

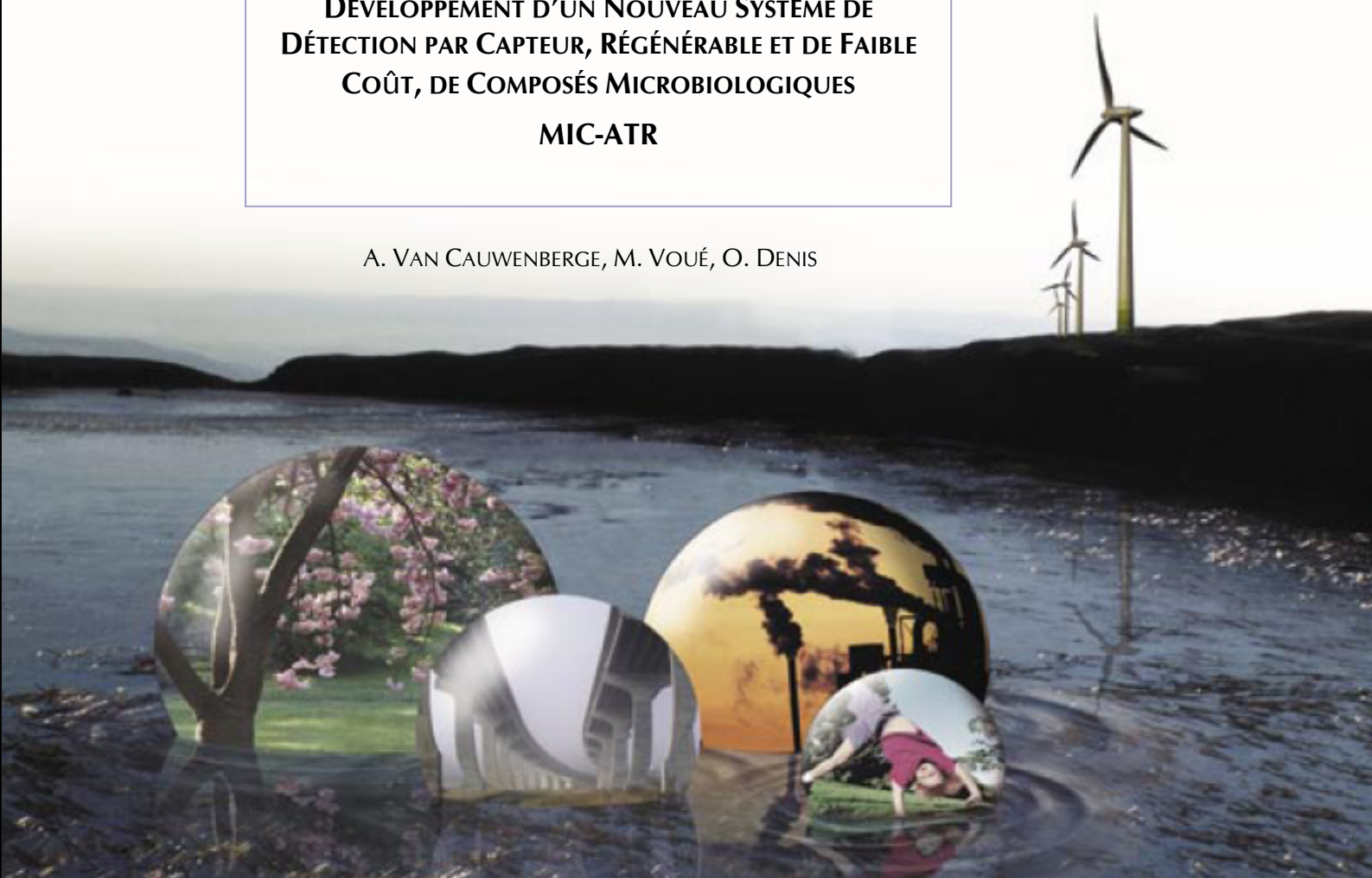
# SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU SYSTÈME DE DÉTECTION PAR CAPTEUR, RÉGÉNÉRABLE ET DE FAIBLE COÛT, DE COMPOSÉS MICROBIOLOGIQUES  
MIC-ATR**

A. VAN CAUWENBERGE, M. VOUÉ, O. DENIS



ENERGY

TRANSPORT AND MOBILITY

AGRO-FOOD

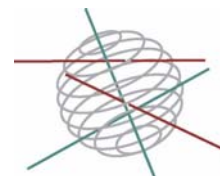
HEALTH AND ENVIRONMENT

CLIMATE

BIODIVERSITY

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS

TRANSVERSAL ACTIONS



***Santé et Environnement***



RAPPORT FINAL PHASE 1  
RESUME

**DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU SYSTÈME DE DÉTECTION PAR  
CAPTEUR, RÉGÉNÉRABLE ET DE FAIBLE COÛT, DE COMPOSÉS  
MICROBIOLOGIQUES  
MIC-ATR**

**SD/HE/04A**

**Promoteurs**

**Dr. E. Noel & Dr. A. Van Cauwenberge**

Hainaut Vigilance Sanitaire (Hygiène Publique en Hainaut)  
Boulevard Saintelette, 55  
B-7000 MONS

**Prof. J. De Coninck & Prof. M. Voué**

Université de Mons  
Centre de Recherche en Modélisation Moléculaire  
Place du Parc, 20  
B-7000 MONS

**Dr. K. Huygen & Dr. O. Denis**

ISP-WIV  
Département Institut Pasteur de Bruxelles  
Unité d'Allergologie  
Engelandstraat, 642  
1180 BRUXELLES

**Auteurs**

**A. Van Cauwenberge**

**M. Voué**

**O. Denis**





Rue de la Science 8  
Wetenschapsstraat 8  
B-1000 Brussels  
Belgium  
Tel: +32 (0)2 238 34 11 – Fax: +32 (0)2 230 59 12  
<http://www.belspo.be>

Contact person: Emmanuèle Bouregois  
+32 (0)2 238 34.94

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

A. Van Cauwenberge, M. Voué, O. Denis "***Développement d'un nouveau système de détection par capteur, régénérable et de faible coût, de composés microbiologiques MIC-ATR***" Rapport Final Phase 1 Résumé. Bruxelles : Politique scientifique 2009 – 7 p. Programme de recherche « La science pour un Développement Durable ».

La présence de moisissures à l'intérieur de l'habitat est une préoccupation majeure en matière de santé publique en raison des problèmes importants qu'elles peuvent engendrer pour la santé humaine. Les moisissures, observées dans 60 % des habitats, sont en effet capables de relâcher dans le milieu intérieur des composés particulièrement dangereux et l'exposition à ces substances a par ailleurs été associée à des pathologies sévères telles que des réactions d'hypersensibilité, d'asthme, des hémorragies pulmonaires potentiellement mortelles. En Belgique, selon l'Institut Scientifique de Santé Publique, la fréquence de l'asthme atteindrait 4% de la population et cette valeur n'a plus évolué entre 2001 et 2004, c'est dire qu'il s'agit d'un problème majeur pour les autorités du pays en matière de santé publique et d'hygiène de l'habitat.

Parmi ces composés fongiques, les spores se retrouvent dans l'atmosphère et sont à l'origine de nombreuses allergies respiratoires. Les moisissures sont en effet capables de croître sur la plupart des substrats rencontrés dans l'habitat pour autant que les conditions de température et d'humidité soient rencontrées, et leurs spores sont communément retrouvées dans les poussières de maison.

Plus de 80 moisissures ont été associées à des symptômes d'allergie respiratoire, parmi lesquelles *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus*.

Parmi les substances relarguées par les moisissures, on distingue quatre grands groupes qui sont les COVs, les spores, les fragments de mycélium et les mycotoxines, des métabolites secondaires très stables et pas ou peu volatiles dont les plus dangereuses en matière de pollution intérieure appartiennent à la famille des aflatoxines et des trichothécènes.

Cependant, il est particulièrement difficile d'établir un lien direct entre la présence de ces composés dans l'environnement et une pathologie déclarée. Parmi les causes identifiées de l'asthme, la précarité de l'habitat figure en bonne place, où l'humidité favorise le développement de moisissures. Une inspection visuelle de l'habitat ne permet hélas pas toujours de détecter le problème et le risque associé à la présence de moisissures pourrait être mieux cerné par la mesure de la présence de mycotoxines dans l'air ambiant.

Or les méthodes permettant leur détection tant qualitative que quantitative ont été principalement développées dans le domaine des denrées alimentaires (« food and feed ») qui dispose de méthodes fiables et suffisamment sensibles. Dans ce contexte en effet, le lien entre la consommation de produits contaminés par les mycotoxines et le développement de pathologies est plus direct et des valeurs-seuils admises pour la teneur en ces composés dans les aliments ont pu être établies et définies au niveau normatif et réglementaire. De telles limites n'ont par contre pas encore pu être établies pour les mycotoxines présentes dans l'air intérieur, faute de données expérimentales et de moyens d'échantillonnage et de détection adaptés.

Jusqu'à présent, les études réalisées se sont focalisées sur les matériaux bruts ou les dépôts de poussières de maison mais les données de santé publique relatives aux pathologies précitées montrent qu'il est nécessaire de pouvoir aussi disposer de techniques spécifiques et sensibles capables de doser les trichothécènes macrocycliques dans l'air intérieur.

Dès lors, nous proposons de surmonter ces problèmes en développant un senseur régénérable, de faible coût, de grande sensibilité et sélectivité, basé sur la

spectroscopie FTIR/ATR. Le biosenseur utilise des éléments optiques, transparents dans le domaine spectral infrarouge, modifié par des méthodes de chimie par voie humide pour permettre le couplage de récepteurs moléculaires, en particulier des anticorps monoclonaux (rat ou souris) contre des trichothécènes macrocycliques.

Pour ce faire; un spectromètre Nicolet 380 FTIR a été installé chez HVS. Le dispositif expérimental consiste en une cellule ATR verticale SPECAC connectée à une pompe péristaltique Watson-Marlow atteignant un flux de 5 à 50  $\mu\text{l}$  par minute. Les cristaux du système FTIR sont en germanium et de forme trapézoïdale (50 x 20 x 2  $\text{mm}^3$ , angle de 45°) et ont été fonctionnalisés dans le laboratoire du CRMM (UMons). Le système complet a été validé par deux types d'expériences, la détermination du pourcentage d'éthanol dans des solutions aqueuses et la liaison de la biotine à l'avidine couplée sur le senseur FTIR. Le système ainsi conformé nous a permis de détecter des molécules de faible poids moléculaire comme le DNP qui a servi de modèle de départ pour la détection des haptènes. Les résultats obtenus par test ELISA « classique » et par FTIR mettant en œuvre 6 anticorps monoclonaux faits chez le rat ont été comparés. Tous les anticorps ont reconnu de la même manière le DNP couplé (DNP-HSA) mais cette réponse a été différente d'un anticorps à l'autre pour la détection du DNP libre. Pour le DNP couplé, les limites de détection obtenues par les deux techniques sont de 5-15 ng/ml pour le FTIR et 40 ng/ml pour l'ELISA, mais pour le DNP libre, les limites sont différentes : 1  $\mu\text{g/ml}$  pour l'ELISA et 4 ng/ml avec la technique FTIR utilisant l'anticorps LO-DNP34, qui donne donc des résultats comparables à ceux obtenus pour la détection du DNP couplé.

Le workpackage 2 était consacré à la détection de l'aflatoxine B1. Des tests préliminaires ont tout d'abord été conduits pour vérifier la liaison de l'aflatoxine sur le cristal de germanium fonctionnalisé. La construction moléculaire fut la même que celle précédemment utilisée pour la détection du DNP. La concentration en aflatoxine B1 a été mesurée par test ELISA en compétition dans 36 échantillons prélevés dans des habitats lors de nos visites. Parmi ceux-ci, 15 ont été détectés positifs pour l'aflatoxine B1 par la spectrométrie de masse. Cependant, nous n'avons pu confirmer la présence d'aflatoxine B1 par ELISA, cette technique ayant une sensibilité moindre que la spectrométrie de masse. Notons cependant que ce manque de sensibilité sera compensé par les méthodes spectrales qui permettent de détecter une liaison spécifique. Ces expériences seront conduites pendant la phase 2 du projet.

Le diagnostic d'un habitat humide étant souvent associé à la découverte de la présence de moisissures, il nous a semblé intéressant de pouvoir disposer d'un outil permettant d'en quantifier la biomasse dans l'air ambiant afin de mieux apprécier le niveau de contamination de l'environnement intérieur étudié. C'est pourquoi un nouveau workpackage a été développé dans ce projet, qui consiste en la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les spores des principales moisissures rencontrées dans les habitats humides à savoir *Alternaria*, *Aspergillus* et *Stachybotrys*.

A cet effet, des anticorps monoclonaux ont été développés chez les rats LOU/c qui ont été immunisés par  $5.10^6$  spores d'*Alternaria alternata* (IHEM 18586) ou *Aspergillus fumigatus* (IHEM 6117) ou *Stachybotrys chartarum* (IHEM 22013). En fin d'immunisation, les lymphocytes obtenus ont été fusionnés avec des cellules IR-983F. Les hybridomes en croissance ont été sélectionnés sur milieu HAT. Les clones positifs ont été sélectionnés par fluorocytométrie sur différents spores de moisissures.

Cinq anticorps ont été sélectionnés et caractérisés de la sorte à partir de rats immunisés par *Alternaria alternata*. LO-ALT-3 s'avéra être spécifique à l'espèce tandis que LO-ALT-5 s'avéra être intéressant pour la détection d'une large gamme de moisissures présentes dans les échantillons de type environnemental. Nous avons testé les performances de cet anticorps sur nos échantillons provenant de poussières aspirées dans les livings de 10 habitations différentes. Les tests ELISA conduits avec LO-ALT-5 ont permis la détection des antigènes recherchés sur quatre des dix échantillons.

Six autres anticorps monoclonaux ont été sélectionnés à partir de rats immunisés avec *Aspergillus*. De ces six anticorps, LO-ASP-2 s'avéra reconnaître avec une forte affinité les spores d' *Aspergillus niger* et avec une affinité moindre les spores d'*Alternaria*, de *Cladosporium* et de *Stachybotrys*. Cinq autres anticorps, dirigés contre *Stachybotrys* ont été obtenus de la même manière. Tous ces anticorps doivent encore être mieux caractérisés avant d'être greffés sur notre système de biosenseur.

L'anticorps anti-*Alternaria* a ensuite été immobilisé avec succès sur la surface du senseur optique et la réponse spectrale en a été mesurée, donnant un résultat proportionnel à la dilution de l'extrait des spores d'*Alternaria*, dans le domaine spectral correspondant aux protéines et aux polysaccharides. Les premiers résultats obtenus montrent que c'est au niveau de ces derniers que l'on obtient la meilleure réponse.

Le Workpackage 3 était consacré à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les mycotoxines. Comme les mycotoxines sont de très petites molécules de nature non-protéique, elles ne permettent pas d'induire une réaction immunitaire quand injectées telles quelles aux animaux car la production d'anticorps nécessite l'aide des cellules T-helper reconnaissant les peptides linéaires. En effet, l'activation des lymphocytes B, la production par celles-ci d'anticorps et la production d'anticorps monoclonaux nécessitent le couplage de la toxine à une protéine « carrier ».

C'est pourquoi la roridine A et la verrucarine A ont été couplées au KLH et à l'OVA par traitement à l'anhydride succinique pour créer des groupes fonctionnels nécessaires aux couplages. Des rats LOU/c ont été immunisés par 50 µg de roridine A ou de verrucarine A couplées au KLH. A la fin du protocole d'immunisation, les lymphocytes obtenus ont été fusionnés avec des cellules IR-983F et les hybridomes sélectionnés en milieu HAT.

L'efficacité de l'immunisation/fusion a été confirmée par la présence de nombreux clones spécifiques du KLH. Plus de 300 clones ont ainsi été obtenus et analysés, dont plus de 60% spécifiques pour le KLH mais aucun n'est dirigé contre les mycotoxines.

C'est la raison pour laquelle une nouvelle réaction de couplage, détaillée dans le rapport complet, fut mise en œuvre, avec la BSA, le KLH et l'OVA. Des rats LOU/c furent immunisés à l'aide de 50 µg de verrucarine A couplée à la BSA et le protocole décrit plus haut appliqué pour l'obtention d'hybridomes dont le surnageant fut testé en ELISA sur plaques « coatées » à la BSA ou à la BSA-verrucarine A pour sélectionner les anticorps spécifiques aux mycotoxines.

Huit anticorps monoclonaux reconnaissant les mycotoxines furent ainsi obtenus. Les surnageants de certains de ces clones contenaient des anticorps reconnaissant la verrucarine A associée à plusieurs carriers (BSA, KLH, OVA). Certains anticorps cross-réagissaient avec la roridine A. Nous avons poussé leur caractérisation plus

loin mais tous les résultats indiquent que nos anticorps détectent uniquement la toxine couplée mais non la toxine libre, hypothéquant ainsi nos essais ultérieurs de détection.

Dès lors de nouveaux essais avec des rats LOU/c immunisés à la verrucarine A couplée à la BSA ont été conduits, suivant le protocole déjà décrit. Des 553 clones testés, 70 (= 13%) ont produit des anticorps reconnaissant la verrucarine couplée à l'OVA. Seul un clone a produit des anticorps inhibés par la verrucarine A libre. Après optimisation des conditions de test ELISA en compétition utilisant cet anticorps (F241G2), nous pouvons détecter la verrucarine A libre avec une sensibilité entre 3,9 et 1,9 ng/ml. L'étape suivante consistera à détecter la verrucarine A dans nos échantillons environnementaux avec ce même anticorps.

Concernant l'échantillonnage environnemental, 40 prélèvements ont été effectués dans des habitations contaminées par des moisissures. Les toxines présentes ont été recueillies sur des filtres de quartz (pore de 2,2 µm) en prélevant un volume d'air correspondant à environ la moitié du volume de la pièce à l'aide d'une pompe à haut débit (400 l/min). Parallèlement au développement de notre technique, les mêmes échantillons ont été soumis à une analyse par LC-MS-MS au laboratoire du Prof. S. De Saeger à l'Université de Gand. Il en ressort que 15 de ces prélèvements présentent un taux de mycotoxines statistiquement significatif. A notre surprise, l'aflatoxine B1 qui est communément associée à des contaminations alimentaires a également été trouvée dans l'air ambiant de ces maisons, rendant de ce fait le Workpackage 2, qui n'était alors considéré que comme une étape de validation technique, du plus grand intérêt en matière de détection de pollutions intérieures.

La comparaison a également été faite entre les résultats obtenus par la LC-MS-MS et le test ELISA commercial de la société Enviroligix. Il en ressort que ce dernier a tendance à sous-évaluer la contamination.

Les anticorps spécifiques dirigés contre les trichothécènes seront produits par technologie des hydridomes et les clones obtenus seront identifiés, propagés et caractérisés. Les anticorps purifiés seront utilisés comme récepteurs sur le nouveau senseur optique. La technologie des biosenseurs tirera parti des technologies antérieures et combinera les avantages de la détection FTIR et ceux de la reconnaissance moléculaire basée sur l'immuno-affinité.

Des prélèvements ont également été effectués en parallèle dans une trentaine d'habitations non contaminées afin de jeter les bases d'une banque de données qui pourrait constituer la première étape d'une future étude épidémiologique de la qualité de l'habitat.

En conclusion, le **transfert de la technologie FTIR/ATR** entre l'UMons et HVS s'est fait avec succès. Le **modèle basé sur la détection du DNP** a été développé avec comparaison de la détection du DNP libre et couplé. Les concepts utilisés en immunodétection ont pu être transférés avec succès à la technologie FTIR, ouvrant ainsi la voie à de nouveaux capteurs : les immuno-capteurs FTIR. Des **anticorps monoclonaux dressés contre Alternaria, Aspergillus et Stachybotrys ont été produits** et partiellement caractérisés. En particulier, deux anticorps (LO-ALT-1 et LO-ALT-5) se sont avérés reconnaître un antigène présent à la surface des spores de nombreuses espèces de moisissures et un troisième anticorps (LO-ALT-3) s'avère être spécifique à *Alternaria alternata*. Nous avons commencé la production et la purification de ces anticorps en vue de leur utilisation sur le biosenseur pour la quantification de la biomasse en moisissures dans l'air intérieur.

**La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les mycotoxines est en cours** et cinq d'entre eux reconnaissent la verrucarine A et la roridine A couplées mais seulement un anticorps, le F24-1G2, permet la détection de la verrucarine A sous sa forme libre, avec une sensibilité de 3,9 à 1,9 ng/ml. Enfin, les **échantillonnages environnementaux ont commencé** et se poursuivent et des validations croisées ont été effectuées sur ceux-ci avec la technique en LC-MS-MS et le test ELISA d'Envirologix. Ce dernier semble systématiquement sous-évaluer le niveau de contamination, d'où l'intérêt de la phase 2 du projet qui verra le développement d'un capteur FTIR-ATR plus sensible que les techniques commerciales existantes, à l'aide des anticorps produits et caractérisés dans le cadre de ce projet.