

Sommaire

RESUME.....	I
المخلص.....	II
ABSTRACT.....	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :	
CHAPITRE I. ASTHME ALLERGIQUE	3
CHAPITRE II. PRINCIPAUX ALLERGENES RESPIRATOIRES RETROUVES DANS LE MILIEU INTERIEUR	18
CHAPITRE III. ASTHME ALLERGIQUE ET STRESS OXYDANT	32
PARTIE EXPERIMENTALE :	
CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES	36
CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION	67
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
ANNEXES	118

Résumé

But : Le but de la présente étude est d'évaluer l'impact des aéroallergènes intérieurs sur la sévérité de l'asthme et la sensibilisation d'enfants asthmatiques de la ville d'Annaba (Algérie).

Méthodes : Notre étude a concerné 68 enfants asthmatiques et 50 enfants sains (âgés de 1 à 15 ans). Via un questionnaire, nous avons évalué la sévérité de l'asthme et les principales manifestations atopiques. Des échantillons de sang ont été obtenus à partir de tous les enfants pour déterminer les paramètres biologiques (éosinophilie, IgE totales et spécifiques aux aéroallergènes), suivis par une visite à domicile pour évaluer les paramètres météorologiques et l'exposition fongique.

Résultats : Nous avons constaté que la majorité de notre population a une histoire familiale d'atopie positive (72,05 %) et présente un asthme modéré (33.82 %). La sévérité de l'asthme a été associée à une éosinophilie (χ^2 , $p = 0,01$), aux taux d'IgE totales (χ^2 , $p < 0,001$) et à la sensibilisation aux aéroallergènes intérieurs. Cette association entre la sévérité de la maladie et la sensibilisation, a été la plus forte avec les acariens (χ^2 , $p < 0,001$ pour *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1) et $p < 0,01$ pour *Dermatophagoides farinae* (d2)) et les poils de chat ($p < 0,05$). En outre, toutes les maisons d'enfants asthmatiques contiennent des spores fongiques (surtout *Cladosporium sp* et *Alternaria sp*) qui sont également associés à une sensibilisation aux champignons (χ^2 , $p < 0,001$).

Conclusion : La température intérieure moyenne et l'humidité dans les maisons d'enfants asthmatiques représentent des conditions favorables à la croissance de moisissures et le développement des acariens. Leur présence a été associée à la sensibilisation aux champignons et à la sévérité de l'asthme. Enfin, le fait que la gravité de la maladie soit liée à l'exposition aux aéroallergènes et que la plupart des enfants asthmatiques aient un asthme modéré, ceci suggère que la réduction des taux d'allergènes intérieurs pourrait réduire la sévérité de la maladie.

Mots clés : Annaba (Algérie), asthme, enfants, IgE, aéroallergènes domestiques, sensibilisation.

الملخص

الهدف: الغرض من هذه الدراسة هو تقييم تأثير المواد المسببة للحساسية في البيئة الداخلية على شدة الربو و تحسس الأطفال المصابين بالربو في مدينة عنابة (الجزائر).

الطريقة: شملت دراستنا 68 طفل مصاب بداء الربو و 50 طفل سليم (تتراوح أعمارهم ما بين سنة و 15 سنة). من خلال استبيان قمنا بتقييم شدة الربو و مختلف مظاهر الحساسية. كما تم الحصول على عينات من الدم بغرض الكشف عن العوامل البيولوجية (IgEs، IgEt)، اليوزينيّات)، تليها الزيارة المنزلية لتقييم عوامل الحرارة و الرطوبة بالإضافة الى تقييم التعرض الى الفطريات المنزلية.

النتائج: وجدنا أن معظم الأطفال المصابين بالربو لديهم حساسية وراثية بنسبة % 72,05 و % 33,82 منهم لديهم ربو حاد معتدل. شدة الربو مرتبطة باليوزينيّات ($\chi^2, p = 0.01$)، معدل IgEt ($\chi^2, p < 0.001$) و الحساسية للمواد المثيرة للحساسية. هذا الارتباط، بين شدة الربو و الحساسية يكون الأعلى بالنسبة للعتة ($\chi^2, p < 0,001$ بالنسبة ل *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1) و $p < 0,01$ بالنسبة ل *goides farinae* (d2) و شعر القطط ($p < 0.001$) كما أن جميع منازل الأطفال المصابين بالربو تحتوي على فطريات (خاصة *Cladosporium sp* و *Alternaria*) و التي ترتبط أيضا بالحساسية للفطريات ($\chi^2, p < 0.001$).

الخاتمة: معدل الحرارة الداخلية و الرطوبة في منازل الأطفال المصابين بالربو تعتبر شروط ملائمة لنمو الفطريات و العتة. ان تواجدهم مرتبط بالحساسية للفطريات و شدة الربو. و أخيرا بما أن شدة الربو مرتبطة بالتحسس للمواد المثيرة للحساسية و أن معظم الأطفال لديهم ربو حاد معتدل نستطيع أن نقترح تخفيض من معدل المواد المثيرة للحساسية في البيئة الداخلية و هذا للتخفيض من شدة الربو.

الكلمات الدالة : عنابة (الجزائر)، الربو، الأطفال، IgE، المواد المثيرة للحساسية، الحساسية.

Abstract

Background: The aim of the present study was to assess the role of indoor aeroallergens on asthma severity and sensitization in children from Annaba city (Algeria)

Methods: Our study was concerned 68 asthmatic children and 50 healthy children (aged 1 to 15 years). From a questionnaire, we evaluate asthma severity and the main atopic manifestations. Blood samples were obtained from all children to determine biological parameters (eosinophilia, total and specific IgE to aeroallergens), followed by home visit to assess meteorological parameters and fungal exposure.

Results: We found that the most of our population have a positive family history of atopic disease (72.05 %) and had moderate asthma (33.82 %). Asthma severity was associated with eosinophilia (χ^2 , $p = 0.01$), rate of total IgE (χ^2 , $p < 0.001$) and sensitization to indoor aeroallergens. This association, between the severity of disease and sensitization, was strongest with mites (χ^2 , $p < 0.01$) and pets of cats ($p < 0.001$). Moreover, all homes of asthmatic children contain fungal spores (especially *Cladosporium sp* and *Alternaria sp*) which were also associated with sensitization to fungi (χ^2 , $p < 0.001$).

Conclusion: The average indoor temperature and humidity in homes of asthmatic children represents favorable conditions for mold growth and mites' development. The presence of them, were associated with sensitization to fungi and severity of asthma. Finally, the fact that the severity of disease is related to exposure to aeroallergens and that most asthmatic children had moderate asthma suggests that reducing levels of indoor allergens could reduce the severity of the disease.

Key words: Annaba (Algeria), asthma, children, IgE, indoor aeroallergens, sensitization.

Table des matières

RESUME.....	I
المُلخَص.....	II
ABSTRACT.....	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE I. ASTHME ALLERGIQUE	
1. DEFINITION DE L'ASTHME ALLERGIQUE	3
2. EPIDEMIOLOGIE	4
3. SYMPTOMATOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE	4
4. CAUSES ET FACTEURS DE RISQUES DE L'ASTHME	5
4.1. Facteurs endogènes.....	5
4.2. Facteurs exogènes(environnementaux).....	5
5. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE.....	7
5.1. Phase de sensibilisation	7
5.2. Phase de déclenchement (phase précoce).....	9
5.3.Phase inflammatoire (phase tardive).....	10
6. LES CELLULES IMPLIQUEES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME	13
6.1. Les mastocytes et les basophiles	13
6.2. Les éosinophiles et plaquettes.....	14
7. MEDIATEURS PREFORMES LIBERES.....	14
7.1.L'histamine.....	14
7.2. Les protéoglycanes	15
7.3. Enzymes.....	15
8. MEDIATEURS NEOSYNTHESES LIBERES.....	16
8.1. Les dérivés de la cyclo-oxygénase.....	16
8.2. Les dérivés de la lipoo-oxygénase.....	17
8.3. le PAF acéther.....	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE II. PRINCIPAUX ALLERGENES RESPIRATOIRES RETROUVES DANS LE MILIEU INTERIEUR	
1. LES MOISSURES.....	18
1.1. Structure et généralités.....	18
1.2. Condition de croissance des moisissures.....	20
1.3. Cycle de vie des moisissures	21
1.4. Composants fongiques susceptibles d'entraîner des effets nocifs	22
1.5. Principaux effets et symptômes associés aux moisissures.....	23

1.6. Population à risque	27
1.7. Principales espèces de moisissures rencontrées dans le milieu intérieur	28
2. LES ACARIENS	29
2.1. Généralités	29
2.2. Sensibilisation aux acariens et terrains atopique	31

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE III. ASTHME ALLERGIQUE ET STRESS OXYDANT

1. STRESS OXYDANT ET INFLAMMATION ALLERGIQUE	32
2. LES COSEQUENCES DU STRESS OXYDANT	32
3. PROTECTION ET SYSTEME ANTIOXYDANT.....	33
3.1. Systèmes de défense enzymatiques(primare).....	34
3.2. Systèmes antioxydant non enzymatiques (secondaire).....	34
3.3. Les oligoéléments	34
4. LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDANT	34

PARTIE EXPERIMENTALE : CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES

BUT ET OBJECTIFS.....	36
1. POPULATION D'ETUDE	38
2. QUESTIONNAIRE	38
3. DETERMINATION DES SCORES CLINIQUES	42
4. PRELEVEMENT SANGUIN	42
4.1. Détermination de laconcentration des IgE totaux.....	42
4.2. Dosage des IgE spécifiques aux pneumallergènes(IgEs).....	45
4.3. Détermination de l'éosinophilie.....	49
4.4. Préparation des lysats d'érythrocytes.....	49
4.5. Dosage des protéines.....	50
4.6. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	52
a. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	52
b. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx).....	54
4.7. Dosage de l'interleukine-5 (IL-5).....	55
5. VISITE DES DOMICILES ET ECHANTILLONNAGE DE L'AIR ET DE POUSSIERES	60
5.1. Echantillonnage de l'air	62
5.2. Echantillonnage de surfaces.....	63
5.3. Mise en culture	64
5.4. Identification des spores fongiques	65
a. Examen macroscopique	65
b. Examen microscopique	65
5.5. Détermination des paramètres météorologiques	65
5.6. Analyse statistique.....	66

PARTIE EXPERIMENTALE : CHAPITRE V. RESULTATS & DISCUSSION

1. DESCRIPTION DE LA POPULATION	67
2. SCORES CLINIQUES ET ANCIENNETE DE LA MALADIE	67
3. SCORES CLINIQUES ET PARAMETRES BIOLOGIQUES	71
4. PARAMETRES BIOLOGIQUES ET STRESS OXYDANT	76
5. STRESS OXYDANT ET SCORES CLINIQUES.....	76
6. SENSIBILISATION AUX PNEUMALLERGENES ET SEVERITE DE L'ASTHME	78

7. L'ENVIRONNEMENT DOMESTIQUE ET L'EXPOSITION AUX ACARIENS	80
7.1. <i>Description des habitats.....</i>	<i>80</i>
7.2. <i>Développement des moisissures.....</i>	<i>83</i>
7.3. <i>Sévérité de l'asthme et moisissures</i>	<i>90</i>
7.4. <i>Répartition différentielle des espèces entre zones urbaines et périurbaines</i>	<i>90</i>
8. DISCUSSION	93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	103
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
ANNEXES	113

Liste des figures

FIGURE 01. ILLUSTRATION DE L'OBSTRUCTION BRONCHIQUE	3
FIGURE 02. CLASSIFICATION DES SYMPTOMES DE L'ASTHME ALLERGIQUE	4
FIGURE 03. LES PRINCIPAUX ALLERGENES IMPLIQUES DANS LE DECLENCHEMENT DE L'ASTHME ALLERGIQUE.....	6
FIGURE 04. PHASE DE SENSIBILISATION A L'ALLERGENE INITIEE DANS LES VOIES RESPIRATOIRES.....	8
FIGURE 05. LIBERATION DES MEDIATEURS AU COURS DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE	10
FIGURE 06. LES DEUX PHASES INFLAMMATOIRES PRECOCE ET TARDIVE.....	12
FIGURE 07. REGROUPEMENT DES HYPHES SOUS FORME D'UN MYCELIUM.....	19
FIGURE 08. DEVELOPPEMENT D'UNE SPORE EN MOISSURES.....	20
FIGURE 09. DEPOT DES ANTIGENES DANS L'ARBRE RESPIRATOIRE SELON LE DIAMETRE	24
FIGURE 10. MORPHOLOGIE D'UN ACARIEN	30
FIGURE 11. DOMMAGE CELLULAIRE EN CONSEQUENCE DU STRESS OXYDATIF.....	33
FIGURE 12. SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRE PRIMAIRE ET SECONDAIRE	35
FIGURE 13. SCHEMA GENERALE DU PROTOCOLE DE LA THESE	37
FIGURE 14. PRINCIPE DU DOSAGE DES IGE TOTALES.....	44
FIGURE 15. ETAPES DU DOSAGE DES IGE SPECIFIQUES AUX PNEUMALLERGENES.....	46
FIGURE 16. EVALUATION DES IGE SPECIFIQUES AUX PNEUMALLERGENES.....	48
FIGURE 17. PRINCIPE DE BASE DE LA REACTION DE BRADFORD.....	51
FIGURE 18. COURBE D'ETALONNAGE ETABLI A PARTIR D'UNE SOLUTION MERE DE BSA (1 MG/ML)	51
FIGURE 19. REACTION DU MALONDIALDEHYDE (MDA) ET L'ACIDE THIOBARBITURIQUE	52
FIGURE 20. REACTION DE LA GLUTATHION PEROXYDASE.....	54
FIGURE 21. ETAPES PRINCIPALES DE LA REACTION ELISA	57
FIGURE 22. COURBE D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE DE L'IL-5	58
FIGURE 23. METHODES ADOPTEES DANS LE PRELEVEMENT DES MOISSURES A PARTIR DE L'AIR ET DES SURFACES	61
FIGURE 24. REPARTITION DES PRINCIPALES MANIFESTATIONS ALLERGIQUES RETROUVES DANS LA POPULATION ASTHMATIQUE.....	68
FIGURE 25. VARIATION DES SCORES CLINIQUES SELON L'ANCIENNETE DE LA MALADIE.....	70
FIGURE 26. VARIATION DU TAUX DES IGE TOTAUX SELON LA SEVERITE DE L'ASTHME	73
FIGURE 27. POURCENTAGE DES CAS POSITIFS DES IGE TOTAUX ET DE L'EOSINOPHILIE SELON LES DEUX SCORES.....	74
FIGURE 28. POURCENTAGE DES CAS POSITIFS POUR L'IDÉ TOTAUX ET L'EOSINOPHILIE SELON LES TRANCHES D'AGE.....	75
FIGURE 29. VARIATION DES TAUX DU MDA (A) ET DE LA GPX (B) SELON LA SEVERITE DE L'ASTHME	77
FIGURE 30. NOMBRE DE CAS POSITIFS POUR CHAQUE ALLERGENE CHEZ LA POPULATION ASTHMATIQUE	79
FIGURE 31. QUELQUES PHOTOS PRISES DANS QUELQUES UNS DES HABITATS PRELEVES	82
FIGURE 32. : ASPECTS MACROSCOPIQUE DE 4 ECHANTILLONS DE CUTURES MONTRANT LES COLONIES EN CROISSANCE APTRES 5 JOURS (A1 ET A2) ET 10 JOURS (B1 ET B2) D'INCUBATION RETROUVES DANS LES MAISONS DES ENFANTS MALADES	85
FIGURE 33. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE (G :X40) DE LA CULTURE REALISEE PAR L'IMPACTEUR (DUO SAS 360) DANS LES MAISONS DES ENFANTS MALADES. IDENTIFICATION DE TROIS COLONIES DE CHAMPIGNONS : A : <i>CLADOSPORIUM</i> B : <i>ALTERNARIA</i> C : <i>PENICILLIUM</i>	86
FIGURE 34. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE (G :X40) DE LA CULTURE REALISEE DANS UNE BOITE DE SEDIMENTATION DANS LES MAISONS DES ENFANTS MALADES. IDENTIFICATION DE QUATRE COLONIES DE CHAMPIGNONS : A : <i>CLADOSPORIUM</i> B : <i>MUCORALE</i> C : <i>PENICILLIUM</i> D : <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	87
FIGURE 35. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE (G :X40) DE LA CULTURE REALISEE A PARTIR DES TACHES DE MOISSURES DANS LES MAISONS DES ENFNATS MALADES. IDENTIFICATION DE TROIS COLONIES : A : <i>CLADOSPORIUM</i> B : <i>ACREMONIUM</i> C : <i>RHODOTORULA</i>	88
FIGURE 36. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE (G :X40) DE LA CULTURE REALISEE A PARTIR DE LA POUSSIERE DE LITERIE DANS LES MAISONS DES ENFNATS SAINS. IDENTIFICATION DE DEUX COLONIES A : <i>RHODOTORULA</i> B : <i>PENICILLIUM</i>	89
FIGURE 37. VARIATION DU TAUX DES MOISSURES DANS L'AIR (A) ET DANS LA POUSSIERE INTERIEURE (B) SELON LA SEVERITE DE L'ASTHME ET EN COMPARAISON AVEC LES ENFANTS SAINS	91
FIGURE 38. REPARTITION DES GENRES DE CHAMPIGNONS SELON LES SITES DES HABITATS DES ENFANTS MALADES	92

Liste des tableaux

TABLEAU I. PRINCIPALES MOISSURES RETROUVEES EN MILIEU INTERIEUR SELON LEUR SUBSRATUM DE CROISSANCE	29
TABLEAU II. DILLUTION DE L'IL-5 HUMAINE STANDARD	58
TABLEAU III. DESCRIPTION GENERALE DE LA POPULATION.....	69
TABLEAU IV. VALEURS MOYENNES DES PARAMETRES BIOLOGIQUES MESURES CHEZ LES DEUX POPULATIONS	72
TABLEAU V. DESCRIPTION DES HABITATS POUR LES DEUX POPULATIONS.....	81
TABLEAU VI. REPARTITION DES GENRES DE MOISSURES PRESENTS DANS L'AIR ET LA POUSSIERE INTERIEURE SELON LES DEUX POPULATIONS.....	83

Liste des abréviations

5-HPETE: 5-Hydroxyperoxy éicotétraénoïque

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AGPI: Acide Gras Poly Insaturé

APLV: Allergie de Protéine de Lait de Vache

BHT: Butylhydroxytoluène

BSA: Bovin Serum Albumin

COV: Composés Organiques Volatils

DAG: Diacylglycérol

Der: Dermatophagoides

DTNB: dithionitrobenzoate

ECP: Eosinophil Cationic Protein

EDN: Eosinophil-Derived Neurotoxin

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tetracétique

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EOA: Espèces Oxygénées Activées

EPO: Eosinophil Peroxydase

ETE: Eicotétraénoïque

FcεRI: Récepteur de haute affinité pour les IgE

GINA: Global Initiative for Asthma

GINA: Global Initiative for Asthma

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GPx: Glutathion Peroxydase

GSH: Glutathion

HMW-NCF-A: High Molecular weight-Neutrophil Chemotactic Factor-A

IgE: Immunoglobuline de type E

IgG: Immunoglobuline de type G

IL: Interleukine

INF: Interféron

LT: Leucotriène

LTA: Leucotriène A

LTC: Leucotriène C

MBP: Major Basic Protein Toxic

MDA: Malondialdéhyde

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 α

ODTS: Organic dust toxic syndrome

PAF: Platelet Activating Factor

PGG2: Prostaglandine G2

PGH2: Prostaglandine H2

PGI2: Prostaglandine I2, prostacyclin

SOD: Superoxyde Dismutase

TBA: Thiobarbiturique Acid

TBS: Tris Buffered Saline

TCA: Trichloroacetic Acid

TNF: Tumour Necrosis Factor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

L'asthme, du latin "asthma" signifiant "essoufflement", est défini aujourd'hui comme une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires. Cette maladie se caractérise par de l'hyperréactivité bronchique en réponse à des stimuli spécifiques ou non spécifiques. La sécrétion excessive de mucus, l'épaississement de la paroi des bronches, le remodelage tissulaire aboutissent à l'obstruction bronchique et par conséquent provoquent des difficultés respiratoires graves (Deng et al., 2015). Les symptômes peuvent survenir à différents moments de la journée, à une fréquence variable et bien qu'une multitude de traitements soient disponibles pour soulager les symptômes de la maladie, aucun traitement curatif n'a jusqu'à maintenant vu le jour. Il s'agit d'une pathologie multifactorielle hétérogène, associée à une variété de manifestations cliniques et de réponses thérapeutiques, qui défie encore médecins et chercheurs.

Des études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre l'augmentation de la pollution atmosphérique (comprenant notamment les allergènes) et l'augmentation d'hospitalisation pour exacerbation due à des symptômes d'asthme (Salvador et al., 2016). Cependant, l'intérêt récent pour l'exploration de l'environnement intérieur est progressivement apparu puisqu'un citoyen, dans le monde moderne, passe environ 90% de son temps à l'intérieur des locaux. De plus, les caractéristiques de l'environnement intérieur ont été modifiées par des changements dans les méthodes de vie (introduction de divers animaux devenus domestiques, jouets en peluche ... etc.) et les matériaux de construction (Lynch et al., 2014). L'inhalation préalable ou concomitante de polluants de l'environnement intérieur autres que les allergènes pourrait modifier la réponse bronchique à ces allergènes (Baldacci et al., 2015). Parmi les polluants de l'environnement intérieur, on trouve: les acariens, les moisissures, le tabagisme passif...etc.

Notre projet de thèse consiste à étudier l'impact de l'aérocontamination fongique et les principaux polluants du milieu domestique chez une population asthmatique dans la ville d'Annaba (Nord Est de l'Algérie). Pour se faire notre travail est divisé en deux axes principaux :

Santé: un questionnaire préétabli pour chacun des patients suivit d'une évaluation de la sensibilisation, par la détermination des IgE totaux et spécifiques aux pneumallergènes et de l'éosinophilie; ainsi que le dosage des paramètres du stress oxydant et de l'interleukine-5.

Environnement: évaluation de la qualité de l'air intérieur par la détermination de principales espèces de moisissures rencontrées dans les milieux intérieurs des enfants asthmatiques (évaluation de l'aérocontamination fongique).

La recherche de la relation entre différents paramètres cliniques et la présence de polluants intérieurs (moisissures et acariens) a été réalisée pour savoir l'impact de ces derniers sur le développement de l'asthme chez l'enfant à Annaba, comparativement à des enfants sains.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
ASTHME
ALLERGIQUE

1. Définition de l'asthme allergique:

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes au cours de laquelle interviennent de nombreuses cellules immunitaires, notamment les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T. Cette inflammation entraîne des épisodes récidivants d'essoufflements et de toux, accompagnés le plus souvent de sifflements. Ces symptômes sont généralement associés à une obstruction bronchique.

L'asthme est aussi caractérisé par la production excessive de mucus et par une hyperréactivité bronchique, dans laquelle une obstruction des voies respiratoires est provoquée par la contraction excessive des muscles lisses bronchiques en réponse à la présence d'allergènes ou irritants dans les voies respiratoires. Contrairement à celles des personnes en bonne santé, les bronches des personnes asthmatiques diminuent de calibre (Figure 01) lorsqu'elles sont exposées à certains facteurs déclencheurs. Les bronches des jeunes enfants, étant plus petites, s'obstruent plus facilement (Schatz et al., 2011).

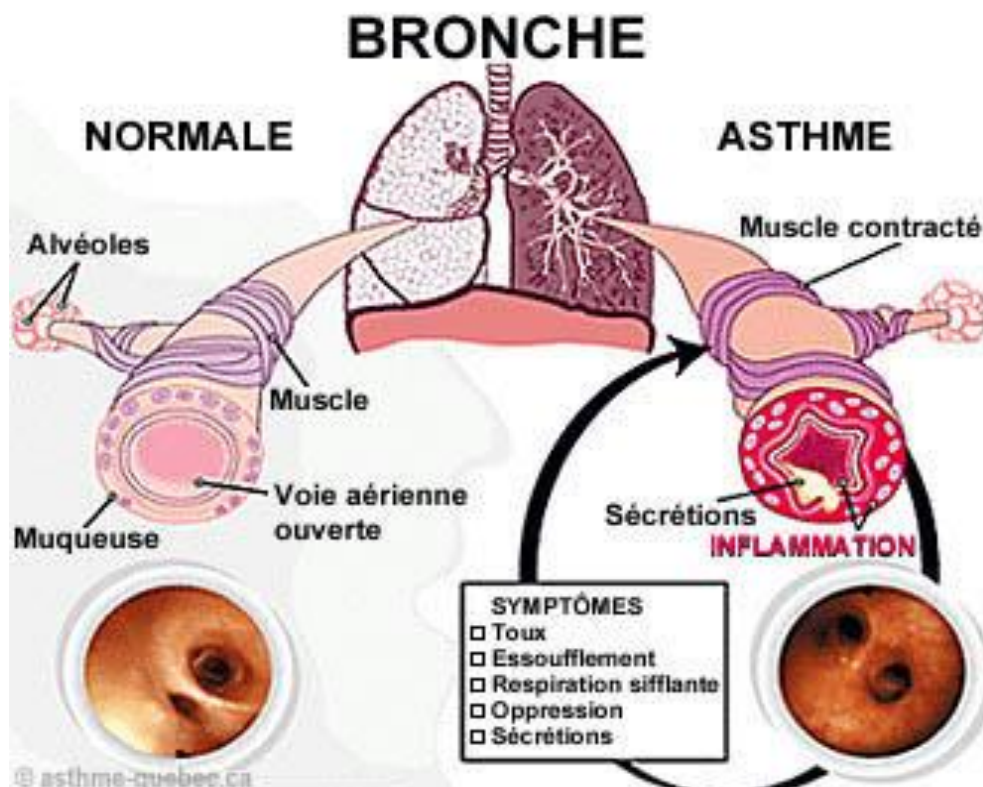


Figure 01: Illustration de l'obstruction bronchique (Delory , 2013).

2. Épidémiologie:

L'asthme constitue un problème de santé publique. Sa prévalence est en nette augmentation au cours des dernières décennies. Il est estimé que plus de 300 millions personnes dans le monde souffrent d'asthme (Akinbami et al, 2012). Cette prévalence augmente surtout chez les enfants. En Algérie la prévalence de l'asthme est estimée à 3,4% (Bourdin et al, 2009), et représente la maladie la plus fréquente chez l'enfant (Anane et al, 2001).

3. Symptomatologie de l'asthme allergique:

Les symptômes majeurs liés à la maladie asthmatique consistent en des épisodes d'oppression respiratoire et de dyspnée sifflante dont la fréquence et l'intensité sont variables et témoignent d'une contraction brutale des muscles lisses commandant le diamètre bronchique, un essoufflement, de la toux et des expectorations visqueuses. Ces symptômes peuvent se manifester plusieurs fois par jour ou par semaine et s'aggravent chez certains sujets lors d'un effort physique ou pendant la nuit (Benayoun et Pretolani, 2003). Ils sont généralement associés à une hyperréactivité et une obstruction bronchique réversible, soit spontanément, soit sous l'effet d'un traitement adéquat fait de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs (Cataldo et al., 2000).

La gravité et la fréquence des symptômes varient d'une personne à l'autre et dépendent notamment du degré de maîtrise de la maladie. Les symptômes sont peu fréquents lorsque l'asthme est bien maîtrisé. La figure 02 représente la classification de l'asthme en fonction de sa sévérité selon la classification de Global Initiative for Asthma (GINA, 2013).

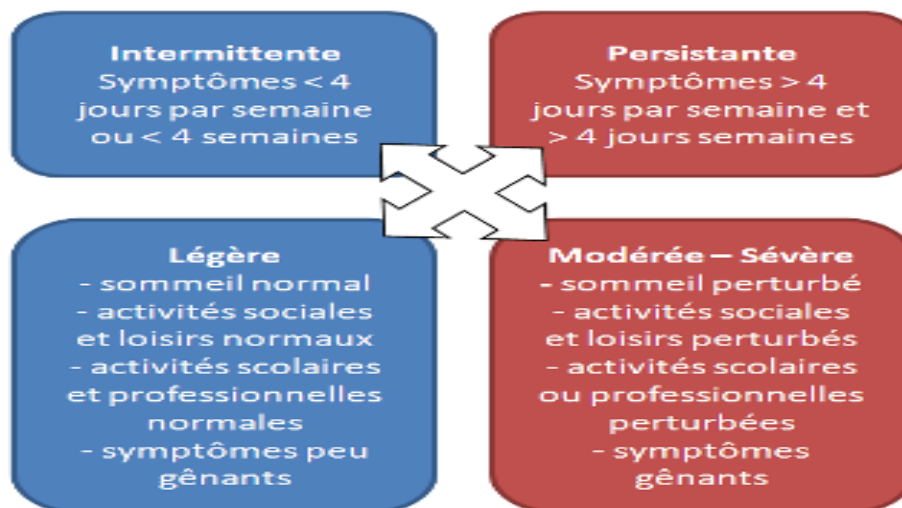


Figure 02: Classification des symptômes de l'asthme allergique (Bousquet J. et al.2008).

4. Causes et facteurs de risque de l'asthme:

L'asthme peut être causé par des facteurs endogènes et par des facteurs exogènes.

4.1. Facteurs endogènes:

Le terrain *atopique* est le principal facteur responsable de l'asthme. L'atopie est une aptitude anormale d'un individu à synthétiser des immunoglobulines (Ig) E spécifiques dirigées contre les allergènes environnementaux entrant en contact avec l'organisme par des voies naturelles. L'atopie est ainsi la première cause de l'asthme, puisqu'elle en est responsable dans environ 80% des cas (Magnan et Vervloet.2000)

L'influence de l'*hérédité* sur la maladie asthmatique est très importante chez les jeunes enfants. Il existe, en effet, une prédisposition héréditaire à la production d'IgE envers les allergènes environnementaux et à l'hyperréactivité bronchique. Plus de 100 gènes ont été associés à l'asthme dans au moins une étude de génétique (Ober et Hoffjan, 2006 ; Kauffmann et *al.*, 2002). La plupart de ces gènes sont des gènes impliqués dans l'inflammation tels que les interleukines-4, -10 et -13 (IL- 4, IL-10, IL-13), l'interféron (IFN) et le Tumeur Necrosis Factor (TNF) (Weiss et *al.*, 2009).

4.2. Facteurs exogènes (environnementaux):

Les facteurs liés à l'environnement sont indispensables à l'apparition des signes cliniques (Figure 03). On retrouve certains de ces facteurs à l'intérieur de nos maisons : les poussières de maison ont été reconnues comme responsables d'un grand nombre des cas d'asthme. Ces poussières sont constituées d'acariens, de bactéries, de fibres végétales, de squames de peau humaine, de poils d'animaux domestiques ou non (le hamster, le cochon d'inde, le cobaye, le lapin, la souris, le rat, le cheval, le chien et le chat), des moisissures provenant de champignons présents à l'intérieur des maisons dans les conduits d'aération et de climatisation ainsi qu'autour des conduites d'eau.

Parmi les allergènes présents dans l'air extérieur, les pollens sont très souvent en cause dans les allergies respiratoires. Mais aussi, la pollution atmosphérique joue un rôle important dans la maladie. Les gaz ou les particules rencontrées dans l'atmosphère sont de deux types : la pollution acido-particulaire (dioxyde de soufre, particules en suspension et aérosols acide) et la pollution photo-oxydante (ozone et dioxyde d'azote). Les principales sources de pollution atmosphérique sont les foyers fixes de combustion, les usines d'incinération des déchets et le trafic automobile.

Le tabagisme est également un cofacteur important. Le tabac provoque une inflammation des voies aériennes avec une hypersécrétion de mucus ainsi qu'une paralysie et une destruction ciliaire. De plus, le tabagisme est responsable d'une augmentation des taux sériques d'IgE (Baena-Cagnani et *al.*, 2009).

Les infections des voies aériennes par des virus ou des bactéries constituent également un facteur important. En fin, l'exercice physique réalisé dans un milieu où l'air est froid ou sec, peut être un facteur provoquant l'asthme d'effort. Il se caractérise par la survenue d'une obstruction bronchique à l'arrêt de l'effort. Il a, par ailleurs, été montré que l'asthme se développe davantage dans les populations d'individus soumis à des pratiques sportives intensives (Randolph, 2006 ; Butcher, 2006).

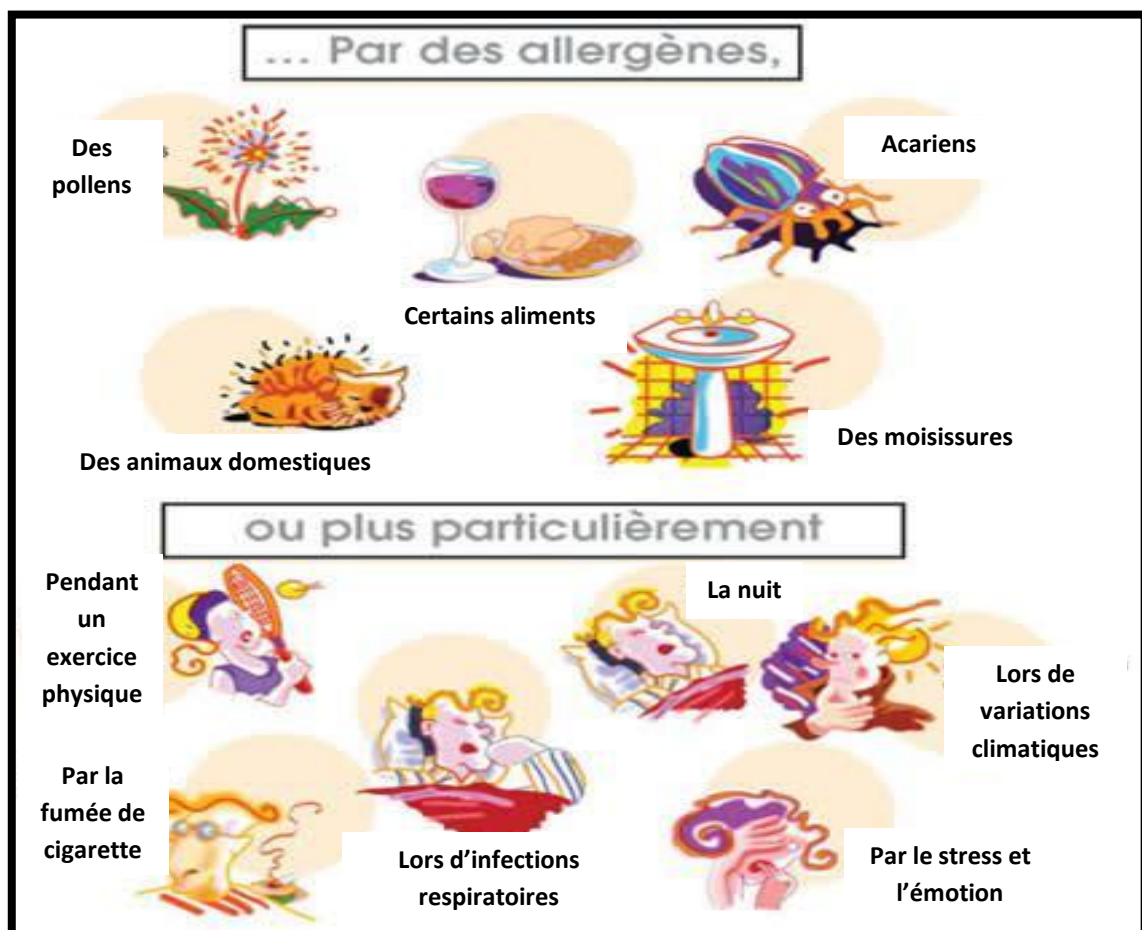


Figure 03: Les principaux allergènes impliqués dans le déclenchement de l'asthme allergique (Teixeira et *al.*, 1995)

5. Physiopathologie de l'asthme allergique:

Dans l'asthme allergique, les processus inflammatoires semblent être le résultat d'une réponse immunitaire inappropriée à l'encontre d'allergènes inhalés. Cette réponse immune se déroule en plusieurs temps :

5.1. Phase de sensibilisation:

L'asthme étant le résultat d'une allergie, il nécessite une phase de sensibilisation à l'antigène (allergène) contre lequel le patient réagit. La sensibilisation a lieu au niveau des voies respiratoires. L'allergène est pris en charge par les cellules dendritiques des voies respiratoires qui s'activent et migrent vers les ganglions médiastinaux qui drainent les poumons. Ces cellules dégradent l'antigène et sélectionnent les fragments peptidiques qui seront liés aux protéines du système majeur d'histocompatibilité de classe II et présentés aux cellules T, initiant la conversion des cellules T CD4 naïves en cellules Th2. Ces dernières produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et interagissent avec les cellules B qui produisent des IgE, qui diffusent localement et gagnent la circulation lymphatique et sanguine pour enfin être distribuées systématiquement (Sokol et al., 2008).

Les IgE se lient aux récepteurs IgE de haute affinité (FcεRI) à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette phase de la réponse allergique est asymptomatique mais met en veille un état inflammatoire prêt à répondre rapidement en cas d'exposition subséquente des voies respiratoires au même allergène (Galli et al., 2008) (Figure 04).

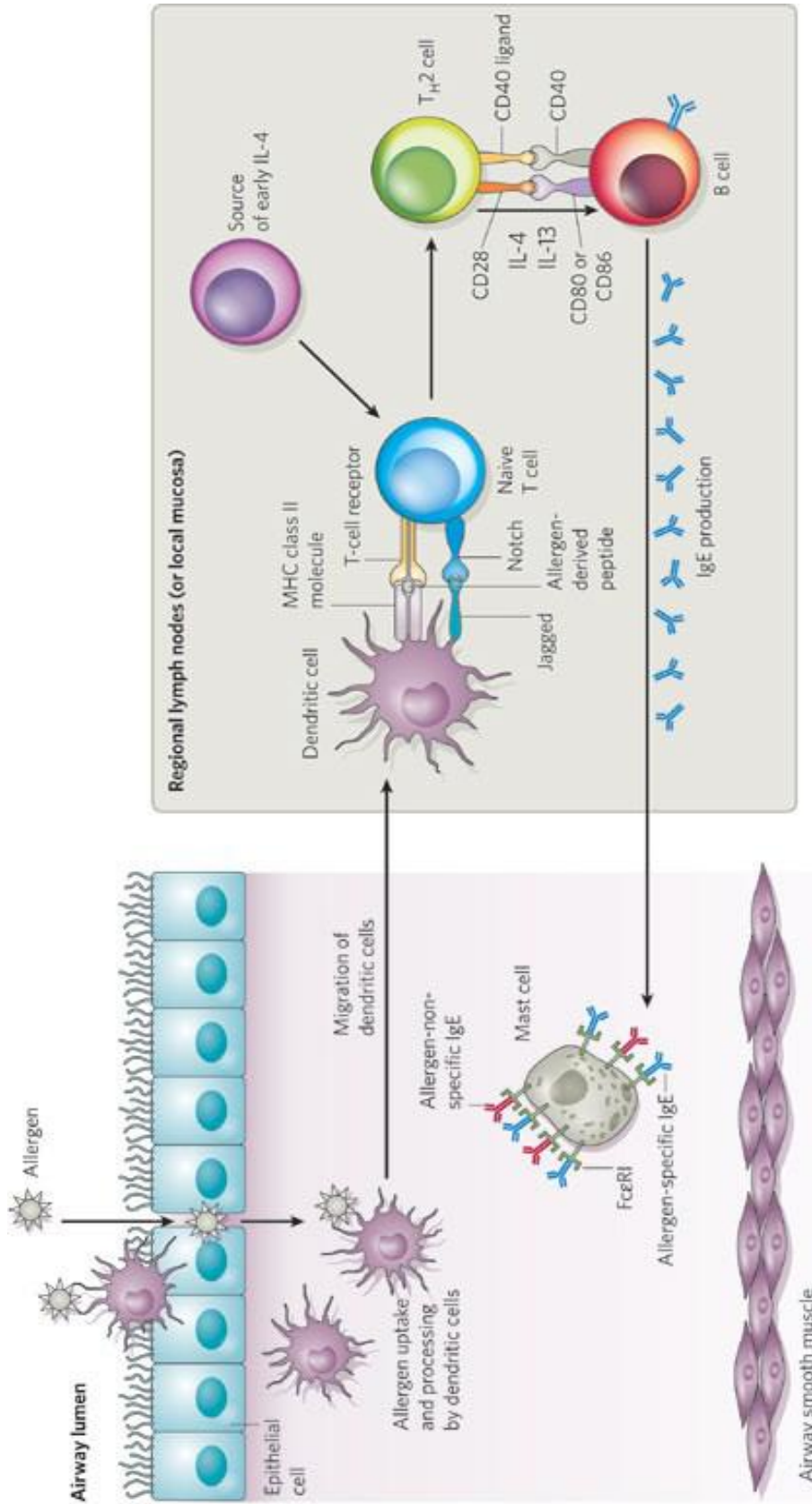


Figure 04: Phase de sensibilisation à l'allergène initiée dans les voies respiratoires.

(Galli et al., 2008)

5.2. Phase de déclenchement (phase précoce):

Une seconde exposition à ces allergènes entraîne alors une réponse humorale secondaire. En effet, lors du second contact avec l'allergène en question, la phase effectrice précoce s'enclenche. L'allergène est capté par les IgE circulants et/ou présents sur les cellules présentatrices d'antigènes, mais aussi par les IgE fixées sur leur récepteur FcεR, lui même présent à la surface des basophiles et des mastocytes. Les mastocytes sont présents tout au long de l'arbre respiratoire principalement au niveau de la sous-muqueuse. Ces cellules, une fois activées, synthétisent des médiateurs inflammatoires qui sont libérés soit par exocytose du contenu de leurs granules soit par libération de médiateurs sans dégranulation. Les médiateurs libérés sont, entre autres, l'histamine, la prostaglandine D2 et les leucotriènes (C4, D4 et E4) (Churg et al., 2007). Ces différents médiateurs sont des facteurs bronchoconstricteurs typiques de l'asthme mais aussi de l'activation de cellules inflammatoires et de l'augmentation de la production de mucus (A l'origine du bronchospasme). Les mastocytes sécrètent également des cytokines telles l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 responsables du développement et du maintien de l'inflammation (Figure 05). Les éosinophiles, les lymphocytes, les macrophages ainsi que d'autres mastocytes provenant de la circulation sanguine sont alors recrutés et persistent sur le site inflammatoire. La capacité des mastocytes et des basophiles à produire de l'IL-4 a été confirmée chez l'homme, en particulier lors d'une activation de ces cellules via les IgE de surface. Au cours d'une telle stimulation, d'autres cytokines peuvent être produites, telle que l'IL-6. Pour ce qui est de l'IL-8 et du TNF α , non seulement ils peuvent être libérés par les mastocytes activés via l'IgE, mais ils existent également constitutivement de façon préformée au sein de la cellule. Chez l'homme, la présence de TNF α biologiquement actif et de son ARNm a également été rapportée au sein de mastocytes cutanés. Plus récemment, il a été montré que l'IL-4 existait également de façon préformée dans les mastocytes. Alors que sa synthèse par les lymphocytes est relativement lente, cette IL-4 est disponible pour une action immédiate et en favorisant le développement des populations Th2 et constituerait alors une boucle d'amplification de la réaction allergique.

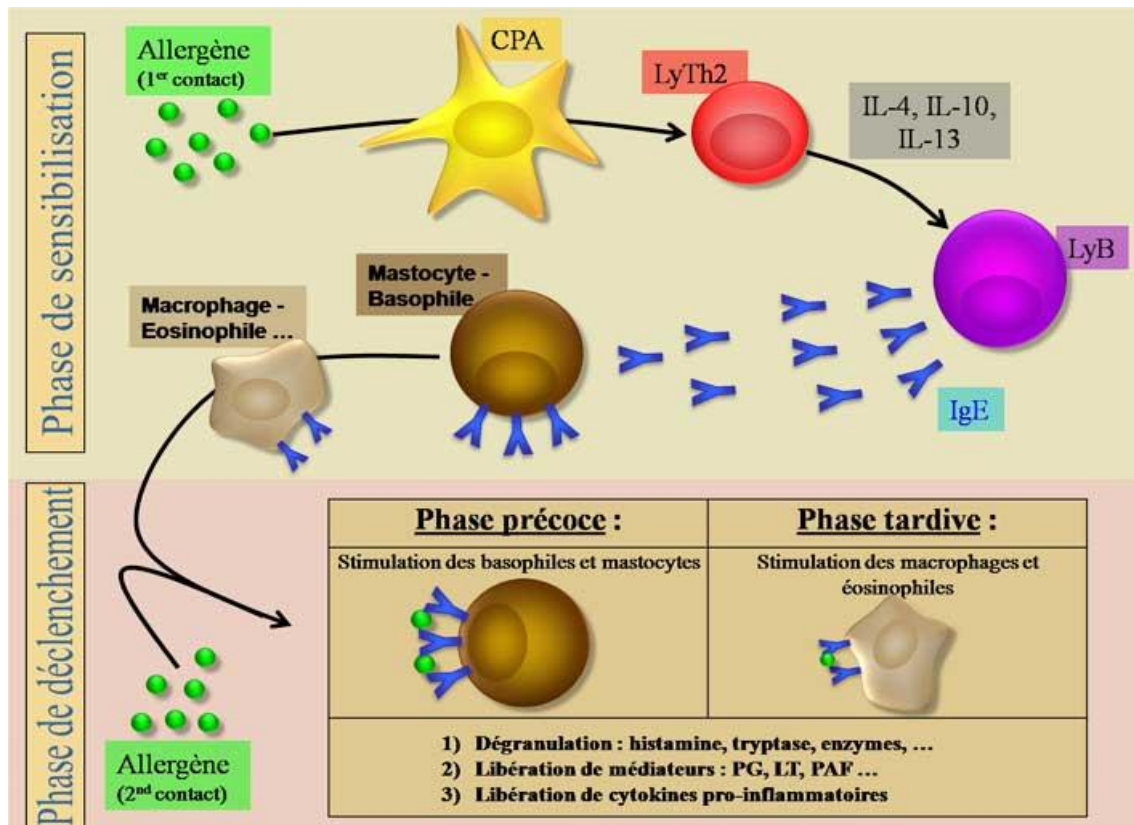


Figure 05 : Libération des médiateurs au cours de la physiopathologie de l'asthme allergique (Nédélec , 2012)

5.3. Phase inflammatoire (phase tardive)

Au cours de l'hypersensibilité immédiate, des médiateurs inflammatoires sont libérés suite à l'activation cellulaire des mastocytes, des basophiles et autres cellules telles que les éosinophiles. Les réactions de la phase tardive sont initiées 4 à 6 heures après le contact avec l'allergène, et persiste 1 à 2 jours. La réaction inflammatoire est caractérisée par l'infiltration des neutrophiles, des éosinophiles, des macrophages, des lymphocytes et des basophiles. La phase tardive peut être initiée aussi partiellement par des cytokines libérées par les mastocytes. Le $TNF\ \alpha$ et l'IL-1 augmente l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, et facilite ainsi l'agrégation des neutrophiles, des éosinophiles et des mastocytes qui caractérisent la réponse tardive. Les éosinophiles jouent un rôle principal au cours de cette phase, où elles représentent environ 30% des cellules recrutées. Le facteur chimiotactique de l'éosinophile, libéré par les mastocytes durant la réaction de sensibilisation, attire un large nombre les éosinophiles dans le site inflammatoire. Une variété ce cytokines libérées dans ce site, tels l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (Holgate et Polosa, 2008), permettent la croissance et la différenciation des éosinophiles. Ces dernières expriment sur leur surface des récepteurs Fc pour l'IgG et l'IgE (Woltmann et al., 2000).

Les éosinophiles activés libèrent plusieurs médiateurs inflammatoires, y compris les leukotriènes, le major basic protein, le platelet activation factor, l'eosinophil cationic protein (ECP) et l'eosinophil derived neurotoxin. Ces médiateurs contribuent à des dommages tissulaires considérables dans la phase tardive. L'afflux des éosinophiles dans cette phase contribue à l'inflammation chronique qui caractérise l'asthme persistant (Maddox et Schmitz, 2005).

Les neutrophiles, autres participants majeurs dans la phase tardive, représentent aussi 30 % des cellules inflammatoires. Ils sont attirés dans le site inflammatoire par le neutrophil chemotactic factor, libéré par les mastocytes. De plus, une variété de cytokines libérées au cours de la phase tardive, tel que l'IL-8, activent les neutrophiles ce qui induit la dégranulation de ces granules et la libération de leur contenu constitué: d'enzymes lytiques, du platelet activating factor et des leucotriènes (Holgate et Polosa, 2006).

Ainsi, durant la *phase tardive* (figure 06), les réponses inflammatoires se développent et apparaissent un œdème de la muqueuse, une augmentation du tonus musculaire et une obstruction bronchique associés à la dégranulation des mastocytes. Cette phase débute trois à six heures après l'exposition à l'allergène et peut persister plusieurs jours en cas d'absence de traitement adéquat. Cette phase est aussi caractérisée par une obstruction bronchique associée à la migration des cellules inflammatoires du sang vers le parenchyme pulmonaire (Wills-Karp, 1999).

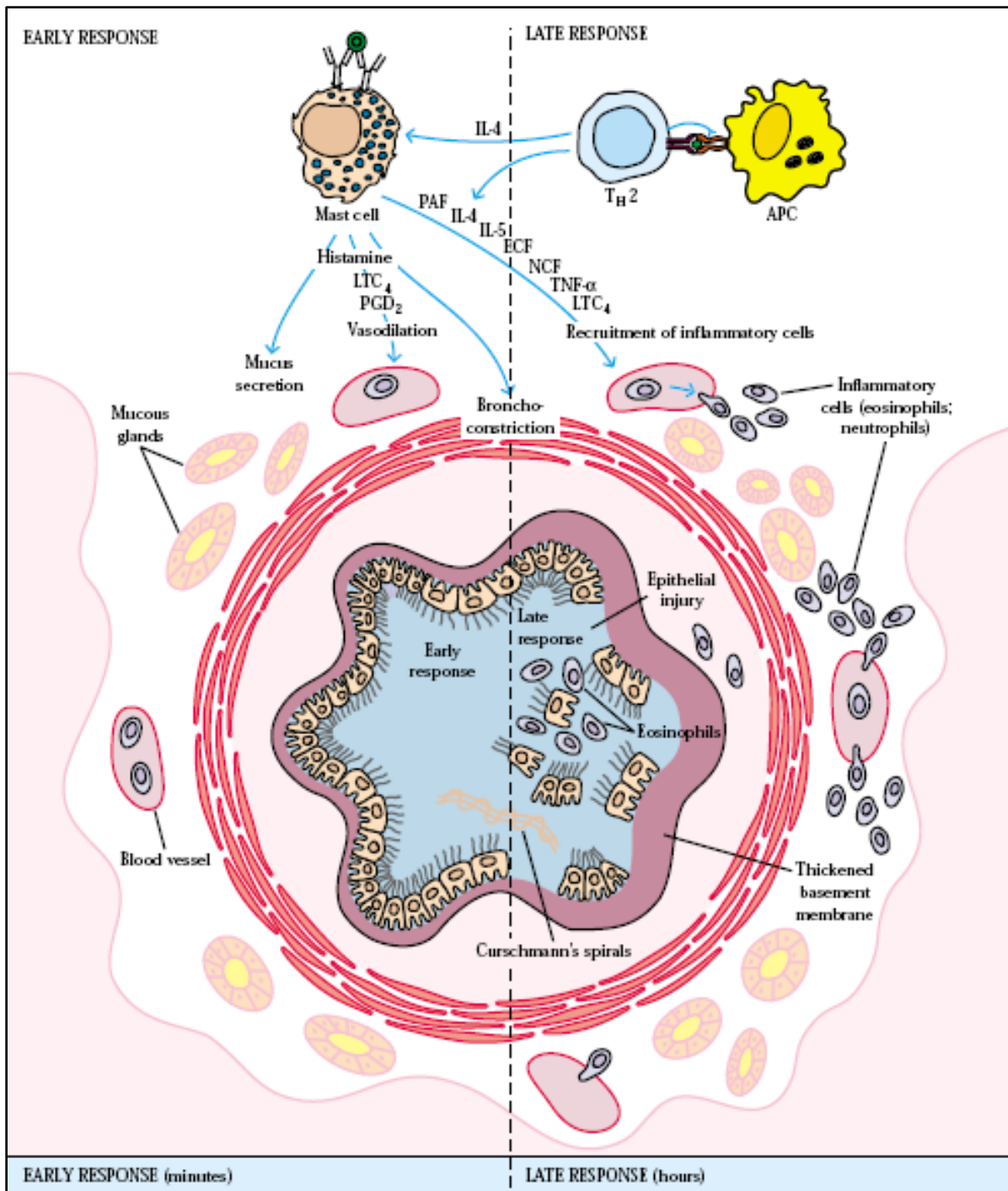


Figure 06: Les deux phases inflammatoires précoce et tardive (Teixeira et al., 1997).

6. Les principales cellules impliquées dans la physiopathologie de l'asthme allergique:

De nombreuses cellules interviennent dans la physiopathologie de l'asthme causant différents dommages dans les voies aériennes en libérant divers facteurs. Ces derniers, sont la cause de la bronchoconstriction, de la sécrétion de mucus, mais également ils en endommagent les nerfs et les cellules épithéliales conduisant à des changements cytologiques et histologiques des parois bronchiques (Fahy, 2009). Ces différents changements sont appelés le remodelage bronchique (Yo et al., 2006). Parmi ces cellules les plus importantes sont:

6.1. Les mastocytes et des basophiles

Les molécules d'IgE secrétées par les plasmocytes vont se fixer sur les cellules effectrices de l'hypersensibilité immédiate: les mastocytes tissulaires et basophiles sanguines.

Les mastocytes sont ubiquitaires et particulièrement abondants dans la peau et les muqueuses. Malgré une concentration sérique peu élevée (0,05 à 1 µg/ml contre 10 mg/ml pour les IgG) (Gould et Sutton, 2008), les IgE occupent en permanence une proportion appréciable de leurs récepteurs grâce à la haute affinité de leur liaison y compris chez les individus non allergiques (Gruber et al., 1988 ; Grattan et al., 1991). Cette observation a été reproduite chez des souris de type sauvage, où l'IgE occupe environ 80% des récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes. La fixation d'IgE stabilise la présence membranaire de son récepteur et régule positivement son expression membranaire (Kubo et al., 2001). Découvert en 1879 par Paul Ehrlich, le polynucléaire basophile, peu représenté dans le sang périphérique et difficile à purifier, fut considéré comme une curiosité et à ce titre largement exclu de l'analyse physiopathologique de la réponse immunitaire. Il se présente comme une cellule ronde, avec peu de projections cytoplasmiques, à noyau polylobé, comportant une chromatine en amas. Les granules cytoplasmiques sont peu nombreux, plus grands que ceux du mastocyte.

Bien que d'origine très différente, les basophiles et les mastocytes présentent un caractère commun consistant en la présence dans leur cytoplasme de nombreux granules très fortement osmiophiles. L'augmentation d'expression du récepteur sur les mastocytes et basophiles cause une exacerbation et la production de médiateurs inflammatoires (comme le MIP-1α) par ces cellules (Schneider et al., 2009; Wang et al., 2006).

6.2. Les éosinophiles et les plaquettes :

Ce sont des cellules ayant à la surface de leur membrane de nombreux récepteurs très variés, et en particulier le récepteur de faible affinité pour l'IgE. Selon le type de récepteur stimulé, l'éosinophile est capable de libérer de nombreux médiateurs comme : MBP (Major Basic protein toxique), ECP, EDN, EPO, PAF et les radicaux libres. Certains de ces médiateurs sont responsables de la cytotoxicité des éosinophiles (Maddox et Schwartz, 2002).

7. Médiateurs préformés libérés:

Parmi les nombreux médiateurs libérés au cours de la physiopathologie de l'asthme, on distingue les médiateurs préformés présents au niveau des granules métachromatiques, denses aux électrons, représentent jusqu'à 40 % environ du volume de la cellule. Ils contiennent :

7.1. L'histamine:

Elle est synthétisée au niveau de l'appareil de Golgi du mastocyte, par décarboxylation de l'acide aminé précurseur, l'histidine. Lors du processus de dégranulation, l'histamine est libérée du réseau de protéoglycane en position extracellulaire par échange cationique. Sa durée de vie est alors de l'ordre de quelques minutes, ce qui suggère un mode d'action plutôt localisé, paracrine. Deux voies catalytiques permettent un métabolisme rapide de cet autacoïde : la méthylation et l'oxydation, qui concernent respectivement 70 et 30 % de l'histamine métabolisée. En dehors de tout contexte pathologique, l'histamine est normalement décelable aux niveaux plasmatique (0,05 à 0,2 ng/ml) et urinaire (5 à 15 $\mu\text{g}^{-1}/24\text{ h}$). Ces niveaux sont augmentés lors de réactions anaphylactiques.

Ses effets pro-inflammatoires sont nombreux et font intervenir des récepteurs cellulaires spécifiques. Deux sous-classes ont été bien étudiées, sur les trois existantes : H_1 et H_2 . Le récepteur de type H_1 est responsable de la plupart des réactions allergiques dues à l'histamine, telles que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'initiation des réflexes axoniques et la contraction musculaire lisse.

Les effets liés aux récepteurs H_2 ne semblent pas déterminants dans les réponses inflammatoires pulmonaires. Un troisième type de récepteur pour l'histamine, le récepteur H_3 , a été décrit en 1987, est d'abord localisé au niveau du système nerveux central. Ce récepteur serait potentiellement impliqué dans l'activation des éosinophiles humains dépendante des mastocytes (Schneider et al., 2005).

L'histamine régule la production des cytokines, telles que l'IL-6, l'IL-3, l'IL-2 et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α). En retour, le réseau des cytokines influence la production d'histamine : l'IL-3 l'IL-5 et l'IL-8 en augmentant sa biosynthèse (David et Guenounou, 1996).

7.2. Les protéoglycanes:

Ils représentent un noyau peptidique, composé d'une succession de résidus sérine et glucine, sur lequel viennent se greffer de longues chaînes radicalaires de carbohydrates composées de sucres aminés et sulfatés. Les protéoglycanes composent la trame des granules mastocytaires, à laquelle se lient d'autres médiateurs préformés. L'héparine est un des éléments essentiels des protéoglycanes acides auxquels est associée l'histamine par liaison ionique. L'héparine est présente dans le mastocyte humain, alors que dans le cas du basophile, il s'agit d'un chondroïtine sulfate (David et Guenounou, 1996).

7.3. Enzymes:

Parmi les enzymes associées aux granules, les protéases neutres catalysent le clivage des liaisons peptidiques et constituent la composante protéique prédominante des granules sécrétoires. Elles s'avèrent être un marqueur spécifique des mastocytes, voire des sous-types mastocytaires. Chez l'homme, prédominent plutôt les enzymes à activité tryptique : tryptase et carboxypeptidase (David et Guenounou, 1996).

La tryptase:

Représente 20 à 50 % des protéines mastocytaires. Elle se trouve en des quantités de l'ordre de 10 à 12 pg/mastocyte pulmonaire humain. Sa localisation cellulaire est le granule où elle est stockée en association avec l'héparine. Il s'agit d'un tétramère de 134 kD, où chacune de ces sous-unités présente un site actif enzymatique et des sites antigéniques en commun. La structure tétramérique est la forme biologiquement active et maintenue par l'association ionique avec l'héparine. La demi-vie de la tryptase est de 1,5 à 2,5 h dans la circulation. Elle est donc significativement plus élevée que celle de l'histamine (David et Guenounou, 1996).

La carboxypeptidases:

Sont des métalloexopeptidases intragranulaires qui clivent les fonctions carboxyle. Chez l'homme, cette enzyme se retrouve exclusivement au niveau des mastocytes muqueux (David et Guenounou, 1996).

La chymase est une sérine protéase apparentée à la chymotrypsine. Chez l'homme, seule une sous-population mastocytaire en contient et elle n'est représentée qu'à 10 % dans les poumons. La chymase humaine est un monomère de 30 kDa, stockée probablement en association avec la trame protéoglycanes granulaires (David et Guenounou, 1996).

Les hydratases acides sont la 3-hexosaminidase, la β -glucuronidase, la β -D-galactosidase et l'arylsulfatase. La 3-hexosaminidase est une exoglycosidase, libérée parallèlement à l'histamine. Une partie reste associée aux lysosomes secondaires des mastocytes. Elle est impliquée dans la dégradation des glycoprotéines et des protéoglycanes, comme la β -glucuronidase, enzyme lysosomale également dans les neutrophiles et les macrophages (David et Guenounou, 1996).

La superoxyde dismutase est une enzyme oxydative cytoplasmique qui permet la génération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir d'anions superoxyde. La peroxydase associée à l'héparine transforme les acides gras polyinsaturés tels que l'acide arachidonique en médiateurs lipidiques (David et Guenounou, 1996).

Les peptides chimiotactiques sont contenus dans les granules. Parmi eux le térapeptide chimiotactique pour l'éosinophile (ECP-A), des peptides de poids moléculaire intermédiaire chimiotactiques pour l'éosinophile, un peptide chimiotactique de faible poids moléculaire et le facteur chimiotactique de haut poids moléculaire pour le neutrophile (HMW-NCF-A) (David et Guenounou, 1996).

8. Médiateurs néosynthétisés libérés:

Lors de l'activation des mastocytes, l'acide arachidonique est libéré des sites intracellulaires de stockage et des phospholipides membranaires, sous l'effet de processus enzymatiques impliquant les phospholipides A et C et les diacylglycérol (DAG) lipase et/ou des lipases ayant pour substrats des lipides neutres. L'acide arachidonique peut être métabolisé selon deux voies, celle de la cyclo-oxygénase qui aboutit à la formation des dérivés éicosatétraénoïque (ETE) et aux leucotriènes (LT) (David et Guenounou, 1996).

8.1. Les dérivés de cyclo-oxygénase: Sous l'effet de la cyclo-oxygénase l'acide arachidonique est converti en prostaglandines instables. A la PGG₂ succède la PGH₂ par l'action d'une PGH₂ synthétase. L'isomérisation de la PGH₂ donne des produits biologiquement actifs tels que la PGI₂ ou prostacycline. Ils subissent une dégradation non enzymatique vers des produits stables mais inactifs, la 6-céto-PGFI et le TxB₂.

La prostaglandine D₂ est un médiateur majeur des mastocytes humains tandis que le thromboxane A₂ est produit en faibles quantités. Par contre, le basophile ne synthétise pas de prostaglandine (David et Guenounou, 1996).

8.2. Les dérivés de la lipo-oxygénase: Sous l'effet de la lipo-oxygénase, l'acide arachidonique qui est un acide éicotétraénoïque (ETE) va être converti en 5-hydroxyperoxy-ETE (5-HPETE). Une partie du 5-HPETE peut se transformer en 5-HETE et aboutit au leucotène A₄ (LTA₄). Le LTA ne peut subir l'action de la LTC synthétase en présence de glutathion, ce qui conduit à la production des peptidylleucotriènes C₄, D₄, E₄. Les basophiles humains surtout et les mastocytes des parenchymes pulmonaires à un degré moindre produisent essentiellement du LTC₄ alors que les mastocytes cutanés n'en produisent pas (David et Guenounou, 1996).

8.3. Le PAF acéther : Un autre médiateur lipidique, doté de puissantes activités pro-inflammatoires et spasmogéniques, est le facteur d'activation plaquettaire (PAF ou PAF-acéther). Contrairement aux éicosanoïdes, produits du métabolisme d'acides gras dérivés des stocks de phospholipides, le PAF est lui-même un phospholipide éther.

Il est synthétisé, mais non libéré par le mastocyte humain. Sa production par le basophile humain est inexistante. A durée de vie courte, son inhalation induit une augmentation de la bronchoconstriction et de l'hyperréactivité des voies aériennes (David et Guenounou, 1996).

CHAPITRE II
PRINCIPAUX
ALLERGENES
RESPIRATOIRES
RETROUVES DANS
LE MILIEU
INTERIEUR

Durant ces dernières années, la qualité de l'air intérieur dans les maisons a fait l'objet d'une préoccupation croissante. La maison familiale peut parfois devenir une source de contamination pour les occupants, où l'homme passe la plus grande partie de son temps à l'intérieur de locaux (de 70 % à 90 %) (Host et al., 2005). Les principaux contaminants de l'air intérieur sont de nature biologiques (moisissures, les animaux domestiques et les acariens) ou physico-chimique (fumée de tabac, produits de combustion et composés organiques volatils). Ces sources intérieures sont imputables aux occupants et à leurs activités (bricolage, ménage, utilisation d'appareils de combustion, présence d'animaux domestiques) mais aussi à certains matériaux de construction et au mobilier. Les teneurs en polluants sont par ailleurs conditionnées par le taux d'humidité, la température et le taux de renouvellement de l'air (ventilation).

Parmi les troubles associés à une mauvaise qualité de l'air intérieur, les pathologies du système respiratoire (rhinites, bronchites, asthme...) sont celles le plus souvent observées. Parmi ces manifestations, beaucoup sont de nature allergique.

1. Les moisissures

1.1. Structure et généralités

Les champignons, dont font partie les moisissures, sont des organismes Eucaryotes aérobies. Ni plantes ni animaux, ils constituent un règne à part (Eumycota) dans le monde vivant (Kendrick, 2000). Le terme familier de « moisissures » fait généralement référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, qui peut être observée à divers endroits, comme sur les aliments entreposés depuis un certain temps ou dans les lieux humides d'une habitation, par exemple. Ils sont exempts de chlorophylle, et ne peuvent pas, comme les plantes, synthétiser leur matière organique à partir du CO₂ atmosphérique. Ils doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau et les substances organiques et minérales nécessaires à leurs propres synthèses; ils sont donc hétérotrophes. Pour cela, ils dégradent la matière organique complexe grâce à l'excrétion d'enzymes et d'acides puis ils en absorbent les composants digérés (Chabasse et al., 1999). Tout ceci s'effectuant à travers la paroi perméable de leur appareil végétatif. Ils peuvent être saprophytes s'ils se développent sur de la matière organique inerte (c'est le cas des moisissures) ou parasites s'ils se développent sur du vivant. Certains sont symbiotiques car ils vivent en association à bénéfice réciproque avec d'autres organismes. L'exemple classique est celui des lichens qui sont une association algues-champignons (Adl et al. 2005).

L'appareil végétatif est constitué de filaments ou hyphes qui s'accroissent par leur sommet et dont l'ensemble constitue un réseau appelé mycélium (Figure 07). Les taches ou colonies que l'on voit à la surface des matériaux moisiss sont essentiellement constituées de mycélium. Chez les levures cet appareil végétatif est unicellulaire (Chabasse et al., 2002)

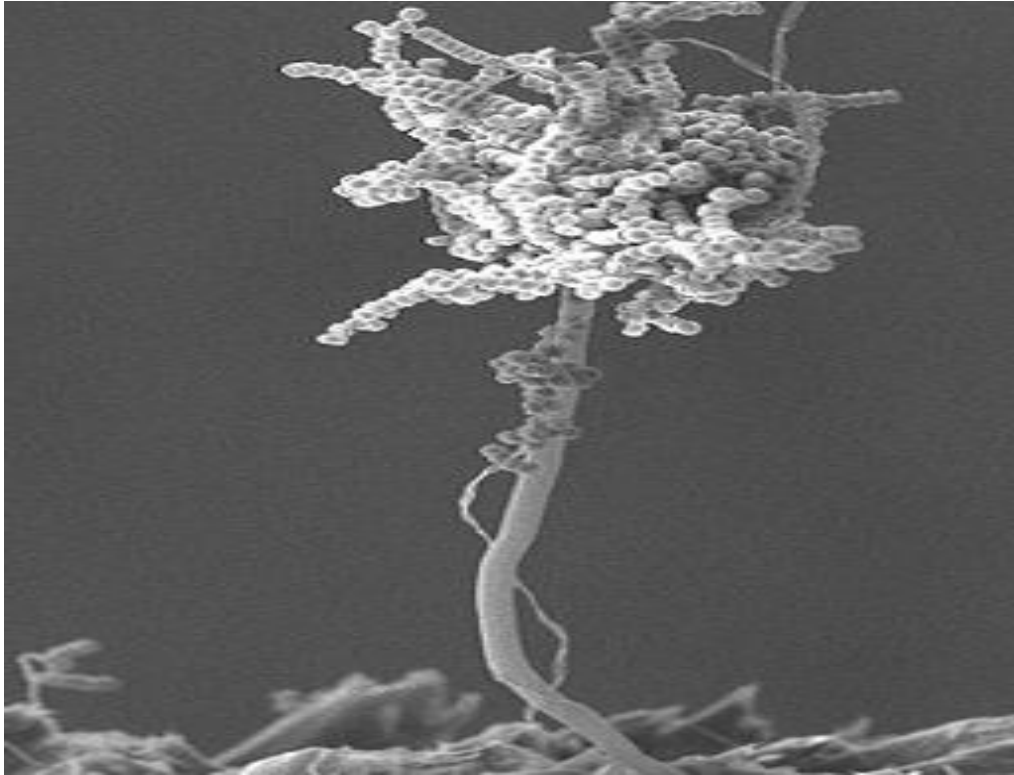


Figure 07 : Regroupement des hyphes sous forme d'un mycélium (Basset et bouvet, 2007)

Les champignons se multiplient par des spores formés à partir du mycélium et qui sont des organes de résistance, sortes de graines microscopiques, servant à la propagation lorsqu'elles se détachent (Figure 08). Elles sont ensuite dispersées par les courants d'air, par l'eau de ruissellement ou en se collant sur des vecteurs : objets, plantes, animaux (insectes, acariens) ou l'homme. L'air et les surfaces de notre environnement extérieur et intérieur sont ainsi naturellement chargés de spores à l'état latent. En conditions favorables d'humidité les spores peuvent germer et redonner du mycélium qui pourra à son tour sporuler et recontaminer. Elles peuvent également élaborer des substances chimiques susceptibles de demeurer à l'intérieur des spores, d'être libérées dans les matériaux qu'elles colonisent (ex. : mycotoxines), ou encore d'être libérées dans l'air ambiant (ex. : composés organiques volatils).

La reproduction peut être à caractère sexué (champignon téléomorphe ou parfait) et/ou asexué (champignon anamorphe ou imparfait). Les deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon dit holomorphe.

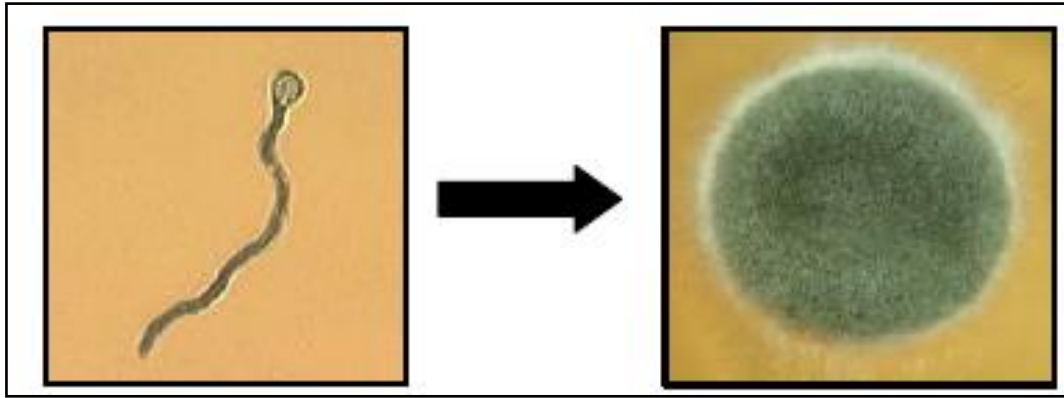


Figure 08 : Développement d'une spore en moisissures (Basset et bouvet, 2007)

1.2. Conditions de croissance des moisissures

Dans leur milieu naturel, la plupart des moisissures sont saprophytes, tirant leur nourriture de matières organiques mortes ou plus ou moins décomposées. Même si toute matière organique peut constituer un substrat de croissance pour les moisissures, les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement. Certaines moisissures requièrent un taux d'humidité très élevé pour croître tandis que d'autres préfèrent des taux beaucoup moins élevés. Certaines peuvent croître sur des feuilles en décomposition, substance humide et facilement pénétrable, tandis que d'autres s'attaqueront à des matières plus ligneuses, telles le bois ou même à des matières animales chitineuses tels les cheveux et les ongles. De plus, la compétition inter-espèces procurera un avantage aux moisissures les mieux adaptées, référant à la notion de niches écologiques particulières pour la croissance optimale de chaque type de moisissure (Robbins *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 1988). Dans le milieu intérieur, les moisissures peuvent se retrouver sur des aliments destinés à la consommation humaine ou animale ainsi que sur des objets faits de matériaux cellulosiques (coton, papier, bois) ou d'origine animale (cuir). Tel que précisé précédemment, la température normalement rencontrée dans un environnement intérieur permet la germination, la croissance et la prolifération de certaines

moisissures. Plusieurs d'entre elles sont d'ailleurs adaptées aux conditions de l'environnement intérieur et croissent bien sur les matériaux de construction (Gravensen *et al.*, 1999). Selon certains auteurs, une trentaine de genres y sont observés de façon régulière en milieu intérieur contaminé, les plus fréquents étant les *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Alternaria* (Hamilton et Eggleston, 1997 ; Husman, 2000 ; Strachan *et al.*, 1990).

Lorsqu'elle se dépose sur une surface, la spore a besoin de trois principaux éléments pour germer:

- les éléments nutritifs nécessaires (de la matière organique, notamment la cellulose),
- l'eau en quantité suffisante,
- et une température appropriée (entre 10 et 40°C).

1.3. Cycle de vie des moisissures

Le réservoir naturel des moisissures se situe à l'extérieur, sur les végétaux, la matière organique en décomposition, à la surface d'eau stagnante ainsi que dans le sol ou à la surface de ce dernier. Lorsque les conditions le permettent, les moisissures produisent, à maturité, des spores qui peuvent être transportées par les courants d'air ou par les humains et les animaux domestiques et se retrouver éventuellement dans les maisons et les édifices. Dans les climats tempérés, c'est durant la saison de croissance des végétaux et quelque temps après celle-ci, que le nombre de spores se trouvant à l'extérieur est le plus élevé (Who, 2000). Ces spores sont une forme latente des moisissures. La dispersion des spores peut se faire sur de grandes distances. Tout comme en milieu extérieur, le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenche par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées (Kendrick, 1999). Chaque moisissure produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, appelé sporée, se présente très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de formes relativement constantes ce qui, dans

bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (ACGIH, 1999). Le diamètre des structures fongiques de reproduction varie entre 2 et 200 μm , bien qu'il se situe pour une forte proportion des spores entre 2 et 20 μm (WHO, 2000). Certaines spores se retrouvent à l'intérieur de structures fongiques spécialisées qui peuvent mesurer jusqu'à 250 μm de diamètre.

Tous les types de spores pourront dans des conditions favorables, recommencer un cycle de vie, soit à proximité du thalle original ou même à forte distance de celui-ci, dans les jours ou les mois suivant sa production.

1.4. Composants fongiques susceptibles d'entraîner des effets nocifs

Diverses composantes fongiques sont susceptibles d'entraîner des effets nocifs chez un individu exposé. Il s'agit de substances élaborées par les moisissures (ex. : mycotoxines, composés organiques volatils) ou d'éléments constituant les parois des spores et du mycélium (ex. : $\beta(1,3)$ glucanes). Les structures fongiques (ex. : spores) non viables d'une espèce donnée peuvent être tout aussi nocives (allergènes, irritantes ou toxiques) que ses structures viables (ACGIH, 1999).

Les mycotoxines : Il s'agit de métabolites secondaires peu volatils, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. À l'heure actuelle, seules certaines espèces de moisissures sont connues comme ayant la capacité de produire des toxines. Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence d'autres espèces en compétition (Hendry et Cole, 1993).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce, même lorsque les éléments fongiques ne sont plus viables. Il faut toutefois noter qu'il n'existe actuellement pas de données sur la durée précise de cette toxicité. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu'à 400 mycotoxines répertoriées (Etzel, 2002). La taille des particules les contenant (ex. : spores, fragments mycéliens) ou sur lesquelles elles sont adsorbées (ex. : poussières) déterminera la profondeur de la pénétration des substances toxiques dans l'arbre bronchique.

Des études effectuées en laboratoire ont démontré que la majorité des mycotoxines sont de puissants cytotoxiques qui interfèrent à plusieurs niveaux de la vie cellulaire. Par exemple, il est reconnu que certaines mycotoxines, lorsque inhalées, peuvent détruire les macrophages au

niveau pulmonaire (Lee *et al.*, 1999 ; Mason *et al.*, 1998). Certaines toxines attaquent l'intégrité de la structure de l'épithélium pulmonaire permettant à la moisissure de coloniser les cavités alvéolaires et dans les cas les plus sévères, notamment chez les personnes sévèrement immunodéprimées, de traverser l'épithélium, donnant ainsi lieu à une infection. Ces différents modes d'action ont des effets délétères sur les voies respiratoires et peuvent mener à l'exacerbation de l'asthme, à des infections fongiques (chez les personnes immunodéprimées), ou encore à des infections secondaires, en partie dues aux effets immunosuppresseurs des mycotoxines (Rieman et Bryan, 1979).

Les glucanes ($\beta(1-3)$ glucanes) : Il s'agit de polymères du glucose faisant partie de la membrane cellulaire de la majorité des moisissures, pouvant être associés à des molécules de chitine ou de mannane. Ces sucres complexes peuvent, dans certains cas, avoir des effets immunogènes et stimuler la fonction des macrophages et des neutrophiles. Ils pourraient être impliqués dans le processus inflammatoire lié à la pneumonite en déclenchant la production d'IgG spécifiques. Les glucanes feraient aussi partie du mélange complexe lié à l'apparition du syndrome toxique (ODTS) (ACGIH, 1999).

Les composés organiques volatils (COV) : Le métabolisme des moisissures produit une quantité importante de composés organiques volatils (COV) odorants : limonène, acétone, méthylcétone, butanone, hexanone, octanone, etc. Les groupes de COV, tels les alcools, les aldéhydes et les cétones, sont responsables de l'odeur caractéristique associée aux moisissures. Ainsi, le seuil de détection olfactive très faible de certains de ces COV permet de déceler des odeurs de « moisi » bien avant l'apparition des signes visibles du développement mycélien sur les matériaux de construction (Déoux, 2001). Des symptômes d'irritation des yeux, du nez et de la gorge ont souvent été rapportés en présence de fortes odeurs produites par une croissance abondante de moisissures (ACGIH, 1999).

1.5. Principaux effets et symptômes associés aux moisissures

Pour que les occupants soient exposés, il est nécessaire que les particules fongiques (spores, fragments ou métabolites fongiques), viables ou non, soient émises dans l'air puis inhalées, qu'elles entrent en contact physique direct avec la peau ou les muqueuses ou encore, qu'elles soient ingérées ; ce dernier type d'exposition est toutefois beaucoup moins fréquent dans les cas de contamination de l'air intérieur. Ces particules fongiques peuvent être en suspension seules ou portées par des poussières contaminées (ACGIH, 1999).

Lorsqu'elles sont inhalées, les particules se déposent à différents niveaux de l'arbre bronchique selon leur diamètre (figure 09).

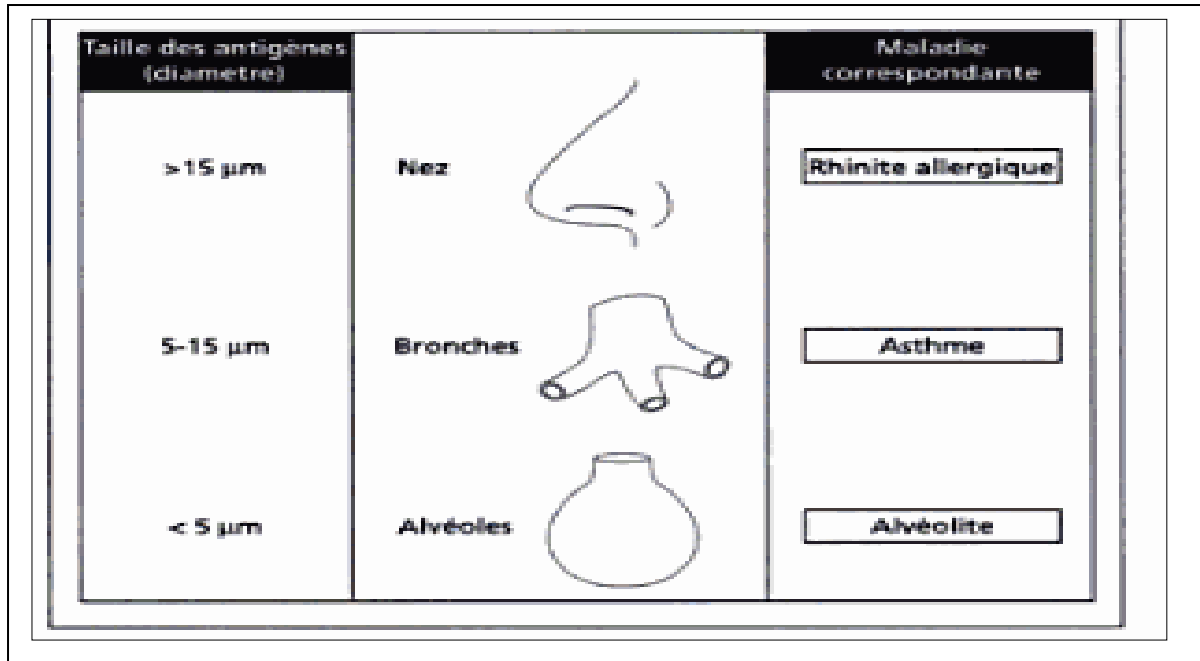


Figure 09: Dépôt des antigènes dans l'arbre respiratoire selon le diamètre (Hendry et Cole, 1993).

Celles dont le diamètre est de 2 à 4 µm auront tendance à se loger au niveau des alvéoles pulmonaires tandis que les particules de 10 à 60 µm de diamètre demeureront davantage au niveau des voies respiratoires supérieures : les bronches et le nez (Hendry et Cole, 1993). Il est de plus reconnu que les expositions répétées augmentent les risques pour la santé (Johanning, 1998).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données fiables permettant d'établir un seuil au-dessous duquel il n'y a pas d'effet sur la santé, que ce soit pour l'irritation, l'hypersensibilité ou la réponse toxique (ACGIH, 1999; NYC, 2000), pas plus qu'il n'existe de liste de référence permettant d'évaluer le niveau de risque pour la santé selon une espèce de moisissures donnée.

De fait, pour une personne allergique, déjà sensibilisée aux moisissures, la majorité des espèces peut poser un risque de réaction même à de faibles concentrations. D'autre part, dans le cas des effets toxiques, les personnes allergiques comme celles non allergiques peuvent être affectées.

- **Les effets de type allergiques**

Les réactions allergiques provoquées par l'inhalation de spores fongiques constituent un problème de santé reconnu par les cliniciens depuis des décennies (Roitt *et al.*, 1998). La rhinite allergique et l'asthme sont des exemples de maladies de type allergique associées entre autres à une exposition aux moisissures. Les symptômes les plus couramment associés à ces réactions allergiques sont le nez qui coule, l'irritation des yeux, la toux, la congestion et l'aggravation de l'asthme (NYC, 2000).

Il est à noter qu'un individu prédisposé aux allergies pourra être sensibilisé à une ou plusieurs espèces de moisissures. Une fois sensibilisé à une moisissure donnée, le sujet fera une réaction allergique en présence de cette moisissure particulière ou, parfois, réagira à une autre espèce du même genre.

En pratique, le seuil de réactivité varie d'un individu à l'autre ainsi que selon le type de moisissure pour un même individu (Rose et Friedman, 1997). Il a aussi été démontré que la sévérité de la réaction n'est pas nécessairement proportionnelle à la dose d'exposition (Klanova, 2000), bien qu'il existe probablement des seuils d'exposition sous lesquels les sujets sensibilisés ne réagissent pas.

- ✚ **Les effets irritatifs**

Les symptômes d'irritation des yeux, du nez et de la gorge ont souvent été associés à la présence d'une croissance de moisissures à l'intérieur. Par contre, le mécanisme causal exact à l'origine des symptômes ressentis ou rapportés n'a pas encore été établi avec certitude. L'hypothèse généralement retenue est celle de l'existence d'un phénomène d'irritation mécanique due aux particules que sont les spores et les fragments fongiques dans l'air venant en contact direct avec les muqueuses, combiné à une irritation chimique due aux produits irritants ou toxiques contenus dans les spores (Smith et Lumley, 1996).

Les produits volatils (MCOV) émanant des moisissures croissant sur les matériaux de construction pourraient théoriquement causer une irritation chimique, sans que des spores aient été en contact direct avec les muqueuses (Verhoeff et Burge, 1997) tandis que les glucanes de la paroi des moisissures pourraient provoquer l'irritation des muqueuses, causer la toux et la démangeaison de la peau (Verhoeff et Burge, 1997; Rylander 2000).

Les effets infectieux

Peu de moisissures parmi celles croissant sur les matériaux de construction ou dans les systèmes de ventilation, peuvent être à l'origine d'infections. L'aspergillose invasive¹⁴ survenant en milieu hospitalier (aspergillose nosocomiale) est cependant une infection relativement bien connue. Une fois inhalées, les conidies d'*Aspergillus* peuvent entraîner, chez les populations immunodéprimées ou fortement débilitées de ce milieu, une invasion des tissus du poumon (aspergillose). Une exposition à cet agent pathogène peut avoir des conséquences très graves voire même fatales pour les personnes sévèrement immunodéprimées. Le diagnostic clinique d'aspergillose pulmonaire invasive demeure difficile à établir puisque les premiers signes ne sont pas spécifiques et que la moisissure est rarement isolée dans les expectorations (Santé Canada, 2001). L'aspergillose provoque des infiltrats pulmonaires pouvant évoluer vers la consolidation ainsi qu'une éosinophilie (excès de cellules éosinophiles dans le sang). La dissémination à d'autres organes est fréquente chez les cas graves. La manifestation clinique et la gravité dépendent en grande partie de l'état immunologique du patient (Santé Canada, 2001).

Une fois introduites au fond des alvéoles de certains sujets, certaines espèces de moisissures se multiplient et, au lieu de traverser l'épithélium pulmonaire, forment un amas de mycélium, appelé mycétome. Ces mycétomes, dont le plus connu est l'aspergillome, ne constituent pas une infection à proprement parler mais plutôt une colonisation dont les effets sur la santé se caractérisent par une obstruction pulmonaire ; de plus, selon l'espèce de moisissure, les mycétomes peuvent devenir une source constante d'irritants ou d'allergènes.

Les effets toxiques

La majorité des effets toxiques causés par inhalation de moisissures ont été associés à des expositions en milieu industriel ou agricole, c'est-à-dire dans des endroits où leur concentration s'avère élevée et où l'exposition est répétitive ou chronique. Une forte exposition aux poussières organiques contaminées par des moisissures pourrait causer un syndrome toxique (ODTS) (Sorenson et Lewis, 1996), ainsi que la pneumonie d'hypersensibilité. En milieu intérieur, ce type de réaction pourrait survenir lors de travaux effectués sans protection respiratoire, dans des sites fortement contaminés. Plus récemment, des symptômes associés à l'ODTS ont aussi été notés chez des occupants d'appartements fortement contaminés aux moisissures ainsi que chez des travailleurs effectuant des travaux de rénovation (Husman, 2000).

Outre l'ODTS, les autres effets toxiques provoqués par les moisissures surviennent dans des cas d'expositions répétées à une contamination environnementale, donnant lieu à une dose cumulative élevée et se manifestant à moyen ou à long terme.

Le terme « mycotoxicose » est surtout employé dans les cas d'intoxication suivant l'ingestion d'aliments contaminés par des moisissures et contenant des toxines fongiques ; par extension, ce terme désigne aussi les effets systémiques dus à l'exposition environnementale à des doses importantes de toxines fongiques dans l'air. Par exemple, la stachybotrycose (ou stachybotryotoxicose) est reconnue comme une mycotoxicose pouvant provenir soit de l'ingestion, de l'inhalation ou du contact cutané avec du matériel contaminé (Pitt *et al.*, 2000; Etzel, 2002).

1.6. Populations à risque

Certains individus ou groupes d'individus sont, de par leur condition, plus susceptibles de développer des problèmes de santé lorsqu'ils sont exposés à des contaminants fongiques. Selon le MIEH (1999) et le California Department of Health Services (1998), ces populations sont, de façon générale :

- les individus atopiques ;
- les personnes sévèrement immunodéprimées (atteintes du VIH-SIDA, sous chimiothérapie, greffées, etc.), population se retrouvant souvent en milieu hospitalier. Dans ce milieu, ces personnes sont particulièrement à risque d'une infection nosocomiale à *Aspergillus*.
- les individus souffrant d'atteintes respiratoires, telles que l'asthme, les maladies pulmonaires obstructives chroniques et la fibrose kystique ;
- les nourrissons et les jeunes enfants, compte tenu de leur système de défense en développement et de leur taux de ventilation élevé par unité de masse corporelle (WHO, 1999) ; par ailleurs, compte tenu que leurs poumons sont en croissance, les enfants seraient plus susceptibles aux effets des mycotoxines inhalées;
- les personnes âgées, qui montrent généralement une susceptibilité accrue aux contaminants de l'air compte tenu du fonctionnement réduit de leur mécanisme physiologique de défense, et de la prévalence plus élevée de maladies observée dans ce groupe d'âge (WHO, 1999).

1.7. Principales espèces de moisissures rencontrées dans le milieu intérieur

Dans le milieu intérieur, les moisissures peuvent se retrouver sur des aliments destinés à la consommation humaine ou animale ainsi que sur des objets faits de matériaux cellulosiques (coton, papier, bois) ou d'origine animale (cuir). Tel que précisé précédemment, la température normalement rencontrée dans un environnement intérieur permet la germination, la croissance et la prolifération de certaines moisissures. Le tableau 1 présente des exemples de moisissures pouvant être retrouvées en milieu intérieur selon le substrat sur lequel elles sont susceptibles de croître. Plusieurs moisissures sont adaptées aux conditions de l'environnement intérieur et croissent bien sur les matériaux de construction (Gravensen *et al.*, 1999). Selon certains auteurs, une trentaine de genres y sont observés de façon régulière en milieu intérieur contaminé, les plus fréquents étant les *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Alternaria* (Garrett *et al.*, 1998).

Tableau I : Principales moisissures retrouvés en milieu intérieur selon leur substratum de croissance (Malloch, 1997).

SUBSTRAT	MOISSURES RETROUVÉES
Aliments	<i>Aspergillus</i> sp <i>Eurotium</i> sp <i>Penicillium</i> sp <i>Rhizopus</i> sp <i>Xeromyces</i> sp Certaines levures
Grains, céréales et fourrage	<i>Aspergillus</i> sp <i>Eurotium</i> sp <i>Calviceps purpurea</i> <i>Fusarium</i> sp <i>Stachybotrys</i> sp
Produits faits de cellulose tel le papier, le carton et le bois	<i>Alternaria</i> sp <i>Chaetomium</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Epicoccum</i> sp <i>Stachybotrys</i> sp
Bois (bois d'œuvre, souches, arbres, etc.)	<i>Armillaria mellea</i> <i>Ceratocystis</i> sp <i>Chaetomium</i> sp <i>Phialophora</i> sp <i>Serpula lacrymans</i>
Matériaux de construction et autres produits : <ul style="list-style-type: none"> • murs peints • papier peint • placoplâtre • cuir • calfeutrage synthétique ^c 	<i>Aspergillus</i> sp <i>Aureobasidium</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Exophiala</i> sp <i>Penicillium</i> sp <i>Phoma</i> sp <i>Stachybotrys</i> sp <i>Scopulariopsis</i> sp <i>Trichoderma</i> sp
Végétaux en décomposition (à l'intérieur comme à l'extérieur)	<i>Alternaria</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Epicoccum</i> sp

2. Les acariens

2.1. Généralités

Il s'agit d'*arachnides* mesurant moins d'un demi-millimètre qui se comptent par millions dans nos literies où ils se nourrissent des débris de peau et de poils (figure 10). Il en existe plus de 50000 espèces répertoriées. Celles de la "poussière de maison" sont essentiellement les "*Dermatophagoïdes pteronyssinus* (dp) et *Dermatophagoïdes farinae* (df)". Bien souvent les personnes qui souffrent d'allergies aux acariens pensent souffrir d'allergie à la plume ou d'allergie à la poussière, ceci est dû à une vieille confusion entre l'endroit où on en trouve beaucoup (les oreillers en plumes) et leur présence en ces lieux (Mc Gavin et Leraut, (2006).

Ces acariens (dp et df), supportent difficilement les climats secs et froids de l'altitude. Les centres de cure climatique s'y sont donc naturellement installés.

En soit, ils sont tout à fait inoffensifs pour l'homme et même écologiquement utiles, cependant les protéines de leur carapaces et de leurs déchets (les allergènes donc) peuvent donner lieu à des réactions d'allergie qui sont délétères pour le bon fonctionnement de notre organisme.

Pour bien vivre et donc proliférer, un acarien a besoin d'être au chaud (entre 26 et 32°C dans le matelas, ce qui correspond à 21/22°C dans la pièce), dans l'humidité (75% d'hygrométrie semblent le satisfaire pleinement)...et d'avoir à manger (poils humains ou d'animaux, débris alimentaires).

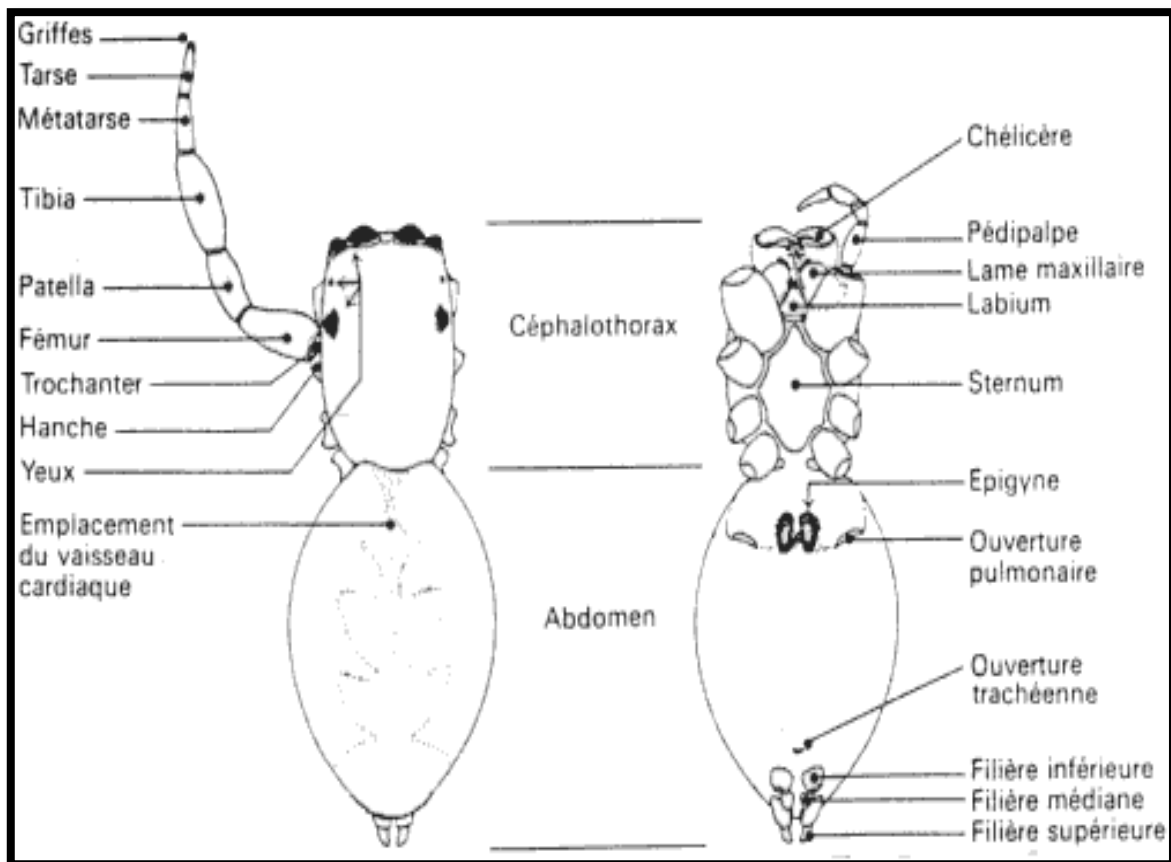


Figure 10: Morphologie d'un acarien (Mc Gavin et Leraut, 2006)

2.2. Sensibilisation aux acariens et terrains atopiques:

La sensibilisation aux acariens est un facteur indépendant majeur de risque d'asthme dans toutes les régions où le climat est favorable. Quatre-vingt-cinq pour cent des patients asthmatiques ont des prick-tests positifs aux acariens contre 5 à 30 % de la population générale (Custovic et *al.*, 1998).

L'acquisition d'une sensibilisation aux acariens est corrélée à un taux de Der p1 au moins égal à 2 microgrammes de Der p1 par gramme de poussière. Sporik et al. (Sporik et *al.*, 2001), dans leur étude princeps, montrent que s'il existe un terrain atopique, l'exposition précoce (moins de un an) à une quantité importante d'acariens (supérieure à 10 µg/g) favorise l'apparition d'un asthme au cours de la première décennie.

Le seuil de sensibilisation varie en fait en fonction de l'existence d'un terrain atopique ou non. Kuehr et al. (Kuehr et *al.*, 1994), ont montré qu'une exposition à un taux de Der p1 supérieur à 9 µg/g représentait un facteur de risque de sensibilisation dans la population générale. Chez les enfants atopiques (déjà sensibilisés à d'autres allergènes), le risque de sensibilisation apparaît à partir de 2 µg et en l'absence d'atopie, ce risque est à 30 µg.

CHAPITRE III

ASTHME

ALLERGIQUE ET

STRESS OXYDANT

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (Delattre et *al.* 2005).

1. Stress oxydant et inflammation allergique:

En condition dite « physiologie », la production des EOA reste faible et ne concerne qu'un pourcentage de l'oxygène capté par la respiration (Auberval, 2010). Un stress oxydant par augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou par carence en micronutriments antioxydants ou cofacteurs des systèmes enzymatiques antioxydants, est fréquent au cours des syndromes inflammatoires chroniques, participant à l'entretien de l'inflammation et des lésions qui en résultent (Comhair et Erzurum, 2010). Ceci concerne des affections aussi diverses que les maladies inflammatoires chroniques intestinales, des maladies respiratoires (asthme, mucoviscidose) ou la polyarthrite rhumatoïde. Cette mise au point se propose de résumer certaines données fondamentales et cliniques soulignant la participation du stress oxydant à la physiopathologie des syndromes inflammatoires chroniques (Babior et *al.*, 2002). Ainsi, au cours des dernières années, de nombreux arguments expérimentaux sont venus étayer les conséquences du stress oxydant dans la pathogénie de certaines maladies inflammatoires chroniques respiratoires comme l'asthme.

2. Les conséquences du stress oxydant :

Au cours des syndromes inflammatoires chroniques la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) (Esterbauer et *al.*, 1992).

Dans la peroxydation lipidique, les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des radicaux libres. Après une série de réaction, il y a formation de sous-produits qui sont les aldéhydes et les hydrocarbures (Pincemail et *al.*, 1999).

Une grande partie des dégâts provoqués par le stress oxydant résulte de la modification de l'ADN à l'intérieur d'un noyau des cellules qui provoque des mutations.

Les dommages cellulaires causés par ces radicaux sont d'intensité variable, proportionnelle à leur taux de production et à leur durée d'action (Figure 11). Ils sont associés à une diminution de l'activité antioxydante dans les voies respiratoires et à l'élaboration de l'hyperréactivité des voies aériennes (Favier, 2003).

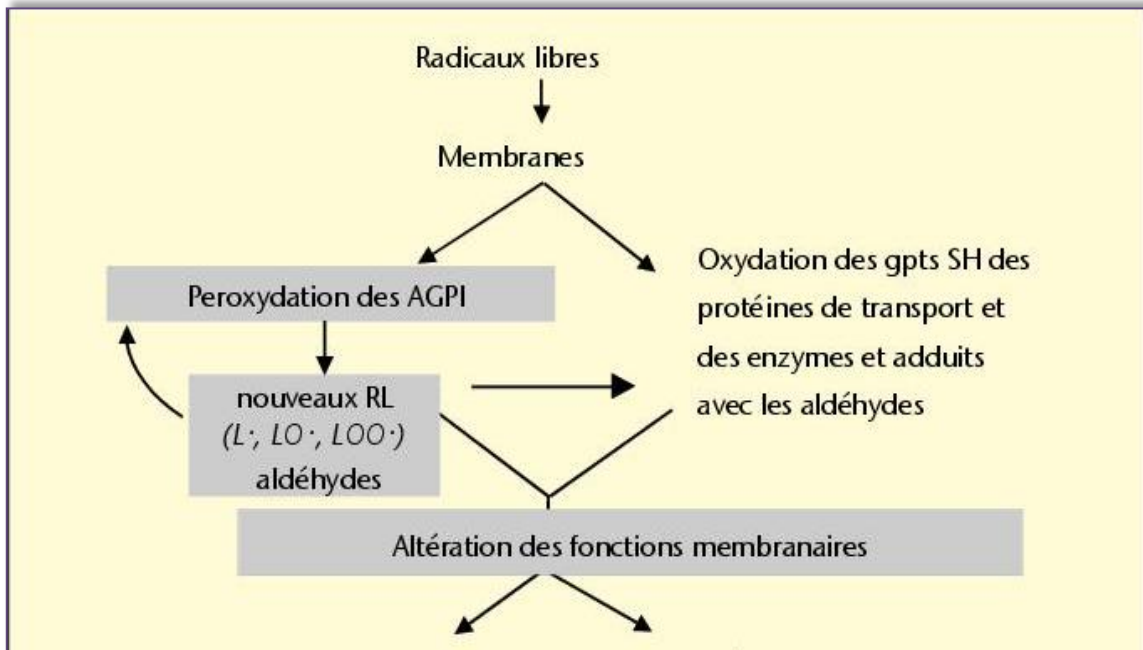


Figure 11 : Dommages cellulaires en conséquence du stress oxydatif (Cillard J, 2006).

3. Protection et système antioxydant:

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses anti oxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes et l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants (Langsjoen et *al.*, 2005) (Figure 12).

3.1. Systèmes de défense enzymatiques (primaire):

- + **Le superoxyde dismutase (SOD):** Il s'agit de métalloprotéine, qui représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$.
- + **Les glutathion peroxydases (GPx):** Il s'agit d'une scléroprotéine (possédant cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques (secondaire):

- + **La vitamine C:** Il s'agit, avant tout, d'un excellent piègeur des EOA ($HO\cdot$ ou $O_2^{\cdot-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques.

3.3. Les oligoéléments:

- + **Le sélénium:** Il ne s'agit pas d'un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine (Langsjoen et *al.*, 2005).

4. Lutte contre le stress oxydant :

Le stress oxydant étant à l'origine de nombreuses maladies, il semble logique de chercher à le supprimer. Toutefois, il faut bien se garder d'être « simpliste » sur un sujet aussi complexe et ambigu. Tout d'abord, le stress oxydant est souvent à l'origine des premières anomalies responsables de modifications irréversibles de molécules et de cellules, et ces anomalies se produisent plusieurs années avant l'apparition des signes de la maladie qui sont irréversibles.

On peut envisager sous le titre d'«antioxydants» au sens large, l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène (Sies, 1997).

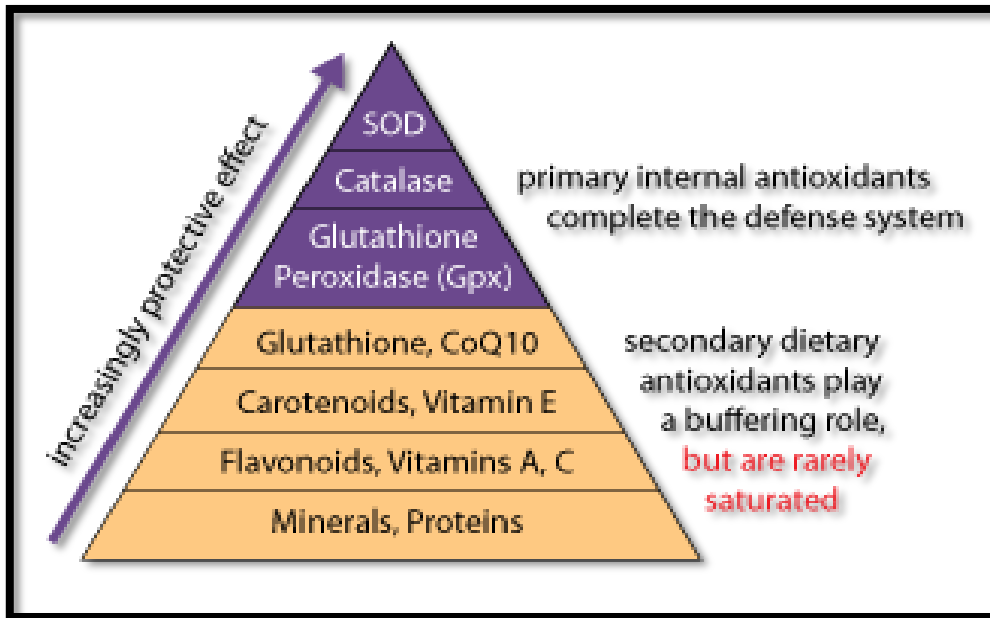


Figure 12: Systèmes de défense cellulaire primaire et secondaire (Cillard J, 2006)

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV
MATERIEL ET
METHODES

But et objectifs :

L'environnement intérieur semble être un facteur favorisant le développement des aéroallergènes. Ces derniers ont un rôle important dans le développement des maladies respiratoires telles que l'asthme allergique et la rhinite allergique.

En Algérie, nous assistons bien à un changement dans le mode de vie des foyers (logements vides et fermés durant l'absence journalière de tous les membres de la famille). Cette situation a favorisé l'humidité dans l'habitat, faisant de celui-ci un environnement favorable aux développements fongiques.

Notre objectif est l'évaluation de la contamination fongique présente dans les milieux intérieurs des enfants asthmatique de la ville d'Annaba, ainsi que d'examiner leur effets sur la santé. Notre travail de recherche s'articule autour de deux axes complémentaires (figure 13):

- a) Environnement : l'identification et le dénombrement des microorganismes notamment des moisissures en cause. L'étude permettra de refléter l'état actuel des habitats des patients allergiques en termes d'aérocontamination fongique (Évaluation de la qualité de l'air).
- b) Santé : Parallèlement au questionnaire qui accompagne chacun des patients, un bilan immunoallergologique (évaluation des IgE spécifiques aux principaux pneumallergènes) sera réalisé pour déterminer l'état de sensibilisation (mono ou polysensibilisation) des patients. Les paramètres du stress oxydatif seront également mesurés ainsi que l'interleukine-5.

L'analyse statistique permettra d'évaluer la relation entre la biocontamination fongique et les paramètres clinico-biologiques.

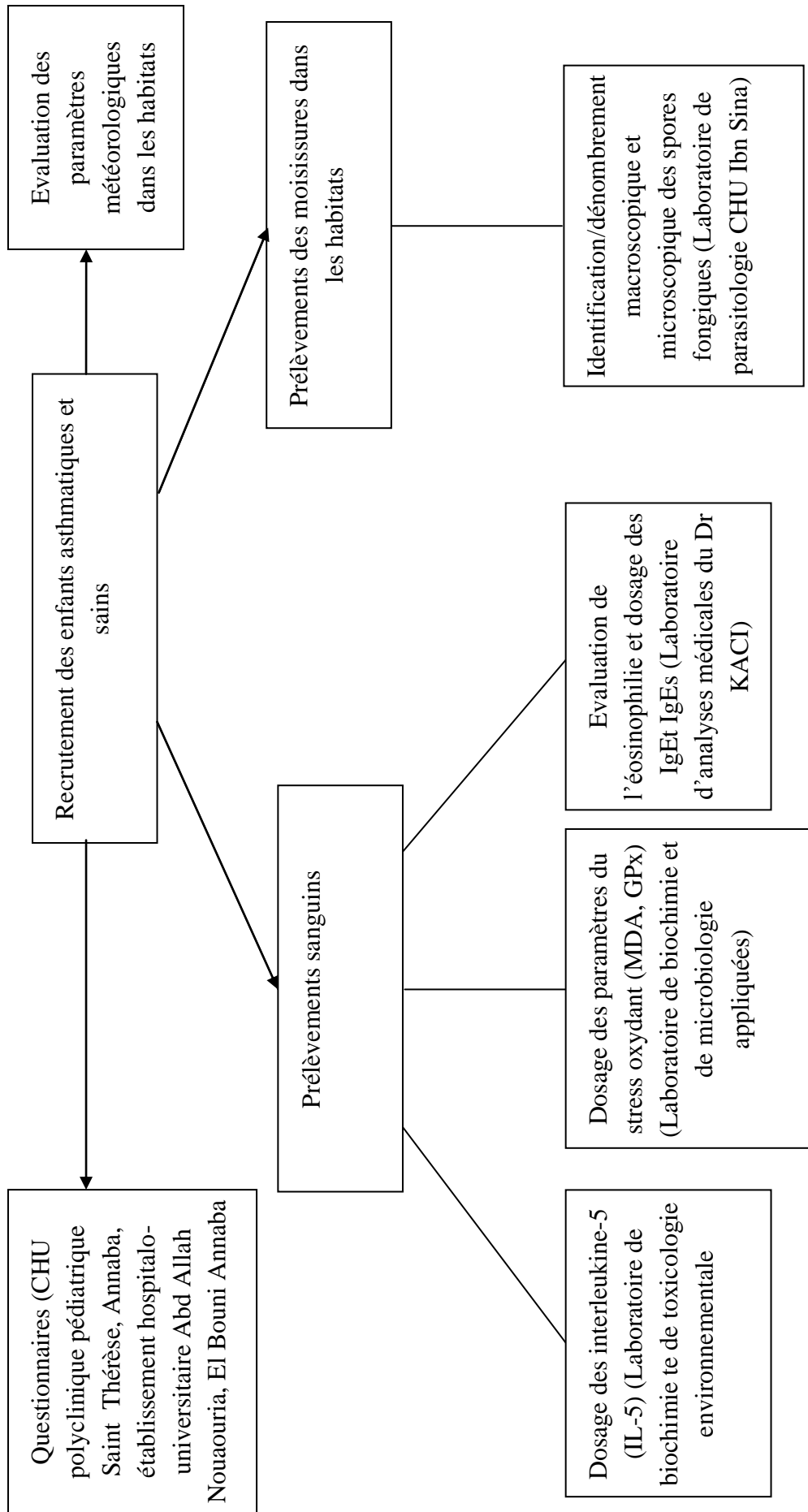


Figure 13: Schéma général du protocole de la thèse

1. Population d'étude :

Le recrutement de notre population est réalisé entre Mars 2011 et Janvier 2012 dans la ville d'Annaba (extrême Est de l'Algérie). Notre étude a concernée 68 enfants asthmatiques âgés de 2 à 15 ans (sexe ratio M/F 0,62) choisis aléatoirement. Une population composée de 50 enfants sains (non asthmatiques) âgés de 1 à 15 ans (sexe ratio M/F 0,64), a été aussi recrutée. Durant la consultation des enfants asthmatiques avec leurs médecins (pédiatres et pneumologues), un questionnaire préétabli a été renseigné avec l'un des parents des enfants. Le prélèvement sanguin ainsi que les prélèvements d'air et de poussières domestiques sont réalisés après le consentement éclairé des parents de tous les enfants.

2. Questionnaires:

Les questionnaires sont remplis suivant les réponses de l'un des parents des enfants (asthmatiques et sains), après explication du but de l'étude. Le questionnaire comprend deux parties différentes :

-la première contenant les informations générales sur la maladie asthmatique, qui sont regroupés dans les points suivantes: antécédents atopiques personnelles, antécédents atopiques familiaux, ancienneté de la maladie et les principaux symptômes;

-la seconde partie cherchait les conditions environnementales des enfants où ils habitent selon les informations suivantes: présence de fumeurs, présence d'animaux domestiques, caractérisation de la chambre à coucher de l'enfant, présence de moisissures...etc

Questionnaire

Ce questionnaire est strictement confidentiel. Il est destiné à des atteintes à la santé en lien possible avec la qualité de l'air intérieur. Tenues au secret professionnel, seules les personnes membres de ce projet de recherche sont autorisées à accéder à son contenu.

En donnant votre consentement éclairé pour tout prélèvement de sang au vu d'un dosage immunoallergologique ainsi que pour toute analyse par prélèvement de poussières au niveau de votre domicile, répondez du mieux que vous pouvez à toutes les questions.

Nom et prénom du patient :
Date et lieu de naissance :
Adresse :
.....
.....
Numéro de Tel :
Email :
Date :

Signature de l'un des parents du patient :

(Indiquez le lien de parenté :)

Antécédents atopique personnels :

Est-ce que le patient souffre ou a déjà souffert d'une ou de plusieurs des maladies suivantes ?

	Oui	Non	depuis quelle année ?
Rhinite allergique:			
APLV:			
Allergie alimentaire:			
Eczéma:			
Conjonctivite allergique:			
Autres maladie respiratoire, précisez:			

Antécédents atopiques familiaux :

Y-a-t'il des problèmes d'allergies dans la famille proche du patient ? (frère, sœur, mère, père, enfants)

	Oui	Non	Lien de parenté
Asthme:			
Autres manifestations atopiques, précisez:			

Le patient est asthmatique depuis :

Est-ce que le patient prend des médicaments pour l'allergie (Anti histaminiques) ?

Oui Non

Si oui, indiquer le nom du (ou des) médicaments et depuis quelle année ?

Nom : _____ Depuis quelle année ? _____

Symptômes

Depuis la dernière année, est-ce que le patient a présenté ou s'est plaint de façon régulière de l'un ou l'autre des symptômes suivants pendant qu'il est à l'intérieur de la maison ? Si oui, précisez à quelle fréquence en cochant la case appropriée.

symptômes	Jamais	2 à 3 jours par semaine	Tous les jours ou presque
1. Irritation ou sensation de brûlure aux yeux (rougeur, démangeaison)			
2. Irritation ou sensation de brûlure à la gorge			
3. Irritation ou sensation de brûlure au nez (écoulement, congestion, éternuement)			
4. Essoufflement lors de l'activité physique			
5. Toux			
6. Sifflement			
7. Exacerbation			
8. Absentéisme scolaire			

Description de la résidence :

Localisation: RDC à l'étage (indiquer l'étage

Zone : Urbaine : Rurale

Nombre de personnes vivant dans la maison : Nombre de pièces :

Fréquence d'ouverture des fenêtres par jour :

	Oui	Non
Rarement ou jamais		
De temps en temps		
Moins d'une demi-heure		
Entre une de-heure et une heure		
Plus d'une heure		

Y a-t-il un climatiseur: oui non / Y a-t-il un ventilateur : oui non

Quel est le type de chauffage de votre résidence ? (vous pouvez cocher plus d'une réponse)

	Oui	Non
Chauffage à gaz de ville :		
Chauffage à gaz butane :		
Chauffage électrique :		
Autres, précisez :		

Avez-vous remarqué une ou plus des conditions suivantes à votre domicile ?

	Oui	Non
Odeur caractéristique de mois		
Tâches de moisissures		
Petite surface couverte de moisissures (moins de 1 m ²)		
Grande surface couverte de moisissures (1 m ² ou plus)		

Y a-t-il des plantes dans votre résidence

Oui Non

Si oui, combien et où sont elles situées :

Y a-t-il un ou des animaux domestiques dans votre résidence ?

Oui Non

Si oui, précisez quel type(s) d'animal ?

	Oui	Non
Chat :		
Chien :		
Oiseaux :		
Rongeur :		
Autres, précisez :		

Y a-t-il des blattes dans votre résidence ?

Oui Non

Utilisez-vous des pesticides ou des insecticides à l'intérieur de la maison ?

Jamais A l'occasion Souvent

Y a-t-il des personnes qui fument régulièrement à l'intérieur de la maison ?

Oui Non

Si oui, précisez combien de personnes ? _____

Faites-vous une activité qui expose votre enfant à des émanations de produits chimiques

Oui Non

Si oui, précisez de quel(s) type(s) de produit(s) chimique(s) il s'agit :

	Oui	Non
Solvant ou diluant :		
Colle contact :		
Nettoyeur :		
Autres, précisez :		

Dans la chambre à coucher du patient, y a-t-il :

	Oui	Non
Des taches de moisissures :		
Un tapis :		
Des rideaux :		
Des animaux en peluches dans le lit :		
Literie en laine :		

MERCI DE VOTRE COLLABORATION (Fin du questionnaire)

3. Détermination des scores cliniques:

Sur la base des questionnaires nous avons identifiés deux scores cliniques: le premier est le score GINA Global Initiative for Asthma (www.ginasthma.org), qui détermine les différents niveaux de sévérité de l'asthme et allant de 1 à 4. Le second score est le score allergologique, qui détermine les principales manifestations allergiques et est représenté aussi par 4 niveaux. Les deux scores (GINA et allergologique) sont considérés comme étant positifs à partir du deuxième pallier.

4. Prélèvements sanguin:

Les échantillons de sang sont obtenus par ponction veineuse à jeun de tous les patients. Le sang recueilli est réparti en deux tubes :

Le premier sur EDTA pour la détermination de la formule numérique sanguine et l'équilibre leucocytaire (éosinophilie);

Le second sur héparine pour le dosage des IgE totaux et spécifiques aux pneumallergènes ainsi que l'IL-5.

Les tubes héparinés sont centrifugés immédiatement après prélèvement à 1200g pendant 5 minutes, le sérum obtenu est utilisé pour le dosage des paramètres immunoallergologiques et le culot sanguin est utilisé pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

4.1. Détermination de la concentration des IgE totaux:

Principe du dosage:

La concentration des IgE a été déterminée par la méthode immunoenzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) dite sandwich (ROCHE DIAGNOSTICS, 2010). Cette méthode est une variante du test Elisa utilisée afin de détecter un échantillon d'antigène dans le sérum. Dans ce cas, la fixation de l'antigène est révélée grâce à un anticorps anti-immunoglobuline (marqué par un substrat luminescent), qui se lie sur l'anticorps spécifique qui a reconnu l'antigène.

Mode opératoire:

La réaction se déroule en deux étapes importantes (figure 14):

1^{ère} incubation :

Une prise d'essai de 10µl est mise en présence d'un anticorps monoclonal anti –IgE biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti- IgE marqué au ruthénium. Il se forme un « sandwich ».

2^{ème} incubation :

Les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine –biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de proCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production d'Immunescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyse utilisée, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres des réactifs.

Calcul des résultats :

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en UI/mL ou en ng/mL.

$$\text{Facteurs de conversion : } \text{UI/mL} \times 2,40 = \text{ng/mL}$$

$$\text{ng/mL} \times 0,42 = \text{UI/mL}$$

Les valeurs normales sont données en fonction de l'âge : de 1 à 5 ans [0,01-60] UI/mL, de 6 à 9 ans [0,01- 90] UI/mL, de 10 à 15 ans [0,01 – 200] UI/mL et plus de 15 ans [0 ,01-100] UI/mL).

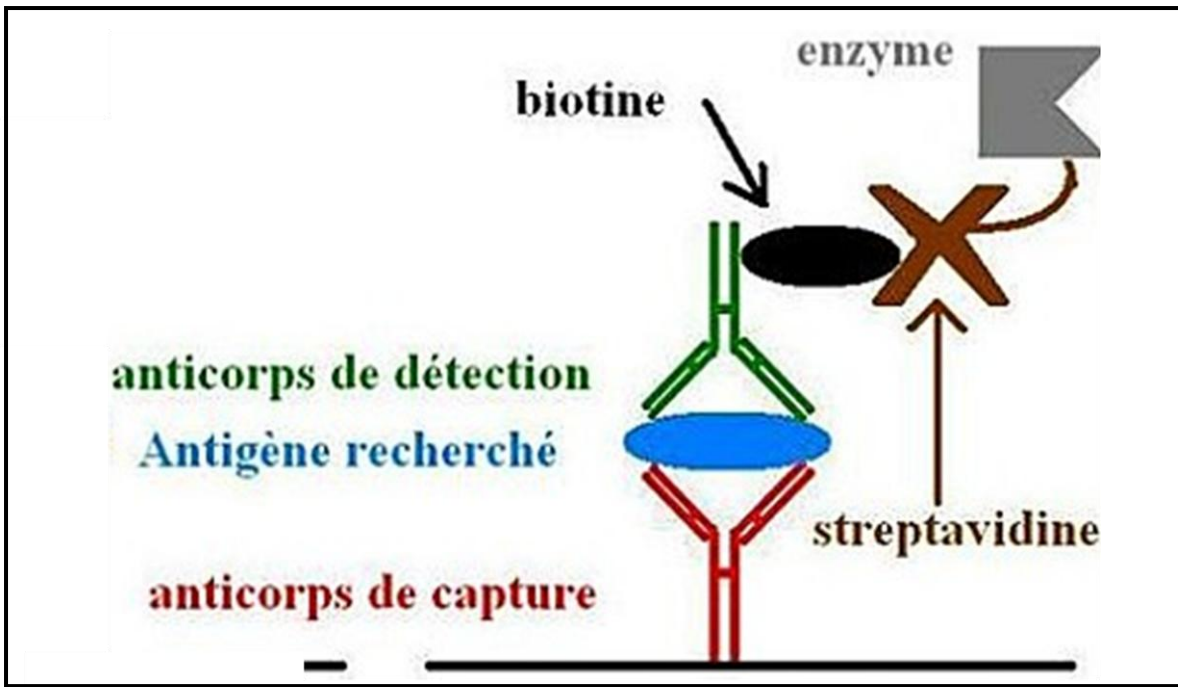


Figure 14: Principe du dosage des IgE totales (Roche Diagnostics, 2010)

4.2. Dosage des IgE spécifiques aux pneumallergènes (IgEs):

Principe du dosage:

Nous avons utilisé le kit EUROLINE pour le dosage des IgE spécifiques aux pneumallergènes (Weimann, 2012). Ce kit est un test semi quantitatif in vitro pour la détection des anticorps humains de classe IgE dirigé contre les allergènes respiratoires méditerranéens les plus communs dans le sérum ou le plasma. Le coffret contient des bandelettes tests sur lesquelles sont coâtés en linge parallèles 21 extraits d'allergènes différents (Chiendent, Fléole des prés (g6), Bouleau (t3), Noisetier (t4), Olivier (t9), Platane (t11), Cyprès (t21), Troène (Ligustrum vulgare) (t210), Ambroisie commune (w1), Armoise (w6), Plantain (w9), Pellitory, *Dermatophagoides pter.* (d1), *Dermatophagoides farinae* (d2), *Acarus siro*, Chat (e1), Chien (e2), Cheval (e3), *Cladosporium herbarum* (m2), *Alternaria alternata* (m6), Marqueur CCD). Les bandelettes sont en premier temps humidifiées et sont ensuite incubées avec le sérum de patient. Dans le cas d'échantillon positifs, les anticorps spécifiques de la classe IgE se fixent sur les allergènes. Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant un anticorps anti-IgE humaine couplé à une enzyme (conjugué enzymatique) catalysant une réaction colorée.

Mode opératoire:

La concentration des IgE spécifiques est obtenue après les étapes suivantes (Figure 15):

Prétraitement: Placer la quantité requise de bandelettes tests dans le bac l'incubation. Remplir chaque rigole avec 1 ml de tampon universel et incuber les bandelettes tests pendant 5 minutes. Ensuite, aspirer tout le liquide.

Incubation du sérum (1ère étape): Remplir chaque rigole avec 1 ml d'échantillon de sérum non dilué et incuber 60 minutes à température ambiante sur un agitateur à bascule.

Lavage: Aspirer le liquide contenu dans chaque rigole et laver chacune 3 fois pendant 5 minutes avec 1 ml de tampon universel sur un agitateur à bascule.

Incubation du conjugué: Pipeter et distribuer 1 ml de conjugué enzymatique (anti-IgE humaine monoclonale couplée à la phosphatase alcaline) dans chaque rigole et incuber pendant 60 minutes à température ambiante sur un agitateur à bascule.

Lavage: Aspirer le liquide contenu dans chaque rigole et laver chacune 3 fois pendant 5 minutes avec 1 ml de tampon universel sur un agitateur à bascule.

Incubation du substrat: Pipeter et distribuer 1 ml de solution du substrat dans chaque rigole et incuber pendant 10 minutes à température ambiante sur un agitateur à bacule.

Arrêt: Aspirer le liquide contenu dans chaque rigole et laver chacune 3 fois avec de l'eau déionisée ou distillée pendant 1 minute.

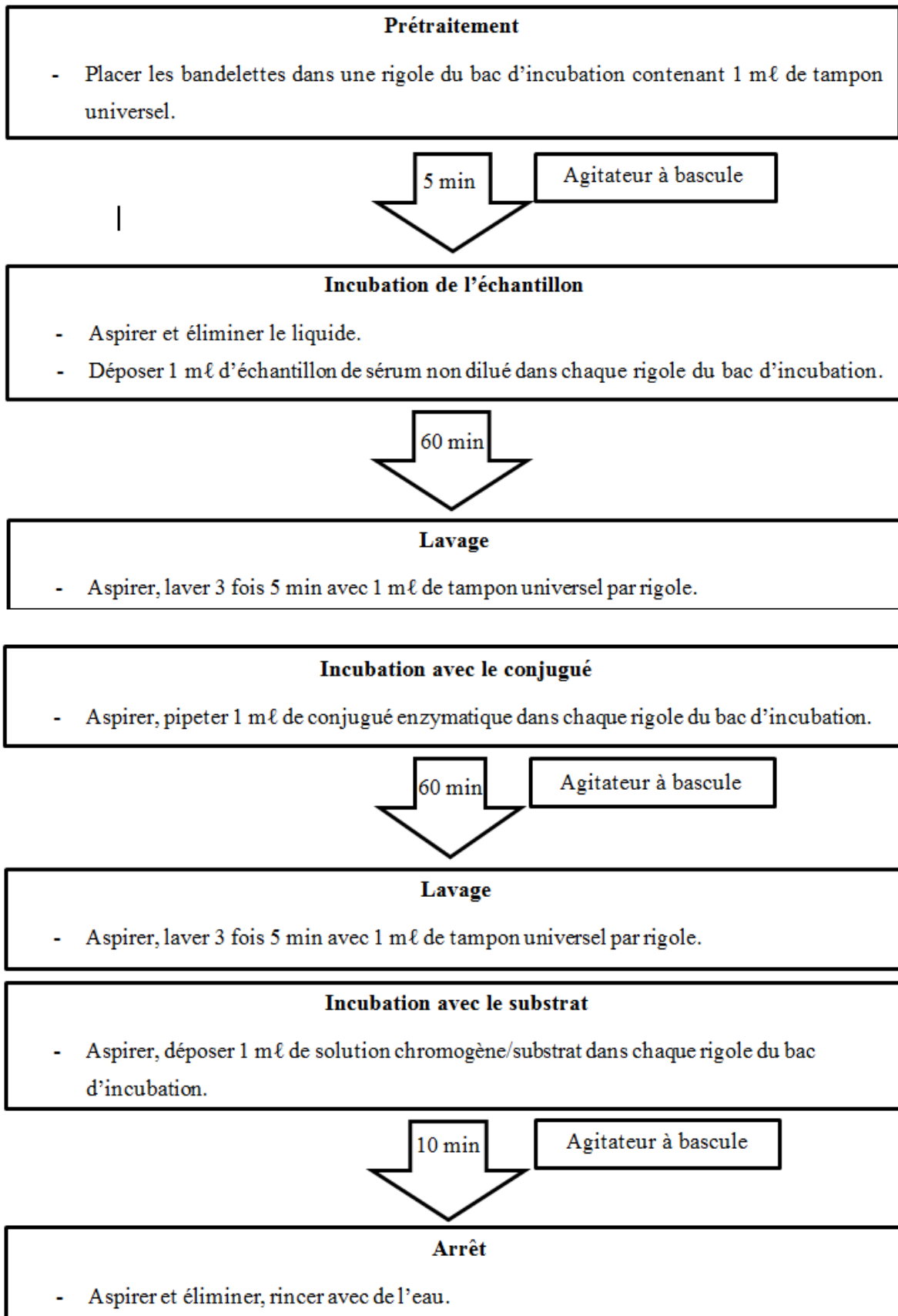


Figure 15: Etapes du dosage des IgE spécifiques aux pneumallergènes

Evaluation: Placer la bandelette test sur le protocole d'évaluation (Figure 16), sécher à l'air et ensuite évaluer.

Interprétation des résultats: Pour l'évaluation des signaux, la position des bandes et leur intensité de coloration doivent être pris en compte. L'identification des allergènes reconnus par les anticorps IgE présents dans l'échantillon est faite en comparant les bandelettes tests incubées avec la bandelette d'évaluation imprimée. Les signaux des bandes peuvent être divisés en 4 classes :

-Négatif : pas de signification clinique

-Faible concentration d'IgE spécifiques de l'allergène : signification clinique partielle

-Concentration modéré d'IgE spécifiques de l'allergène : souvent avec la présence des symptômes cliniques.

- concentration d'IgE spécifiques de l'allergène : présence des symptômes cliniques dans la plus part des cas.



Figure 16: Evaluation des IgE spécifiques aux pneumallergènes

4.3. Détermination de l'éosinophilie:

Le sang recueilli sur EDTA est utilisé pour la détermination de l'éosinophilie. Un frottis sanguin a été préparé puis fixé avec du méthanol pendant 3 minutes. On procède à la coloration de May-Grunwald-Giemsa. Sous microscope, on dénombre 200 cellules sanguines (toutes les catégories leucocytaires sont incluses). Le nombre de cellules est présenté en terme de pourcentage. On considère que 500 éléments/ μ l est la valeur seuil et que le taux normal de l'éosinophilie varie entre 0,9 % et 2,9 % (Dutau, 2004).

4.4. Préparation des lysats d'érythrocytes :

Mélanger 1,36 g de KH_2PO_4 avec 9 g de NaCl 0,9% et compléter avec 1 litre d'eau distillée, puis ajuster le pH à 7,4.

Après un broyage du culot sanguin de chacun des tubes des patients, on procède à un premier lavage par l'ajout de 2 ml de solution de lyse des globules rouges [KH_2PO_4 (10 Mm), NaCl (150 Mm), pH = 7,4]. Le tout est homogénéisé, puis centrifugé à 3000g pendant 15 min à 4°C.

Ensuite, le culot est récupéré pour subir un second lavage, dans lequel 2 ml de la même solution de lyse sont ajoutées puis centrifugées à 4000 tours / min pendant 30 min.

Le surnagent est enfin récupéré dans des tubes éppendorf pour être utilisé pour le dosage des protéines, du MDA et du GPx.

4.5. Dosage des protéines :

✚ Principe du dosage:

La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de BRADFORD qui utilise le bleu de coomassie G250 comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines des protéines pour former un complexe de couleur bleue (Figure 17).

✚ Mode opératoire:

Des tubes secs sont préparés en fonction du nombre d'échantillons. Dans chaque tube 990 μ l du tampon phosphaté sont déposés auxquels sont ajoutés 10 μ l de l'échantillon (l'hémolysat). Les tubes sont par la suite vortexés.

Une deuxième série de tubes est préparée en plus d'un tube blanc, contenant 100 μ l du mélange précédant et 5ml de la solution de BRADFORD. Enfin, une lecture au spectrophotomètre à 595nm est réalisée (Spitz, 2006).

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (figure 18).

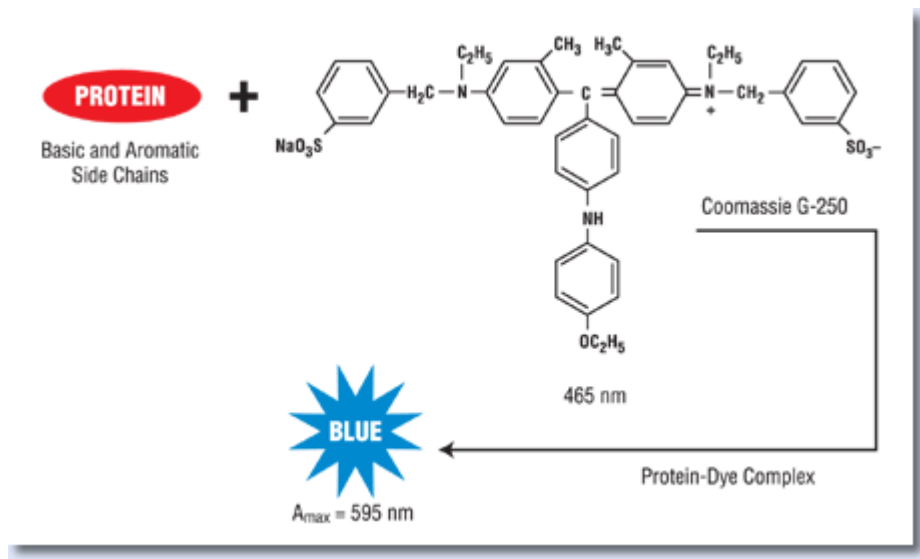


Figure 17: Principe de base de la réaction de Bradford

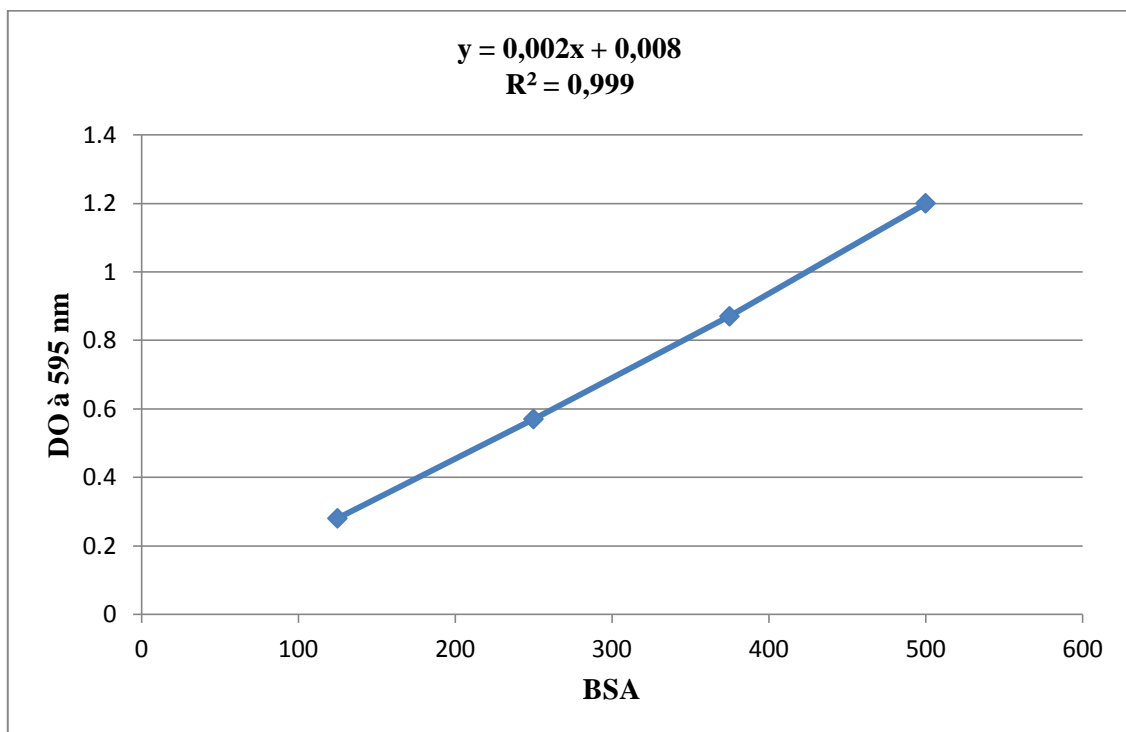


Figure 18: Courbe d'étalonnage établit à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml).

4.6. Dosage des paramètres du stress oxydant:

a. Dosage du malondialdéhyde (MDA):

✚ Principe du dosage:

Il a été évalué par la mesure des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA) comprenant des aldéhydes (dont le MDA) et des lipides hydroperoxydés. Le MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique.

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'aide de l'acide thiobarbiturique TBA. La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'ESTERBAUER et *al.* 1992.

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation du MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment rose (Figure 19). L'absorbance du mélange est mesurée à 530 nm.

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité du MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

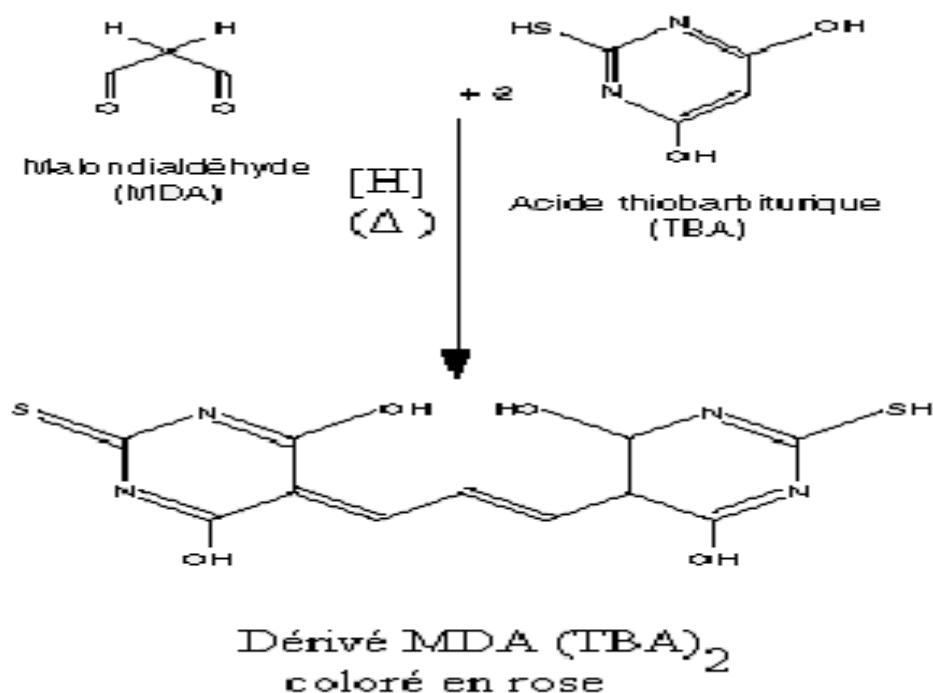


Figure 19: Réaction du malondialdéhyde (MDA) et l'acide thiobarbiturique

✚ Préparation des solutions:

* **TBS** : (Tris : 50 mM, NaCl : 150 mM, pH = 7,4).

- NaCl : 150 mM : 8,775 g → Compléter à un litre d'eau distillée.

- Tris : 50 mM : 6,057 g → Mélanger le tout → Ajuster le pH = 7,4.

- HCl : 0,6 M : 51,56 g → Compléter à un litre d'eau distillée.

* **Tris-TBA** :

- Tris : 26 mM : 3,149 g → Compléter à un litre d'eau distillée.

- TBA : 120 mM : 17,299 g → Compléter à un litre par Tris 26 mM.

* **TCA-BHT** : (Préparation au moment).

- TCA 20% (Poids/Volume) : 20 g/100 ml d'eau distillée.

- BHT 1% (Poids/Volume) : 1 g BHT → Compléter à 200 ml TCA 20% → Agitation à chaud.

✚ Mode opératoire:

En bref, des tubes secs sont préparés en fonction du nombre d'échantillon ainsi qu'un tube blanc. 150µl et 525µl du tampon phosphaté sont ajoutés respectivement dans la première série et dans le tube blanc. 375 µl de chaque échantillon (lysats érythrocytaires) et 375 µl de la solution TCA-BHT sont, par la suite, ajoutés dans les tubes. Le tout est vortexé puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 min.

400 µl du surnageant sont prélevés et mis dans la deuxième série de tubes. Dans chacun d'entre eux 320 µl du Tris-TBA sont ajoutés. Le tout est vortexé puis incubé à 80 C° pendant 10 min.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E \cdot C \cdot L$) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times x \times Fd}$$

- C: concentration du MDA en nmoles par mg de protéines ;
- DO : densité optique lue à 530 nm ;
- ϵ : coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
- L : longueur du trajet optique (L = 0,779 cm) ;
- X : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : facteur de dilution (Fd = 0,2083).

b. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx):

✚ Principe du dosage:

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été déterminée par la méthode de FLOHE & GUNZLER (1984). Cette méthode est basée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH) (figure 20). Ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :

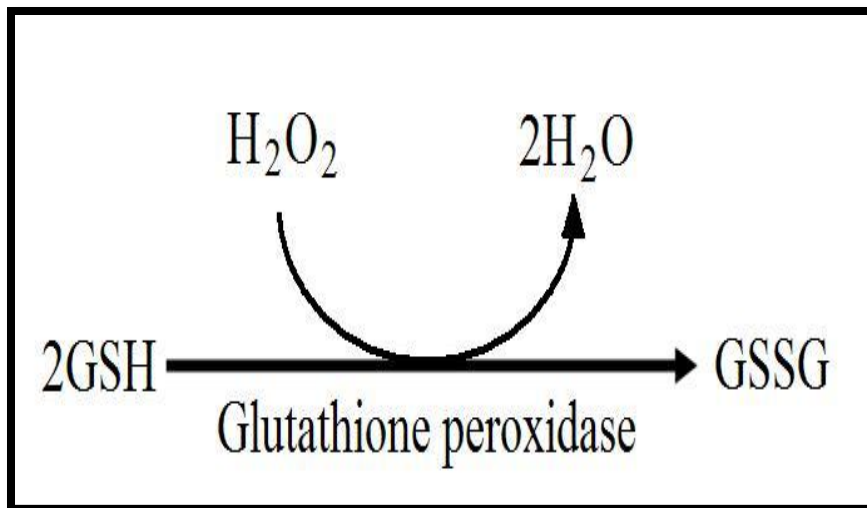


Figure 20: Réaction de la glutathion peroxydase

✚ Préparation des solutions:

* **GSH (réduit):** (0,1 mM)

3,073 mg et compléter à 100 ml d'eau distillée

* **TCA 1 %**

Peser 1,5 g de TCA poudre et compléter à 150 ml avec de l'eau distillée.

* **DTNB:** 1 mM

Peser 3,963 mg de DTNB poudre et ajouter 10 ml d'eau distillée.

* **TBS :** (Tris : 50 mM, NaCl : 150 mM, pH = 7,4).

- NaCl : 150 mM : 8,775 g → Compléter à un litre d'eau distillée.

- Tris : 50 mM : 6,057 g → Mélanger le tout → Ajuster le pH = 7,4.

- HCl : 0,6 M : 51,56 g → Compléter à un litre d'eau distillée.

✚ Mode opératoire:

Pour cela nous avons procédé en premier lieu, au prélèvement de 0,2 ml de chaque échantillon, auxquels sont ajoutés 0,4 ml de GSH et 0,2 ml de la solution tampon TBS. Puis on incube au bain marie à 25°C pendant 5min.

0,2 ml de H₂O₂ est par la suite ajouté pour initier la réaction. Après un temps d'incubation de 10 min, la réaction est arrêtée par l'ajout de 1ml de TCA. Le tout est mis dans la glace pendant 30 minutes, puis centrifugé durant 10 min à 3000 tours / minutes.

En second lieu, 0,48 ml du surnageant prélevé sont ajoutés à 2,2 ml de la solution tampon TBS et 0,32 ml de DNTB. Le tout est mélangé et la densité optique est lue après 5 minutes à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0,04}{\text{DO étalon}}$$

- DO _{échantillon} : densité optique de l'échantillon.
- DO _{étalon} : densité optique de l'étalon.
- 0,04 : concentration de substrat (GSH).

4.7. Dosage de l'interleukine-5 (IL-5):

✚ Principe du dosage:

Le kit Invitrogen Human Interleukine-5 (Hu IL-5) ELISA est utilisé pour la détermination quantitative de l'IL-5 dans le sérum humain.

Le kit invitrogen pour l'IL-5 est un SANDWICH Enzyme Linked Immuno Sorbet Essay (ELISA) sur phase solide. Un anticorps spécifique de l'IL-5 a été fixé sur les puits de la plaque ELISA fournis par ce kit. Les échantillons, y compris les standards de l'IL-5 connus, les contrôles, et les échantillons inconnus sont pipetés dans ces puits.

Durant la première incubation, l'IL-5 humaine (antigène) se fixe sur l'anticorps immobilisé dans les puits. Après lavage, un anticorps biotinylé spécifique de l'IL-5 humaine est ajouté. Durant la deuxième incubation, ce dernier anticorps se fixe sur l'anticorps immobilisé (Hu IL-5) capturé durant la première incubation.

Après l'élimination de l'excès du deuxième anticorps, la Streptavidine-Peroxydase (enzyme) est ajoutée. Cette enzyme se fixe sur l'anticorps biotinylé pour compléter le quatrième membre de la réaction SANDWICH (figure 21). Après une troisième incubation et lavage pour éliminer les molécules d'enzymes libres, la solution de substrat est ajoutée, qui transforme l'enzyme en un produit coloré. L'intensité de coloration de ce produit est directement proportionnelle à la concentration de l'IL-5 humaine présente dans l'échantillon.

Mode de lavage

Le lavage est effectué manuellement comme suit: aspirer complètement le liquide de tous les puits. Remplir par la suite les puits avec au moins 0,4 mL de la solution de lavage diluée. Laisser tremper pendant 15 à 30 secondes, puis aspirer le liquide. Répéter 4 fois.

Après l'opération de lavage, la plaque est inversée et tapotée sur papier absorbant.

Préparation des réactifs

Reconstitution et dilution de l'IL-5 Hu standard

- Reconstituer le standard pour 7500 pg/ml avec le tampon diluant standard (instructions sur l'étiquette du flacon). Agiter et laisser reposer pendant 10 minutes (pour assurer complète reconstitution).
- Ajouter 0,100 ml du standard reconstitué dans un tube contenant 0,900 ml du tampon diluant standard. Etiqueter à 750 pg/ml IL-5 Hu. Mélanger.
- Ajouter 0,300 ml du tampon diluant standard à chacun des six tubes marqué 375; 187,5; 93,7; 46,8; 23,4; et 11,7 pg/ml IL-5 Hu.
- Faire des dilutions en série du standard comme suit (tableau II). Mélanger soigneusement entre les étapes.

A partir de ces données on peut tracer une courbe d'étalonnage $DO = f [C]$ (figure 22) pour le calcul des concentrations de l'IL-5 dans nos échantillons.

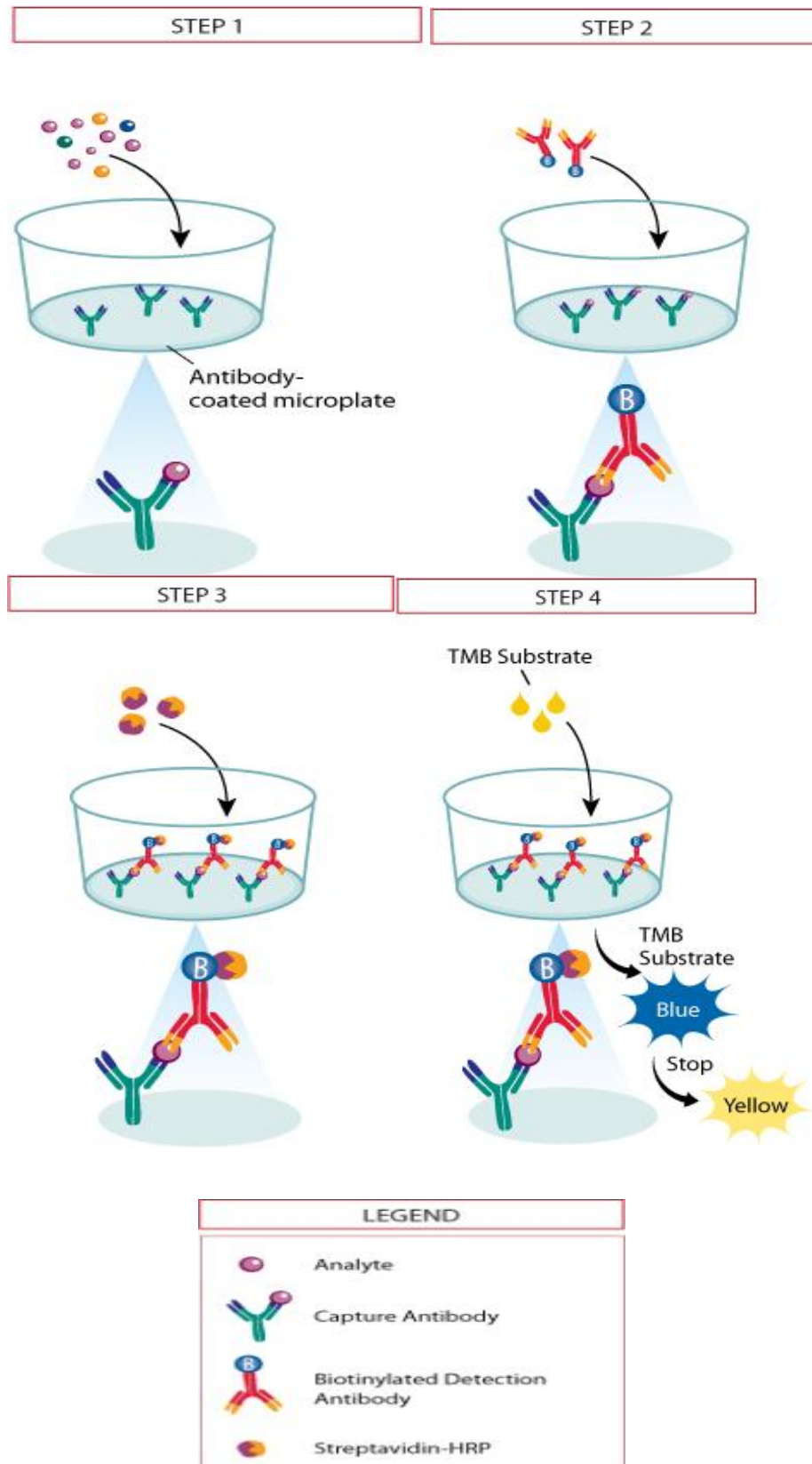


Figure 21: Etapes principales de la réaction ELISA

Tableau II: Dilution de l'IL-5 humaine standard

Standard	Ajouter :	À :
750 pg/ml	Préparer comme décrit à l'étape 2	
375 pg/ml	0,300 ml du standard à 750 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
187,5 pg/ml	0,300 ml du standard à 375 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
93,7 pg/ml	0,300 ml du standard à 187,5 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
46,8 pg/ml	0,300 ml du standard à 93,7 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
23,4 pg/ml	0,300 ml du standard à 46,8 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
11,7 pg/ml	0,300 ml du standard à 23,4 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant
0 pg/ml	0,300 ml du tampon diluant	

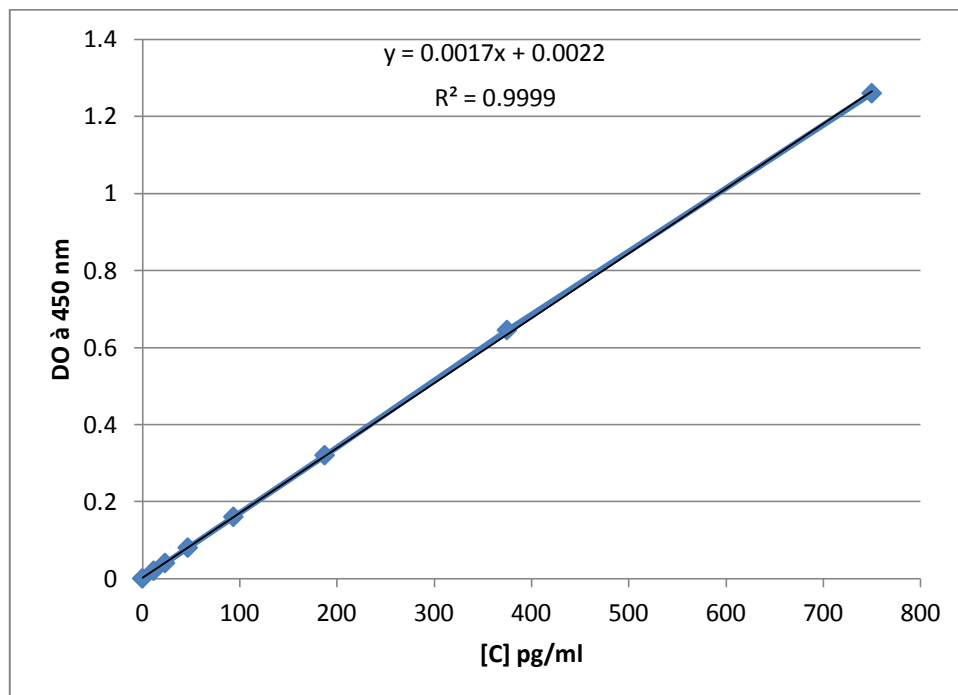


Figure 22: Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'IL-5

Stockage et dilution finale de la streptavidine-HRP

Diluer 10 µl de cette solution concentrée (100x) avec 1 ml du diluant de Streptavidine-HRP pour chaque bande de 8 puits utilisé dans le dosage.

Dilution du tampon de lavage

Diluer 1 volume du tampon de lavage concentré (25x) avec 24 volumes d'eau déminéralisée (par exemple, 50 ml peuvent être dilués jusqu'à 1,25 litres, 100 ml peuvent être dilués jusqu'à de 2,5 litres).

Mode opératoire:

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant l'utilisation.

Une courbe standard doit être toujours réalisée pour chaque test.

- Déterminer le nombre de puits utilisés, pour le présent dosage 2 bandes de 8 puits vont être utilisées, dont 7 puits serviront pour les standards, 1 puits pour le blanc et les 8 derniers puits pour les échantillons (sérum).
- Ajouter 100 µl du Tampon diluant standard à chaque puits. Sauf celui réservé aux chromogène (blanc).
- Ajouter 100 µl du standards et des échantillons aux puits appropriés.
- Couvrir la plaque avec un couvercle de la plaque et incuber pendant 2 heures à température ambiante.
- Aspirer soigneusement ou jeter le liquide contenu dans tous les puits, puis laver les puits 4 fois.
- Pipeter 100 µl de la solution biotinylé anti-IL-5 (biotine conjuguée) dans chaque puits à l'exception du blanc. Tapoter délicatement sur le côté de la plaque pour mélanger.
- Couvrir la plaque avec un couvercle de la plaque et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Aspirer soigneusement ou jeter le liquide. Laver les puits quatre fois.
- Ajouter 100 µl de la solution de travail Streptavidin-HRP à chaque puits à l'exception du blanc.
- Couvrir la plaque avec le couvercle de la plaque et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Aspirer soigneusement ou jeter le liquide. Laver les puits quatre fois.
- Ajouter 100 µl du chromogène stabilisé à chaque puits. Le liquide dans les puits va virer au bleu.
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité.

- Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits. Taper le côté de la plaque en douceur pour mélanger. La solution dans les puits devrait changer du bleu au jaune.
- Lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm.
- Tracer la courbe du standard : l'absorbance des standards contre la concentration standard.
- Lire les concentrations en IL-5 Hu à partir de la courbe standard tracée.

5. Visite des domiciles et échantillonnage de l'air et de poussières:

Parmi les 83 enfants chez qui nous avons réalisé le prélèvement sanguin, seuls 34 parents ont accepté la visite à domicile et les prélèvements de l'air et de la poussière. L'ensemble des prélèvements sont réalisés entre Mai et Octobre 2012.

L'échantillonnage de moisissures a concerné deux éléments : l'air et les surfaces (figure 23).

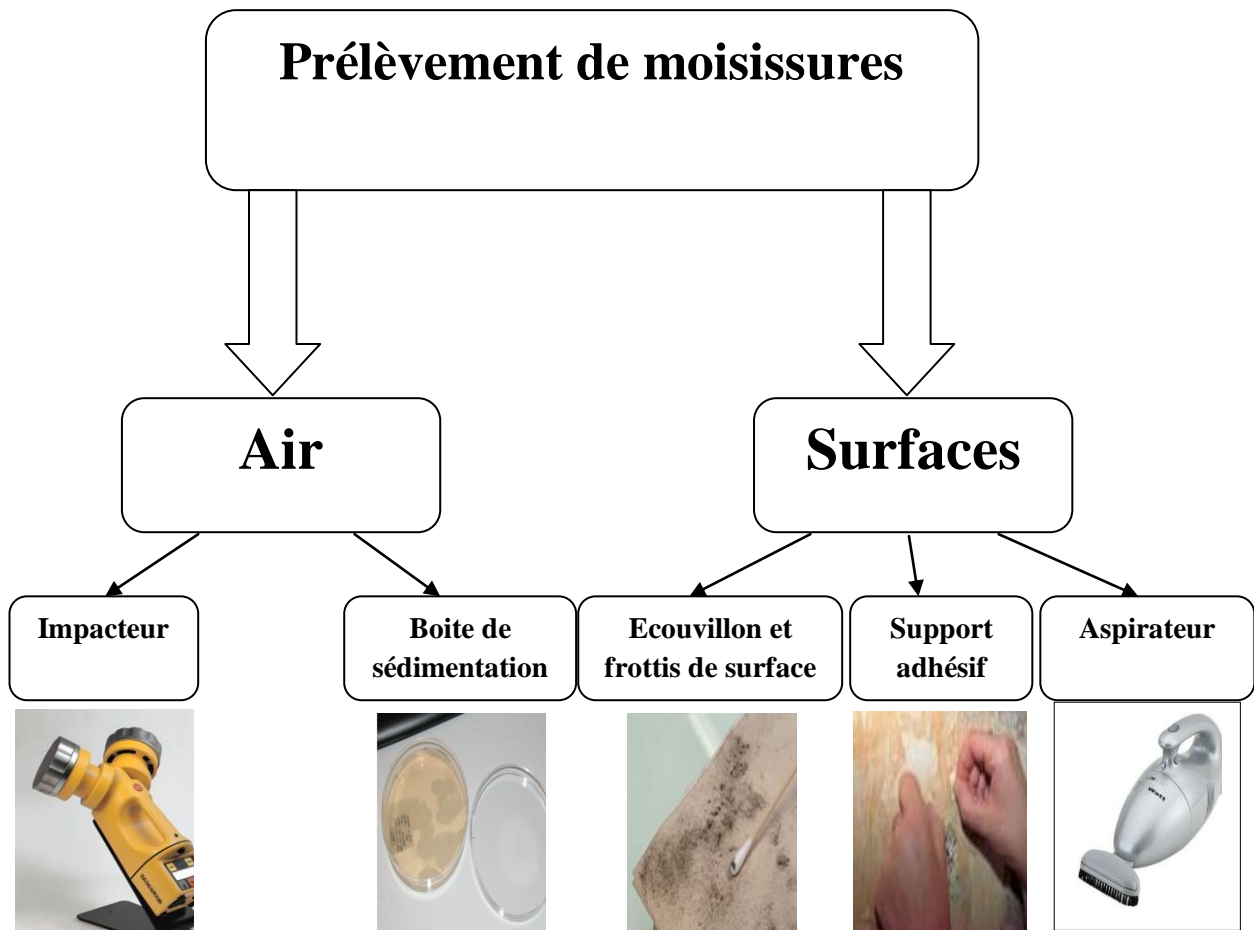


Figure 23: Méthodes adoptées dans le prélèvement des moisissures à partir de l'air et des surfaces

5.1. Echantillonnage de l'air:

Pour rechercher les champignons dans l'air ambiant, deux techniques ont été adoptées:

- La technique dite de «la boîte de sédimentation» :

Elle est basée sur le dépôt spontané des spores sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture gélosé « Sabouraud/chloramphénicol » (Sutton, 2003). Les boîtes de pétri sont laissées ouvertes et placées à environ 80 cm du sol dans l'endroit à contrôler durant 25 minutes ; puis mises à incuber. Cependant, cette technique minimise le prélèvement en excluant les moisissures à spores légères (*Aspergillus* par exemple qui sédimente mal) et ne révèle pas les champignons non cultivables (Chabasse D. et al, 1999). On note également que les fenêtres et les portes de la pièce prélevée ont été fermées afin d'éliminer au mieux l'interférence de l'air extérieur.

- La technique de l'impacteur :

Elle est basée sur l'utilisation d'un impacteur de l'air DUO SAS 360 (Surface Air System, International PBI, Milan, Italy). Cet instrument comprend deux têtes qui peuvent fonctionner en même temps ou indépendamment. Dans notre étude nous avons utilisé une seule tête. L'air est aspiré par un tamis contenant 219 trous et ensuite exposé à une boîte de Petri contenant un milieu de culture (Sabouraud/chloramphénicol). L'impacteur est placé à un niveau de 0,6-1,5 m de hauteur, ce qui permet d'aspirer l'air au niveau de l'aspiration des enfants, selon ISO7726:1998. Après chaque échantillonnage, la tête de l'impacteur est immédiatement frotté avec de l'éthanol 70 %.

5.2. Echantillonnage de surfaces:

Trois types de prélèvement ont été effectués:

- La poussière de la literie et celle des tâches de moisissures (tâches de moisissures : granuleuses, duveteuses, filamenteuses) sont prélevées grâce à un écouvillon stérile légèrement humidifié avec de l'eau physiologique (frottis de surface). Tout en veillant à ne jamais toucher la tige des écouvillons. Ces derniers sont transportés au laboratoire dans leur étui d'origine. Ensuite, l'échantillon est ensemencé par strie sur boîte de Pétri contenant le milieu Sabouraud (Sutton, 2003).
- Sur les surfaces planes et non humides ou sur des taches de moisissures, un ruban adhésif est appliqué (sans appui excessif). Ainsi, les spores y adhèrent et peuvent être transférées sur une lame porte-objet pour leur identification et leur dénombrement au microscope optique (Summerbell, 2003).
- Les échantillons de poussières sont prélevés à partir des lits des enfants aussi en utilisant un aspirateur portable (Clatronic 700 watts). Les échantillons de poussières sont conservés dans des sachets hermétiques et transportés immédiatement au laboratoire le jour même. Après chaque échantillonnage le sachet de l'aspirateur est lavé et réutilisé pour le prochain échantillonnage. Dans le laboratoire les échantillons de poussière sont tamisés en utilisant un tamis fin en acier inoxydable, pour éliminer les particules indésirables; les échantillons obtenus sont conservés dans des sachets hermétiques jusqu'à l'identification des moisissures.

Pour la culture, 1 g de poussière est mis dans la boîte de Pétri en utilisant le tamis mentionné ci dessus. Les échantillons convenablement référencés (numéro, date et type de prélèvement), stockés dans une glacière sont immédiatement transportés au laboratoire pour les analyses mycologiques.

5.3. Mise en culture :

A – Préparation du milieu de culture : La gélose BD Sabouraud Glucose Agar (milieu en flacons) est le milieu de choix en mycologie et parfaitement adapté aux moisissures du milieu intérieur (Sutton, 2003). Le flacon est placé dans un récipient adapté contenant de l'eau, mis sur une plaque chauffante et porté à l'ébullition. Le temps d'ébullition nécessaire pour atteindre le stade de liquéfaction complète du milieu varie considérablement et dépend de plusieurs critères, tels que la température initiale de l'appareil, sa puissance, ses dimensions ou le volume et la température du milieu placé dans le récipient ce délai est enregistré après la première utilisation.

Après liquéfaction complète, le récipient de l'appareil est retiré et placé dans un bain-marie entre 48 et 50 °C. Le chloramphénicol y est alors incorporé à 0.04 % et complètement dissous. Ce dernier est un agent antimicrobien préalablement dissout dans de l'eau, stérilisé par filtration. (Sutton, 2003)

B – Conditions de culture : Pour un ensemencement en surface, 15ml du milieu précédent est versé dans une boîte de Pétri (90 à 100 mm de diamètre) et laissé séché. Pour une solidification complète, les boîtes sont mises une nuit à 18-23°C. Elles sont par la suite conservées entre 2 à 8 °C pour une utilisation valable pendant 5 à 7 jours. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées durant une durée de 7 jours avec une lecture au 3^{ème} jour (Chabasse D. et al, 1999). L'incubation se fait à température ambiante (25-30°C).

5.4. Identification des spores fongiques:

L'identification des spores fongiques est réalisée selon deux examens complémentaires:

a. Examen macroscopique:

L'examen macroscopique de la culture consiste à observer l'aspect des champignons à l'œil nu dans un endroit bien éclairé. Ceci permet de relever la couleur de la colonie au recto et au verso ainsi que de numéroter chaque colonie différente au verso pour pouvoir les identifier microscopiquement.

b. Examen microscopique:

L'observation sous le microscope optique se fait selon la technique dite du drapeau (Larone, 2002), comme suit :

Un morceau de scotch, fixé sur une anse de platine stérile, est appliqué à la surface de la culture par la partie collante et sert ainsi à prendre le champignon à sa surface. Ensuite, le scotch est mis entre une lame porte-objet et une lamelle enduite d'une goutte de bleu de méthylène (colorant). Ce montage, en sandwich, est alors examiné au microscope au grossissement (X10) pour la mise au point, puis au grossissement (X40).

Cet examen permet d'identifier et de différencier les genres et/ou les espèces de moisissures observées sur la base de la morphologie des spores et du mycélium après coloration d'un fragment de colonie au bleu de méthylène.

5.5. Dénombrement des moisissures:

Le principe de ces méthodes s'appuie sur le fait qu'un micro-organisme présent dans un produit ou dans une suspension de ce produit, mis en culture dans des conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie. Il s'agit de faire correspondre un micro-organisme à une UFC (Unité Formant Colonie). Dans notre cas, les résultats obtenus sont exprimés par UFC/ml pour les échantillons de l'air et par UFC/mg pour les échantillons de poussières.

5.6. Détermination des paramètres météorologiques:

Durant l'échantillonnage de l'air et de poussières, la température intérieure ainsi que le taux d'humidité intérieure sont prélevées au fur et à mesure (G.H. Zeal, London, UK).

5.6. Analyse statistique :

Le test t de student pour deux échantillons non appariés est utilisé dans cette étude pour étudier les différences entre les paramètres quantitatifs. Tandis que les paramètres qualitatifs sont analysés par le test Khi deux et le test exact de Fisher.

En plus, pour explorer la corrélation entre les différents paramètres biologiques, la corrélation de Pearson est utilisée. La valeur de $p < 0,05$ considérée statistiquement significative.

CHAPITRE V
RESULTATS ET
DISCUSSION

1. Description de la population:

Les caractéristiques de notre population sont présentées dans le tableau III. Notre étude a montré une prédominance masculine chez les deux populations (malade et témoin). Nous avons trouvé que 63,23 % de la population asthmatique sont des garçons. Chez la population saine la prédominance masculine est aussi observée. L'atopie familiale est observée chez la plupart des enfants asthmatiques parmi lesquels 72,05 % ont un antécédent atopique familiale.

L'atopie personnelle est aussi observée chez les deux groupes. On trouve que les enfants asthmatiques ont au moins une manifestation allergique, et la plus observée est la rhinite allergique chez 73,52 % des enfants asthmatiques. On note aussi la présence d'autres manifestations allergiques telles que la conjonctivite allergique, l'allergie alimentaire et l'eczéma (figure 24).

A partir des questionnaires nous avons classé les enfants asthmatiques selon le degré de la sévérité de l'asthme (voir tableau III). On trouve que la plupart d'entre eux ont un asthme persistant modéré avec 33,83 %, et un asthme persistant léger avec 29,41 %.

2. Scores cliniques et ancienneté de la maladie:

La figure 25 montre la variation de l'ancienneté selon les scores cliniques. On note que les enfants chez qui la maladie a le plus duré (5,19 ans) ont également le nombre de manifestations allergiques le plus élevé (score 4). De même, les enfants qui sont malades depuis 4,53 ans et 4.7 ans, ont les niveaux de l'asthme les plus élevés (scores Gina égalent à 4 et 3, respectivement).

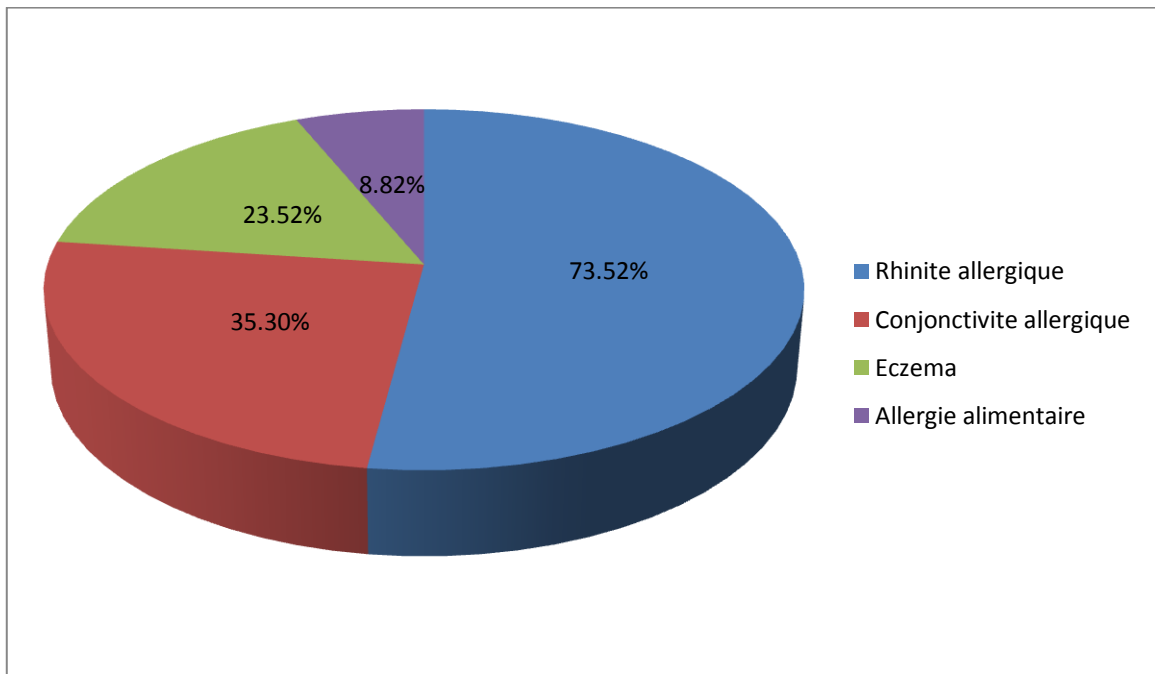


Figure 24: Répartition des principales manifestations allergiques retrouvées dans la population asthmatique

Tableau III: Description générale de la population (n = effectif)

	Population saine n = 50	Population asthmatique n = 68
Sex ratio M/F (%)	30/20 (60.00)	43/25 (63.23)
Age moyen (année)	8.57	7.09
Atopie familiale n (%)	7 (14.00)	49 (72.05)
Ancienneté de la maladie (moyenne)	-	4,53
Manifestations atopiques n (%)		
Rhinite allergique	7 (14,00)	50 (73,52)
Allergie alimentaire	0 (0,00)	6 (8,82)
Conjonctivite allergique	3 (6,00)	24 (35,30)
Eczema	0 (0,00)	16 (23,52)
Score GINA n (%)		
Asthme intermittent	-	9 (13.24)
Asthme persistant léger	-	20 (29.41)
Asthme persistant modéré	-	23 (33.82)
Asthme persistant sévère	-	16 (23.53)

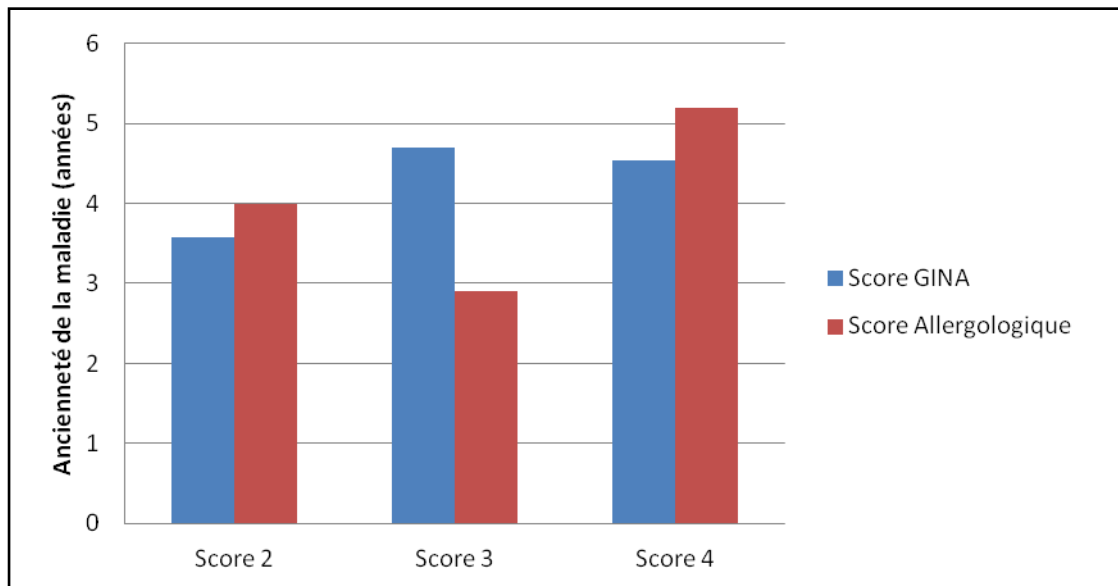


Figure 25: Variation des scores cliniques selon l'ancienneté de la maladie

3. Scores cliniques et paramètres biologiques:

Quant aux paramètres biologiques mesurés chez les deux populations, le tableau IV présente leurs valeurs moyennes pour les deux populations. Nos résultats montrent que le taux des IgEt chez les enfants asthmatiques est élevé comparativement aux enfants sains. Cette différence est très hautement significative ($p < 0,001$). La distribution du taux des IgE totaux selon les différents grades de la sévérité de l'asthme montre que les enfants asthmatiques qui ont un degré supérieur d'asthme ont un taux élevé d'IgE totaux (figure 26). L'analyse statistique a confirmé que le taux des IgE totaux est significativement associé avec la sévérité de l'asthme ($\chi^2, p < 0.001$).

Nous avons également trouvé que l'éosinophilie est élevée chez notre population d'enfants asthmatiques. La différence entre les deux groupes est hautement significative ($\chi^2, p < 0.01$). De plus, l'analyse statistique a montré que l'éosinophilie sanguine est associée avec la sévérité de l'asthme ($\chi^2, p = 0.01$).

Le pourcentage d'enfants asthmatiques ayant des taux d'IgEt et d'éosinophilie supérieurs aux valeurs normales est élevé pour les deux scores et dépasse les 50 % (voir figure 27).

L'augmentation des pourcentages des IgEt est hautement significative ($p < 0,05$) et de l'éosinophilie est très hautement significative ($p < 0,001$) pour le score allergologique.

Nous avons également recherché le lien entre le score GINA et le pourcentage des cas positifs pour les IgEt et l'éosinophilie. Les résultats obtenus montrent que la sévérité de l'asthme est fortement liée au pourcentage des IgEt ($p < 0,001$). Par contre, il n'existe pas un lien avec le pourcentage des cas positifs pour l'éosinophilie ($p > 0,05$).

Nous avons divisé le groupe des enfants asthmatiques en trois tranches d'âge: 2-5, 6-10 et 11-15 (Figure 28). Le pourcentage des enfants asthmatiques avec un taux d'IgE totaux au dessus de la valeur normal augmente avec de l'âge, allant de 68,19 % au dessus de la valeur référence à [2-5] ans, 86,36 % à [6-10] ans et atteindre son pic à [11-15] ans avec 88,88 %. Un résultat similaire a été trouvé pour l'éosinophilie, où on a prouvé que le pourcentage des cas positifs pour l'éosinophilie augmente aussi avec les tranches d'âges.

Tableau IV: Valeurs moyennes des paramètres biologiques mesurés chez les deux populations

Paramètres	Enfants sains (n = 50)	Enfants asthmatiques (n = 68)	Valeurs de <i>p</i>
IgE total (UI/ml)	122,48 ± 143,63	1857,66 ± 563,99	< 0,001 ^a
Eosinophilie (éléments/μl)	450 ± 344	520 ± 0,08	< 0,01 ^b
IgE spécifiques aux pneumallergènes (kU/l)			
Acariens			
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (d1)	1,93 ± 4,45	23,39 ± 23,96	< 0,001 ^a
<i>Dermatophagoides farinae</i> (d2)	1,75 ± 3,76	20,28 ± 18,69	< 0,01 ^a
<i>Acarus siro</i>	0,27 ± 0,35	7,24 ± 9,32	0,09 ^a
Animaux			
Chat (e1)	0,02 ± 0,33	1,10 ± 0,35	0,662 ^a
Chien (e2)	0,03 ± 0,16	0,68 ± 0,47	< 0,05 ^a
Moisissures			
<i>Cladosporium herbarum</i> (m2)	0,21 ± 0,20	3,36 ± 6,98	0,369 ^a
<i>Alternaria alternata</i> m6	0,02 ± 0,17	0,45 ± 0,20	0,121 ^a
IL-5 (pg/ml)	6,86 ± 7,30	30,26 ± 29,00	0,249 ^a
MDA (nmol/mg de protéines)	0,49 ± 0,16	0,86 ± 0,18	< 0,05 ^b
GPx (μmol GSH/mg de protéines)	0,20 ± 0,03	0,09 ± 0,02	< 0,05 ^b
Protéines totales (mg/ml)	7,26 ± 3,20	10,67 ± 0,64	0,368 ^a

^a Le test utilisé est le test *t* de Student pour deux échantillons non appariés

^b Le test utilisé est le test Khi deux

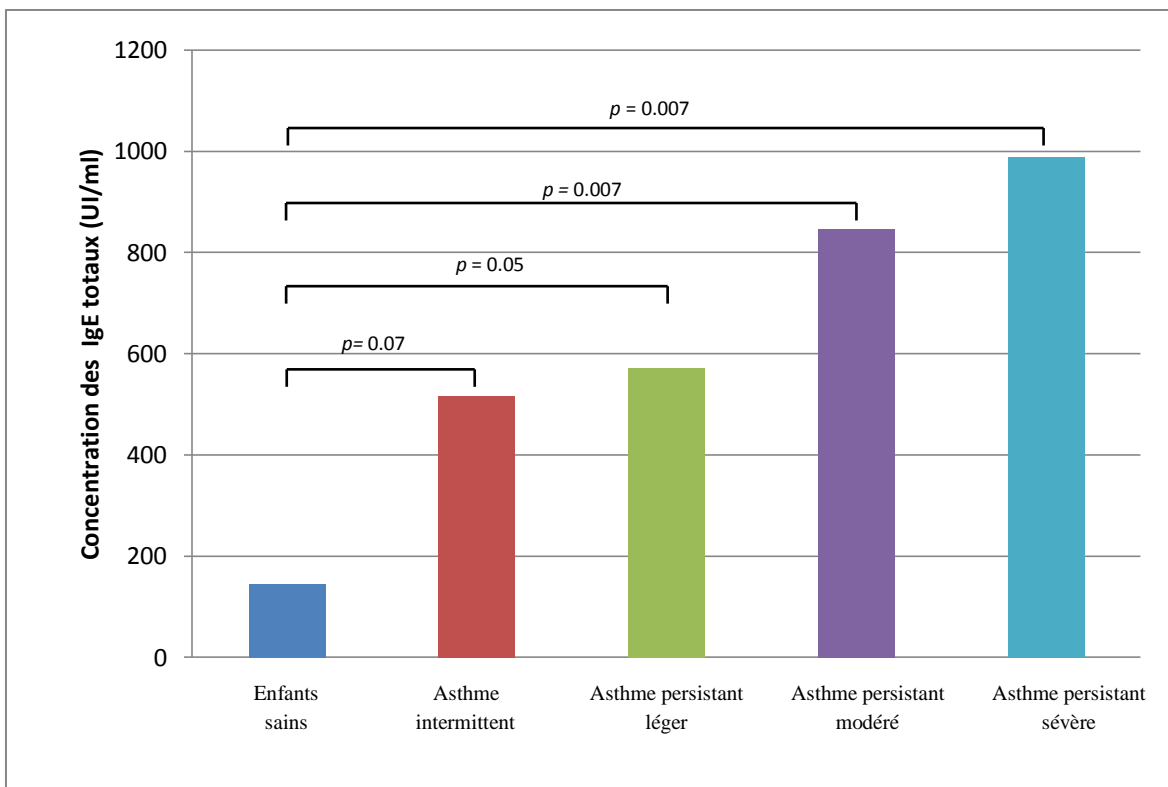


Figure 26: Variation du taux des IgE totaux selon la sévérité de l'asthme

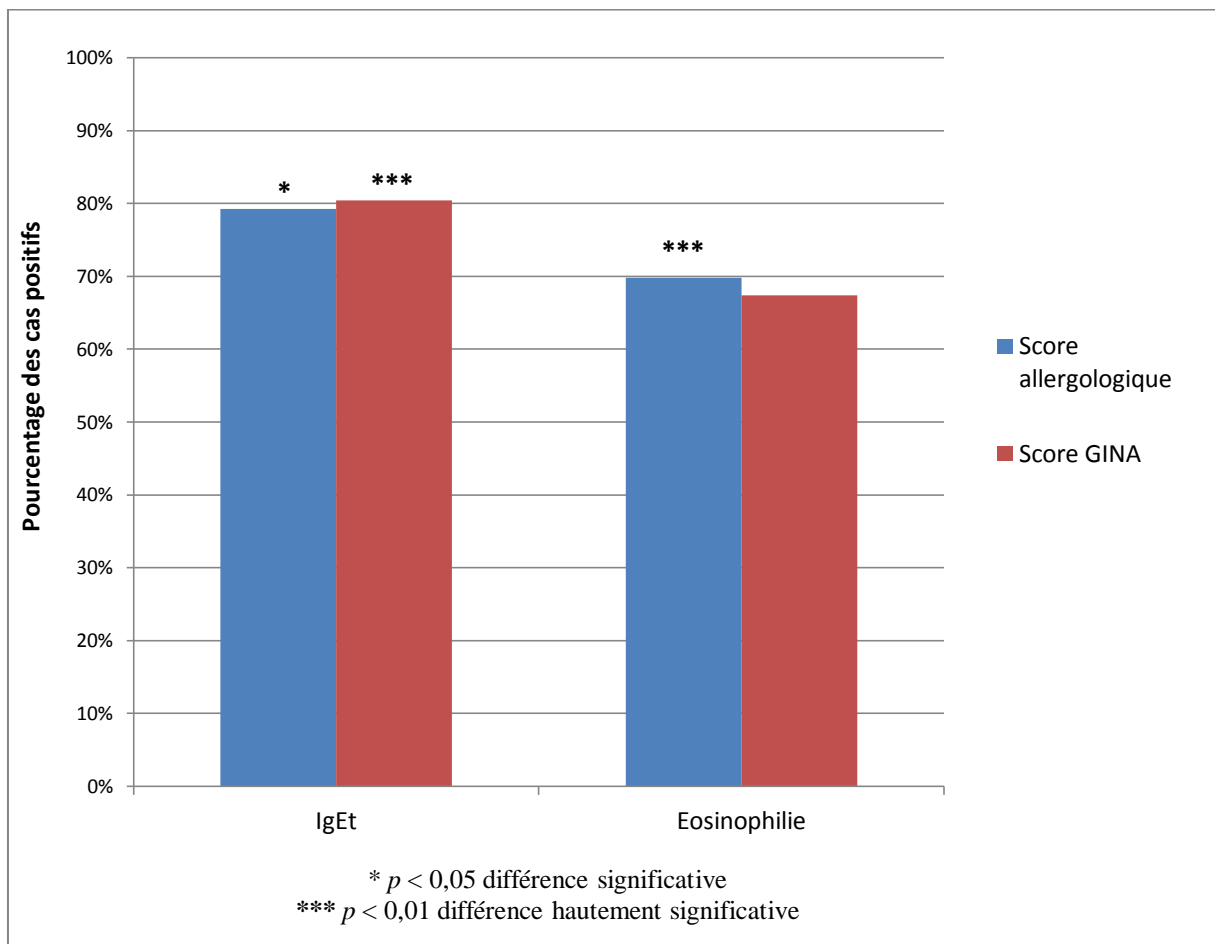


Figure 27: Pourcentage des cas positifs des IgE totaux et de l'éosinophilie selon les deux scores

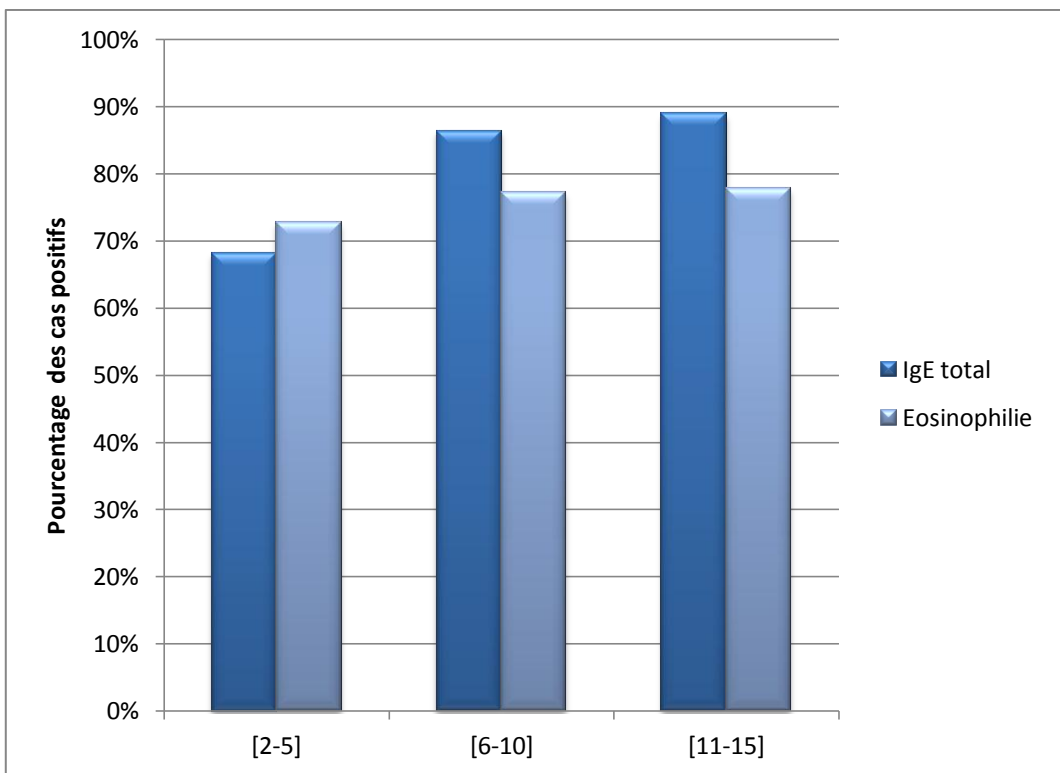


Figure 28: Pourcentage des cas positifs pour l'IgE totaux et l'éosinophilie selon les tranches d'âge

4. Paramètres biologiques et stress oxydant :

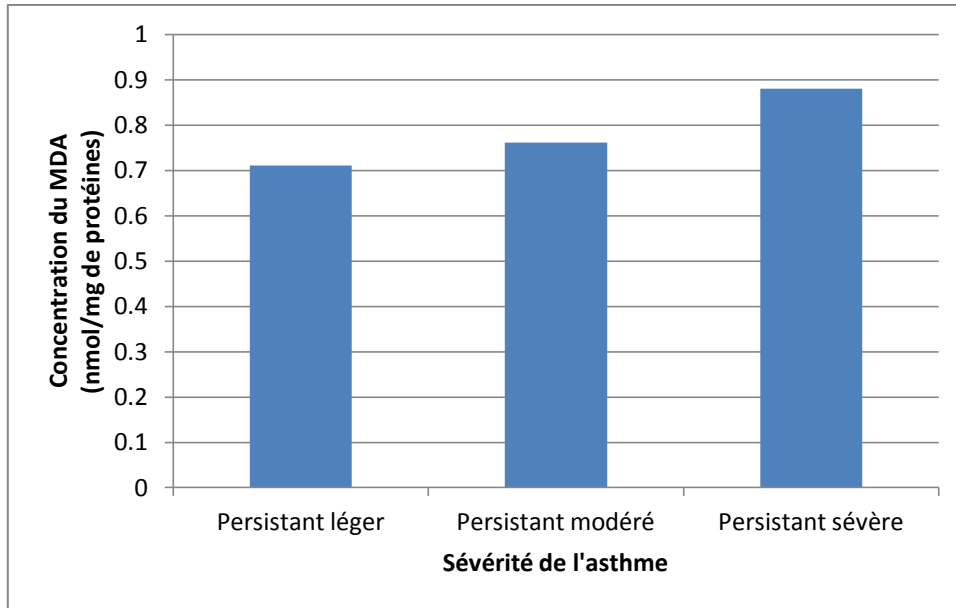
Quant aux paramètres du stress oxydant, selon les résultats obtenus, on trouve que la concentration du MDA est plus importante chez les enfants asthmatiques en la comparant avec celle des enfants sains ($p < 0,05$). De plus, l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) est diminuée chez la population asthmatique d'une façon significative ($p < 0,05$).

L'analyse statistique montre que le taux d'IgEt et la concentration du MDA sont associés. Cette corrélation est très hautement significative ($\chi^2, p = 0,001$). Le taux des IgEt est aussi associé avec la concentration du GPx d'une façon hautement significative ($\chi^2, p < 0,01$). Cependant, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'éosinophilie et ces deux paramètres (MDA et GPx).

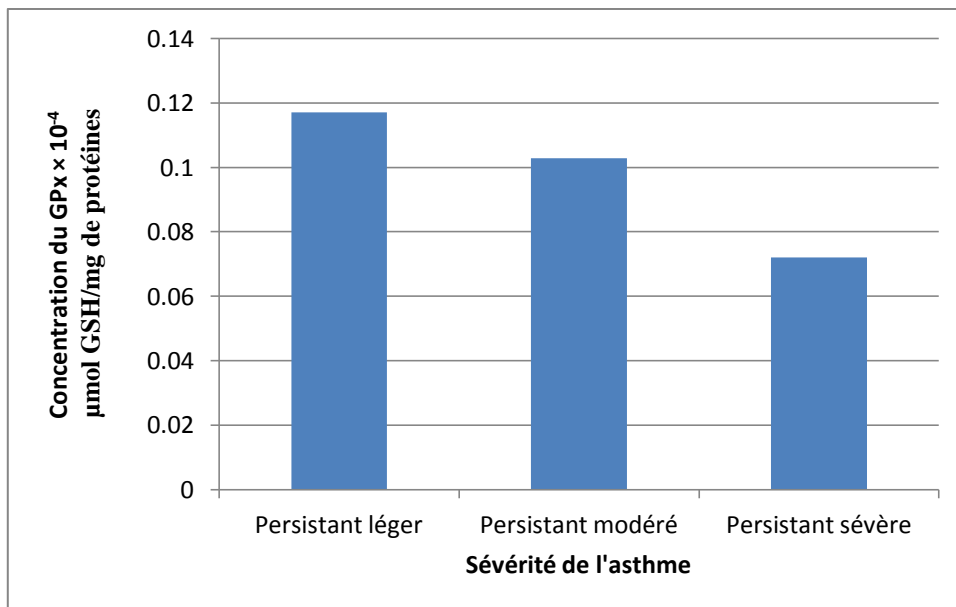
5. Stress oxydant et scores cliniques:

Nous avons également recherché la relation entre les paramètres du stress oxydant et les scores cliniques (score GINA et score allergologique). La figure 29, représentant la variation des taux de MDA et de GPx selon la sévérité de l'asthme, montre que la concentration du MDA augmente avec la sévérité de l'asthme et atteint son seuil maximum avec l'asthme persistant sévère. Au contraire, on note que la concentration de la GPx diminue avec la sévérité de l'asthme.

L'analyse statistique montre que la concentration du MDA est liée d'une façon significative à la sévérité de l'asthme ($\chi^2, p = 0,05$). Par contre, la diminution de la concentration de la GPx n'est pas liée à la sévérité de l'asthme ($\chi^2, p > 0,05$). Nous avons également trouvé que le score allergologique n'est statistiquement lié ni à la concentration du MDA, ni à celle de la GPx ($\chi^2, p > 0,05$).



A (MDA)



B (GPx)

Figure 29: Variation des taux du MDA (A) et de la GPx (B) selon la sévérité de l'asthme

6. Sensibilisation aux pneumallergènes et sévérité de l'asthme:

Tous les enfants asthmatiques de notre étude sont au moins sensibilisés à un pneumallergène (figure 30). La concentration moyenne en IgEs la plus élevée est observée vis-à-vis des acariens (tableau IV). D'ailleurs, 76,50 % des enfants asthmatiques sont sensibilisés aux acariens. L'analyse statistique a montré que les IgE spécifiques aux *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1) et aux *Dermatophagoides farinae* (d2) sont plus élevés chez les enfants asthmatiques en comparaison avec les enfants sains ($p < 0.001$ et $p < 0.01$ respectivement). Par contre il n'y a aucune différence pour les IgE spécifiques aux *Acarus siro* entre les deux populations.

Ainsi l'analyse statistique montre que le taux des IgE totaux est corrélé avec les IgE spécifiques aux acariens: ($r = 0.50, p < 0.001$), ($r = 0.47, p = 0.001$) et ($r = 0.32, p = 0.02$), respectivement. Nous avons également montré que la sévérité de l'asthme est associée avec la sensibilisation aux acariens ($\chi^2, p < 0.01$).

La sensibilisation aux poils d'animaux est aussi retrouvée chez notre population, où 20 % des enfants asthmatiques sont sensibilisés à ce pneumallergène. La différence entre le taux des IgE spécifiques aux chats chez les enfants asthmatiques et les enfants sains n'est pas significative. En revanche la sensibilisation aux chiens est significative entre les deux populations ($p < 0,05$). La sensibilisation aux poils d'animaux est associée avec la sévérité de l'asthme. Cette association est hautement significative pour les chats ($\chi^2, p = 0.001$), tandis qu'il n'existe pas une association entre la sévérité de l'asthme et la sensibilisation aux moisissures ($\chi^2, p > 0.05$), malgré le fait que cette dernière est retrouvée chez 32,3 % chez la population asthmatique.

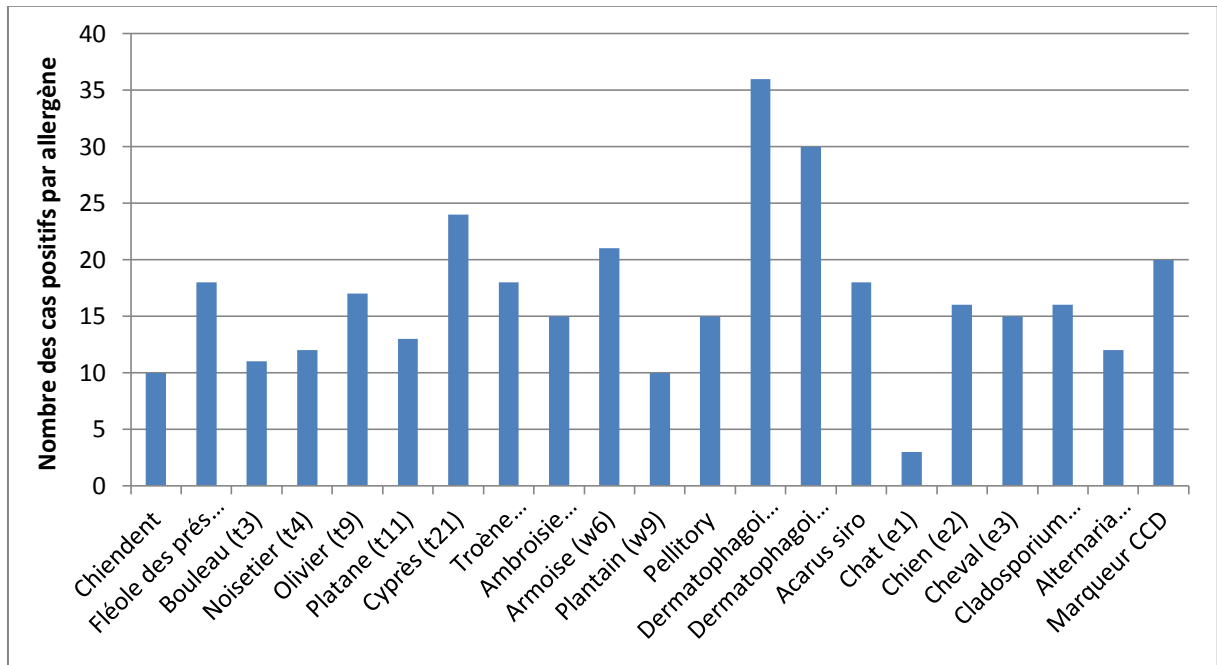


Figure 30: Nombre de cas positifs pour chaque allergène chez la population asthmatique

7. L'environnement domestique et l'exposition aux acariens:

7.1. Description des habitats:

Nos prélèvements ont été réalisés de Mai 2012 à Octobre 2012. Nous n'avons pu réaliser ces mesures chez l'ensemble des habitats des enfants inclus dans notre étude. Seules 33 maisons ont été visitées.

Les mesures de la température et de l'hygrométrie à l'intérieur de chaque habitat ont permis d'observer que la moyenne de la T° intérieure est de 30 °C et la moyenne du taux d'hygrométrie intérieure est de 54 %.

On note que 67.85% des logements des enfants asthmatiques ont un taux d'humidité intérieur supérieur à 50 %.

La description des habitats intérieurs (voir tableau V) permet de mettre en exergue les facteurs favorisant la contamination fongique. Par ailleurs, une inspection visuelle a permis de constater la présence de développement de moisissures au niveau 89 % des logements (voir les photos prises dans quelques habitats et montrées dans la figure 31). Dans 72 % des cas, ces traces pouvaient être à l'origine d'odeur de moisissures.

Viennent s'ajouter à la biocontamination fongique, d'autres facteurs qui sont connus pour être à l'origine de divers symptômes des pathologies allergiques, tels que la fumée de tabac : les occupants de 26 % des logements déclaraient fumer à l'intérieur du logement.

De plus, les animaux domestiques étaient présents avec un moindre pourcentage dans les logements des enfants asthmatiques avec 5 %.

On note également la présence de literie en laine dans 36 % des logements des enfants malades versus 63 % chez les enfants sains. Tout comme les tapis y sont présents dans 51 % des cas versus 90 % chez les enfants sains.

Enfin, d'après le questionnaire, la quasi-totalité (100 %) des maisons des enfants sains sont très régulièrement aérées.

D'après nos résultats, on trouve que soixante six pour cent des enfants asthmatiques vivent en zone urbaine de la ville d'Annaba, versus 60 % des enfants sains.

Tableau V: Description des habitats pour les deux populations

Paramètres	Population saine	Population asthmatique
Taux d'hygrométrie > 50 %	60 %	67,85 %
Localisation des habitats (zone urbaine/zone rurale)	9/6	45/23
Chauffage	40 %	65 %
Aération (ouverture de fenêtres)	100 %	98 %
Tâches de moisissures	25 %	89 %
Odeur de moisis	38 %	72 %
Présence de fumeurs à l'intérieur	3 %	26 %
Animaux domestiques	2 %	5 %
Literie en laine	63 %	36 %
Présence de tapis	90 %	51 %
Présence de rideaux	90 %	71 %
Jouets en peluches	0 %	0,02 %



Photos 1 : Surface couverte de moisissures dans une chambre (habitat n°2)



Photos 2 : Problème d'infiltration d'eau (habitat n°2)



Photo 3 : Taches de moisissures dans la salle de bain (habitat n°1)



Photo 4 : Problème d'humidité (habitat n°6)



Photo 5 : Problème d'humidité avec tâches de moisissures dans la salle de bain (habitat n°5)



Photo 6 : Tâches de moisissures dans le salon (habitat n°2)

Figure 31: Quelques photos prises dans quelques uns des habitats prélevés

7.2. Développement des moisissures:

Le prélèvement des moisissures intérieures n'a pu être réalisé que pour 28/68 enfants asthmatiques (40 %) et seulement pour 5/15 enfants sains (32 %).

Une lecture régulière de la croissance des colonies fongiques est effectuée pour éviter l'envahissement des boîtes de pétri par certaines autres espèces de micro-organismes (comme les bactéries).

L'observation de la culture, après 5 jours d'incubation, montre des cultures dites « jeunes » dont les aspects macroscopique et microscopique demeurent insuffisants pour permettre l'identification des moisissures.

Quant à l'observation de la culture après 10 jours d'incubation, elle révèle de grandes colonies que l'on peut différencier macroscopiquement. Le diamètre et la couleur des colonies diffèrent en fonction de la durée d'incubation (voir figure 32).

Ainsi, l'examen microbiologique, basé sur l'aspect des colonies, la structure et la morphologie du thalle, a servi à la mise en évidence de 11 genres de champignons (neuf genres de moisissures et deux genres de levures) (tableau VI).

Tableau VI: Répartition des genres de moisissures présents dans l'air et la poussière intérieure selon les deux populations

Genres de champignons	Maisons des enfants malades		Maisons des enfants sains	
	Air intérieur	Poussières intérieures	Air intérieur	Poussières intérieure
<i>Cladosporium sp</i>	85,71 %	42,85 %	100%	40%
<i>Penicillium sp</i>	46,42 %	35,71 %	100%	20%
<i>Aspergillus sp</i>	35,71 %	21,42 %	0%	20%
<i>Alternaria sp</i>	21,42 %	7,14 %	0%	0%
<i>Mucorale sp</i>	14,28 %	7,14 %	0%	20%
<i>Paecylomyces sp</i>	7,14 %	0%	0%	0%
<i>Aureobasidium sp</i>	10,71 %	0%	0%	0%
<i>Scytalidium sp</i>	3,57 %	3,57 %	0%	0%
<i>Acremonium sp</i>	2,65 %	0%	0%	0%
<i>Fusarium sp</i>	0%	10,71 %	40%	40%
<i>Rhotorula sp</i>	0%	7,14 %	0%	0%

Ces genres de champignons sont trouvés dans tous les prélèvements réalisés: par impacteur (figure 33), boîte de sédimentation (figure 34), frottis de surface (figure 35), poussières de literie (figure 36).

Alors que certains genres sont plus abondants dans l'air intérieur que dans les poussières intérieures (Tableau V). Les habitats des enfants sains contiennent pratiquement les mêmes genres de moisissures trouvés dans celles des enfants asthmatiques, bien que certains genres soient absents: *Alternaria sp*, *Paecylomyces sp*, *Aureobasidium sp*, *Scytalidium sp*, *Acremonium sp* et *Rhodotorula sp*.

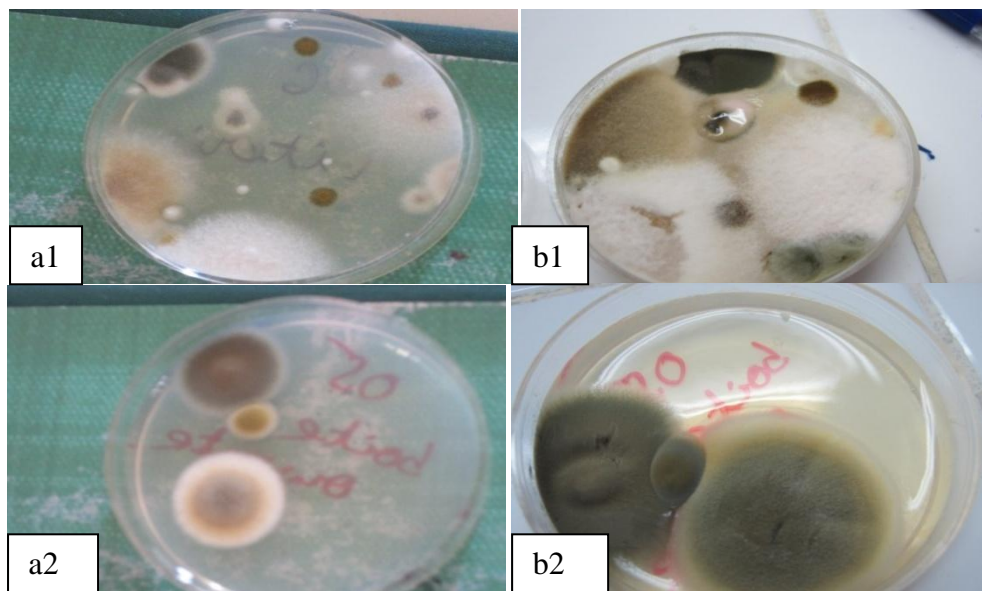


Figure 32 : Aspects macroscopiques de 4 échantillons de cultures montrant les colonies en croissance après 5 jours (a1 et a2) et 10 jours (b1 et b2) d'incubation retrouvés dans les maisons des enfants malades

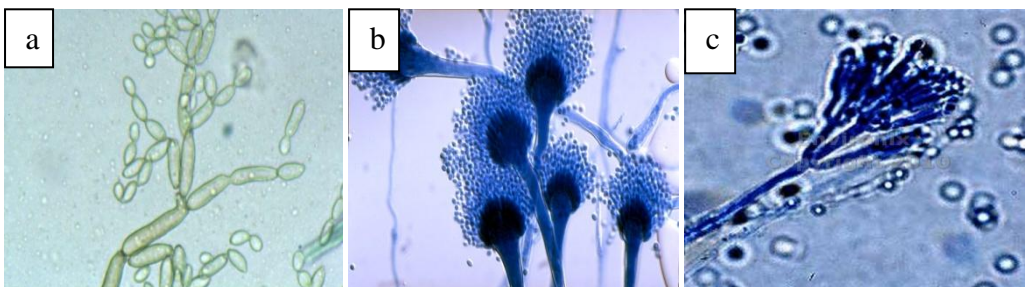
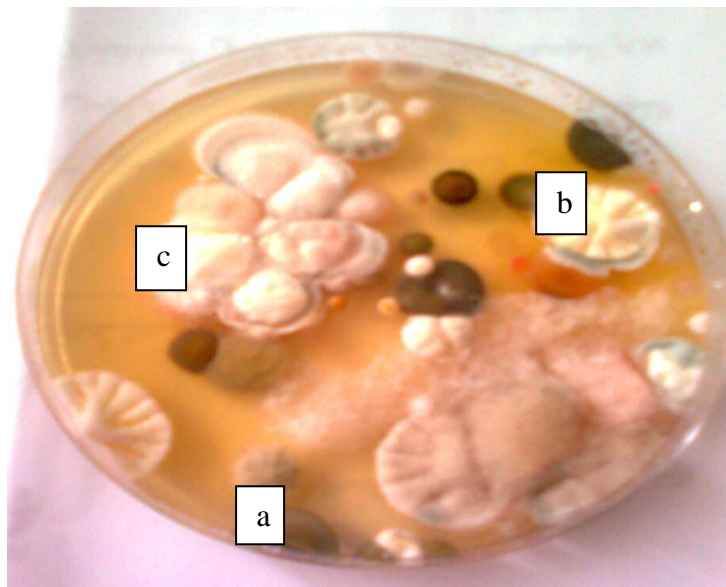


Figure 33: Aspects macroscopique et microscopique (G : X40) de la culture réalisée par l'impacteur (DUO SAS 360) dans les maisons des enfants malades.

Identification de trois colonies de champignons:

a : *Cladosporium* b : *Alternaria* c : *Penicillium*

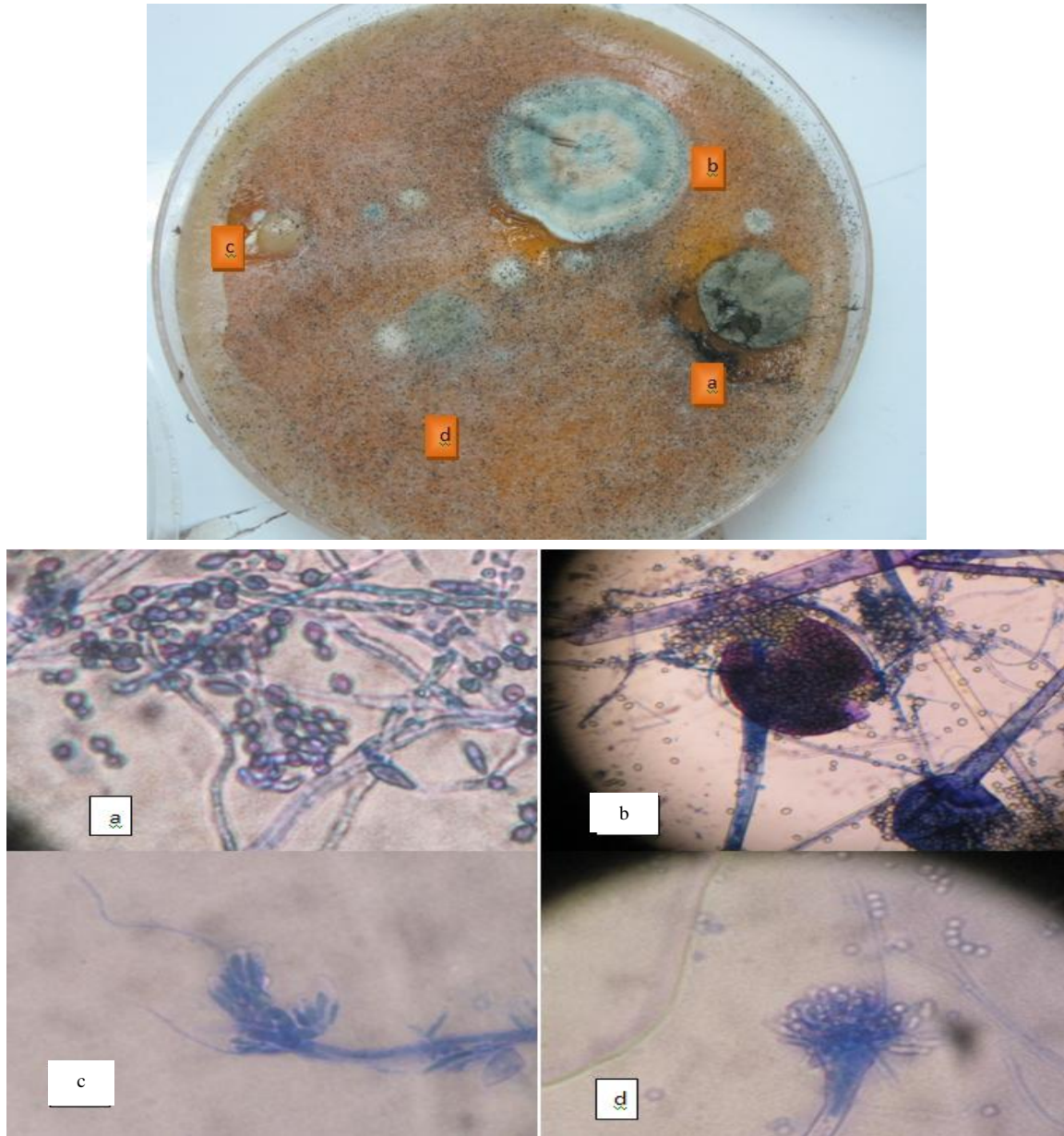


Figure 34: Aspects macroscopique et microscopique (G : X40) de la culture réalisée dans une boîte de sédimentation dans les maisons des enfants malades. Identification de quatre colonies de champignons:
a: *Cladosporium* b: *Mucorale* c: *Penicillium* d: *Aspergillus niger*

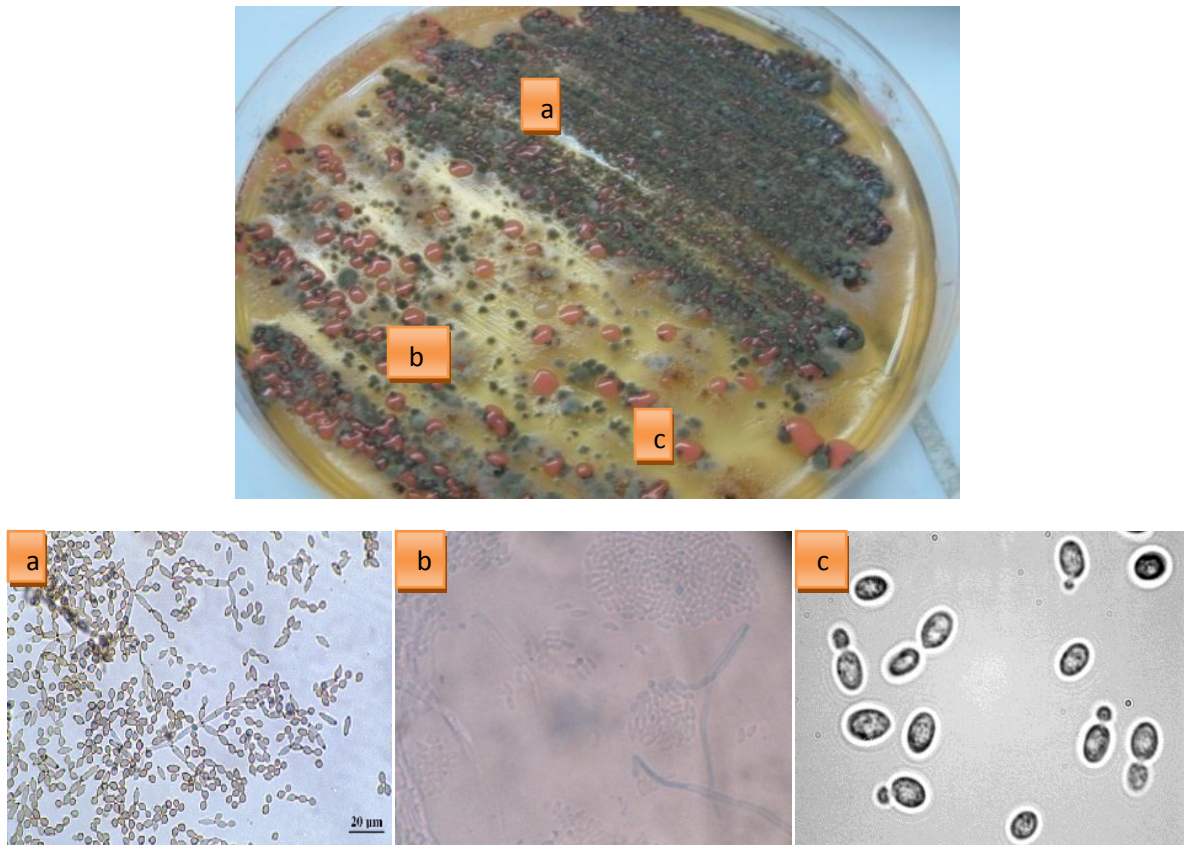


Figure 35: Aspects macroscopique et microscopique (G : X40) de la culture réalisée à partir des tâches de moisissures dans les maisons des enfants malades.

Identification de trois colonies:

a : *Cladosporium*

b : *Acremonium*

c : *Rhodotorula*

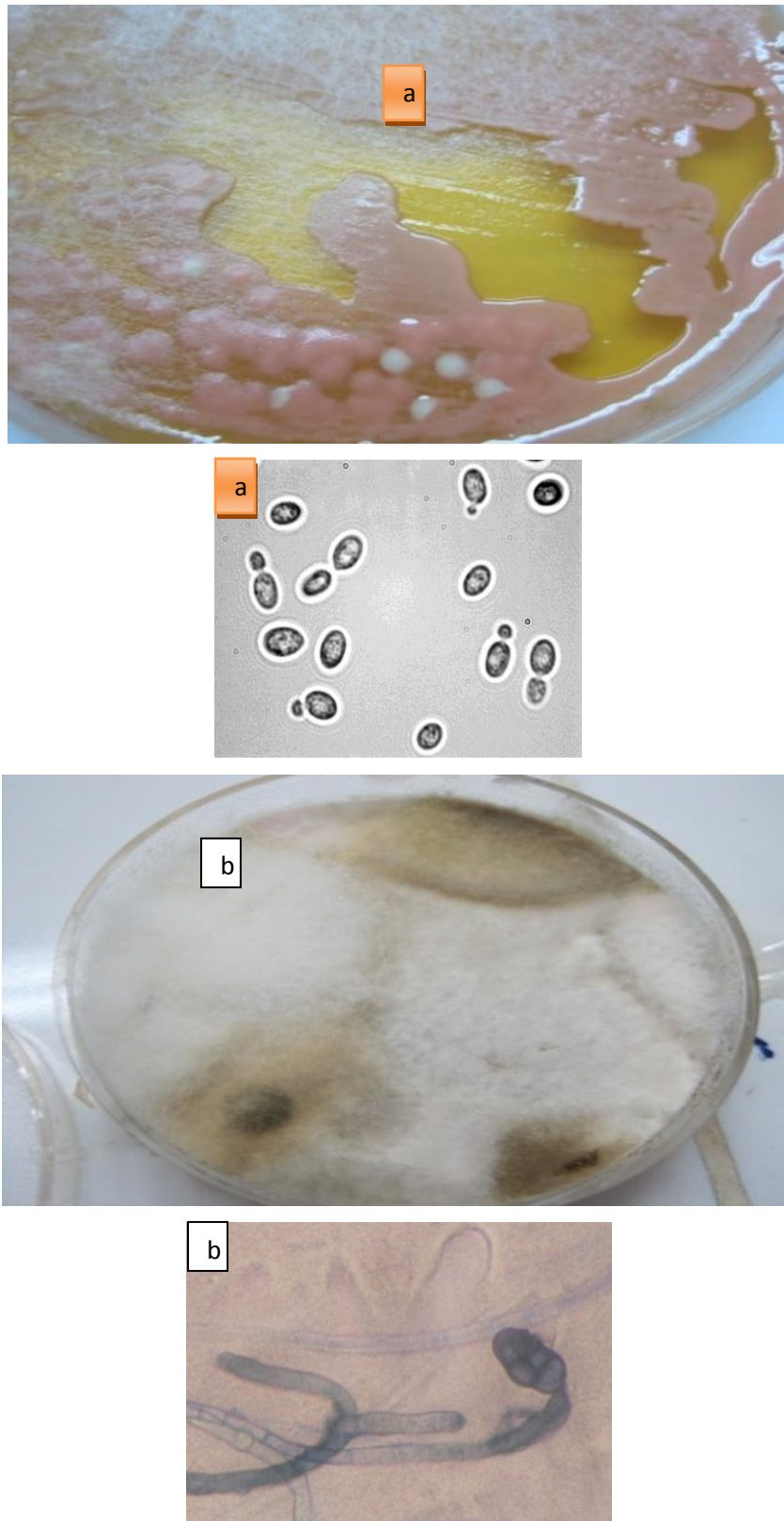


Figure 36: Aspects macroscopique et microscopique (G : X40) de la culture réalisée à partir de la poussière de litière dans les maisons des enfants sains.

Identification de deux colonies:

a : *Rhodotorula*

b : *Penicillium sp*

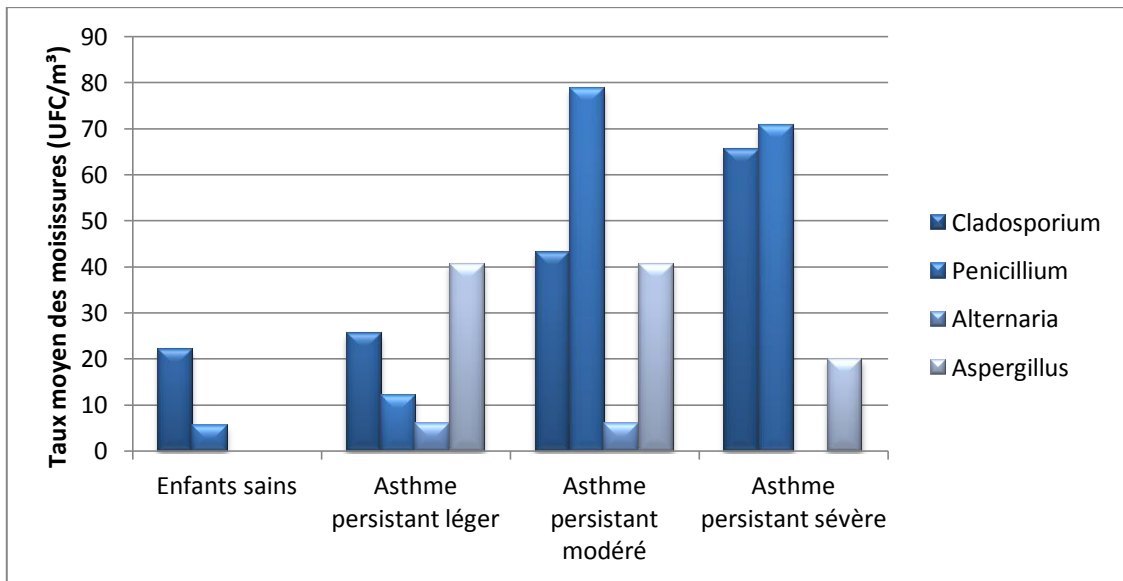
7.3. Sévérité de l'asthme et moisissures:

Tous les genres de moisissures trouvés dans l'air intérieur et la poussière intérieure chez les enfants asthmatiques sont plus élevés ($p < 0,05$) que celles trouvés chez les enfants sains. Cette augmentation est statistiquement significative ($p < 0,05$) pour *Cladosporium* dans les échantillons de l'air et pour *Penicillium* pour les échantillons de poussière. De plus l'analyse statistique a montré que la sensibilisation aux moisissures est fortement associée avec la présence de moisissures dans l'air intérieur ($\chi^2, p < 0.001$).

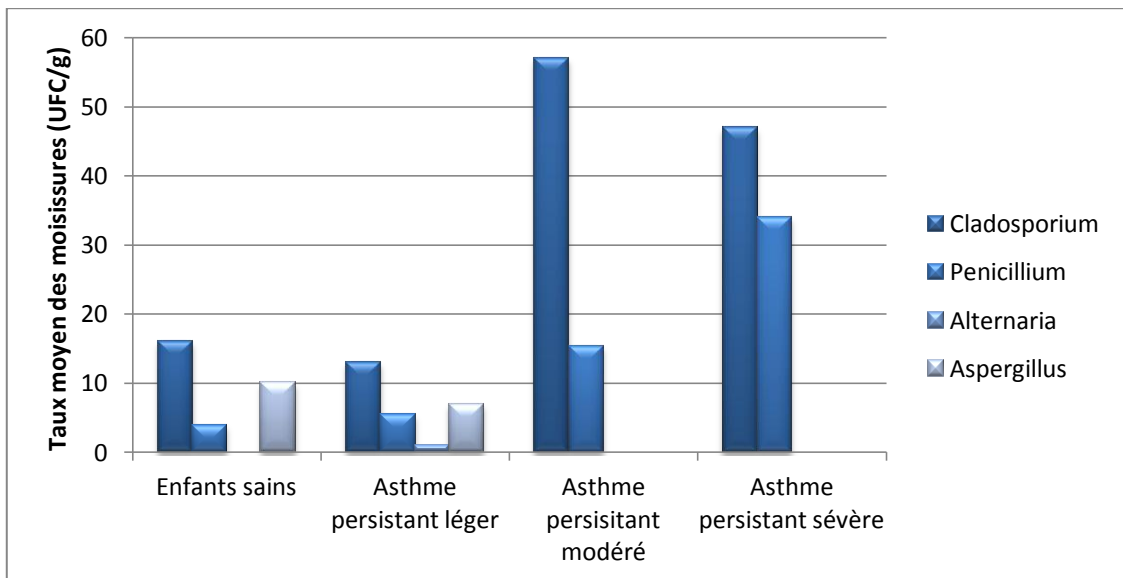
Selon l'étude statistique, nous avons trouvé une augmentation significative pour *Cladosporium* et *Penicillium* dans l'air et la poussière intérieur selon la sévérité de l'asthme. Ce taux a atteint et atteindre son seuil maximum chez les enfants ayant un asthme persistant modéré et persistant sévère (figure 37).

7.4. Répartition différentielle des espèces entre zones urbaines et périurbaines:

Dans notre étude, les espèces de champignons rencontrées sont réparties différemment selon le site de prélèvement (voir figure 38). On remarque qu'*Aspergillus niger* est retrouvé seulement dans la zone urbaine. De plus, la zone urbaine est caractérisée par une grande variété mycologique avec abondance des genres *Penicillium* et *Cladosporium* et exclusivité de la présence d'*Aspergillus* et *Candida*. On note également que les tâches de moisissures contiennent, en plus de *Cladosporium* et le genre *Rhodotorula*.



(A) : Air intérieur



(B) : Poussières domestiques

Figure 37: Variation du taux des moisissures dans l'air intérieur (A) et dans la poussière intérieure (B) selon la sévérité de l'asthme et en comparaison avec les enfants sains

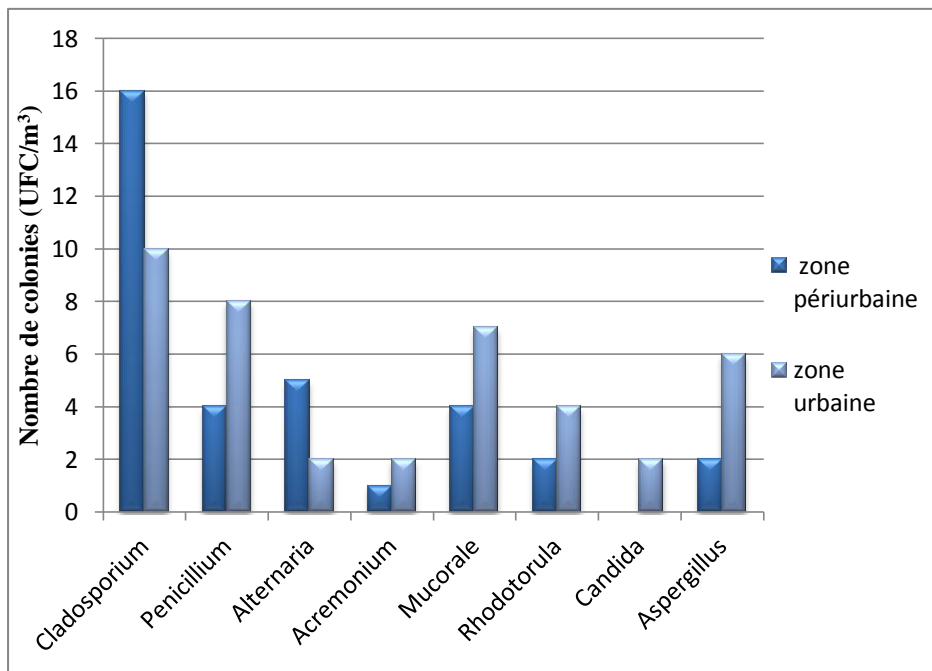


Figure 38: Répartition des genres de champignons selon les sites des habitats des enfants malades

8. Discussion:

L'asthme est une maladie inflammatoire des bronches à forte prévalence dans le monde. Dans les pays du Maghreb, aussi bien en Algérie, au Maroc qu'en Tunisie, la prévalence de cette maladie varie de 2 % à 5 %, touchant surtout des sujets jeunes (Anane et Boukhari, 2001). C'est ce qui justifie notre choix d'étudier une population pédiatrique à Annaba.

On sait également, que l'une des principales causes de l'asthme est l'allergie. D'ailleurs, il n'existe pas de traitement permettant de guérir de cette maladie de façon définitive, néanmoins, les crises sont susceptibles de se raréfier et de s'atténuer dans le cas de l'asthme allergique lorsqu'on évite le contact avec l'allergène. Encore faut-il identifier et connaître les allergènes en cause dans notre région.

C'est ce que nous nous sommes proposé d'explorer à travers cette modeste étude. De plus, nous avons recherché les liens clinico-biologiques qui permettrai de mieux cerner les boimarqueurs de cette maladie chez une population de jeunes patients comparativement à des enfants témoins.

Nous avons ainsi jugé utile, dans un premier temps, de décrire la population étudiée à travers un questionnaire préétablit.

Il est décrit dans la littérature que, chez l'enfant, les garçons sont plus fréquemment asthmatiques que les filles (Dutau et al 1998). Cette prédominance masculine est souvent liée au risque de l'asthme, comme cela a été rapporté par plusieurs auteurs comme Boumendjel et al dans une autre étude pédiatrique toujours à Annaba (Boumendjel et al., 2010).

Cependant, dans notre cas, on la retrouve à la fois chez les enfants malades que chez les enfants en bonne santé. Ainsi, cette prédominance masculine pourrait être simplement le reflet de la structure de la population sélectionnée.

Par ailleurs, on sait qu'il existe différents degrés d'asthme, ceux-ci s'échelonnant de l'asthme léger à l'asthme sévère en fonction de l'importance des crises, de la fréquence respiratoire et de la fréquence d'apparition des crises (de une à plusieurs par semaines).

Ainsi, nous avons subdivisé notre population, selon deux scores : le score GINA, reflétant la sévérité de l'asthme, et un score allergologique décrivant les différents symptômes ou manifestations allergiques des enfants. Aussi, le regroupement des enfants malades selon la sévérité de leur asthme (score GINA), nous a permis de constater que la fraction majoritaire (33%) se retrouve dans le 3ème palier GINA, c'est-à-dire des enfants ayant un asthme persistant modéré (tableau I).

Boumendjel et al. (2010) ont également trouvé que la plupart des enfants asthmatiques dans la région d'Annaba (échantillonnage réalisé en 2005) ont un asthme persistant modéré (46%).

Ainsi, nous sommes au regret de constater que la situation n'aurait pas vraiment changé à Annaba, en une dizaine d'années. Ces résultats montrent également que la majorité de la population asthmatique étaient à haut risque pour passer au grade supérieur de la maladie (c.-à-d. l'asthme sévère) ce qui suggère que les patients asthmatiques souffrent d'un manque de traitement ou d'une exposition excessive à des facteurs déclenchants.

Nous montrons également que les différents scores que nous avons calculés varient en fonction de l'ancienneté de la maladie. Ainsi, plus la maladie est anciennement installée, plus elle est sévère et plus elle présente des manifestations allergiques plus nombreuses. En effet, on trouve que plus de 73 % d'entre eux présentent au moins un antécédent atopique personnel représenté principalement par la rhinite allergique.

Ces résultats suggèrent que ces enfants ayant un asthme sévère et/ou un grand nombre de manifestations allergiques souffrent depuis longtemps d'asthme. Ceci peut témoigner encore une fois d'une mauvaise prise de médicaments ou être dû à un déni de la maladie par les jeunes habitant, ici, en majorité dans les zones urbaines de la ville.

De plus, parmi les antécédents familiaux, l'atopie représente le facteur de risque le plus clairement définie dans l'asthme chez les enfants. Selon le descriptif général de la population, nous avons constaté l'existence de l'atopie familiale chez les enfants asthmatiques qui est d'ailleurs très élevée (72 %), relativement à celle retrouvée dans la population témoin (14%).

Une étude précédente à Annaba (Boumendjel et al. 2012) a montré un pourcentage similaire pour l'atopie familiale avec 74%. Parmi ces enfants atopiques, 43% avaient une atopie maternelle. Ce constat représente également un facteur de risque important pour l'apparition de la maladie dans la petite enfance avec une respiration sifflante récurrente qui persiste durant toute l'enfance (Castro-Rodriguez et al., 2000).

L'atopie décrit donc la prédisposition génétique des êtres humains à produire des anticorps spécifiques (IgE) dirigées contre les allergènes communs se retrouvant soit dans les aliments, soit dans les environnements intérieur et extérieur (Fernando et Donata 2013). Voilà pourquoi la détermination de la concentration sérique des anticorps IgE totales et spécifiques joue un rôle majeur dans le diagnostic de l'asthme pédiatrique qui très souvent est d'origine allergique.

L'évaluation des taux des IgE sériques totales ainsi que l'éosinophilie et les protéines totales chez l'ensemble des enfants recrutés nous a aussi permis d'étudier diverses associations entre ces paramètres biologiques et certains autres paramètres clinico-biologiques de l'inflammation.

Tout d'abord, nous avons constaté que les enfants malades avaient des taux nettement plus élevés que ceux des enfants sains et ce pour les paramètres biologiques précédemment cités.

En fait, ce constat est largement décrit dans la littérature car leur augmentation reflèterai l'augmentation des médiateurs de l'inflammation lors d'états pathologiques (Federlyet al., 2013; Wenzel, 2009).

En effet, nos résultats ont montré que les enfants asthmatiques avaient une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration sérique d'IgE totales en comparaison avec les enfants témoins (tableau II).

De plus, nos résultats viennent confirmer encore une fois que le taux d'IgE sériques est en étroite association avec la sévérité de l'asthme représentée par le score GINA ($p < 0,001$) (Figure 1), tout comme une étude récente à Annaba, fait état d'une corrélation positive entre les IgE totales et la sévérité de l'asthme chez les enfants de moins de 16 ans (Boumendjel et al., 2010).

Dans la littérature, on retrouve bien une corrélation entre la gravité de l'asthme et l'éosinophilie sanguine (Rothenberg et Mehogan 2006). Par contre, dans notre présente étude, on ne trouve aucune association entre la sévérité de l'asthme et l'éosinophilie. Cependant, ce même taux ainsi que les IgE sont tous deux liés au score allergologique ($p < 0,05$). Le pourcentage des cas positifs, à la fois concernant les IgE totales et l'éosinophilie sanguine, augmente avec l'âge (figure 2).

Il est vrai que ce sont surtout les interactions gènes/environnement qui vont déterminer le développement des maladies inflammatoires chroniques, leur initiation, leur progression et le remodelage qui y est associé, sous l'effet de plusieurs facteurs déclenchant (Peden et Reed, 2010).

D'ailleurs, en explorant l'environnement domestique des enfants asthmatiques, on constate qu'il abrite plusieurs sources d'aéroallergènes susceptibles d'aggraver la pathologie en la perdurant. Il s'agit, comme nous l'avions relevé des moisissures qui sont fortement présents par rapport aux demeures des enfants sains (89% vs 10%), des poils d'animaux (5% d'animaux domestiques présents vs 2% dans les maisons des enfants sains) ainsi que du tabagisme passif (26% vs 10%).

Par ailleurs, la littérature rapporte que la sensibilisation aux aéroallergènes, y compris les animaux domestiques, est courante, surtout chez les personnes souffrant d'asthme (Ki-Hyun et al. 2013). Dans notre étude, nous avons relevé 29.4% des enfants asthmatiques ayant une sensibilisation aux animaux de compagnie (chiens et chats). Une étude précédente (Sharif et al., 2004) a estimé également que 20 à 30% des patients asthmatiques ont des symptômes d'allergie vis à vis des animaux domestiques.

En outre, il a été montré dans la littérature que la sévérité de l'asthme est associée à une sensibilisation aux poils de chat (Melen et al., 2001). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les enfants souffrant d'asthme et ceux sans asthme en ce qui concerne la sensibilisation au chat, alors qu'il y avait une différence significative en ce qui concerne la sensibilisation au chien entre les deux groupes.

Ce résultat semble refléter le fait que dans notre société le chien n'a pas vraiment sa place à l'intérieur des demeures, en revanche, le chat représente l'animal domestique par excellence.

De plus, les variables environnementales, telles que la température et l'humidité, peuvent influencer sur la croissance et la reproduction des champignons et la concentration des spores dans l'air. Ceci a été rapporté maintes fois dans la littérature. Nous citons à titre d'exemple, l'étude de Abdel Hameed et al. où les auteurs ont montré que les concentrations fongiques étaient significativement corrélées avec les paramètres météorologiques (Abdel Hameed et al. 2012).

Pareillement, notre étude montre que la température intérieure moyenne était d'environ 30 ° C et 54% d'humidité dans les maisons d'enfants asthmatiques, ce qui représente des conditions favorables à la croissance des moisissures dans les habitats intérieurs.

De plus, nos résultats indiquent clairement qu'il existe une forte corrélation entre le nombre de CFU / m³ dans l'environnement intérieur et la température en particulier en ce qui concerne le genre *Penicillium*, exactement tel qu'il a été relaté dans la littérature (Pakpour et al., 2015).

Nous démontrons également qu'il existe une corrélation hautement significative entre certains champignons (y compris *Aspergillus* et *Mucor*) et l'humidité enregistrée dans les maisons visitées.

Nos données ont ainsi montré que les genres les plus communs dans l'air intérieur étaient : *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus*. Nous l'avions d'ailleurs signalé précédemment (Meharzi et al. 2013). Les mêmes types ont également été trouvés à des taux moindres dans les maisons des enfants témoins.

En outre, la concentration en champignons dans l'air et la poussière de maison étaient plus élevée dans les échantillons provenant des maisons d'enfants asthmatiques que celles des enfants en bonne santé. Ce résultat indique que l'environnement intérieur des premiers constitue une source d'aéroallergènes importante qui pourrait éventuellement être en faveur d'une aggravation significative de leur état de santé.

En tout cas, la différence entre les deux groupes n'est pas due à la variation saisonnière, parce que, nous pensons que, dans cette étude, l'échantillonnage s'est produit dans pratiquement la même période estivale qui (en Algérie) dure de fin mai à mi-October.

Néanmoins, les différences saisonnières dans la zone de la Méditerranée ne sont pas suffisamment documentées dans la littérature.

L'exposition à ces champignons a été associée à des symptômes allergiques et respiratoires (Mendell et al., 2011). En effet, nos résultats ont montré que les enfants qui avaient le grade GINA le plus élevé ont été exposés à des taux élevés de champignons à la fois dans l'air intérieur et dans la poussière de maison.

Ainsi, l'abondance des champignons (et de leurs spores) pourraient être à l'origine de l'exacerbation de l'asthme (Tischer et Heinrich, 2012).

L'évaluation des IgEs montre que les enfants asthmatiques sont également sensibilisés aux champignons. En effet, 32,3% d'entre eux ont été sensibilisés à la fois à *Cladosporium* et *Alternaria*.

D'ailleurs, notre étude montre clairement que les taux des champignons de l'habitat intérieur sont associés à une sensibilisation à ces mêmes champignons, notamment pour *Cladosporium* et *Alternaria*. La sensibilisation pour certains champignons, en particulier *Alternaria alternata*, est liée à la présence, la persistance et la gravité de l'asthme ce qui a été confirmé par plusieurs études (Khosravi et al., 2009) (Baxi et al. 2013).

Dans notre étude, la sensibilisation la plus forte a été trouvée avec les acariens. En effet, à Annaba, à la fois le niveau très élevé d'humidité et la température moyenne, contribue au développement de nombreux autres aéroallergènes intérieurs, mise à part les moisissures, tels que les blattes et les acariens.

En effet, la température et l'humidité favorisent également le développement des acariens dans les habitats intérieurs des enfants asthmatiques. D'ailleurs, plus de 50% des enfants asthmatiques sont sensibilisés aux acariens.

En outre, l'analyse statistique a démontré que le taux d'IgE spécifiques aux acariens chez les enfants asthmatiques était hautement significatif pour *Dermatophagoides pteronyssinus*, p1 Der (d1) ($p < 0,001$) et *Dermatophagoides farinae*, Der f 2 (d2) ($p < 0,01$) en comparaison avec les enfants du groupe témoin. Le cas diffère complètement avec *Acarus siro*, où la différence n'est pas significative.

Plusieurs études ont retrouvé des associations positives entre l'asthme et la sensibilisation aux acariens de la poussière de maison (Gent et al. 2012). De même, nous avons trouvé un résultat similaire et cette association était hautement significative ($p < 0,01$). Les acariens sont considérés comme des allergènes jouant un rôle important dans l'induction de la sensibilisation IgE-médiée et le développement de l'hyperréactivité bronchique (HRB) et l'asthme (Glasgow et al., 2011).

En fin, il faut savoir que Annaba, est une ville poussiéreuse, non ventilée et hautement industrialisée (Khedairia et Khadir, 2012) où la pollution sous ses diverses formes contribue aussi à aggraver les pathologies pulmonaires. Ces caractéristiques fournissent la pollution particulaire et gazeuse (tels que le monoxyde de carbone, l'ozone et le dioxyde de soufre) qui est impliqué dans l'amplification des réactions allergiques et peuvent expliquer la prévalence croissante des maladies respiratoires allergiques dans cette zone urbaine et périurbaine.

En outre, l'énorme consommation de drogues récréatives à travers la fumée de tabac fournit des charges importantes de la nicotine, comme des composés polaires nocifs, dans l'air.

En effet, l'ensemble de ces particules fines et ultrafines sont nuisibles, en particulier chez les nourrissons et les jeunes enfants (Moya et al, 2004). Ces polluants particuliers agissent comme adjuvant lors de sensibilisation allergique, ils pénètrent profondément dans les poumons, causant une aggravation de la réponse inflammatoire bronchique (médiée par les IgE spécifiques aux aéroallergènes) et peut également induire une irritation des muqueuses, une réactivité accrue des voies aériennes aux allergènes, l'augmentation de l'incidence des maladies respiratoires aiguës la maladie et les exacerbations aiguës d'asthme (Terzano et al, 2010).

Par ailleurs, il est bien connu que l'asthme allergique est caractérisé par l'inflammation chronique des voies aériennes (Comhair et Erzurum, 2010). Au cours de cette inflammation les cellules recrutées au niveau de la muqueuse bronchique tels que les éosinophiles sécrètent des médiateurs chimiques essentiellement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Andreadis et al., 2003).

Cette augmentation de la production des ROS provoque un déséquilibre dans la balance oxydant/antioxydant. Il en résulte alors, un état de stress oxydant (Suzki et al., 2012).

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent modifier diverses molécules biologiques y compris les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires essentiellement dont résulte un produit de la peroxydation lipidique qui est le malondialdéhyde (MDA) (Januszewski, 2005).

Dans notre étude nous avons évalué ce stress oxydant par le dosage du MDA et de la GPx. Les résultats obtenus montrent que les enfants asthmatiques ont une concentration de MDA significativement plus importante que celle obtenue chez les enfants sains ($p < 0,05$).

Au niveau moléculaire, cette élévation du MDA peut être expliquée, entre autre, par l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires activées dans les alvéoles pulmonaires qui libèrent de grandes quantités d'anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par divers mécanismes. L'anion superoxyde pouvant interagir avec le $\text{NO}\bullet$ pour générer des peroxy-nitrites (ONOOH) de toxicité élevée (Plotkowski et al., 2002).

D'ailleurs, plusieurs études ont montré que les asthmatiques ont des concentrations élevées des paramètres du stress oxydatif (Sackesen et al., 2008; Al-Afaleg, 2011). Comme il est bien connu que la GPx étant une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ROS, elle protégerai donc les cellules contre les dégâts générés par les aéroallergènes (Bano et al., 2012).

D'ailleurs, nous avons montré que l'activité de la GPx diminue significativement chez les enfants asthmatiques par rapport aux enfants sains ($p < 0,05$). Sackesen et al ont pareillement signalé une baisse de la concentration de la GPx dans le sérum et les globules rouges des enfants asthmatiques (Sackesen et al., 2008).

En effet, la perte de l'activité de GPx favorisera l'exacerbation de l'inflammation chez les patients asthmatiques car le glutathion peroxydase empêche la synthèse des prostaglandines.

De ce fait il réduit l'expression des médiateurs pro-inflammatoires connus pour jouer un rôle majeur dans la pathogénie de l'asthme allergique (Zanatta et al., 2012).

En fin, nous avons trouvé que le taux d'IgE est corrélé d'une façon très hautement significative avec le MDA ($p < 0,001$) et d'une façon hautement significative avec la GPx ($p < 0,01$). Alors que l'éosinophilie n'est pas corrélée avec ces deux paramètres.

Une étude récente (Brown et al., 2012) a montré que le produit de la peroxydation lipidique (MDA) est lié à la sévérité de l'asthme et sa concentration la plus élevée est observée chez les enfants ayant un asthme sévère. Ercan et al. ont également montré que l'augmentation de la concentration de MDA et la diminution de la concentration de la GPx sont liés à la sévérité de l'asthme (Ercan et al., 2006).

Dans notre cas, nous avons recherché ce lien clinicobiologique avec les paramètres du stress oxydatif et les scores cliniques. Les résultats obtenus montrent que le MDA et la GPx sont effectivement liés à la sévérité de l'asthme, mais ne sont pas liés au score allergologique.

Quant à l'IL-5, cytokine produite principalement par les cellules Th2, elle est cinq fois plus élevée chez les enfants asthmatiques par rapport aux enfants sains. Ceci reflète son implication directe dans les phénomènes allergiques respiratoires.

En effet, l'IL-5 contribuera au développement d'un état inflammatoire chronique et sera considérée comme le facteur régulateur central de l'activité éosinophilique au niveau des voies respiratoires. Plusieurs études ont montré une surexpression et une augmentation de la libération d'IL-5 dans l'asthme et l'ont reliée à l'intensité de l'inflammation éosinophilique (Morojina et al., 1993; Robinson et al., 1992).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons tout d'abord constaté l'existence de l'atopie familiale chez les enfants asthmatiques qui est d'ailleurs très élevée (72 %), relativement à celle retrouvée dans la population témoin (14%). Nous constatons également que l'environnement domestique des enfants asthmatiques abrite plusieurs sources d'aéroallergènes susceptibles d'aggraver la pathologie en la perdurant tout en contribuant à l'apparition d'autres manifestations allergiques associées, dont la rhinite allergique (retrouvée chez 73 % des enfants). L'ensemble de ces données font que la fraction majoritaire des enfants malades (33%) ont un asthme sévère appartenant au 3ème palier GINA.

Cette approche clinique est consolidée par les résultats biologiques obtenus. En effet, nous avons constaté que les enfants malades avaient des taux nettement plus élevés que ceux des enfants sains et ce pour l'ensemble des paramètres biologiques mesurés (IgEt, IgEs, éosinophilie, IL-5 et protéines totales). Cet état inflammatoire se manifeste de surcroît par un stress oxydant, qui est caractérisé par la variation de certains marqueurs spécifiques, tel que le MDA dont la concentration est significativement plus importante chez les enfants malades, à l'inverse de l'activité de la GPx.

Plusieurs associations clinico-biologiques ont été relevées. Notamment, le fait que le taux d'IgEt sérique soit en étroite association avec la sévérité de l'asthme, le MDA et la GPx. Ces deux derniers marqueurs sont aussi liés à la sévérité de l'asthme et ne sont pas liés au score allergologique. Tout comme ce dernier score est lié au taux d'IgEt ainsi qu'à l'éosinophilie. En fin, nous montrons que les deux scores varient en fonction de l'ancienneté de la maladie. Ces résultats suggèrent que ces enfants ayant un asthme sévère et/ou un grand nombre de manifestations allergiques souffrent depuis longtemps d'un asthme insuffisamment traité.

En outre, les paramètres météorologiques dans les maisons de ces enfants favorisent le développement des acariens et des moisissures qui sont fortement présents dans toutes les maisons. En effet, la présence de ces moisissures, spécialement *Cladosporium* et *Alternaria* sont associés à la sensibilisation aux moisissures et la sévérité de l'asthme. La sensibilisation la plus remarquée est trouvée vis-à-vis des acariens de poussière (*Dermatophagoides pteronyssinus* (d1) and *Dermatophagoides farinae* (d2)) qui ont une association positive avec la sévérité de l'asthme. Cette forte exposition aux polluants intérieurs, qui sont associés avec le développement de la sensibilisation et la sévérité de l'asthme, suggère que la réduction des allergènes de l'environnement intérieur pourrai réduire la sévérité de la maladie ainsi que la morbidité chez les enfants atopiques et asthmatiques dans la ville d'Annaba.

De plus, aucune mesure n'est prise, en Algérie, pour identifier, selon une démarche d'audit de la qualité de l'air intérieur, les sources d'exposition aux polluants intérieurs, et définir les moyens de remédiation ou même pour la formation des conseillers en environnement intérieur (CEI). Pourtant cette nouvelle discipline apparue il y a à peine une dizaine ou quinzaine d'années serait utile aux personnes exposées ou susceptibles d'être exposées à ces facteurs de risques car les CEI pourront aller à domicile et proposer des mesures ciblées d'amélioration de l'environnement pour des personnes souffrant de différentes pathologies, notamment d'asthme. Ainsi, l'enjeu serai de disposer en Algérie de professionnels formés participant à l'approche diagnostique.

Aussi, pour terminer cette conclusion, on peut dire qu'il serait utile d'approfondir cette recherche en mesurant le taux des particules fines dans l'air et en évaluer l'impact sur la pathologie asthmatique à Annaba. D'autre part, il serait aussi indispensable d'envisager la détermination du taux d'acariens en précisant leurs principales espèces dans les maisons d'enfants asthmatiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel Hameed AA, khoder MI, Ibrahim YH, Saeed Y, Osman ME, Ghanem S. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. *Sci Total Environ*. 2012, 414:696-700.

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eucaryotic Microbiology*. 2005, 52: 399-451.

Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C, Zahran HS, King M, Johnson CA, et al. Trends in Asthma Prevalence, Health Care Use, and Mortality in the United States, 2001–2010. NCHS Data Brief No. 94. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2012.

Al-Afaleg NO, Al-Senaidy A, El-Ansari A. oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients. *Clin Biochem* 2011, 44: 612-7.

Alain Favier. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 2003: 108-115 .

Al-Jahdali H et al. Improper inhaler technique is associated with poor asthma control and frequent emergency department visits. *Allergy, Asthma, Clin Immunol* 2013, 9: 8.

American conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), *Bioaerosols: assessment and control*. Publication 3180. Janet Macher Editor. 1999: 526.

Anane A, Boukari R. Guide pour le diagnostic et le traitement de l'asthme du nourrisson et de l'enfant. *Société Algérienne de Pédiatrie*. 2001: 12-86.

Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003, 35: 213-5.

Anonyme. Atlas des Zones Humides Algériennes d'Importance Internationale, 2004. Direction Générale des Forêts: 15-18.

Auberval N, Dal-Ros S, Shini-Kerth V, Pinget M, Sigrist S, P170 Effect antioxydant des extraits de polyphénols de vin rouge et de thé vert sur des cellules RINm5F après induction d'un stress oxydant. *Diabetes & Metabolism*. 2010, 36: 79-85.

Babior BM, Lamberth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002, 397: 342-344.

Baena-Cagnani CE, Gómez RM, Baena-Cagnani R, Canonica GW. Impact of environmental tobacco smoke and active tobacco smoking on the development and outcomes of asthma and rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009, 9: 136-40.

Baldacci S, Maio S, Cerrai S, Sarno G, Bai N, Simoni, M, Annesi-Maesano I, Viegi G. Allergy and asthma: effects of the exposure to particulate matter and biological allergens. *Respiratory Medicine*. 2015, 109: 1089-1104.

Bano T, Kumar N, Dudhe R. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. *Org Med Chem Lett* 2012, 34: 1-6.

Basset T, Bouvet S, Laboratoire de Microbiologie, Bibliothèque nationale de France. 2007: 1-5.

Baxi SN, Muilenberg ML, Rogers C, Sheehan WJ, Gaffin J, Permaul P et al. Exposures to molds in school classrooms of children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013, 24: 697-703.

Benarab-Boucherit Y, Mehioui H, Nedjar F, Delpierre S, Bouchair N, Aberkane A. Prevalence rate of exercise-induced bronchoconstriction in Annaba (Algeria). *Schoolchildren. J Asthma*. 2011, 48, 511-6.

Benayoun L et Petrolani M. Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives. *Med Sci*. 2003, 19 : 319-26.

Boumendjel A, Tridon A, Messarah M, Ughetto S, Meharzi S, Boulakoud MS. (2012). Eosinophilic activity and bronchial hyperresponsiveness within an asthmatic pediatric population. *Allergol Immunopathol*, 40, 301-5.

Boumendjel A, Tridon A, Ughetto S, Messarah M, Boulakoud MS. Environnement allergénique d'une population d'enfants asthmatiques à Annaba (Algérie). *Ann Biol Clin* 2010, 68: 317-24.

Bourdin A, Doble A, Godard P. The Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study: perspectives and lessons. *Resp med* 2009; 103: 38-48.

Bousquet A, Chané P, Lacoste JE, Barneon G, Ghavanian N, Enander I et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990, 323: 1033-9.

Brown SD, Baxter KM, Stephenson ST, Esper AM, Brown LAS, Fitzpatrick AM. Airway TGF- β 1 and oxidant stress in children with severe asthma: Association with airflow limitation. *Ann Allergy Clin Immunol* 2012, 129: 388-396.

Butcher JD, Exercise-induced asthma in the competitive cold weather athlete. *Curr Sports Med Rep*. 2006, 5: 284-8.

California department of Health Services. Mold in my home: What do I do? Department of health services. 1998: 1-4.

Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. Aclinical index to define risk of asthma in young children with recerent wheezing. *Am J Resoir Crit Care Med.* 200, 162:1403-6.

Cataldo D, Louis R, Godon A, Munaut C, Noël A, Foidart JM, Bartsch P. Bronchial morphologic modification in asthma. *Rev Med Liege.* 2000, 55:715-20.

Chabesse D, Bouchara JP, De gentile L, Brun S, Cimmon B, Penn P. Cahier de formation: les moisissures d'intérêt médicale. 2002, 34 :218-230.

Chabasse D, Guiguen CI, Contet Audonneau N. *Mycologie médicale* Eds Masson. 1999.
Chew GL, Reardon AM, Correa JC et al. Mite sensitization among Latina women in New York, where dust mite allergens levels are typically low. *Indoor air.* 2009, 19:193-7.

Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effects of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodeling in guinea pigs. *Thorax.*2007, 62:706-13.

Comhair SA, Erzurum SC. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid redox Signal* 2010, 12: 93-124.

Cookson WO et Hopkin JM. Dominant inheritance of atopic immunoglobuline-E responsiveness. *Lancet.* 1988, 1:86-8.

Custovic A, Simpson A, Chapman MD, Woodcock A. Allergen avoidance in the treatment of asthma and atopic disorders. *Thorax.* 1998, 53: 63-72.

Dacarro C, picco AM, Grisoli P, Redolfi M. Determination of aerial microbiological contamination in scholastic sports environment. *J Appl Microbiol.* 2003, 95: 904-12.

David B, Guenounou M. *Annales du contrôle national de qualité. Allergy.* 1996, 12 :3-9.

Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris. 2005: 549.

Delory T. L'asthme: toux sifflante bien fréquente. 2013.

Deng Q, Lu CH Norback D, Bornehag CG, Zhang Y, Liu W, Yuan H Shundell J. Early life exposure to ambient air pollution and childhood asthma in China. *Environmental Research*. 2015. 143, 83-92.

Déoux S. Humidité et air intérieur: situation préoccupante. *CSTB Magazine*. 2001: 3-6.

Dutau G. Facteurs de risque des allergies graves. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 2004, 44 : 323-335.

Dutau G, Brémont F, Rancé F, Juchet AJ, Rittié L, Nouilhan P. Rôle de l'infection virale dans la genèse de l'asthme et de l'allergie respiratoire chez l'enfant. *Revue Française D'allergologie et d'Immunologie Clinique*. 1998, 38: 247-257.

Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, Dut R, Sackesen C, Besler T, Kalayci O.. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118: 1097-104.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. the role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992, 13: 341.

Etzel RA. Mycotoxins. *JAMA*. 2002, 287: 425-427.

Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*. 2009, 6: 256-9.

Federly TJ, Jones BL, Dai H, Dinakar C. Interpretation of food specific immunoglobulin E levels in the context of total IgE. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 2013, 111: 20-24.

Fernando DM, Donata V. Asthma. *Lancet*. 2013, 382: 1360-72.

Fisk WJ, Lei-Gomez Q, Mendell MJ. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air*. 2007, 17: 284-96.

Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984, 105: 114-21.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008, 454: 445-454.

Galli SJ, Kalensnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effectors and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 749-786.

Garret MH, Rayment PR, Hooper MA, Abramson MJ, Hooper BM. Indoor airborne fungal spores, house dampness and association with environmental factors and respiratory health in children. *Clin Exp Allergy.* 1998, 28: 459-67.

Gent JF, Kezik JM, Hill ME, Tsai E, Weili D, Leaderer BP. Household mold and dust allergens: Exposure, sensitization and childhood asthma morbidity. *Environ Res.* 2012, 118: 86-93.

Glasgow NJ, Ponsonby AL, Kemp A, Tovey E, Van Asperen P, McKay K et al. Feather bedding and childhood asthma associated with house dust mite sensitization: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child.* 2011, 96: 541-7.

Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Available at: <http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA>. 2013.

Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2011 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2011, 86: 677-88.

Gould HJ et Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008. 205-217.

Grant C, Hunter CA, Flannigan B, Bravery AF. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterioration.* 1988, 25: 259-84.

Grattan CE, Francis DM, Hide M, Greaves MW. Detection of circulating. 1991.

Gravensen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect.* 1999, 107: 505-5.

Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP. Prevalence and fungal role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol.* 1988, 90: 213-217.

Haley, L.D., J. Trandel, and M.B. Coyle. *Cumitech 11, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory.* Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 1980.

Hamilton RG, Eggleston PA. environmental allergens analyses. *Methods.* 1997, 13: 53-60.

Hendry KH, Cole EC. A review of mycotoxins in indoor air. J Toxicol Environ Health. 1993, 38: 183-98.

Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnostics and management of severe asthma in adults. Lancet. 2006, 368: 780-793.

Host S, Lefranc A, Camard JP, Chardon B, Grémy I. Pollution de l'air intérieur: état des connaissances concernant les effets sanitaires. Environnement et Santé. 2005: 13-24.

Husman T. Health effects of microbes in proceedings of health buildings. Indoor air quality info sheet. 2000, 3: 13-24.

Januszewski AS, Alderson NL, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. J Lipid Res 2005, 46:1440-9.

Johanning E. Stachybotrys revisited. Clinical toxicology. 1998, 36: 629-31.

Just J et al. Childhood Allergic Asthma Is Not a Single Phenotype. J Pediatr 2014, 164: 815-20.

Kauffman F et al. Epidemiological study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Chest. 2002, 121: 27.

Kendrick B. The fifth kingdom. 2nd edition. 1999: 20-29.

Kendrick B. The fifth kingdom. Troisième Eds. 2000: 118-124.

Khedairia S, Khadir TM. Impact of clustered meteorological parameters on air pollutants concentrations in the region of Annaba, Algeria. Atmospheric Research. 2012, 113: 289-101.

Khosvari AR, Saghazadeh M, Shokri H. Detection of specific anti-*Alternaria alternata* IgE in asthmatic patients. J Myc Med. 2009, 19: 173-7.

Ki-Hyun K, Shamin AJ, Ehsanul K. A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma. Environ Int. 2013, 59: 41-52.

Klanova K. The concentrations of mixed populations of fungi in indoor air: rooms with and without mould problems; rooms with and without complaints. Centr Eur J Publ Health. 2000, 8: 59-61.

Kubo S, Matsuoka K, Taya C, Kitamura F, Takai T, Yonekawa H, Karasuyama H. Drastic up-regulation of fcepsilonri on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of fcepsilonri on the cells surface. *J Immunol.* 2001, 167: 3427-3434.

Kuehr J, Frischer T, Karmaus W. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization ? *J Allergy Clin Immunol.* 1994, 94: 44-52.

Langsjoen N, Peter H, Langsjoen JO, Langsjoen AM, Lucas LA. Treatment of statin adverse effects with supplemental coenzyme Q10 and statin drug discontinuation. *Biofactors.* 2005, 25: 147-152.

Lantz CS, Yamaguchi M, ettgen HC, Katona IM, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ. IgE regulates mouse basophil fc epsilon RI expression in vivo. *J Immunol.* 1997, 158: 2517-2521.

Larone DH. Medically important fungi, a guide to identification. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2002: 267-274.

Lee MG, Li S, Jarvis BB, Pestka JJ. Effects of satratoxins and other macrocyclic trichothecenes on IL-2 production and viability of EL-4 thymoma cells. *J Toxicol Environ Health.* 1999, 57: 459-74.

Liu F, ZhaoY, Liu YQ, Liu Y, Sun J, Huang MM et al. Asthma and asthma related symptoms in 23,326 Chinese children in relation to indoor and outdoor environmental factors: The Seven Northeastern Cities (SNEC) Study. *Sci Total Environ* 2014, 497-498: 10-17.

Lynch SV, Wood RA, Boushey H, Bacharier LB, Bloomberg GR, Kattan M. Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urbain children. *J Allergy Clin Immunol.* 2014, 134: 593-610.

MacGlashan D, McKenzie-White JR, Chichester K, Bochber BS, Davis FM, Schroeder JT, Lichtenstein LM. In vitro regulation of fc epsilon RI alpha expression on human basophiles by IgE antibody. *Blood.* 1998, 91: 1633-1643.

Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiologyof asthma. *Annu Rev Med.* 2002, 53: 477-498.

Magnan A, Vervloet D. Histoire naturelle de l'atopie. *Rev Mal Respir.* 2000, 17: 235-44.

Malloch D. Moulds: their isolation, cultivation and identification. Department of Botany, University of Toronto. 1997. 89-97.

Mason CD, Rand TG, Oulton M, MacDonald JM, Scott JE. Effects of *Stachybotrys chartarum* (atra) conidia and isolated toxin on lung surfactant production and homeostasis. *Nat Toxins*. 1998, 6: 27-33.

McGavin G, Leraut P. Guide des insectes et araignées. Larousse Coll Nature en Poche. 2006: 224.

Meharzi S, Boumendjel A, Mansouri R, Messarah M. Evaluation de l'aérocontamination fongique dans l'environnement intérieur des enfants asthmatiques à Annaba (Algérie). *Revue française d'allergologie*. 2013, 53: 355-357.

Mehdaoui A, Manoila M, Jaafar M, Mahmoud H, Devin E. Une cause rare d'asthme éosinophilique : le syndrome hyper IgG4 (maladie fibro-sclérosante liée aux IgG4). *Revue des Maladies Respiratoires*. 2015, 32: 941-944.

Melen E, Wickman M, Nordvall SL, van Hage-Hamsten M and Lindfors A. Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy* 2001; 56: 646–652.

Mendell, MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect*. 2011, 119: 748-56.

Miguel H, Juan F, Belen DLH, Raimundo A, Antonio S. Hypersensitivity pneumonitis in workers exposed to esparto grass (*Stipa tenacissima*) fibers. *J Allergy Clin Immunol*. 1996, 9: 85-91.

Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005, 23: 479-490.

Motojima I, Akutsu I, Fukuda T, Makino S, Takatsu K. Clinical significance of measuring levels of sputum and serum ECP and serum IL-5 in bronchial asthma. *Allergy*. 1993, 48: 98-106.

Moya J et al. Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics*, 2004, 113:996.

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Workshop on children's health and indoor mold exposure. *Environmental Health Perspectives*. 1999, 107: 463-515.

Nédélec M, McCall A, Carling C, Legall F, Berthoin S. Dupont recovery in soccer: Part I: post-match fatigue and time course of recovery. *Sports Med.* 2012, 42: 997-1015.

New York City Departement of Health (NYC). Lignes directrices applicable à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur. Service d'hygiène de la ville de New York. 2000: 76-80.

Norme ISO 7726 Ambiances thermiques - Appareils et méthodes de mesurage des caractéristiques physiques de l'environnement. Organisation internationale de Normalisation. Genève. 1998: 56-77.

Ober C Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.* 2006, 7: 95-100.

Pakpour S, Li D.-W, Klironomos J. Relationships of fungal spore concentrations in the air and meteorological factors. *fungal ecology.* 2015, 13: 130-134.

Peden D, Reed CE. Environmental and occupational allergies. *Allergy Clin Immunol* 2010, 125: 150-60.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons.* 1999, 4 :5

Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxins and toxogenic fungi. *Med Mycol.* 2000, 38: 41-46.

Plotkowski MC et al. Early Mitochondrial Dysfunction, Superoxide Anion Production, and DNA Degradation Are Associated with Non-Apoptotic Death of Human Airway Epithelial Cells Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002, 26: 617-626.

Randolph CC. Allergic rhinitis and asthma in the athlete. *Allergy Asthma Proc.* 2006, 27: 104-9.

Rieman H, Bryan FL. Food-borne infections and intoxications, 2nd Edition. Academic Press. 1979: 78-90.

Robbins CA, Swenson LJ, Neally ML, Gots RE, Kelman BJ. Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. *Appl Occup Environ Hyg.* 2000, 15: 773-84.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 ,326: 298-304.

Roche Diagnostics Elecsys® Hitachi High-Technologies Corporation 24-14, Nishi-Shinbashi, 1-chome, Minato-kuTokyo, 105-8717 JAPAN. 2010: 23-34.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, 5th Edition. Mosby. 1998:423.

Rose NR, Friedman H. *Manual of clinical laboratory immunology*. 5th Edition. Washington, DC: American Society for Microbiology. ASM Press. 1997: 1104.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006, 24: 147-74.

Rylander R, Lin RH. (1,3)-beta-D-glucan-relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology.* 2000, 152: 47-52.

Sackesen C et al. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 122: 78-85.

Salvador J, Suan P, DeBlieux MC. Management of acute exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in the emergency department. *Emergency Medicine Clinics of North America.* 2016, 34:15-37.

Santé Canada. Infections nosocomiales chez les patients d'établissements de santé liées aux travaux de construction. Atténer le risque d'aspergillose, de légionellose et d'autres infections; division des infections nosocomiales et professionnelles, bureau des maladies infectieuses, centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, direction générale de la santé de la population et de la santé publique (DGSPSP). 2001: 46.

Schneider E, Machavoine F, Pleau JM, Betron AF, Thurmond RL, Ohtsu H, Watanabe T, Scinkel AH, Dy M. Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *J Exp Med.* 2005, 202: 387-393.

Schneider E, Petit-Bertron AF, Bricard R, Levasseur M, Ramadan A, Girard JP, Herbelin A, DY M. IL-33 activates unprimed murine basophils directly factor production. *J Immunol.* 2009, 183: 3591-3597.

Sengler C, Lau S, Wahn U, Nickel R. Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir Res.* 2002, 3: 7.

Seven Northeastern Cities (SNEC) study. *Sci Total Environ.* 2014, 498: 10-17.

Sharif N, Douwes J, Hoet PHM, Doekes G, Nemery B. Concentrations of domestic mite and pet allergens and endotoxin in Palestine. *Allergy*. 2004, 59: 623-31.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997, 82: 291-295.

Smith TA, Lumley KP. Work-related asthma in a population exposed to grain, flour and other ingredient dusts. *Occup Med*. 1996, 46: 37-40.

Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. 2008, 9: 310-318.

Spitz L. Esophageal atresia: Lessons I have learned in a 40-year experience. *Journal of Pediatric Surgery*. 2006, 41: 1635-1640.

Sporik R, Platts-Mills TAE. Allergen exposure and the development of asthma. *Thorax*. 2001, 56: 58-63.

Strachan DP, Flannigan Bn McCabe EM, McGarry F. Quantification of airborne moulds in the homes of children with and without wheeze. *Thorax*. 1990,45: 382-87.

Summerbell RC. Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton and agents of superficial mycoses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2003: 145-156.

Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Molecular Biol* 2012, 810: 183–205.

Sutton DA. Specimen collection, transport and processing: mycology in Murray. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2003: 22-29.

Suzy AA, Comhair SAA, Erzurum SC. Redox Control of Asthma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010, 12: 93-124.

Teixeira MM, Williams TL, Hellewell PG. Description of an in vivo model for the assessment of eosinophil chemoattractants in the mouse. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997, 92: 211-214.

Terzano C, Di Stefano F, Conti V, Graziani E, Petroianni A. Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2010; 14: 809-821.

Tischer CG, Heinrich J. (2012). Exposure assessment of residential mould, fungi and microbial components in relation to children's health: Achievements and challenges. *Int J Hyg Envir Heal*, 216, 109-14.

Wang YH, Ito T, Homey B, Watanabe N, Martin R, Barnes CJ, McIntyre BW, Gilliet M, Kumar R, Yao Z, Liu YJ. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphoprotein activated dendritic cells. *Immunity*. 2006, 24: 827-838.

Weiman A, Suer W, Vetter, K, Schnell S, Busekow A, Probst C, Schlumberger W, Stoecher W. Component-resolved multiparameter assays for the diagnostics of birch pollen and grass allergy. Institute for Experimental Immunology, affiliated to EUROIMMUNG, Luebeck, Germany. 2012: 13-19.

Weiss ST, Raby BA, Rogers A. Asthma genetics and genomics. *Curr Opin Genet Dev*. 2009, 19: 279-82.

Wenzel SE. Eosinophils in asthma—closing the loop or opening the door? *N Engl J Med*. 2009, 360: 1026-8.

Who/NHLBI workshop report. Global strategy for asthma management and prevention. 2009.

Wills-karp M. Immunological basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*. 1999, 17: 255-81.

Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selection-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood*. 2000, 95: 3146-3152.

World Health Organization (WHO). Human exposure assessment. *Environmental HealthCriteria*. 2000, 214:375.

Xia HZ, Du Z, Craig S, Klisch G, Noben-Trauth N, Kochan JP, Huff TH, Irani AM, Schwartz LB. Effects of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol*. 1997, 159: 2911-2921.

Yano K, Yamaguchi M, De Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ. Production of macrophage inflammatory protei-1 alpha by human mast cells: increased anti-IgE dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cells igE binding ability. *Lab Invest.* 1997, 77: 185-193.

Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest.* 2006, 116: 1633-41.

Zanatta AL, Vicente P, Junior M, Nishiyama A. The prevention of oxidative stress improves asthmatic inflammation. *Adv Biosciences biotech* 2012, 3: 1087-1090.

ANNEXES

(Production scientifique et formation)

PUBLICATIONS INTERNATIONALES :

1. Meharzi S., Boumendjel A., Chekchaki Narimène, Bouchair Nadira, Belgharssa Aïda, Tridon Arlette, Messarah Mahfoud (2015). Clinicobiological Interrelations between Asthma Severity, Duration of Disease and Some Markers of Allergic Inflammation in Asthmatic Pediatric Population in Annaba (Algeria) Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 35(2), Novembre – December 2015; Article No. 01, Pages: 1-6

Autre participation

2. Boumendjel A., Tridon A., Messarah M., Ughetto S., **Meharzi S.**, Boulakoud M.S. (2012). Eosinophilic activity and bronchial hyperresponsiveness within an asthmatic pediatric population. Allergol Immunopathol (Madr). 40 (5):301-305.

Research Article



Clinicobiological Interrelations between Asthma Severity, Duration of Disease and Some Markers of Allergic Inflammation in Asthmatic Pediatric Population in Annaba (Algeria).

Meharzi Sihem^{1,2}, Boumendjel Amel^{1*}, Chekchaki Narimène^{1,2}, Bouchair Nadira³, Belgharssa Aïda³, Tridon Arlette⁴, Messarah Mahfoud¹

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

²Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

³Polyclinic of Pediatrics. CHU Sainte Thérèse, Annaba, Algeria.

⁴Laboratory of Immunology, Faculties of Medicine and pharmacy, Clermont Ferrand (France).

*Corresponding author's E-mail: amel.boumendjel@univ-annaba.org

Accepted on: 20-05-2015; Finalized on: 30-11-2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to study the relationships between the severity of asthma and associated allergic symptoms with the biological parameters of inflammation. 118 children were recruited: 68 asthmatics aged 2-15 years (sex ratio M/F: 1.72) and 50 healthy children aged 1-15 years (sex ratio M/F: 1.5). A standard questionnaire was completed by their GP. Total IgE levels, total protein, eosinophilia and blood levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GPx) were assayed. Atopic disease was present in 72% of children with asthma, in whose home environment high levels of allergens were found. All biological parameters measured were significantly higher in sick children (33% were in the third level GINA) than those of healthy children. Serum total IgE levels were very highly significantly correlated with asthma severity ($p < 0.001$) and MDA levels ($p < 0.001$) and highly significantly correlated with GPx levels ($p < 0.01$). The allergy score was correlated with eosinophilia only ($p < 0.05$). Atopic disease and an allergenic environment were strongly present in the paediatric population studied. The severity of the disease, proven clinically and through blood markers, is associated with many more allergic symptoms. Asthmatic disease, probably inadequately treated, has been present for a long time.

Keywords: Childhood asthma; severity; duration of disease; IgE.

INTRODUCTION

Allergic asthma is a public health problem. In the last few decades, the worldwide prevalence of this disease has doubled and it is estimated that 5 to 10 % of people suffer from this disease, in particular children¹. This is also the case in Algeria where 3.4 % of the population is asthmatic², a majority of whom are children. This marked increase in the incidence of asthma and of allergies cannot be explained by genetic factors alone and it is suggested that in addition to hereditary factors, environmental factors have a significant role in this pathology^{3,4}.

Although numerous studies, such as that conducted by Professor Isabelle Annesi Maesano's team⁵, have evoked phenotypical and environmental factors in severe asthma and allergy, few studies have precisely determined the interrelationships between asthma severity, the concomitant allergic manifestations and the biological markers of inflammation such as those of oxidative stress which characterise this disease.

This is the subject proposed in our study which analyses data from a clinical questionnaire including information about the indoor environment of a child population living in Annaba (Algeria).

We also performed blood assays of total IgE, total protein and eosinophilia and we assessed some oxidative stress parameters by blood assays of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GPx).

Lastly, statistical tests were used to examine the various relationships between the study parameters.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study involved 118 children: 68 asthmatics aged 2 to 15 years (sex ratio M/F: 1.72) and 50 healthy children aged 1 to 15 years (sex ratio M/F: 1.5). They were recruited between April 2011 and January 2012. All the children lived in the town of Annaba (far north-east Algeria) and all the parents of the children gave their informed consent. This study, complying with ethical requirements, was carried out in the context of a national research project PNR/MERSS.

Questionnaire

A standard questionnaire was completed by the patient's GP. It included clinical data and also information on the patient's home environment. These data were used to classify the asthmatic children into four levels of severity of the asthma according to the GINA scale. A second allergy score, also ranging from 1 to 4, and including the principal allergic manifestations of the disease, was established. Scores were considered positive from the 2nd level (GINA) and from the 3rd symptom for the allergy score.

Blood sampling

Blood was collected from fasting subjects by venous puncture into a heparinised tube for assay of total serum



IgE. Oxidative stress parameters were analysed in the globular sediment obtained after centrifugation of the same tube.

Determination of total IgE concentrations

Total IgE concentrations were assayed by ECLIA electrochemiluminescence immunoassay on Roche Elecsys analyser⁶. It is a two step sandwich method using two anti-IgE monoclonal antibodies, one specific for biotin and the other for ruthenium. After formation of the sandwich, the streptavidin-coated microparticles are held by a magnet. A potential difference applied to the electrode triggers the production of luminescence which is measured by a photomultiplier. The results are read on a calibration curve. The recommended cut-off values are as follows: 60 IU/mL (from 1 to 5 years); 90 IU/mL (from 6 to 9 years); 200 IU/mL (from 10 to 15 years); 100 IU/mL (over 15 years).

Determination of eosinophilia

A blood smear was prepared by placing a drop of blood on a microscope slide. This smear was then fixed with methanol for 2 to 3 minutes and then stained with May-Grünwald-Giemsa.

A count is then performed under the microscope, of 200 blood cells, all types. The generally accepted cut-off value for children is 500 cells/ μl ⁷.

Total protein assay

Protein concentration was determined using the BRADFORD method which employs Coomassie blue G250 as reagent. This reagent reacts with the amine groups of protein forming a blue coloured complex.

Optical density (OD) at 595 nm is then read with a spectrophotometer. The protein concentration is determined by comparison with a standard range of bovine serum albumin (BSA) (1mg/ml) previously measured under the same conditions.

Assay of oxidative stress parameters

The globular sediment obtained after removal of the serum is milled, washed in two aliquots of an isotonic solution, and cold centrifuged.

The supernatant or the lysate of erythrocytes obtained is collected for the assay of oxidative stress parameters.

The marker of lipid peroxidation, or malondialdehyde (MDA), is evaluated by measuring substances reacting with thiobarbituric acid (TBA) according to the method of Esterbauer.⁸

MDA concentration is expressed in nmol/mg of protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the method of Flohe & Gunzler (1984)⁹, based on the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of reduced glutathione (GSH).

The concentration of GPx is expressed in μmol GSH/mg of protein.

Statistical Analysis

Table 1: Descriptive statistics

	Healthy population	Asthmatic population
Number of subjects	50	68
Mean age (years)	7.09	8.57
Sex ratio (M/F)	30/20	43/25
Familial atopy (%)	14	72
Duration of the disease (mean)	-	4.53
GINA score (%)		
Intermittent asthma	-	13
Mild persistent asthma	-	29
Moderate persistent asthma	-	33
Severe persistent asthma	-	23
Location of the homes (urban area/ rural area)	30/20	45/23
Presence of smokers (%)	10	26
Presence of pets (%)	2	5
Presence of moulds (%)	10	89

Student's *t* test was used to compare the means of the two groups (asthmatic children and healthy children). The impact of allergic asthma on oxidative stress was obtained by the Chi2 test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Description of the population

The descriptive statistics of the population, compiled from the questionnaires are given in table 1. We observed that familial atopy was present in 72 % of asthmatic children and in 14 % of healthy children. Over 73 % of asthmatic children had a history of at least one personal atopic manifestation other than allergic asthma, the most significant of which was allergic rhinitis which was found in 73.52 % of them (figure 1).

According to the GINA classification, we found that the majority, amounting to 33 % of asthmatic children, had moderate persistent asthma.

The indoor environment of asthmatic children was rich in aeroallergens, as shown by the percentages displayed in table 1 which gives the figures for animal hair, moulds and passive smoking. Sixty six percent of asthmatic children lived in the urban zone of the town of Annaba.

Clinical scores and biological parameters

Mean values for the biological parameters for the two populations are shown in table 2. Our results show that total IgE levels in asthmatic children are high compared with those in healthy children. This difference is highly significant ($p < 0.01$). Eosinophilia is also significantly higher in sick children compared with healthy children ($p < 0.05$).



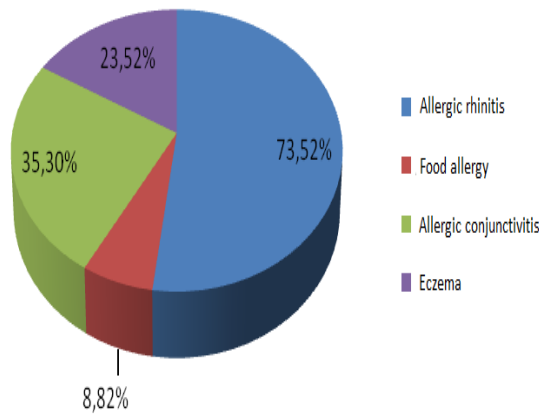


Figure 1: Distribution of personal allergic manifestations in the asthmatic population.

Table 2: Mean values of the biological parameters in the two populations

Parameters	Healthy children	Asthmatic children
Total IgE (UI/ml)	122.48	1857.66**
Eosinophilia (cells/ μ l)	450	520*
MDA (nmol/mg of protein)	0.49	0.86*
GPx (μ mol GSH/mg of protein)	0.20	0.09*
Total protein (mg/ml)	7.26	10.67

*: $p < 0.05$ significant difference

** : $p < 0.01$ highly significant difference

Our results show that the concentration of MDA is higher in asthmatic children compared with that in healthy children ($p < 0.05$). Furthermore, glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity is significantly decreased in the asthmatic population ($p < 0.05$).

The percentage of asthmatic children with total IgE concentrations and eosinophilia above normal values is high for the two scores, exceeding 50 % (see figure 2).

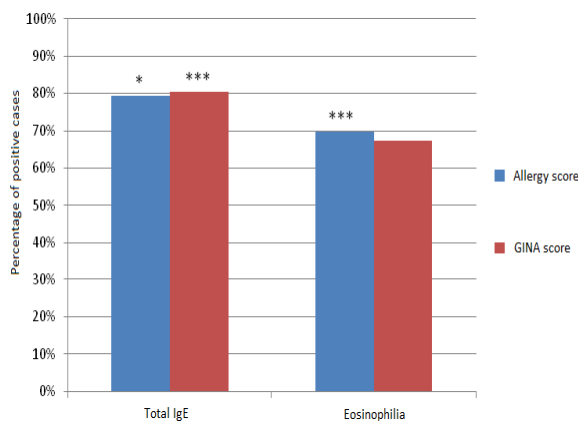


Figure 2: Percentage of cases positive for total IgE and eosinophilia in children with positive clinical scores.

The increase in the percentages of total IgE is highly significant ($p < 0.05$) and that of the eosinophilia is very highly significant ($p < 0.001$) for the allergy score.

We investigated the relationship between the GINA score and the percentage of positive cases for total IgE and eosinophilia. The results obtained show that the severity of the asthma is strongly related to the percentage of total IgE ($p < 0.001$). In contrast, there is no relationship with the percentage of positive cases for eosinophilia ($p > 0.05$).

Biological parameters and oxidative stress

The statistical analysis shows an association between total IgE levels and MDA concentration. This correlation is very highly significant ($\chi^2, p = 0.001$). Total IgE levels are also associated with GPx concentration in a highly significant ($\chi^2, p < 0.01$) manner. However, we did not find a correlation between eosinophilia and these two parameters (MDA and GPx).

Oxidative stress and clinical scores

We also investigated the relationship between the oxidative stress parameters and clinical scores (score GINA and allergy score). Figure 3, displaying the changes in the MDA and GPx levels according to severity of the asthma, shows that MDA concentration increases with the severity of the asthma and reaches its maximum levels in severe persistent asthma. In contrast, we note that GPx concentration decreases with asthma severity. The statistical analysis shows that MDA concentration is significantly related to asthma severity ($\chi^2, p = 0.05$). On the other hand, the decrease in GPx concentration is not related to asthma severity ($\chi^2, p > 0.05$). We also found that the allergy score is not statistically related to MDA concentration, nor to that of GPx ($\chi^2, p > 0.05$).

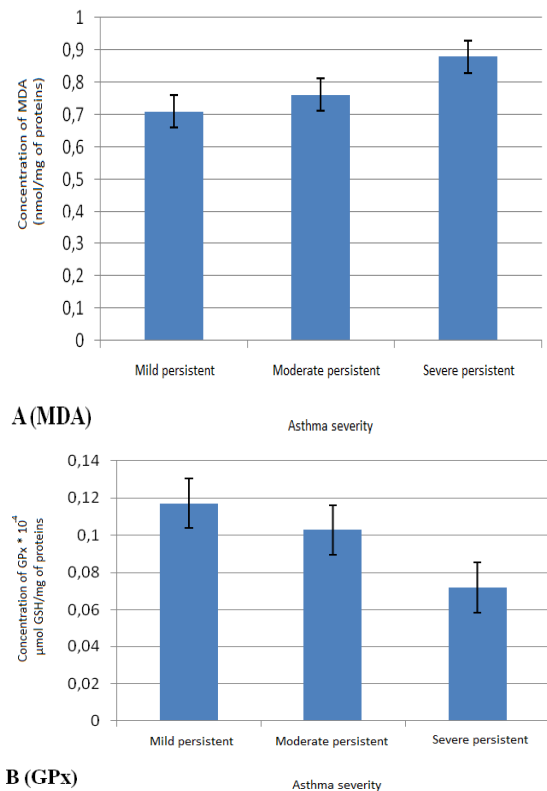


Figure 3: Variation in MDA (A) and GPx (B) concentrations in relation to asthma severity.



Clinical score and duration of the disease

Figure 4 shows the duration of the disease in relation to the clinical scores. We note that children with a longer duration of the disease (5.19 years) also have a higher number of allergic manifestations (score 4). Similarly, children who have been sick for 4.53 years and 4.7 years, have more severe asthma levels (GINA scores of 4 and 3, respectively).

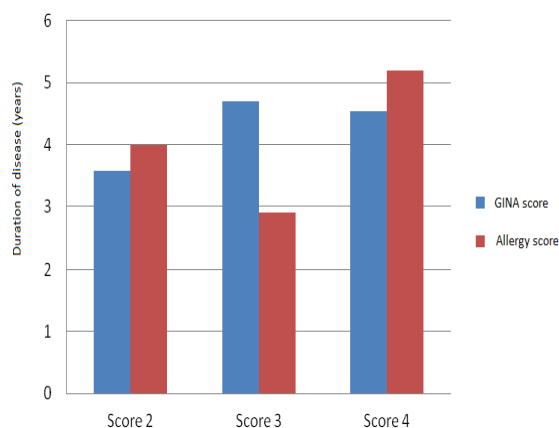


Figure 4: Variation in the duration of the disease in relation to clinical score in the asthmatic population.

DISCUSSION

The general description of the population reveals the existence of familial atopy in asthmatic children and this at a frequency which is very high (72 %), compared to that found in the control population (14%). This genetically determined tendency to produce IgE-type antibodies is already considered as a risk factor for the development of an allergic disease. However it is true that it is above all the interaction genes/environment which will determine the development of chronic inflammatory diseases, their onset, their progression and the associated remodelling, due to the effect of several aggressive factors [10].

In this context we confirmed that the home environment of asthmatic children contained several sources of aeroallergens likely to exacerbate the pathology by prolonging it. We found these to be moulds which are present in high quantities compared with the homes of healthy children (89% vs 10%), animal hair (pets present in 5% vs 2% of houses of healthy children) and passive smoking (26% vs 10%). Taken together these factors are thus considered to contribute not only to the development of the asthmatic disease but also to the onset of other associated allergic manifestations. Indeed, 73 % of them had a history of at least one personal atopic manifestation. In most cases this was allergic rhinitis.

In our study, after scoring the sick children according to the severity of their asthma (GINA score), we note that the majority fraction (33%) is in the 3rd GINA level, i.e. children with moderate persistent asthma. Boumendjel¹¹ also found that most asthmatic children in the Annaba region (study carried out in 2005) had moderate

persistent asthma. We regret to observe that the situation in Annaba has not really changed over a period of about ten years.

As we assayed serum total IgE levels, eosinophilia and total protein in all the children recruited, it was tempting to study various associations between these biological parameters and certain other markers of inflammation. Firstly, we remarked that sick children had markedly higher concentrations than healthy children for all the above mentioned biological parameters. In fact this finding is widely described in the literature because their increase is thought to reflect an increase in proinflammatory mediators in pathological conditions^{12,13}. Moreover, our results again confirm that serum total IgE level is closely associated with asthma severity as evaluated by the GINA score ($p < 0.001$) and although we found no correlation between asthma severity and eosinophilia, this level and that of total IgE are nevertheless both related to the allergy score ($p < 0.05$).

In addition, it is well known that allergic asthma is characterised by chronic inflammation of the airways¹⁴. During this inflammation, cells recruited in the bronchial mucosa such as the eosinophils secrete chemical mediators, essentially reactive oxygen species (ROS)¹⁵. This increase in the production of ROS provokes an imbalance in the oxidant/antioxidant balance. The result is oxidative stress¹⁶. Reactive oxygen species can modify various biological molecules including the polyunsaturated fatty acids of the cell membranes principally, resulting in a product of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA)¹⁷.

In our study we evaluated this oxidative stress by assay of MDA and GPx. The results obtained show that asthmatic children have higher concentrations of MDA than those of healthy children ($p < 0.05$). This raised MDA level may be explained, among other things, by the increase in the number of inflammatory cells activated in the pulmonary alveoli which release large quantities of superoxide anions and hydrogen peroxide by various mechanisms. The superoxide anion can interact with NO• generating highly toxic peroxynitrites (ONOOH)¹⁸. Moreover, several studies have shown high concentrations of oxidative stress parameters in asthmatics^{19,20}. As it is well known that GPx is a key antioxidant enzyme which regulates ROS levels, it is therefore suggested that it would protect cells from damage caused by aeroallergens²¹. In fact we showed that GPx activity was significantly decreased in asthmatic children compared with healthy children ($p < 0.05$). Similarly, Sackesen reported a fall in GPx concentration in the serum and in the erythrocytes of asthmatic children¹⁹. It is thought that loss of GPx activity could amplify the exacerbation of inflammation in asthmatic patients because glutathione peroxidase prevents prostaglandin synthesis.

In doing this it reduces the expression of proinflammatory mediators known to play a major role in the pathogenicity of allergic asthma²².

Lastly, we found total IgE levels to be very highly significantly correlated to MDA concentration ($p < 0.001$) and highly significantly correlated to GPx ($p < 0.01$), whereas eosinophilia was not correlated with these two parameters. We also investigated the clinical-biological link with oxidative stress parameters and clinical scores. The results obtained show that MDA and GPx are related to the severity of the asthma and are not related to the allergy score. A recent study²³ showed that the product of lipid peroxidation (MDA) is related to asthma severity and the highest concentrations of it are observed in children with severe asthma. Ercan also showed that the increase in MDA concentrations and the decrease in GPx concentrations are linked to the severity of the asthma²⁴.

In addition, we show that our various calculated scores varied with the duration of the disease. That is, the longer the duration of the disease, the greater the severity and the more numerous are the allergic manifestations. These results suggest that these children with severe asthma and/or a large number of allergic manifestations have suffered from asthma for a long time. This may be evidence of poor treatment compliance or due to denial of the disease by young people living mainly, in this case, in urban areas or in the town.

CONCLUSION

We first remarked the existence of familial atopy in asthmatic children and this at a frequency which was very high (72 %), compared to that found in the control population (14%). We also remarked that the home environment of asthmatic children contained several sources of aeroallergens likely to exacerbate the pathology by prolonging it and contributing to the onset of other associated allergic manifestations, including allergic rhinitis (observed in 73 % of children). These findings meant that the majority of sick children (33%) were scored as having severe asthma, in the 3rd GINA level.

This clinical approach was strengthened by the result of the biological parameters tested. We found the sick children to have markedly higher levels than healthy children for all the biological parameters assayed (total IgE, eosinophilia and total protein). This inflammatory condition is manifested by excess oxidative stress, which is characterised by changed in certain specific markers such as MDA the concentration of which was significantly higher in sick children, contrary to GPx activity.

Several clinical-biological relationships were revealed. In particular, the fact that serum total IgE is closely related to asthma severity, MDA and GPx. The latter two markers are also related to asthma severity and not related to allergy score. In a similar way this latter score is related to total IgE and also to eosinophilia. Lastly, we showed that the two scores vary in relation to duration of the disease.

These results suggest that children with severe asthma and/or numerous allergic manifestations have been suffering from poorly controlled asthma for a long time.

Acknowledgement: The authors wish to thank the DGSRTD (*Direction generale de la recherche scientifique and du developpement technologique*) of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for their financial support of this research (Research project (PNR) supervised by Dr Boumendjel Amel: evaluation of biocontamination in the indoor environments of patients with IgE mediated allergic respiratory disease Impacts on health).

REFERENCES

1. Al-Jahdali H, Ahmed A, Al-Harbi A, Khan M, Bararoon S, Bin Salih S, Halwani R, Al-Muhsen S, Improper inhaler technique is associated with poor asthma control and frequent emergency department visits, *Allergy Asthma Clin Immunol*, 9, 2013, 8.
2. Bourdin A, Doble A, Godard P, The Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study: perspectives and lessons, *Respiratory Medicine*, 103, 2009, 38-48.
3. Sengler C, Lau S, Wahn U, Nickel R, Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments, *Respiratory Research*, 3, 2002, 7.
4. Liu F, Zhao Y, Liu YQ, Liu Y, Sun J, Huang MM, Asthma and asthma related symptoms in 23,326 Chinese children in relation to indoor and outdoor environmental factors: The Seven Northeastern Cities (SNEC) Study, *Science of the Total Environment*, 497-498, 2014, 10-17.
5. Just J, Saint-Pierre P, Gouvis-Echraghi R, Laoudi L, Momas I, Annesi Maesano I, Childhood Allergic Asthma Is Not a Single Phenotype, *Journal of Pediatrics*, 164, 2014, 815-20.
6. Roche Diagnostics Elecsys® Hitachi High-Technologies Corporation 24-14, Nishi-Shinbashi, 1-chome, Minato-kuTokyo, 105-8717 JAPAN. 2010.
7. Gotlib J, World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2011 update on diagnosis, risk stratification, and management, *American Journal of Hematology*, 86, 2011, 677-88.
8. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G, the role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radical Biology & Medicine*, 13, 1992, 341.
9. Flohé L, Gunzler WA, Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 1984, 105, 114-21.
10. Peden D, Reed CE, Environmental and occupational allergies, *Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2010, 150-60.
11. Boumendjel A, Tridon A, Ughetto S, Messarah M, Boulakoud MS, Environnement allergénique d'une population d'enfants asthmatiques à Annaba (Algérie), *Annals de Biologie Clinique*, 68, 2010, 317-24.
12. Federly TJ, Jones BL, Dai H, Dinakar C, Interprétation of food specific immunoglobulin E levels in the context of total IgE, *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 111, 2013, 20-24.



13. Wenzel SE, Eosinophils in asthma—closing the loop or opening the door?, *The New England Journal of Medicine*, 360, 2009, 1026-8.
14. Comhair SA, Erzurum SC, Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling*, 12, 2010, 93-124.
15. Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC, Oxidative and nitrosative events in asthma, *Free Radical Biology & Medicine*, 35, 2003, 213-5.
16. Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR, Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation, *Methods in Molecular Biology*, 810, 2012, 183–205.
17. Januszewski AS, Alderson NL, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW, Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids, *Journal of Lipid Research*, 46, 2005, 1440-9.
18. Plotkowski MC, Póvoa HCC, Zahm JM, Lizard G, Pereira GMB, Tournier JM, Puchelle E, Early Mitochondrial Dysfunction, Superoxide Anion Production, and DNA Degradation Are Associated with Non-Apoptotic Death of Human Airway Epithelial Cells Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26, 2002, 617-626.
19. Sackesen C, Ercan H, Dizdar E, Soyer O, Gumus P, Tosun BN, Buyuktuncer Z, Karabulut E, Besler HT, Kalayci O, A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma, *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 122, 2008, 78-85.
20. Al-Afaleg NO, Al-Senaidy A, El-Ansari A, Oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients, *Clin Biochemistry*, 44, 2011, 612-7.
21. Bano T, Kumar N, Dudhe R, Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives, *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 34, 2012, 1-6.
22. Zanatta AL, Vicente P, Junior M, Nishiyama A, The prevention of oxidative stress improves asthmatic inflammation, *Advances in Biosciences and Biotechnology*, 3, 2012, 1087-1090.
23. Brown SD, Baxter KM, Stephenson ST, Esper AM, Brown LAS, Fitzpatrick AM, Airway TGF- α 1 and oxidant stress in children with severe asthma: Association with airflow limitation, *Annals of Allergy Clinical Immunology*, 129, 2012, 388-396.
24. Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, Dut R, Sackesen C, Besler T, Kalayci O, Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma, *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 118, 2006, 1097-104.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.





Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



ORIGINAL ARTICLE

Eosinophilic activity and bronchial hyperresponsiveness within an asthmatic paediatric population

A. Boumendjel^a, A. Tridon^b, M. Messarah^{c,*}, S. Ughetto^d, S. Meharzi^a,
M.S. Boulakoud^c

^a Applied Biochemistry and Microbiology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP12, Sidi Amar, 23000, Annaba, Algeria

^b Immunology Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, 28 Henri Dunant, 63000 Clermont Ferrand, France

^c Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12, Sidi Amar, 23000, Annaba, Algeria

^d Department of medical informatics, Gabriel-Montpied Hospital, CHU de Clermont-Ferrand, 63003 Clermont-Ferrand, France

Received 29 April 2011; accepted 24 June 2011

Available online 2 October 2011

KEYWORDS

Asthmatic children;
Annaba (Algeria);
Atopy;
Biological markers;
ECP;
Eosinophilia

Abstract

Background: Our study aims to assess the importance of serum eosinophil cationic protein (ECP) levels as a non-invasive marker of bronchial hyperresponsiveness (BHR) in children with asthma, and may predict objectively the asthmatic severity and sensitivities.

Methods: This study, which was carried out on 75 asthmatic patients from a paediatric population (average age: nine years old, sex-ratio M/F: 1.64), is based on both interrogation conducted by the clinician and biological explorations, essentially serological testing of ECP and eosinophilia determination, as well as the measurement of serological IgE amounts.

Results: The analysis of the questionnaires and the biological results allowed us to evaluate the clinico-biological relations within this population. ECP, more than eosinophilia, proves to be a relevant marker of asthma severity ($p < 0.05$) and sensitivities within this given population ($r = 0.65$).

Conclusion: We were able to show that the evaluation of the serological levels of ECP seems to be a good biological marker of asthma.

© 2011 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introduction

It is currently well established that an inflammatory reaction is the basis of allergic diseases. The cell populations involved

in this process are the lymphocytes Th2 determining the allergic reaction and the effective cells among which, after mastocytic activation, eosinophils play a predominant role within the mid-late phase of IgE-dependent allergy.¹

These cells contain various proteins among which the major basic protein (MBP), located inside the crystalloid of the granules, as well as the neurotoxin (EPX-EDN), the peroxidase (EPO) and the eosinophil cationic protein (ECP), all

* Corresponding author.

E-mail address: mmessarahdz@yahoo.fr (M. Messarah).

three found in the granule matrix. ECP quantity increases in cases of asthma, rhinitis, atopic dermatitis, parasitic infections and auto-immune diseases.² Nevertheless, blood testing and expectoration are principally suggested when it comes to the estimation of inflammatory allergy (asthma and rhinitis).^{3,4} The aim of this work was to determine the role of the eosinophilic activity in the bronchial inflammation and allergenic sensitivity within an asthmatic paediatric population. Thus, after establishing a general description of the population under study through the questionnaire, we evaluated the eosinophilia and serological ECP values in order to correlate them with the clinical parameters and study their variations depending on the age of the patients.

Patients

During their medical consultations, specialised doctors (ENT doctors, paediatricians, lung specialists) proceeded to the selection of the patients and the elaboration of the questionnaire. The study concerns 75 asthmatic people of Annaba (Algeria) between 4 and 18 years old (average of 9 years old) including 47 males and 28 females (sex-ratio of 1.64 in favour of the males). Table 1 shows the general description of the population under study.

Methods

Determination of the clinical scores

On the basis of the questionnaire, two different scores were obtained: A first one, named "allergological", with values ranging from 1 to 4, taken into account all of the atopic manifestations associated with the patients' bronchial hyperreactivity. The second score resents asthma severity and its values, ranging from 1 to 4, which correspond to the four levels described by the GINA classification.⁵

Determination of eosinophilia

A blood sample had to be collected on EDTA in order to determine the leukocytic formula. A smear test was then carried out and fixed with methanol for 2 to 3 min before exposure to the May-Grünwald-Giemsa coloration procedure. We could then proceed to the calculation of the eosinophil percentage by counting at least 200 cells, all leukocytic cell categories included, under the microscope. Eosinophilia is expressed as an absolute value (number of elements per μl), after carrying out a globular enumeration using a coulter. We consider 500 elements/ μl as the threshold value.⁶

Measurement of the eosinophil cationic protein

A blood sample was taken and immediately centrifuged at 12,000 rpm for 10 min; ECP amounts could then be measured by chemiluminescence as described previously in the Immulite 2000 (DCP).⁷ The normal value is 20 ng/ml.

Table 1 General description of the patients.

	GINA Classification			
	Level 1 Intermittent asthma	Level 2 Light persistent asthma	Level 3 Moderate persistent asthma	Level 4 Severe persistent asthma
<i>Individuals (%)</i>	15 (21%)	14 (19%)	33 (46%)	10 (14%)
<i>Average age (years)</i>	9.53	8.64	9.90	12.2
<i>Sex (M/F)</i>	10/5	7/7	24/9	3/7
<i>Family atopy</i>	10/12 (83%)	8/14 (57%)	22/29 (76%)	7/9 (77%)
<i>Principal personal atopic manifestations</i>				
Rhinitis	7	4	19	2
Conjunctivitis	1	2	5	1
Earache	-	-	2	-
Laryngitis	-	-	1	-
None	5	2	5	2

^a Corresponds to all of the patients included in the study, considering that some of them did not answer all the questions.

Table 2 Immunobiological parameters studied: average values and number of positive cases.

Parameters (unit)	Average value \pm standard deviation	Normal values	Number of cases \geq normal value	Percentage
IgE _s t (UI/ml)	943.29 \pm 940.69	According to the age (see text)	56/75	75
IgE _s pneumoallergen mixture (kU/L)	25.54 \pm 27.84	0.70	54/75	72
IgE _s D1 (kU/L)	77.38 \pm 38.04	0.35	50/74	68
IgE _s I6 (kU/L)	25.99 \pm 35.88	0.35	26/70	37
Serological ECP (ng/ml)	66.94 \pm 46.94	20	61/70	87
Blood eosinophilia (number of elements/ μ l)	213.34 \pm 221.43	<500	8/43	19

Measurement of serological IgE

Measurement of total IgE (IgE_t)

This sequential immunoenzymatic test ('sandwich' type) has been described previously by Addison,⁸ It was carried out using the Beckman CoulterTM immunoanalysis Access system. The results are given in UI/ml (1 UI/ml corresponding to 2.4 ng of IgE). The values considered as normal are the following: 0.01–60 UI/ml (from 1 to 5 years old); 0.01–90 UI/ml (from 6 to 9 years old); 0.01–200 UI/ml (from 10 to 15 years old); 0.01–100 UI/ml (over 15 years old).

Measurement of specific IgE (IgE_s)

We carried out an automated qualitative test using the VIDAS system (Stallertest),⁹ allowing the detection in serum of specific IgE_s from a determinate mixture of the 10 allergens most frequently involved in allergies: tree pollen (birch: T3 and parietal tree: T9), grass (orchard grass: G3), herbaceous (parietary: W21 and mugwort: W6), animal hair (cat: E1 and dog: E2), an acarid (*Dermatophagoides pteronyssinus*: D1), a fungus (*Alternaria*: M6) and an insect (*Blattella germanica*: I6). A 'value from the test' (VT) is automatically calculated by the device against a pre-memorised standard S1. The result of the test is positive when VT \geq 0.70. Moreover, IgE_s specific to two individualised pneumallergens (D1: *D. pteronyssinus* and I6: *B. germanica*) are detected (Immulate 2000, DPC).¹⁰ In this last case, the limit of detection is 0.35 kU/L.

Ethical approval

The study was performed in accordance with Good Clinical Practice and was approved by the local Ethics Committee. Written informed consent was obtained from each patient's parents or legal guardian.

Statistical study

Pearson's correlation coefficient as well as Student's *t*-test results was correlated between the statistical analysis software Minitab 13. Differences between the qualitative variables were analysed using the χ^2 and Fisher's exact tests through the software SAS version 8.02. A value of $p < 0.05$ is statistically significant.

Results

Clinico-biological correlations

The mean values of the different parameters under study are shown in Table 2. The GINA score was considered positive when over the first level and a positive allergological score was obtained when at least two allergological symptoms were observed.

We thus noticed a relation between asthma severity, depicted by the GINA score, and the ECP ($p = 0.03$). However, we did not notice any significant relation between asthma severity and blood eosinophilia. Eosinophilia only correlated with the duration of the disease ($p = 0.389$, $p = 0.013$). Thereby, the duration of the disease increases along with the GINA levels from four years for the first level up to an average of nine and a half years for the last one (Fig. 1).

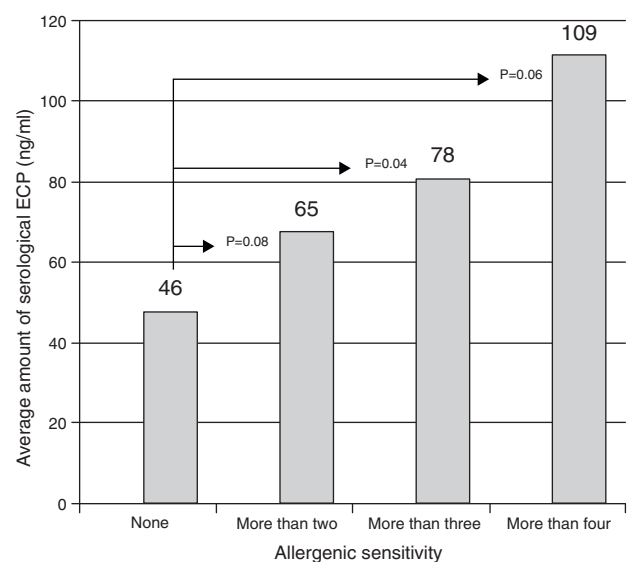


Figure 1 The variation of ECP levels in function of the number of sensitivities among the children. There was a significant increase of serological ECP (ng/ml) as a function of allergen sensitisation. In fact $p = 0.04$ for children over three sensitisations compared with children who have no awareness detected by the tests we made.

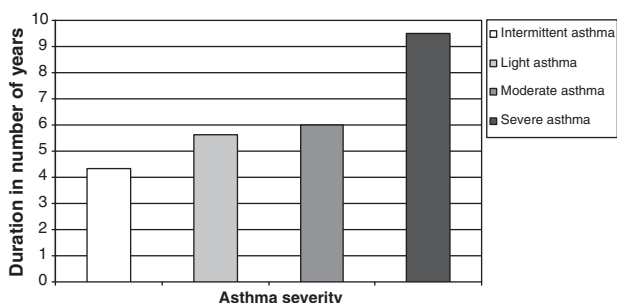


Figure 2 Duration of the disease (average in terms of number of years) depending on the asthma severity. There was an increase in length of illness based on levels of asthma, ranging from intermittent asthma, mild asthma, moderate asthma to the severe asthma).

The ECP values are correlated with the total IgE_s values ($r=0.54$) and with those of the IgE_s against the pneumoallergens ($r=0.65$). Fig. 2 illustrates the increase in the ECP average value in function of the level of children's sensitivity.

Relation between the age and both the biological and clinical parameters

We divided the whole population into three age brackets: from 4 to 6, 7 to 12, and 13 to 18 years old. The results are expressed in terms of values obtained which were higher than the normal ones, for each age bracket (Fig. 3). All the considered parameters (asthma severity and asthma-associated symptoms) increase with the age of the patients. Moreover, the eosinophilic activity also seems to increase with age.

Discussion

Looking at the general description of the population under study, we notice that most of the children suffer from a grade 3 moderate persistent asthma (46%) with an average age of nine. Very few suffer from severe asthma (14%) and their average age is higher, around 12 years old. Yet, precisely, most types of asthma in children, are light or moderate during adolescence. Nevertheless, asthma can become worse for various reasons, such as: the loss of the referral

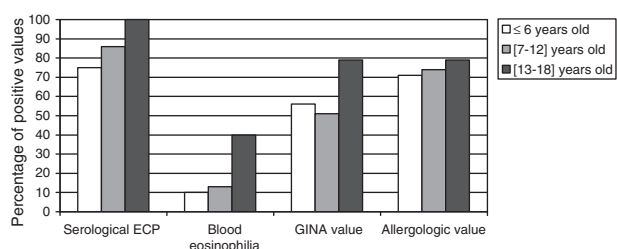


Figure 3 Values higher than the normal for the various parameters under study depending on the age bracket. All the parameters (ECP, eosinophil, GINA scores and allergological values) increase with the children's age.

doctor, the denial of the disease, smoking habits and even a bad diagnostic or a cessation of the basic medical treatment.

Associated allergic signals, such as rhinitis and conjunctivitis (being the most frequently observed, 32 and 9 times, respectively), lead to suspicion of an atopic component. Indeed, the association of rhinitis and bronchial hyperreactivity is frequent¹¹ and the role of the inflammation of the superior airways of the respiratory system on the appearance of bronchial hyperreactivity has been widely described in literature.^{12,13} This can be explained by the existence of direct interactions between the inflammatory nasal suffering and the superior airways of the respiratory system, probably through the diffusion of inflammation mediators from the nasal cavity.¹⁴ Our study concerned children with high familial atopy, as the family atopic field seems more pronounced than in other paediatric studies, with 74% of family atopy antecedents compared to 70.5% for Moneret-Vautrin for example.¹⁵ We also observe that paternal atopy is more predominant (1.6 times) than the maternal one.

We know that neither the diagnostic nor the appreciation of the intensity of the allergic inflammation depends on the amount of inflammation acute proteins, synthesised by the liver, as cytokines Th2 do not induce this synthesis. Therefore, the biological parameters leading to the identification of the allergic inflammation are the cytokines Th2 along with the mediators of the effective cells, especially eosinophils. The screening of the latter is thus proposed for the evaluation of bronchial hyperreactivity. Just et al.¹⁶ have previously shown that among children with asthma, eosinophilic inflammation was closely related to respiratory allergy. Several other studies^{17,18} suggest the existence of a relation between eosinophilic inflammation (ECP) and asthma severity. In our study, eosinophilia was correlated with the duration of the disease. In fact, the persistence of a restructuration of the superior respiratory airways due to the activation of eosinophils and the resulting release of deleterious proteins such as ECP, proceeding from the intracytoplasmic granules which, once liberated, cause damage to the epithelium of the airways, shedding, and an increase in bronchial hyperreactivity.¹⁹ Indeed, we notice that the ECP serological rate is related to the asthma severity as already described by several authors.^{20,21} However, we have not found any significant correlation between blood eosinophilia and asthma severity.

The sensitivity level and allergenic environment of the children that have been discussed in a previous study,²² will not be contemplated here. In addition, we notice that the rates of total and specific IgE_s are both in accordance with the ECP amounts. We observe an increase in the average amount of serological ECP with the sensitivity level of the children. Our results seem to confirm those obtained in the study conducted by Fauquert et al., in which the authors analysed the value of a selective measurement of serological ECP and observed that its average amount was significantly higher in cases of allergy provoked by mites.²³ The same observation was made in several other studies showing that polysensitized asthmatic children, especially those allergic to dust mites, pollen and domestic animals, showed high ECP levels compared to monosensitized ones.

Various studies suggested that during childhood, the appearance of allergic sensitivities and then the

development of clinical signals follow a particular chronology, which depends on family inheritance as well as on exposition, more or less important or lasting, to environmental allergens.^{22,24} In our work, the children are divided within three age brackets which differentiate roughly the preschool, school, and adolescence phases. We find an increase in eosinophilic activity, asthma severity and associated symptoms in accordance with age. This observation suggests that, for asthmatic children, a high ECP serological value could represent a risk factor in asthma persistence and may be a potential marker of the severity of the inflammation.²⁵

Conclusion

In conclusion, the present data show that eosinophilic activity represented by ECP (more than eosinophilia itself) seems to be a good biological marker of allergic asthma, reflecting its severity as well as the allergenic sensitivity level. In addition, we notice a statistically significant increase in accordance with age, affecting not only the amounts of IgE_s against the pneumallergen mixture, acarids and cockroaches but also the global sensitivity level of the children.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We are sincerely grateful to the "Agence Universitaire de la Francophonie" for its support to the firm of a grant research training as well as to the firm "Siemens" (ex-DPC), especially to Mrs S. Grillère (from Company Gen-Probe), for kindly providing us with the major part of the reagents used for this study. We thank the Doctors from Annaba who participated in the recruitment of the patients: Aidaoui, Amiri, Bechtella, Bouhadeb, Bouhouche, Boukertouta, Boumaza, Chahlef, Debez, Demmak, Derouiche, Fezzari, Guedjati, Malki, Nacer and Tarfaya. Finally, we also thank the heads of department and all the technicians from Chekat and Bensalah laboratories as well as those from the immunology laboratory of the CHU Clermont Ferrand.

References

1. Tonnel AB, Gosset P, Tillie-Leblond I. Characteristics of the inflammatory response in bronchial lavage fluids from patients with status asthmaticus. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124:267-71.
2. Tischendorf FW, Bratting NW, Lintzel M, Buttner DW, Bushard GD, Bork K, et al. Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis. *Trop Med Int Health*. 2000;5:898-905.
3. Garcia-Marcos L, Brand PL. The utility of sputum eosinophils and exhaled nitric oxide for monitoring asthma control with special attention to childhood asthma. *Allergol Immunopathol*. 2010;38:41-6.
4. Ishigaki N, Masuhara C, Sakamaki K, Ishikawa Y, Ohta K, Koike R, et al. Relation between serum eosinophil cationic protein level and asthma attack in children. *Arerugi*. 2000;49:1093-103.
5. Global Strategy for asthma management and prevention. NIH publication. www.ginasthma.org; 1995.
6. Dutau G. Biologie en allergologie. Conduite à tenir devant une hyperéosinophilie. *Rev Fr Allergol et Immunol*. 2004;44:664-7.
7. Advenier D, Guichard Ch, Kemeny JL, Tridon A, Gilain L. Analysis of eosinophil and ECP levels in nasal secretions of 119 nasal polyposis patients. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 2002;119:322-9.
8. Addison: Access de Beckman Coulter.
9. Sohn M, Lee SY, Lee KE, Kim KE. Comparison of Vidas Stallertest and Pharmacia CAP assays for detection of specific IgE antibodies in allergic children. *Ann Clin Lab Sci*. 2005;35:318-22.
10. Guilloux L, Hamberber C. Evaluation du dosage des IgE spécifiques sur l'Immulite® 2000 DPC. *Immunoanal Biol spéc*. 2004;19:71-80.
11. Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. Perennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European community respiratory health survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:301.
12. Aubier M. Hyperréactivité bronchique et inflammation nasale. *Pneumographies*. 1993:9-10.
13. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther*. 2002;94:185-211.
14. Braunsahl GJ, Kleijian A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:2051-7.
15. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Rancé F, Dutau G. Evaluation des dermatoses diagnostiques de l'allergie alimentaire dans 113 cas de dermatite atopique. *Rev Fr Allergol*. 1996;36:239-44.
16. Just J, Fournier L, Goudard E, Momas I, Sahraoui F, Grimfeld A. L'éosinophile et le neutrophile alvéolaires chez l'enfant asthmatique: quelle signification clinique ? *Rev Française d'allergologie et d'immunol Clin*. 2003;43:153-8.
17. Bousquet J, Chané P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990;323:1033-9.
18. Weller PF, Lim K, Wan HC, Dvorak AM, Wong DT, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Role of the eosinophil in allergic rhinitis. *Eur Respir J Suppl*. 1996;22:109s-15s.
19. Obase Y, Shimoda T, Mitsuda K, Matsuo N, Matsvne H, Kohno S. Correlation between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in young adult population: eosinophil, ECP and cytokine levels in induced sputum. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86:304-10.
20. Tillie-Leblond I, Iliescu C, Deschidre A. Physiopathologie de la réaction inflammatoire dans l'asthme. *Arch Pédiatr*. 2004;11:58s-64s.
21. Joseph-Bowen J, de Klerk N, Holt PG, Sly PD. Relationship of asthma, atopy, and bronchial responsiveness to serum eosinophil cationic protein in early childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1040-5.
22. Badar A, Saeed W, Hussain MM, Aslam M. Correlation of eosinophil cationic protein with severity of asthma. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2004;16:66-71.
23. Boumendjel A, Tridon A, Ughetto S, Messarah M, Boulakoud MS. Environnement allergénique d'une population d'enfants asthmatiques à Annaba (Algérie). *Ann Biol Clin*. 2010;68:317-24.
24. Fauquet J, Beaujon G, Héraud MC, Doly M, Labbé A. Intérêt du dosage sérique de la protéine cationique des éosinophiles chez l'enfant asthmatique. Notre expérience à propos de l'analyse de 166 cas en hospitalisation de jour. *Rev Fr Allergol*. 1997;37:227-32.
25. Petronella S, Conboy-Ellis K. Asthma epidemiology: risk factors, case finding, and the role of asthma conditions. *Nurs Clin North Am*. 2003;38:725-35.