur au cœur de leur politique. De plus en plus sensibilisés à la pollution de l'air intérieur, les Français ont pour principaux gestes préventif l'installation de VMC efficace : diminue significativement les concentrations en acariens de

stockage (article ACARI) et l'aération de l'habitat : 84 % des enquêtés déclarent aérer leur logement en ouvrant les fenêtres au moins une fois par jour en hiver (Ménard et al., 2008). Cependant des comportements à risque restent fréquents, comme par exemple le fait de boucher les orifices d'aération dans les pièces (ce qui est effectué par environ 5 % de la population). Les principales sources de vapeur d'eau à l'intérieur du logement sont les occupants, les activités domestiques mais aussi la détérioration des matériaux imperméabilisants qui peut être à l'origine d'infiltration d'eau dans les bâtiments. Des bâtiments bien conçus et bien construits sont ainsi essentiels pour prévenir et contrôler les excès d'humidité et la croissance des acariens et des micro-organismes, comme en témoignent les différentes recommandations de l'OMS (Figure 20).

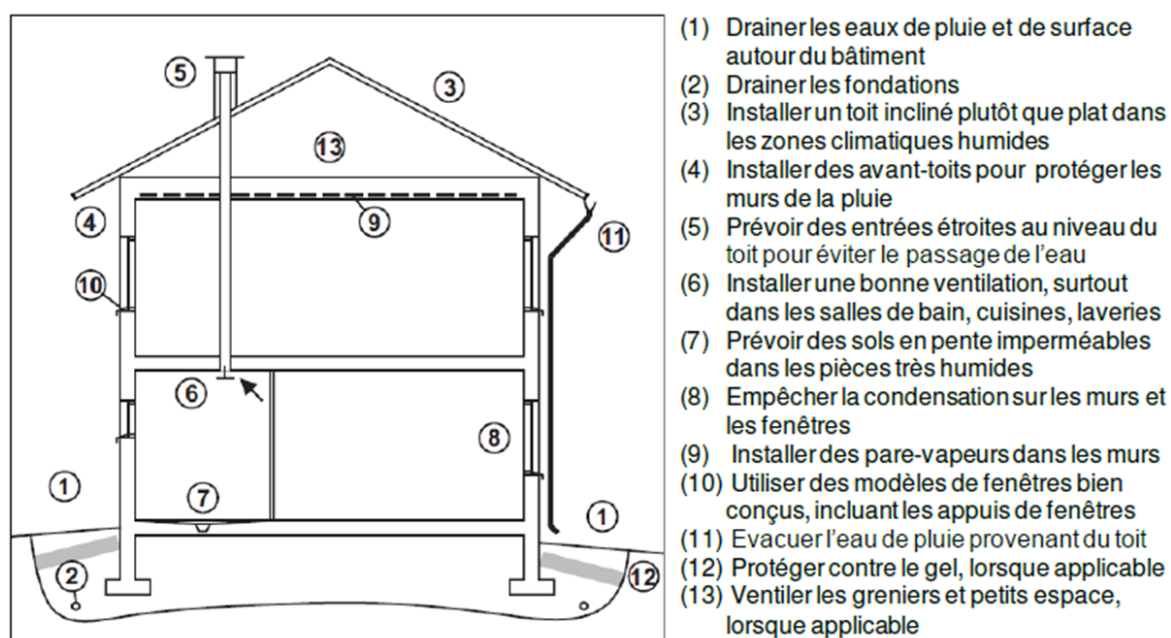


FIGURE 20 : PRINCIPALES RECOMMANDATIONS POUR LA CONCEPTION ET LA CONSTRUCTION DE BATIMENTS AFIN DE PREVENIR LES PROBLEMES D'HUMIDITE (D'APRES OMS, 2009).

Ces recommandations distribuées à la population permettent, lorsqu'elles sont appliquées, une meilleure utilisation de l'habitat et une diminution de notre exposition. En communiquant sur nos connaissances via des plaquettes de sensibilisation et des articles dans des journaux grands publics à destination des cabinets médicaux et des lecteurs pratiquant le compostage domestique (voir annexes), on peut participer à la prévention du risque et aider les personnes sensibles à limiter leur exposition par des gestes simples au quotidien. Dans ce domaine, le rôle des CEI consiste non seulement à mesurer l'exposition aux polluants de l'environnement intérieur mais aussi à fournir de précieux conseils aux malades et à leurs familles qui s'avèrent efficaces (de Blay et al., 2003). Un protocole sur l'évaluation clinique

et étude d'impact économique de l'intervention de CEI au domicile des patients asthmatiques (ECENVIR) est actuellement en cours en France. Il a pour objectif d'évaluer l'efficacité de l'intervention des CEI sur le contrôle de l'asthme à 12 mois en tenant compte de l'évolution de la consommation de soins, de l'évolution de la qualité de vie après l'intervention et de l'évolution de l'exposition à des polluants intérieurs..

III. Mode de vie et pollution de l'air intérieur

Les producteurs laitiers ont une prévalence de BPCO « agricole » plus élevée que la moyenne. Ils sont également plus exposés à certains micro-organismes (article mic-BALISTIC), et ce même au sein de leurs logements, dont le rôle dans le développement de la maladie du poumon de fermier a été confirmé (Bellanger et al., 2010; Pepys et al., 1990). Cette plus forte exposition à cette flore microbienne caractéristique de l'environnement de la ferme suggère un transport vers les logements en quantité non négligeable. Ce transport peut se faire soit par un flux aérien lorsque l'habitation se situe à proximité de l'exploitation agricole, soit plus probablement par les allées et venues des personnes entre les bâtiments agricoles et le domicile. Ce flux modifie de façon importante la composition de la flore microbienne et donc l'exposition des producteurs laitiers dans leurs logements. Les genres fongiques les plus présents dans l'habitat sont habituellement *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus* (Reboux et al., 2009) mais les logements des producteurs laitiers sont principalement contaminés par *A. glaucus*. En effet, cette espèce est caractéristique de l'environnement fermier et trouve son origine dans la distribution du fourrage au bétail (Roussel et al., 2005). Ces champignons, mais aussi certaines Mucorales (*L. corymbifera*) et certains actinomycètes (*S. rectivirgula*) sont très fréquents dans les fermes ce qui confirme la présence d'un transport des micro-organismes depuis l'exploitation agricole.

Même si les producteurs laitiers sont plus exposés à certains micro-organismes, il n'y a pas de différence d'exposition entre les sujets développant une BPCO et les sujets sains. Cela n'explique pas la relation exposition/maladie mais pourrait être la cause de facteurs individuels, du tabac ou de certaines substances toxiques liées aux micro-organismes tels que les mycotoxines et les endotoxines. Pourtant, chez les agriculteurs, la prévalence du tabagisme est faible (Blair and Freeman, 2009) et dans le cadre du projet BALISTIC, les sujets ont été appariés en prenant en compte ce paramètre. Parmi les moisissures émettrices de mycotoxines, on retrouve les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stachybotrys*, ... (Seltzer and

Fedoruk, 2007) mais leur relation avec la BPCO n'a, à ce jour, jamais été démontrée. Les mycotoxines sont retrouvées principalement dans les produits issus de l'agriculture (graines, céréales, viande, œufs, lait, ...) et les producteurs laitiers y sont potentiellement exposés. Les endotoxines sont une fraction lipopolysaccharidique (LPS) constituant de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Le LPS, fraction fortement antigénique, est libéré lors de la croissance et de la lyse des bactéries. Les endotoxines sont présentes dans les bioaérosols. L'inhalation de LPS induit une réponse inflammatoire pulmonaire mais peu d'études épidémiologiques ont cherché à relier des taux excessifs d'endotoxines à la BPCO. Des taux d'endotoxines élevés ont pourtant été mesurés dans les élevages de porc (Vogelzang et al., 1998) mais cette donnée n'a été évaluée dans le cas des productions laitières que rarement (Barnig et al., 2013).

Une plus forte exposition ne provoque pas systématiquement une plus forte sensibilisation et les sujets sans activité liée à l'agriculture sont également sensibilisés aux micro-organismes. En effet, la réponse immunologique des producteurs laitiers aux antigènes testés n'était pas significativement plus importante que celle des personnes sans activité liée à l'agriculture. Seul l'antigène de *W. sebi* présente une différence statistique entre la réponse immunologique des producteurs laitiers ayant développés une BPCO et les malades qu'ils soient producteurs laitiers ou non. Ce basidiomycète est détecté fréquemment en environnement intérieur et est caractéristique de la ferme où il est un témoin d'un séchage efficace du foin ou d'une installation agricole « moderne » bien ventilée ($a_w = 0.65$). L'évolution des techniques agricoles influence la flore microbiologique, donc l'exposition des agriculteurs (Reboux et al., 2006) et pourrait favoriser la présence de *W. sebi* au détriment d'autres micro-organismes et actinomycètes hydrophiles ($a_w > 0.80$) favorisés par une humidité plus importante du foin. Du point de vue santé, *W. sebi* produit de petites spores hautement allergisantes capables de pénétrer l'arbre bronchique et produit des mycotoxines récemment découvertes (wallemine, wallimidione, ...) (Desroches et al., 2014).

La surveillance de la qualité biologique de l'air des logements de personnes pratiquants ou non le compostage n'a pas montré d'influence négative du bio-seau. La biodiversité est équivalente à celle des logements sans bio-seau et celle des logements standards français (Dallongeville et al., 2015; Reboux et al., 2009). Les concentrations en micro-organismes détectées dans l'air ne sont pas significativement plus importantes à proximité et seules les concentrations en acariens de stockage augmentent à proximité du bio-seau. D'autres facteurs peuvent influencer la qualité de l'air au même titre que la présence du

bio-seau de compostage. C'est le cas du milieu dans lequel est situé le logement (urbain ou rural) (Lanier et al., 2010) ou de la présence de plantes et d'animaux domestiques (S. Rocchi et al., 2015). Pourtant l'analyse des réponses au questionnaire n'a pas permis de mettre en évidence des facteurs clairement liés à une augmentation de la contamination autour du bio-seau.

Au niveau des surfaces proches du bio-seau, les concentrations en acariens de stockage et en certaines moisissures relevées dans les poussières sédimentées suggèrent que le bio-seau est bien la source de cette contamination. Les ouvertures successives du couvercle et les déplacements des acariens pourraient expliquer leur présence dans les poussières. Ces espèces peuvent présenter un risque pour les utilisateurs sensibles et ce risque peut être allergique, infectieux ou toxique (Reboux et al., 2009; Russell, 2006). Cependant, un simple nettoyage des surfaces proches et du bio-seau devrait suffire à limiter tout risque quant à la pratique du compostage d'intérieur.

IV. Conclusion et Perspectives

Dans cette thèse, les qPCR développées ont permis de détecter et de quantifier de manière sensible et spécifique les acariens domestiques, les animaux domestiques et les blattes. On a pu alors mettre en avant la présence des acariens de la poussière domestique et des acariens de stockage dans l'ensemble du logement de la chambre à la cuisine. Or, le plus souvent, seule la chambre du patient reçoit un traitement particulier visant à limiter la présence des acariens domestiques. Il est donc important de traiter l'ensemble de l'habitat. On a également vu que la présence des acariens de stockage était sous-estimée dans les logements. Pourtant ces acariens sont aussi responsables d'effets cliniques et leurs allergènes devraient être testés par les allergologues. Les concentrations en acariens domestiques sont corrélées avec les concentrations en certaines moisissures mais la recherche simultanée de ces deux organismes reste peu développée. Pourtant il existe une relation symbiotique vraie entre les acariens et les moisissures.

Certains modes de vie peuvent favoriser notre exposition aux acariens et aux micro-organismes. Les milieux professionnels comme la production laitière connaissent une prévalence élevée de BPCO non tabagiques. En plus d'une exposition professionnelle importante, certains micro-organismes caractéristiques de la ferme sont retrouvés en de fortes concentrations dans les logements traduisant un transport de la ferme vers le logement et ces

professionnels semblent également plus sensibilisés à une espèce fongique déjà décrite comme pouvant jouer un rôle dans les PHS agricoles. Malgré les craintes des pratiquants du compostage domestique et les interrogations des services publics. L'utilisation du bio-seau dans les cuisines ne semble pas avoir un impact important sur la qualité biologique de l'air intérieur où seules les surfaces proches sont impactées.

Nos modes de vie et nos logements évoluent et de nouveaux moyens techniques sont aujourd'hui à notre disposition pour l'évaluation de notre exposition aux polluants biologiques de l'air intérieur. Depuis les mesures basées sur le ressenti et les constatations visuelles telles que le comptage microscopique, les odeurs ou les surfaces moisies, nous avons progressé et sommes aujourd'hui capables de mesurer de manière standardisée et objective les quantités en acariens et en microorganismes de notre environnement. Même si, jusqu'à présent, le choix des espèces recherchées ne permet pas de relier les différents risques pour la santé et les contaminations observées, l'utilisation de la métagénomique devrait nous fournir une image globale des organismes présents dans notre environnement. Elle nous permettrait d'affiner nos choix de cibles de qPCR pour l'étude des logements et de mieux cibler les pathologies qui pourraient y être associées. Les techniques de séquençage de nouvelle génération permettent d'ailleurs d'avoir une idée de la composition microbiologique (fongique et bactérienne) de l'environnement intérieur (Dannemiller et al., 2014)..

Nous sommes tous exposés quotidiennement aux acariens et aux micro-organismes de l'environnement intérieur. Un moyen préventif pour éviter les effets sur la santé est visiblement de réduire l'exposition des patients/personnes à certains acariens ou micro-organismes. Nous supposons que l'approche consistant à prendre en compte plusieurs micro-organismes et donc leurs interactions potentielles sera plus adaptée pour appréhender un risque sanitaire allergique ou inflammatoire que l'étude de différentes espèces prises séparément. La mise en place de nouveaux indicateurs prenant en compte les acariens de la poussière domestique, les acariens de stockage, les moisissures, les actinomycètes, les mycobactéries, les entérobactéries, les animaux domestiques et les blattes permettrait de progresser dans la détermination de la relation dose/effet en prenant compte de possibles effets synergiques.

ANNEXES

Allergies et habitat. Chiesi N°2 Avril 2013, p 10.

Moisissures et acariens

Alexandre Naegele et Gabriel Reboux



Photo : A. Naegele

Un *Dermatophagoides farinae* observé à la loupe binoculaire (grossis 120 fois)

Les acariens (250 microns) et les moisissures (5 microns) cohabitent dans les logements au niveau de la literie (*Dermatophagoides* spp.) ou des denrées alimentaires (*Acarus siro*). Les acariens se nourrissent de moisissures et les transportent sur leur corps. De cette façon, ils contribuent à leur propagation ou partiellement à leur élimination. Nos 160 observations à la loupe [9] démontrent que les acariens, par leurs choix alimentaires, sélectionnent préférentiellement certains genres de moisissures (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Wallemia*) alors que d'autres ont un effet répulsif (*Penicillium*, *Stachybotrys*, *Aspergillus*). Certains

individus préfèrent jeûner que de se nourrir de moisissures «répulsives». Cela pourrait expliquer en partie les différences de concentrations en moisissures entre les logements contaminés par les acariens et les autres. Lorsque les moisissures conviennent aux acariens, dans leur frénésie alimentaire ils se frayent un chemin dans une véritable forêt microscopique et se chargent de plusieurs dizaines de spores qu'ils vont déposer plus loin à une vitesse de 7mm à la minute. La prise en compte du nombre de spores transportées et du volume consommé par les acariens permettrait de modéliser la progression de la contamination en micro-organismes à l'échelle d'un logement.

Risques sanitaires liés à la pollution des milieux aériens et hydriques, Les cahiers de la Recherche Avril 2013, pp14-15.



L'impact des composteurs domestiques sur l'environnement intérieur

Impact des composteurs domestiques sur l'environnement intérieur

Sandrine ROUSSEL

Mots-clés : composteur, air intérieur, recyclage, déchets organiques, vers, terreau, compostage, compost, lombricomposteur

Chacun de nous produit 390 kg de déchets par an qui se retrouvent dans nos poubelles et conteneurs de tri qu'il s'agisse de déchets de cuisine, de déchets ménagers, etc. C'est deux fois plus qu'il y a 40 ans. Depuis le rapport Brundtland²⁰ qui a défini en 1987 le développement durable « comme un développement qui répond aux besoins présents sans compromettre la capacité des générations futures de répondre aux leurs », chacun se sent concerné notamment par le pilier environnemental du développement durable. Comment préserver, améliorer et valoriser les ressources naturelles sur le long terme ?

Faire son compost est une des solutions, qui consiste à réduire localement ses déchets tout en nourrissant le sol. Ainsi, de plus en plus de personnes pratiquent le recyclage de leurs déchets organiques ménagers. Cette pratique permet une réduction allant jusqu'à 50 % de leur volume et la production de terreau.

Les déchets organiques

Tous les déchets organiques sont compostables à différents degrés :

- Les déchets de cuisine (épluchures, marc de café, os, noyaux, filtres en papier, pain, laitages, croûtes de fromage, fanes de légumes, fruits et légumes abîmés²¹...) ;
- Les déchets de jardin (tontes de gazon, feuilles, fleurs fanées, mauvaises herbes...) ;
- Les déchets de maison (mouchoirs en papier et essuie-tout usagés, cendres de bois, sciures et copeaux, plantes d'intérieur, cartons salis mais non souillés par des produits polluants...).

Pour réaliser un bon compostage, il faut mélanger des catégories opposées : les déchets riches en carbone avec ceux riches en azote, les humides avec les secs et les grossiers avec les fins. À l'abri des aléas climatiques, le compostage domestique peut être rapide : quatre à cinq mois.

Les composteurs domestiques

Les composteurs domestiques peuvent se présenter sous la forme d'une structure en bois ou en plastique. Si vous n'avez pas de jardin, le lombricomposteur est préconisé pour les balcons ou en intérieur (garage, véranda...), car les déchets sont moins importants. Dans ce dispositif, le compostage est effectué au contact de vers rouges (*Eisenia Foetida*, *Eisenia Andrei*) ainsi que divers micro-organismes qui se nourrissent naturellement de matière organique et produisent deux sortes de compost : liquide et solide.



Le compostage à domicile
(Source : Adema/Atelier des gibouilles)

Les conditions de dégradation des déchets, en espace clos mais aéré, fournissent à la fois des températures²² et une hygrométrie²³ idéales pour la microfaune ainsi que des poussières organiques contenant un grand nombre d'agents biologiquement actifs.

UMR CNRS chrono-environnement - Besançon

²⁰ C'est une publication intitulée « Notre avenir à tous » issue de l'Organisation des Nations unies. Elle porte le nom de la norvégienne Gro Harlem Brundtland qui a présidé ce travail.

²¹ Attention, les graines de tomates, potirons et de quelques mauvaises herbes peuvent regermer lors du compostage.

²² Supérieures à 20°C.

²³ Supérieure à 60%.

Potentiel de l'ADEME N°100 Décembre-Janvier-Février 2014, p 3.

IMPACT DES COMPOSTEURS DOMESTIQUES SUR L'ENVIRONNEMENT INTÉRIEUR

■ Le recyclage des déchets organiques par compostage séduit de plus en plus la population, y compris dans l'habitat collectif. Ce recyclage implique la présence, le plus souvent dans la cuisine, d'un bio-seau servant au stockage intermédiaire des déchets organiques. Ce stockage est-il une source de contamination en bactéries, moisissures et acariens pour le logement ? Pour le savoir, une étude a été confiée au laboratoire Chrono-Environnement de Besançon afin d'analyser la qualité biologique de l'air à proximité et à distance du bio-seau. Quarante-huit familles pratiquant le compostage ont été sélectionnées par le Syndicat mixte de Besançon et de sa région pour le traitement des déchets (SYBERT). Elles ont accueilli pendant 12 mois des capteurs de poussières dans leur cuisine. L'air et la poussière ont été analysés pour identifier et comptabiliser les bactéries, moisissures et acariens présents dans les logements. Une quarantaine d'espèces de moisissures et de bactéries ont ainsi été recensées, mais qu'on se rassure, cette microflore est habituelle dans une cuisine. L'analyse des résultats montre que la présence du bio-seau est bien associée à une augmentation en moisissures et en acariens, mais dans un espace limité à moins d'un mètre du bio-seau, l'ensemble de la cuisine n'étant pas contaminé par sa présence. Ainsi, pour limiter la pollution de l'air intérieur et poursuivre cette collecte en toute sérénité, il suffit de nettoyer régulièrement le bio-seau et les surfaces alentour avec un désinfectant ordinaire, de transférer régulièrement les déchets organiques dans le composteur et d'aérer.



CONTACTER

sandrine.roussel@univ-fcomte.fr / Tél. 03 81 66 90 29

alexandre.naegele@univ-fcomte.fr / Tél. 03 63 08 22 36

En direct N°251 Janvier-Février 2014, pp 4-5.

Méli-mélo d'épluchures inoffensif

La présence d'un « bio-seau » dans une cuisine, assurant le stockage temporaire des déchets avant leur compostage, est-elle responsable du développement de bactéries, de moisissures et d'acariens ? Une question qui se pose de façon cruciale dans le cadre d'une étude plus vaste menée au laboratoire Chrono-environnement : celle-ci concerne les facteurs de risque qui, dans l'environnement, pourraient exposer à une infection les personnes immunodéprimées au retour à leur domicile après une hospitalisation.

Des lingettes électrostatiques captant la poussière ont été placées dans trente-cinq logements, et analysées à cinq reprises sur une année complète par techniques de biologie moléculaire et de culture.

Une quarantaine d'espèces de moisissures et de bactéries ont ainsi été recensées, mais qu'on se rassure : cette moyenne est tout à fait habituelle dans une cuisine entretenue de façon régulière. Cependant, les mesures à proximité du seau, c'est-à-dire à moins d'un mètre, révèlent une présence significativement plus importante de trois moisissures et d'un acarien que les autres prises de mesures, effectuées à plus de trois mètres.

« *Acarus siro* est un acarien de stockage que l'on trouve couramment dans le milieu agricole, mais aussi dans les produits qui en sont issus comme la farine, les céréales ou les fromages. Sa présence et celle des moisissures,

GreenNews Techno N°121 Janvier 2014, p 6.


Étude

• Bio-déchets et air intérieur ?

Dans le cadre d'une étude portant sur les risques d'infection des personnes immuno-déprimées au retour à leur domicile après hospitalisation, le laboratoire Chrono-Environnement de l'université de Franche-Comté s'est intéressé à nos poubelles sélectives de bio-déchets. Une campagne de prélèvement et de mesures a eu lieu dans 35 logements avec des lingettes électrostatiques captant la poussière pour déterminer si des concentrations anormales de

certaines moisissures ou bactéries étaient constatées. Ainsi dans une cuisine normalement entretenue, les espèces recensées se sont avérées classiques à la nuance près qu'à proximité des seaux de biodéchets, trois moisissures et un acarien ont marqué une présence significativement plus importante. L'acarien, *Acarus siro*, est une espèce courante du milieu agricole et des produits dérivés, peu compliquée à éliminer par un entretien classique. Cela dit, les chercheurs s'interrogent sur la présence concomitante

des acariens et des moisissures, et sur le rôle éventuellement joué par l'acarien dans la dissémination des spores de moisissures et éventuellement sur la croissance des espèces pathogènes pour l'homme. Des réflexions importantes à approfondir compte tenu du rôle potentiel des moisissures dans le développement de l'asthme et des rhinites allergiques.

 **Laboratoire Chrono-Environnement**
> 03 81 66 90 29

Plaquette de prévention distribuée par l'ADEME, 2014.

FINANCEURS

Cette étude a été financée par l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)

dans le cadre du programme national de la recherche, de la santé et du travail de l'ANSES (Agence nationale de la sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail)

(APR, 2011, contrat N°1106C0025)




QUELQUES CHIFFRES

- ✓ 52 % des déchets ménagés sont recyclables
- ✓ 12 % des foyers pratiquent le compostage
- ✓ 150 kg / an de déchets en moins, soit une diminution de 40 % du poids

CONTACTS

Service de Parasitologie-Mycologie
CHRU de Besançon

Dr Sandrine Roussel
s1roussel@chu-besancon.fr
Alexandre Naegele
alexandre.naegele@univ-fcomte.fr
03 81 66 90 29

Syndicat mixte de Besançon et de sa Région pour le traitement des déchets (SYBERT)

Louise Rouget
louise.rouget@sybert.fr
Gwenaél MARTIN
gwenael.martin@sybert.fr

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)

Isabelle Desporte
isabelle.desporte@ademe.fr

Réalisation plaquette A Naegele & S Rocchi



IMPACT DU COMPOSTAGE DOMESTIQUE SUR L'ENVIRONNEMENT INTERIEUR



PARTENAIRES




Merci aux 48 foyers volontaires pour leur participation à cette étude

GENERALITES

LE COMPOSTAGE

De plus en plus d'habitants adhèrent au recyclage des déchets organiques.

Ce tri implique la présence d'un bio-seau servant au stockage intermédiaire des déchets organiques.

Ce stockage est-il une source de contamination en micro-organismes pour nos logements ?

LES MICRO-ORGANISMES ASSOCIES AU BIO-SEAU

Les acariens se nourrissent de nos squames mais aussi de nos restes alimentaires.

Les moisissures, présentes dans notre habitat, sont capables de se développer sur nos fruits.

Les bactéries, toujours proche de nous, retrouvent les conditions idéales au sein du bio seau.

CE QU'IL SE PASSE DANS NOS LOGEMENTS

Une quarantaine d'espèces d'acariens, de moisissures et de bactéries ont été recensées dans l'air et les poussières :


Acarus siro, Dermatophagoides, ...
Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, ...
Streptomyces, Thermoactinomyces, ...

Mais qu'on se rassure, cette microflore est habituelle dans nos logements.

L'utilisation du bio-seau est associée à une augmentation en moisissures et en acariens de stockage.

Cette augmentation est limitée dans l'espace à 50 cm autour de du bio-seau

Le compostage domestique n'a pas d'impact à long terme sur la qualité de l'air intérieur.
(un an au-delà de 50 cm du bio-seau)




RECOMMANDATIONS


ADAPTER NOTRE COMPORTEMENT

- ☐ Transférer régulièrement les déchets organiques dans le composteur
- ☐ Nettoyer et désinfecter régulièrement le bio-seau et les surfaces proches (désinfectant ordinaire)

GARDER NOS BONNES HABITUDES



Aérer
la cuisine
10 min/jour
minimum



Ventiler
la cuisine
avec une VMC
performante

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, 29 Novembre 2013, Paris.

MODE DE VIE ET FLORE FONGIQUE : ETUDE DU COMPOSTAGE DOMESTIQUE

NAEGLÉ Alexandre ¹, REBOUX Gabriel ^{1,2}, VACHEYROU Mallory ¹, VALOT Benoit ¹, MILLON Laurence ^{1,2}, ROUSSEL Sandrine ^{1,2}



¹ UMR/CNRS 6249, Chrono-Environnement, Besançon, France.

² Service de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Besançon, France.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale – 29 Novembre 2013 – Paris – France



Introduction

Depuis quelques années et l'avènement du **développement durable**, les citoyens peuvent contribuer à leur façon au respect de l'**environnement**. Le **recyclage des déchets organiques ménagés** séduit de plus en plus la population, y compris dans les appartements de ville où divers **plans d'action** ont vu le jour.

L'augmentation du nombre d'utilisateurs a également multiplié les **inquiétudes** autour de cette pratique: **Le bio seau a-t-il un impact sur la qualité de l'air intérieur et présente-t-il un risque pour la santé des personnes sensibles?** L'objectif de l'étude a été de **caractériser la qualité biologique de l'air sur 12 mois à proximité et à distance du bio seau**.

Matériel et Méthodes

Recrutement : 35 logements de janvier à mai 2012

Echantillonnage:

✓ **Air**: impaction ○ 250 L (3distances), collecte de particules ○ (1 distance, 24h)

✓ **Poussières**: capteurs électrostatiques de poussières (CEP) (2 distances) ○

Analyse:

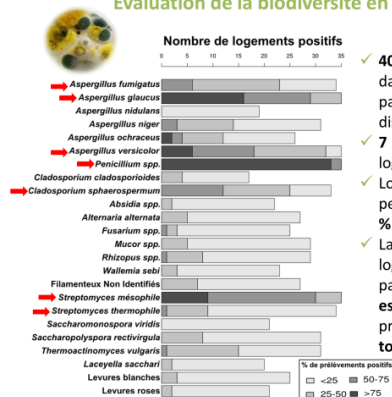
✓ **Culture**: moisissures (DG18), bactéries (MH) et actinomycètes (Difco, R8)

✓ **PCR en temps réel (qPCR)**: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Wallemia sebi*, Enterobactéries, *Acarus siro* et *Dermatophagoides* spp.



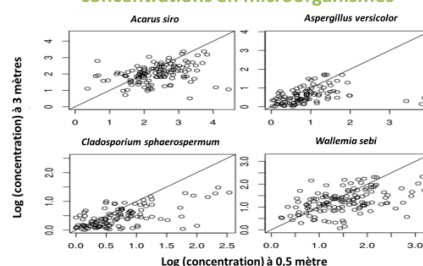
Résultats et Discussion

Evaluation de la biodiversité en microorganisme à 12 mois



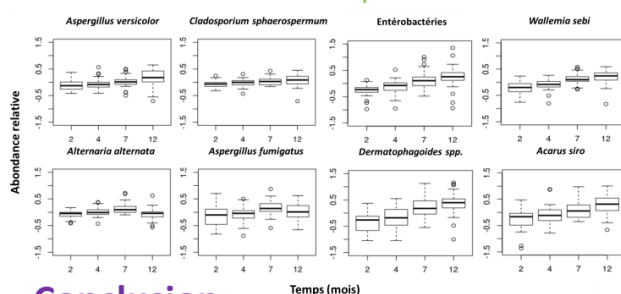
- ✓ **40 espèces** sont détectées par culture dans l'ensemble des 16 prélèvements par logement (air et poussières aux 3 distances et aux 5 temps).
- ✓ **7** sont retrouvées dans **90 %** des logements.
- ✓ Lorsqu'elles sont présentes, ces espèces peuvent être détectées dans plus de **75 % des prélèvements**.
- ✓ La **biodiversité** est équivalente aux logements franc-comtois ne pratiquant pas le compostage mais certaines espèces retrouvées fréquemment présentent un **risque allergique, toxique ou infectieux** (1).

Evaluation de l'impact du bio seau sur les concentrations en microorganismes



- ✓ Parmi les espèces **fongiques** et **acarologiques** présentes, certaines ont des **concentrations** par **qPCR** **significativement plus importante à proximité** du bio seau soulignant un impact limité dans l'espace (*A. siro*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum* et *W. sebi*).
- ✓ La présence d'**acariens** de **stockage** en forte quantité suggère une **colonisation des CEP**.

Cinétique des concentrations en microorganismes sur 12 mois



- ✓ L'**évolution des concentrations** en micro-organismes analysées par **qPCR** ne montre pas d'accumulation systématique à **proximité du bio seau sur 12 mois**. Les **concentrations** de certaines espèces restent **stables** ou sont influencées par les **saisons chaudes** et d'autres augmentent **jusqu'à 10 fois**.
- ✓ **Divers facteurs** influence cette **cinétique** dont les **acariens** qui peuvent dégrader et transporter les spores de moisissures (2) (3).
- ✓ La relation ***Acarus siro*/moisissures** montre une **corrélation significative** entre les concentrations en acariens de stockage et 2 moisissures qu'ils consomment et disséminent (4) (5):
 - *C. sphaerospermum*
 - *W. sebi*

Conclusion

Le bio seau a un **impact limité** sur la **qualité biologique de l'air** avec une biodiversité proche de celle retrouvée habituellement au sein des logements. Cependant, la présence fréquente d'**espèces à risques** nécessite certaines précautions pour les personnes sensibles. Parmi les espèces retrouvées principalement à proximité du bio seau, les **acariens** de

stockage en représente une part importante. Leurs relations avec certaines moisissures suggèrent une **consommation des spores** entraînant une dégradation et une dissémination de celles-ci. Les **acariens** ont une **influence** sur les **concentrations** en moisissures de l'environnement domestique.

(1) Reboux et al. Indoor Air. 2009

(2) Nesvorna et al. J Stored Prod Res. 2012

(3) Van Asselt. Indoor Built Environ. 1999

(4) Hubert et al. Pedobiologia. 2004

(5) Naegele et al. Int J Environ Health Res. 2012

Contact: alexandre.naegele@univ-fcomte.fr

Sondes et amorces utilisées pour chaque cible qPCR

Acariens (Roussel et al., 2013)

Amorce sens MisppF1 : 5'-GAGGTTCGAAGGCGATCAGA-3'

Amorce antisens MisppR1 : 5'-TTGCTGGTTGGCATCGTTTA-3'

Sonde MisppP1 : 5'-ACCGCCCTAGTTCTA-3'

Acariens de stockage (*Acarus siro*, *Glycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*)
(Article ACARI)

Amorce sens SMF1 : 5'-CGCAAACCTGTGGTGCAGTA-3'

Amorce antisens SMR1 : 5'-GCTCCTTGGTCCGTGTTTCA-3'

Sonde SMP1 : 5'-TCGGTCTCCACCCGACCCGTC-3'

Alternaria alternata (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AaltrF1 : 5'-GGCGGGCTGGAACCTC-3'

Amorce antisens AaltrR1-1 : 5'-GCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCGTA-3'

Sonde AaltrP1 : 5'-TTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTT- 3'

Aspergillus fumigatus (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AfumiF1 : 5'-GCCCCGCCGTTTCGAC-3'

Amorce antisens AfumiR1 : 5'-CCGTTGTTGAAAGTTTAACTGATTAC-3'

Sonde AfumiP1 : 5'- CCCGCCGAAGACCCCAACATG-3'

Aspergillus glaucus (*Eurotium amstelodami*) (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens EamstF1 : 5'-GTGGCGGCACCATGTCT-3'

Amorce antisens EamstR1 : 5'-CTGGTTAAAAAGATTGGTTGCGA-3'

Sonde EamstP1 : 5'-CAGCTGGACCTACGGGAGCGGG-3'

Aspergillus versicolor (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens AversF2 : 5'-CGGCGGGGAGCCCT-3'

Amorce antisens AversR1-1 : 5'-CCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATCTTA-3'

Sonde versP1 : 5'-AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAG-3'

Cladosporium sphaerospermum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens CsphaF1 : 5'-ACCGGCTGGGTCTTTTCG-3'

Amorce antisens CsphaR1 : 5'-GGGGTTGTTTTACGGCGTG-3'

Sonde CsphaP1 : 5'- CCCGCGGCACCCTTTAGCGA-3'

Dermatophagoides spp. (Roussel et al., 2013)

Amorce sens DermaF1 : 5'-CCTCGTGGTGGAGTGCATT-3'

Amorce antisens DermaR1 : 5'- TCAGCTGCAGTTATCCAGAGTCA-3'

Sonde DermaP1 : 5'-ATTAGACCAAGACCAAAGGTGGCAACACC-3'

Dermatophagoides farinae (Roussel et al., 2013)

Amorce sens DfariF1 : 5'- TGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTG-3'

Amorce antisens DfariR1 : 5'- ATGCGATATTCTGCTCAGCATGACA-3'

Sonde DfariP1 : 5'- CAGCTCATGCATGGTGGTCCACTTG-3'

Dermatophagoides farinae (cytochrome B) (Article ACARI)

Amorce sens DfariCBF1 : 5'-CACACATTCAACCAGAGTGGTACTT-3'

Amorce antisens DfariCBR1 : 5'-GGCTAACACTCCCCCTAGTTTAGA-3'

Sonde DfariCBP1 : 5'-CGCTTACGCGATCCTACGAGCCATT-3'

Dermatophagoides pteronissynus (Roussel et al., 2013)

Amorce sens Dpter F1: 5'-TGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTG-3'

Amorce antisens DpterR1: 5'-ATGCGATAATCTGCTCAGTATGACA-3'

Sonde DpterP1: 5'-CAGCTCATGTATGGCGGTCCACCTG-3'

Dermatophagoides pteronyssinus (cytochrome B) (article ACARI)

Amorce sens DpterCBF1 : 5'-CATCCAACCAGAGTGGTATTTCC-3'

Amorce antisens DpterCBR1 : 5'GCTATTGCGCATACTCCACCTA-3'

Sonde DpterCBP1 : 5'-TATGCAATCCTTCGGGCTATCCCATCA-3'

Enterobacteriaceae (*Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp.) (Sen and Asher, 2001)

Amorce sens UF2 : 5'-GGCGGCAGGCCTAAC-3'

Amorce antisens UR2 : 5'-CAGGCAGTTTCCCAGACATTACT-3'

Sonde : 5'-AGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGA-3'

Lichtheimia corymbifera (*Absidia corymbifera*)
(<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens NS92F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'

Amorce antisens AcoryR1: 5'-GCAAAGCGTTCCGAAGGACA-3'

Sonde AcoryP1: 5'-ATGGCACGAGCAAGCATTAGGGACG-3'

Penicillium chrysogenum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens PchryF4-1 : 5'-GCCTGTCCGAGCGTCACTT-3'

Amorce antisens PchryR8 : 5'-CCCCCGGGATCGGAG-3'

Sonde PenP6 : 5'-CCAACACACAAGCCGTGCTTGAGG-3'

Saccharopolyspora rectivirgula (Schäfer et al., 2011)

Amorce sens SrF1 : 5'-GATCTACCGGGACGGCTAC-3'

Amorce antisens SrR1 : 5'-AACTCGGTCACCTCGAACA-3'

Sonde SrP1 : 5'-AATCCTCGTAGCGCTGGCGC-3'

Stachybotrys chartarum (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens StacF4 : 5'-TCCCAAACCCTTATGTGAACC-3'

Amorce antisens StacR5 : 5'-GTTTGCCACTCAGAGAATACTGAAA-3'

Sonde StacP2 : 5'-FAM-CTGCGCCCGGATCCAGGC-TAMRA-3'

Streptomyces mésophiles (Rintala and Nevalainen, 2006)

Amorce sens SMfw8: 5'-GCCGATTGTGGTGAAGTGGA-3'

Amorce antisens Mrev9: 5'-GTACGGGCCCGCCATGAAA-3'

Sonde: SMP6 5'-ATCCTATGCTGTCGAGAAAAGCCTCTAGCG-3'

Thermoactinomyces vulgaris (Betelli et al., 2013)

Amorce sens Tvu-F751 : 5'-GCCGATCATTTCCAAACCTATTT-3'

Amorce antisens Tvu-R824 : 5'-GCCATCACGGCTTTGTTAATAATC-3'

Sonde Tvu-S776 : 5'-ACGAGCATCCCGCGGAAGCG-3'

Trichoderma viride (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens TviriF1 : 5'-CCCAAACCCAATGTGAACCA

Amorce antisens TviriR1 : 5'-TCCGCGAGGGGACTACAG

Sonde TridP1 : 5'-CCAAACTGTTGCCTCGGCGGG

Wallemia sebi (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>)

Amorce sens WsebiF1 : 5'-GGCTTAGTGAATCCTTCGGAG

Amorce antisens WsebiR1 : 5'-GTTTACCCAACCTTGCAGTCCA

Sonde WsebiP1 : 5'-TGTGCCGTTGCCGGCTCAAATAG

REFERENCES

- Adhikari, A., Kettleson, E.M., Vesper, S., Kumar, S., Popham, D.L., Schaffer, C., Indugula, R., Chatterjee, K., Allam, K.K., Grinshpun, S.A., Reponen, T., 2014. Dustborne and airborne Gram-positive and Gram-negative bacteria in high versus low ERMI homes. *Sci. Total Environ.* 482-483, 92–99.
- Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K.W., Strachan, D.P., Weiland, S.K., Williams, H., ISAAC Phase Three Study Group, 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368, 733–743.
- Barnig, C., Reboux, G., Roussel, S., Casset, A., Sohy, C., Dalphin, J.-C., de Blay, F., 2013. Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 161–167.
- Belanger, K., Triche, E.W., 2008. Indoor combustion and asthma. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 28, 507–519.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Botterel, F., Candido, C., Roussel, S., Rognon, B., Dalphin, J.-C., Bretagne, S., Millon, L., 2010. New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. *Med. Mycol.* 48, 981–987.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Immunology Provides Important Techniques with Which to Investigate Proteins, in: *Biochemistry*. New York, USA.
- Beroiz, B., Couso-Ferrer, F., Ortego, F., Chamorro, M.J., Arteaga, C., Lombardero, M., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., 2014. Mite species identification in the production of allergenic extracts for clinical use and in environmental samples by ribosomal DNA amplification. *Med. Vet. Entomol.* 28, 287–296.
- Bessot, J.-C., Metz-Favre, C., de Blay, F., Pauli, G., 2011. Acariens de stockage et acariens pyroglyphides : ressemblances, différences et conséquences pratiques. *Rev. Fr. Allergol.* 51, 607–621.
- Betelli, L., Duquenne, P., Grenouillet, F., Simon, X., Scherer, E., Géhin, E., Hartmann, A., 2013. Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 92, 25–32.
- Blair, A., Freeman, L.B., 2009. Epidemiologic Studies of Cancer in Agricultural Populations: Observations and Future Directions. *J. Agromedicine* 14, 125–131.
- Blanc, P.D., Eisner, M.D., Katz, P.P., Yen, I.H., Archea, C., Earnest, G., Janson, S., Masharani, U.B., Quinlan, P.J., Hammond, S.K., Thorne, P.S., Balmes, J.R., Trupin, L., Yelin, E.H., 2005. Impact of the Home Indoor Environment on Adult Asthma and Rhinitis. *J. Occup. Environ. Med.* 47, 362–372.
- Boor, B.E., Spilak, M.P., Corsi, R.L., Novoselac, A., 2015. Characterizing particle resuspension from mattresses: chamber study. *Indoor Air* 25, 441–456.
- Boquete, M., Iraola, V., Fernández-Caldas, E., Arenas Villaroel, L., Carballada, F.J., González de la Cuesta, C., López-Rico, M.R., Núñez Orjales, R., Parra, G.A., Soto-Mera, M.T., Varela, S., Vidal, C., 2006. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. Off. Organ Int. Assoc. Asthmology INTERASMA Soc. Latinoam. Alerg. E Inmunol.* 16, 169–176.
- Bouillard, L., O, M., M, D., M, D., 2005. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12, 187–192.
- Bourrin, J.-L., 2009. Méthodologie des tests à lecture immédiate 136, 661–667.
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N.G., Bousquet, P.J., Burney, P.G., Canonica, G.W., Carlsen, K.H., Cox, L., Haahtela, T., Lodrup Carlsen, K.C., Price, D., Samolinski, B., Simons, F.E.R., Wickman, M., Annesi-Maesano, I., Baena-Cagnani,

- C.E., Bergmann, K.C., Bindselev-Jensen, C., Casale, T.B., Chiriac, A., Cruz, A.A., Dubakienė, R., Durham, S.R., Fokkens, W.J., Gerth-van-Wijk, R., Kalayci, O., Kowalski, M.L., Mari, A., Mullol, J., Nazamova-Baranova, L., O’Hehir, R.E., Ohta, K., Panzner, P., Passalacqua, G., Ring, J., Rogala, B., Romano, A., Ryan, D., Schmid-Grendelmeier, P., Todo-Bom, A., Valenta, R., Woehrl, S., Yusuf, O.M., Zuberbier, T., Demoly, P., 2012. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 67, 18–24.
- Bush, R.K., Portnoy, J.M., Saxon, A., Terr, A.I., Wood, R.A., 2006. The medical effects of mold exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 326–333.
- Calderón, M.A., Linneberg, A., Kleine-Tebbe, J., De Blay, F., Hernandez Fernandez de Rojas, D., Virchow, J.C., Demoly, P., 2014. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 38–48.
- Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.-C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2011. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 6, e28425.
- Celli, B.R., Cote, C.G., Marin, J.M., Casanova, C., Montes de Oca, M., Mendez, R.A., Pinto Plata, V., Cabral, H.J., 2004. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 1005–1012.
- Ceylan, E., Doruk, S., Genc, S., Ozkutuk, A.A., Karadag, F., Ergor, G., Itil, B.O., Cımrın, A.H., 2013. The role of molds in the relation between indoor environment and atopy in asthma patients. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 18, 1067.
- Cheraghi, M., Salvi, S., 2009. Environmental tobacco smoke (ETS) and respiratory health in children. *Eur. J. Pediatr.* 168, 897–905.
- Codina, R., Fox, R.W., Lockey, R.F., DeMarco, P., Bagg, A., 2008. Typical levels of airborne fungal spores in houses without obvious moisture problems during a rainy season in Florida, USA. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 18, 156–162.
- Colloff, M.J., 2010. *Dust Mites*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, Netherlands.
- Colloff, M.J., 1998. Taxonomy and identification of dust mites. *Allergy* 53, 7–12.
- Crawford, J.A., Rosenbaum, P.F., Anagnost, S.E., Hunt, A., Abraham, J.L., 2015. Indicators of airborne fungal concentrations in urban homes: understanding the conditions that affect indoor fungal exposures. *Sci. Total Environ.* 517, 113–124.
- Curtis, J.L., Freeman, C.M., Hogg, J.C., 2007. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 512–521.
- Dallongeville, A., Le Cann, P., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I., Blanchard, O., 2015. Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air and house dust of French dwellings. *Sci. Total Environ.* 536, 964–972.
- Dannemiller, K.C., Mendell, M.J., Macher, J.M., Kumagai, K., Bradman, A., Holland, N., Harley, K., Eskenazi, B., Peccia, J., 2014. Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 24, 236–247.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 187–196.
- de Blay, F., Fourgaut, G., Hedelin, G., Vervloet, D., Michel, F.-B., Godard, P., Charpin, D., Pauli, G., Scientific Committee of the MIEC study, 2003. Medical Indoor Environment Counselor (MIEC): role in compliance with advice on mite allergen avoidance and on mite allergen exposure. *Allergy* 58, 27–33.

- Degano, B., Bouhaddi, M., Laplante, J.-J., Botebol, M., Annesi-Maesano, I., Marescaux, A., Roux, P., Thaon, I., Wolf, J.-P., Regnard, J., Dalphin, J.-C., 2012. BPCO des producteurs laitiers : dépistage, caractérisation et constitution d'une cohorte. Étude BALISTIC. *Rev. Mal. Respir.* 29, 1149–1156.
- Delmas, M.-C., Guignon, N., Leynaert, B., Annesi-Maesano, I., Com-Ruelle, L., Gonzalez, L., Fuhrman, C., 2012. Prévalence et contrôle de l'asthme chez le jeune enfant en France. *Rev. Mal. Respir.* 29, 688–696.
- de Marco, R., Accordini, S., Cerveri, I., Corsico, A., Sunyer, J., Neukirch, F., Künzli, N., Leynaert, B., Janson, C., Gislason, T., Vermeire, P., Svanes, C., Anto, J.M., Burney, P., European Community Respiratory Health Survey Study Group, 2004. An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax* 59, 120–125.
- de Saint Georges-Grédelet, D., 1987. Vitamin requirements of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae), in relation to its fungal association. *J. Med. Entomol.* 24, 408–411.
- Desroches, T.C., McMullin, D.R., Miller, J.D., 2014. Extrolites of *Wallemia sebi*, a very common fungus in the built environment. *Indoor Air* 24, 533–542.
- DiFranza, J.R., Aligne, C.A., Weitzman, M., 2004. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 113, 1007–1015.
- Domingo, J.L., Nadal, M., 2009. Domestic waste composting facilities: a review of human health risks. *Environ. Int.* 35, 382–389.
- Douwes, J., Gibson, P., Pekkanen, J., Pearce, N., 2002. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 57, 643–648.
- Douwes, J., Le Gros, G., Gibson, P., Pearce, N., 2004. Can bacterial endotoxin exposure reverse atopy and atopic disease? *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1051–1054.
- Douwes, J., Pearce, N., 2008. Commentary: The end of the hygiene hypothesis? *Int. J. Epidemiol.* 37, 570–572.
- Doz, M., Chouaid, C., Com-Ruelle, L., Calvo, E., Brosa, M., Robert, J., Decuypère, L., Pribil, C., Huerta, A., Detournay, B., 2013. The association between asthma control, health care costs, and quality of life in France and Spain. *BMC Pulm. Med.* 13, 15.
- Drobotko, V.G., 1945. Stachybotryotoxicosis, a new disease of horses and humans. *Rev Soviet Med* 2, 238–242.
- Dutkiewicz, J., 1997. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4, 11–16.
- Eder, W., Ege, M.J., von Mutius, E., 2006. The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* 355, 2226–2235.
- Eduard, W., 2009. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 799–864.
- Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C., Green, B.J., 2012. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J. Environ. Monit. JEM* 14, 334–339.
- Eduard, W., Pearce, N., Douwes, J., 2009. Chronic bronchitis, copd, and lung function in farmers: The role of biological agents. *CHEST J.* 136, 716–725.
- Fisk, W.J., Lei-Gomez, Q., Mendell, M.J., 2007. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air* 17, 284–296.
- Flannigan, B., 1997. Air sampling for fungi in indoor environments. *J. Aerosol Sci., Sampling and Rapid Assay of Bioaerosols* 28, 381–392.
- Frankel, M., Timm, M., Hansen, E.W., Madsen, A.M., 2012. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor Air* 22, 405–414.

- Gaffin, J.M., Kanchongkittiphon, W., Phipatanakul, W., 2014. Perinatal and early childhood environmental factors influencing allergic asthma immunopathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 22, 21–30.
- Garcia-Vidal, C., Upton, A., Kirby, K.A., Marr, K.A., 2008. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 47, 1041–1050.
- Garrett, M.H., Hooper, M.A., Hooper, B.M., Abramson, M.J., 1998. Respiratory symptoms in children and indoor exposure to nitrogen dioxide and gas stoves. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 891–895.
- Gent, J.F., Kezik, J.M., Hill, M.E., Tsai, E., Li, D.-W., Leaderer, B.P., 2012. Household mold and dust allergens: exposure, sensitization and childhood asthma morbidity. *Environ. Res.* 118, 86–93.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995–1001.
- GINA, 2006. Global strategy for asthma Management and Prevention. (No. NIH Publication N° 02-3659). Bethesda, National Institut of Health, National Heart, Lung and Blood Institut.
- Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, 2015.
- Górny, R.L., 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air--a review. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 11, 185–197.
- Gravesen, S., Nielsen, P.A., Iversen, R., Nielsen, K.F., 1999. Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 3, 505–508.
- Guinea, J., Torres-Narbona, M., Gijón, P., Muñoz, P., Pozo, F., Peláez, T., de Miguel, J., Bouza, E., 2010. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 870–877.
- Halbert, R.J., Natoli, J.L., Gano, A., Badamgarav, E., Buist, A.S., Mannino, D.M., 2006. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 28, 523–532.
- Hallas, T.E., Yi, X., Schou, C., 1993. Does guanine concentration in house-dust samples reflect house-dust mite exposure? *Allergy* 48, 303–305.
- Hamilos, D.L., 2010. Allergic Fungal Rhinitis and Rhinosinusitis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7, 245–252.
- Handal, G., Leiner, M.A., Cabrera, M., Straus, D.C., 2004. Children symptoms before and after knowing about an indoor fungal contamination. *Indoor Air* 14, 87–91.
- HAS, 2004. Recommandation pour le suivi médical des patients asthmatiques adultes et adolescents. Haute Autorité de Santé.
- Heinrich, J., 2011. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 1–25.
- Henderson, J., Sherriff, A., Farrow, A., Ayres, J.G., 2008. Household chemicals, persistent wheezing and lung function: effect modification by atopy? *Eur. Respir. J.* 31, 547–554.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber,

- R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 10, 413–417.
- Hogg, J.C., 2004. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364, 709–721.
- Høst, A., Andrae, S., Charkin, S., Diaz-Vázquez, C., Dreborg, S., Eigenmann, P.A., Friedrichs, F., Grinsted, P., Lack, G., Meylan, G., Miglioranza, P., Muraro, A., Nieto, A., Niggemann, B., Pascual, C., Pouech, M.-G., Rancé, F., Rietschel, E., Wickman, M., 2003. Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 58, 559–569.
- Host, S., Grange, D., Chatignoux, E., Sommen, C., Grémy, I., Dusseaux, M., Bex-Capelle, V., Moularat, S., 2010. Effets sanitaires des moisissures dans l’habitat. L’enquête Esmha, pilote d’une étude épidémiologique. Observatoire régional de santé d’île de France.
- Hoyet, C., Bessot, J.C., Le Mao, J., Quoix, E., Pauli, G., 1991. Comparison between Der p I plus Der f I content determinations and guanine measurements in 239 house dust samples. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88, 678–680.
- Hubert, J., Jaroik, V., Mourek, J., Kubatova, A., & Zbreve Darkova, E., 2004. Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. *Pedobiol. - Int. J. Soil Biol.* 48, 205–214.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Kopecký, J., 2014. The effect of *Tyrophagus putrescentiae* on *Fusarium poae* transmission and fungal community in stored barley in a laboratory experiment. *Insect Sci.* 21, 65–73.
- Hubert, J., Stejskal, V., Kubátová, A., Munzbergová, Z., Vánová, M., Zd’árková, E., 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Exp. Appl. Acarol.* 29, 69–87.
- Hunter, C.A., Grant, C., Flannigan, B., Bravery, A.F., 1988. Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. *Int. Biodeterior.* 24, 81–101.
- Husman, T., 1996. Health effects of indoor-air microorganisms. *Scand. J. Work. Environ. Health* 22, 5–13.
- Inamdar, A.A., Bennett, J.W., 2013. Volatile organic compounds from fungi isolated after hurricane katrina induce developmental defects and apoptosis in a *Drosophila melanogaster* model. *Environ. Toxicol.* 30, 614–620.
- Iraola, V., Prados, M., Pinto, H., Morales, M., Leonor, J.R., Carnés, J., 2014. Allergological characterisation of the storage mite *Acarus gracilis* (Acari: Acaridae). *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 43, 332–338.
- Jaakkola, J.J.K., Parise, H., Kislitsin, V., Lebedeva, N.I., Spengler, J.D., 2004. Asthma, Wheezing, and Allergies in Russian School children in Relation to New Surface Materials in the Home. *Am. J. Public Health* 94, 560.
- Jeong, K.Y., Park, J.-W., Hong, C.-S., 2012. House Dust Mite Allergy in Korea: The Most Important Inhalant Allergen in Current and Future. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 4, 313.
- Jones, R.C., Donaldson, G.C., Chavannes, N.H., Kida, K., Dickson-Spillmann, M., Harding, S., Wedzicha, J.A., Price, D., Hyland, M.E., 2009. Derivation and validation of a composite index of severity in chronic obstructive pulmonary disease: the DOSE Index. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 1189–1195.

- Jouneau, S., Boché, A., Brinchault, G., Fekete, K., Guillot, S., Bayat, S., Desrues, B., 2012. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85, 623–630.
- Kaarakainen, P., Rintala, H., Vepsäläinen, A., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Meklin, T., 2009. Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci. Total Environ.* 407, 4673–4680.
- Kanchongkittiphon, W., Mendell, M.J., Gaffin, J.M., Wang, G., Phipatanakul, W., 2015. Indoor environmental exposures and exacerbation of asthma: an update to the 2000 review by the Institute of Medicine. *Environ. Health Perspect.* 123, 6–20.
- Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Rintala, H., Korppi, M., Täubel, M., Doekes, G., Gehring, U., Renz, H., Pfefferle, P.I., Genuneit, J., Keski-Nisula, L., Remes, S., Lampi, J., von Mutius, E., Pekkanen, J., 2014. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy* 69, 1092–1101.
- Kasznia-Kocot, J., Kowalska, M., Górny, R.L., Niesler, A., Wypych-Ślusarska, A., 2010. Environmental risk factors for respiratory symptoms and childhood asthma. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 17, 221–229.
- Kendrick, B., 2001. Fungi and the History of Mycology, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd. British Columbia, Canada.
- Korpi, A., Kasanen, J.P., Alarie, Y., Kosma, V.M., Pasanen, A.L., 1999. Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs. *Arch. Environ. Health* 54, 347–352.
- Korsgaard, J., 1998. House-dust mites and asthma. A review on house-dust mites as a domestic risk factor for mite asthma. *Allergy* 53, 77–83.
- Kouao-Bile, I., Keita, G., Kouao-Bile, D., 1991. Asthme aux acariens et environnement domestique : nouvelle approche par le dosage semi-quantitatif de la guanine. A propos de 16 cas. *Médecine Afr. Noire* 38, 593–595.
- Lanier, C., Richard, E., Heutte, N., Picquet, R., Bouchart, V., Garon, D., 2010. Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment. *Atmos. Environ.* 44, 1980–1986.
- Li, D.-W., Yang, C.S., 2004. Fungal Contamination as a Major Contributor to Sick Building Syndrome, in: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 31–112.
- Lignell, U., Meklin, T., Rintala, H., Hyvärinen, A., Vepsäläinen, A., Pekkanen, J., Nevalainen, A., 2008. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and *Streptomyces* in relation to moisture damage of the house. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 303–308.
- Lind, P., 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of major excrement allergens of house dust mite species *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *D. microceras*. *Allergy* 41, 442–451.
- Lin, S., Jones, R., Munsie, J.P., Nayak, S.G., Fitzgerald, E.F., Hwang, S.A., 2012. Childhood asthma and indoor allergen exposure and sensitization in Buffalo, New York. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 215, 297–305.
- Lustgraaf, B. v. d., 1978. Ecological Relationships between Xerophilic Fungi and House-Dust Mites (Acarida: Pyroglyphidae). *Oecologia* 33, 351–359.
- Mannino, D.M., Buist, A.S., 2007. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370, 765–773.
- Marchand, D., Weiss, K., Laffitte, J.-D., 2010. Syndrome des bâtiments malsains ou syndrome psychogène collectif ? *Environnement, Risques & Santé* 9, 401–407.
- Matsui, E.C., Hansel, N.N., Aloe, C., Schiltz, A.M., Peng, R.D., Rabinovitch, N., Ong, M.J., Williams, D.L., Breyse, P.N., Diette, G.B., Liu, A.H., 2013. Indoor pollutant

- exposures modify the effect of airborne endotoxin on asthma in urban children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1210–1215.
- McGinnis, M.R., 2007. Indoor mould development and dispersal. *Med. Mycol.* 45, 1–9.
- Ménard, C., Girard, D., Léon, C., Beck, F., 2008. Baromètre santé environnement 2007. INPES, Saint-Denis, France.
- Millon, L., Reboux, G., Bellanger, P., Roussel, S., Sornin, S., Martin, C., Deconinck, E., Dalphin, J.-C., Piarroux, R., 2006. Quantification de *Stachybotrys chartarum* par PCR en temps réel dans l'environnement domestique, hospitalier, et agricole. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 16, 183–188.
- Morales, M., Iraola, V., Leonor, J.R., Bartra, J., Rodríguez, F., Boquete, M., Huertas, Á.J., Paniagua, M.J., Pinto, H., Carnés, J., 2015. Different sensitization to storage mites depending on the co-exposure to house dust mites. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 114, 36–42.
- Morgan, W.J., Crain, E.F., Gruchalla, R.S., O'Connor, G.T., Kattan, M., Evans, R., Stout, J., Malindzak, G., Smartt, E., Plaut, M., Walter, M., Vaughn, B., Mitchell, H., 2004. Results of a Home-Based Environmental Intervention among Urban Children with Asthma. *N. Engl. J. Med.* 351, 1068–1080.
- Naegele, A., Reboux, G., Scherer, E., Roussel, S., Millon, L., 2013. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *Int. J. Environ. Health Res.* 23, 91–95.
- Nesvorna, M., Gabrielova, L., Hubert, J., 2012. Suitability of a range of *Fusarium* species to sustain populations of three stored product mite species (Acari: Astigmata). *J. Stored Prod. Res.* 48, 37–45.
- Nevalainen, A., Täubel, M., Hyvärinen, A., 2015. Indoor fungi: companions and contaminants. *Indoor Air* 25, 125–156.
- Noss, I., Wouters, I.M., Visser, M., Heederik, D.J.J., Thorne, P.S., Brunekreef, B., Doekes, G., 2008. Evaluation of a Low-Cost Electrostatic Dust Fall Collector for Indoor Air Endotoxin Exposure Assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5621–5627.
- OMS | Affections respiratoires chroniques [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/respiratory/fr/> (accessed 10.8.14).
- OMS | Asthme [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/topics/asthma/fr/> (accessed 4.20.15).
- OMS | Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/topics/chronic_obstructive_pulmonary_disease/fr/ (accessed 4.14.15).
- OQAI, 2011. Qualité d'air intérieur, qualité de vie. 10 ans de recherche pour mieux respirer. CSTB.
- Pattenden, S., 2006. Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure. *Tob. Control* 15, 294–301.
- Pauli, G., Bessot, J.-C., 2013. Les acariens : biologie, écologie et actualités des allergènes moléculaires. *Rev. Fr. Allergol., Huitièmes rencontres d'allergologie du Grand Sud (Narbonne – 29-30 novembre 2013)* 53, Supplement 1, 45–58.
- Pearce, N., Pekkanen, J., Beasley, R., 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 54, 268–272.
- Pepys, J., Jenkins, P.A., Festenstein, G.N., Gregory, P.H., Lacey, M.E., Skinner, F.A., 1990. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. 1963. *Allergy Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc.* 11, 101–102, discussion 97–99.
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A., Rintala, H., 2008. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 233–244.

- Platts-Mills, T.A., Vervloet, D., Thomas, W.R., Aalberse, R.C., Chapman, M.D., 1997. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, S2–24.
- Poulsen, O.M., Breum, N.O., Ebbenhøj, N., Hansen, A.M., Ivens, U.I., van Lelieveld, D., Malmros, P., Matthiasen, L., Nielsen, B.H., Nielsen, E.M., 1995. Sorting and recycling of domestic waste. Review of occupational health problems and their possible causes. *Sci. Total Environ.* 168, 33–56.
- Pyrhönen, K., Näyhä, S., Läärä, E., 2015. Dog and cat exposure and respective pet allergy in early childhood. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 26, 247–255.
- Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S.A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., Zielinski, J., Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2007. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 532–555.
- Reboux, G., Bellanger, A.-P., Dalphin, J.-C., 2011. Contre : les composés organiques volatils d’origine fongique ont un impact sur la santé. *Rev. Fr. Allergol.* 51, 350–353.
- Reboux, G., Bellanger, A.-P., Roussel, S., Grenouillet, F., Millon, L., 2010. Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Rev. Mal. Respir.* 27, 169–179.
- Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C., Millon, L., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* 19, 446–453.
- Reboux, G., Nolard, N., 2007. Moisissures de l’environnement intérieur: les techniques d’échantillonnage et de mesure. *Rev Mal Respir* 243–245.
- Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnnet, K., Dalphin, J.C., 2001. Role of molds in farmer’s lung disease in Eastern France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1534–1539.
- Reboux, G., Piarroux, R., Roussel, S., Millon, L., Bardonnnet, K., Dalphin, J.-C., 2007. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmers’ lung disease. *J. Med. Microbiol.* 56, 1317–1321.
- Reboux, G., Reiman, M., Roussel, S., Taattola, K., Millon, L., Dalphin, J.-C., Piarroux, R., 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 13, 267–273.
- Reponen, T., Lockey, J., Bernstein, D.I., Vesper, S.J., Levin, L., Khurana Hershey, G.K., Zheng, S., Ryan, P., Grinshpun, S.A., Villareal, M., Lemasters, G., 2012. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 639–644.e5.
- Rintala, H., Hyvärinen, A., Paulin, L., Nevalainen, A., 2004. Detection of streptomycetes in house dust—comparison of culture and PCR methods. *Indoor Air* 14, 112–119.
- Rintala, H., Nevalainen, A., 2006. Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR. *J. Environ. Monit. JEM* 8, 745–749.
- Rocchi, S., Reboux, G., Frossard, V., Scherer, E., Valot, B., Laboissière, A., Zaros, C., Vacheyrou, M., Gillet, F., Roussel, S., Raherison, C., Millon, L., Elfe team, 2015. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. *Sci. Total Environ.* 505, 1026–1035.
- Rocchi, S., Richaud-Thiriez, B., Barrera, C., Grenouillet, F., Dalphin, J.-C., Millon, L., Reboux, G., 2015. Evaluation of mold exposure in cystic fibrosis patients’ dwellings and allergic bronchopulmonary risk. *J. Cyst. Fibros.* 14, 242–247.

- Roche, N., Zureik, M., Vergnenègre, A., Huchon, G., Neukirch, F., 2007. Données récentes sur la prévalence de la bronchopneumopathie chronique obstructive en France. *BEH* 27-28, 245–248.
- Roussel, S., Reboux, G., Bellanger, A.-P., Sornin, S., Grenouillet, F., Dalphin, J.-C., Piarroux, R., Millon, L., 2008. Characteristics of dwellings contaminated by moulds. *J. Environ. Monit.* 10, 724–729.
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.-C., Laplante, J.-J., Piarroux, R., 2005. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 12, 217–221.
- Roussel, S., Reboux, G., Naegele, A., Martinez, J., Vacheyrou, M., Scherer, E., Millon, L., 2013. Detecting and quantifying mites in domestic dust: a novel application for real-time PCR. *Environ. Int.* 55, 20–24.
- Roussel, S., Rognon, B., Barrera, C., Reboux, G., Salamin, K., Grenouillet, F., Thaon, I., Dalphin, J.-C., Tillie-Leblond, I., Quadroni, M., Monod, M., Millon, L., 2011. Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 301, 150–156.
- Russell, G., 2006. The childhood asthma epidemic. *Thorax* 61, 276–277.
- Saijo, Y., Nakagi, Y., Sugioka, Y., Ito, T., Endo, H., Kuroda, H., Yoshida, T., 2007. Comparative study of simple semi-quantitative dust mite allergen tests. *Environ. Health Prev. Med.* 12, 187–192.
- Santucci, R., Meunier, O., Ott, M., Herrmann, F., Freyd, A., de Blay, F., 2007. Contamination fongique des habitations : bilan de 10 années d'analyses. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 47, 402–408.
- Sato, M., Kuwahara, Y., Matsuyama, S., Suzuki, T., 1993. Chemical Ecology of Astigmatid Mites : XXXVII. Fatty Acid as Food Attractant of Astigmatid Mites, Its Scope and Limitation. *Appl. Entomol. Zool.* 28, 565–569.
- Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U., 2011. Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative real-time PCR. *Ann. Occup. Hyg.* 55, 612–619.
- Scherer, E., Rocchi, S., Reboux, G., Vandentorren, S., Roussel, S., Vacheyrou, M., Raherison, C., Millon, L., 2014. qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. *Sci. Total Environ.* 466-467, 716–724.
- Seltzer, J.M., Fedoruk, M.J., 2007. Health Effects of Mold in Children. *Pediatr. Clin. North Am., Children's Health and the Environment: Part II* 54, 309–333.
- Sen, K., Asher, D.M., 2001. Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood. *Transfusion (Paris)* 41, 1356–1364.
- Sherriff, A., Farrow, A., Golding, J., Henderson, J., 2005. Frequent use of chemical household products is associated with persistent wheezing in pre-school age children. *Thorax* 60, 45–49.
- Sin, D.D., Anthonisen, N.R., Soriano, J.B., Agusti, A.G., 2006. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur. Respir. J.* 28, 1245–1257.
- Spaan, S., Wouters, I.M., Oosting, I., Doekes, G., Heederik, D., 2006. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. *J. Environ. Monit. JEM* 8, 63–72.
- Strachan, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Thomas, W.R., 2010. Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac. J. Allergy Immunol. Launched Allergy Immunol. Soc. Thail.* 28, 211–224.
- Tillie-Leblond, I., Grenouillet, F., Reboux, G., Roussel, S., Chouraki, B., Lorthois, C., Dalphin, J.-C., Wallaert, B., Millon, L., 2011. Hypersensitivity pneumonitis and metalworking fluids contaminated by mycobacteria. *Eur. Respir. J.* 37, 640–647.

- Tischer, C., Chen, C.-M., Heinrich, J., 2011. Association between domestic mould and mould components, and asthma and allergy in children: a systematic review. *Eur. Respir. J.* 38, 812–824.
- Tischer, C., Gehring, U., Chen, C.-M., Kerkhof, M., Koppelman, G., Sausenthaler, S., Herbarth, O., Schaaf, B., Lehmann, I., Krämer, U., Berdel, D., von Berg, A., Bauer, C.P., Koletzko, S., Wichmann, H.-E., Brunekreef, B., Heinrich, J., 2011. Respiratory health in children, and indoor exposure to (1,3)- β -D-glucan, EPS mould components and endotoxin. *Eur. Respir. J.* 37, 1050–1059.
- Tovey, E.R., Chapman, M.D., Platts-Mills, T. a. E., 1981. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* 289, 592–593.
- Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61, 279–293.
- Upton, A., Kirby, K.A., Carpenter, P., Boeckh, M., Marr, K.A., 2007. Invasive Aspergillosis following Hematopoietic Cell Transplantation: Outcomes and Prognostic Factors Associated with Mortality. *Clin. Infect. Dis.* 44, 531–540.
- Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y., 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262.
- Van Asselt, L., 1999. Interactions between Domestic Mites and Fungi. *Indoor Built Environ.* 8, 216–220.
- Van Bronswijk, J.E., Bischoff, E., Schirmacher, W., Kniest, F.M., 1989. Evaluating mite (Acari) allergenicity of house dust by guanine quantification. *J. Med. Entomol.* 26, 55–59.
- VanBronswijk, J.E.M.H., Sinha, R.N., 1973. Role of Fungi in the Survival of *Dermatophagoides* (Acarina: Pyroglyphidae) in House-Dust Environment. *Environ. Entomol.* 2, 142–145. doi:10.1093/ee/2.1.142
- Vandentorren, S., Baldi, I., Annesi Maesano, I., Charpin, D., Neukirch, F., Filleul, L., Cantagrel, A., Tessier, J.F., 2003. Long-term mortality among adults with or without asthma in the PAARC study. *Eur. Respir. J.* 21, 462–467.
- van der Brempt, X., Haddi, E., Michel-Nguyen, A., Fayon, J.P., Soler, M., Charpin, D., Vervloet, D., 1991. Comparison of the ACAREX test with monoclonal antibodies for the quantification of mite allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87, 130–132.
- van Hage-Hamsten, M., Johansson, E., 1998. Clinical and immunologic aspects of storage mite allergy. *Allergy* 53, 49–53.
- Vesper, S., Barnes, C., Ciaccio, C.E., Johanns, A., Kennedy, K., Murphy, J.S., Nunez-Alvarez, A., Sandel, M.T., Cox, D., Dewalt, G., Ashley, P.J., 2013. Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values measured in homes of asthmatic children in Boston, Kansas City, and San Diego. *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma* 50, 155–161.
- Vialatte, J., Brunet, D., 1974. Role antigénique des acariens dans la poussière de maison. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 14, 97–102.
- Viegi, G., Simoni, M., Scognamiglio, A., Baldacci, S., Pistelli, F., Carrozzi, L., Annesi-Maesano, I., 2004. Indoor air pollution and airway disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 8, 1401–1415.
- Vogelzang, P.F., van der Gulden, J.W., Folgering, H., Kolk, J.J., Heederik, D., Preller, L., Tielen, M.J., van Schayck, C.P., 1998. Endotoxin exposure as a major determinant of lung function decline in pig farmers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 15–18.
- von Mutius, E., 2007. Allergies, infections and the hygiene hypothesis – The epidemiological evidence. *Immunobiology* 212, 433–439.
- Von Pirquet, C., 1906. Allergie. *Münch Med Wochenschr* 30, 1457.

- Wålinder, R., Ernstgård, L., Norbäck, D., Wieslander, G., Johanson, G., 2008. Acute effects of 1-octen-3-ol, a microbial volatile organic compound (MVOC)—An experimental study. *Toxicol. Lett.* 181, 141–147.
- WHO, 2010. Health and Environment in Europe: Progress Assessment. WHO, Copenhagen, Denmark.
- Wijga, A.H., Kerkhof, M., Gehring, U., de Jongste, J.C., Postma, D.S., Aalberse, R.C., Wolse, A.P.H., Koppelman, G.H., van Rossem, L., Oldenwening, M., Brunekreef, B., Smit, H.A., 2014. Cohort profile: the prevention and incidence of asthma and mite allergy (PIAMA) birth cohort. *Int. J. Epidemiol.* 43, 527–535.
- Woodcock, A., Custovic, A., 1998. ABC of allergies: Avoiding exposure to indoor allergens. *BMJ* 316, 1075.
- World Allergy Organization | Allergic Diseases Resource Center [WWW Document]. URL http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/nomenclature/french.php (accessed 4.22.15).
- Wouters, E.F.M., 2003. Economic analysis of the confronting COPD survey: an overview of results. *Respir. Med.*, The economic impact of COPD in North America and Europe Analysis of the Confronting COPD survey 97, Supplement C, S3–S14.
- Würtz, H., Sigsgaard, T., Valbjørn, O., Doekes, G., Meyer, H.W., 2005. The dustfall collector—a simple passive tool for long-term collection of airborne dust: a project under the Danish Mould in Buildings program (DAMIB). *Indoor Air* 15 Suppl 9, 33–40.
- Yach, D., Hawkes, C., Gould, C.L., Hofman, K.J., 2004. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* 291, 2616–2622.
- Yooseph, S., Andrews-Pfannkoch, C., Tenney, A., McQuaid, J., Williamson, S., Thiagarajan, M., Bami, D., Zeigler-Allen, L., Hoffman, J., Goll, J.B., Fadrosch, D., Glass, J., Adams, M.D., Friedman, R., Venter, J.C., 2013. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PloS One* 8, e81862.