



Etude de la contamination fongique des environnements intérieurs par la détermination et la mesure de traceurs chimiques spécifiques : application à l'hygiène de l'habitat

Stéphane Moularat

► To cite this version:

Stéphane Moularat. Etude de la contamination fongique des environnements intérieurs par la détermination et la mesure de traceurs chimiques spécifiques : application à l'hygiène de l'habitat. Microbiologie et Parasitologie. Université de Marne-la-Vallée, 2005. Français. NNT : . tel-03840867

HAL Id: tel-03840867

<https://hal-cstb.archives-ouvertes.fr/tel-03840867>

Submitted on 6 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Marne-La-Vallée

Institut Francilien des Géosciences
Ecole Doctorale Information Communication Modélisation Simulation

THÈSE
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Marne-La-Vallée

Spécialité : Géomatériaux

présentée et soutenue publiquement par

Stéphane MOULARAT

le 12 mai 2005

Etude de la contamination fongique des environnements intérieurs par
la détermination et la mesure de traceurs chimiques spécifiques :
application à l'hygiène de l'habitat

STUDY OF FUNGAL CONTAMINATION OF THE INDOOR ENVIRONMENTS BY DETERMINATION AND MEASUREMENT OF
SPECIFIC CHEMICAL TRACERS : APPLICATION TO HOUSING HYGIENE

Directeur de thèse
Pr. Mehmet A. OTURAN

Jury

Président :	Pr. J-J. AARON	ITODYS - Université Paris 7
Rapporteurs :	Pr. M-N. BELLON-FONTAINE	ENSIA - Directeur du laboratoire de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux à l'INRA (Massy)
	Pr. P. BOIRON	Faculté de pharmacie - Directeur du laboratoire de génie de l'hygiène et des procédés alimentaires - Université Claude Bernard Lyon 1
Examineurs :	Pr. M. COUDERCHET	Université de Reims Champagne-Ardenne
	Dr. E. ROBINE	Chef du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Intérieurs au CSTB (Marne-la-Vallée)

A Lie-Chin
A Guillaume

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Messieurs Philippe DUCHENE-MARULLAZ et Christian COCHET, respectivement chef du département Développement Durable et chef de la division Santé-Bâtiment, pour m'avoir accueilli au CSTB et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Mehmet OTURAN pour le soutien et l'aide qu'il m'a apporté tout au long de ce travail. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoigné en acceptant la direction de cette thèse et en permettant ainsi sa réalisation.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Intérieurs, dirigé par Monsieur Enric ROBINE, que je remercie chaleureusement pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils, et son soutien. Je lui témoigne ici toute ma gratitude pour l'aide qu'il m'a apporté tant au niveau scientifique qu'au niveau humain.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Olivier RAMALHO, responsable de la métrologie des polluants de l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur, pour m'avoir apporté une aide précieuse dans les domaines de la chimie analytique et de la statistique, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements durant l'ensemble de mon travail de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, directrice du laboratoire de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (INRA Massy) et au Professeur Patrick BOIRON, Directeur du laboratoire de génie de l'hygiène et des procédés alimentaires (Université Claude Bernard Lyon 1), pour leur sympathie et pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse et d'en être rapporteurs.

Je remercie également Monsieur Jean-Jacques AARON, Professeur à l'ITODYS (université Paris 7) et Monsieur Michel COUDERCHET, Professeur à l'Université de Reims Champagne Ardenne, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Merci à tout mes collègues et amis (Marjorie, Sébastien, Thi-Lan, Isabelle, Christelle, Guillaume, Stéphane, Michelle, Céline, Frédéric, Julien, Mélanie, Mickael, Catherine, ...) qui, par leurs conseils, leur expérience, leur bonne humeur et leur écoute, m'ont aidé au quotidien à réaliser ce travail.

Enfin, je tiens à témoigner ma reconnaissance et toute mon affection aux personnes de mon entourage, mon épouse, ma famille ainsi que mes amis (Estelle, Fabien, Loïc...) pour avoir cru en moi et m'avoir toujours soutenu. Qu'ils sachent que leur présence m'a été d'une aide précieuse.

RESUME

L'apparition de maladies chez les occupants d'environnements « moisissus » a été très largement décrite dans la littérature. Les effets sur la santé des moisissures et métabolites associés sont nombreux : infections, allergies, toxi-infections, irritations. La prévalence et la sévérité des maladies déclarées chez l'enfant et l'adulte semblent corrélées avec une augmentation des surfaces contaminées dans l'habitat. Cependant, la caractérisation de l'exposition des personnes reste méconnue.

L'objet du travail de thèse a essentiellement porté sur le développement de méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des milieux, la définition et la validation d'indicateurs de surveillance de cette qualité.

Ainsi, cette recherche a porté à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement mais également sur la mise au point et l'adaptation de méthodes de dosage et de reconnaissance indirecte, basées en particulier sur la recherche des produits du métabolisme (COV spécifiques) ou de constituants cellulaires spécifiques (Ergostérol, mycotoxines).

Ainsi, l'étude des COV d'origine fongique a permis de définir une liste de 18 traceurs chimiques pertinents associés à un développement fongique.

A partir de l'étude de ces composés, nous avons établi un indice de contamination fongique des locaux. Des prélèvements *in situ* réalisés dans 12 habitations ont permis la validation de cet indice.

Par ailleurs, une méthodologie originale de quantification de l'exposition aux moisissures par l'évaluation de la biomasse et des mycotoxines aéroportées a été proposée.

Le taux de transfert matériau-air d'une mycotoxine (la stérigmatocystine) a également été étudié.

Mots clés : *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, COV, déoxynivalénol, développement fongique, ergostérol, moisissures, mycotoxines, ochratoxine, *Penicillium brevicompactum*, qualité de l'air intérieur, *Stachybotrys chartarum*, stérigmatocystine.

ABSTRACT

Disease occurrence in mouldy environments is very widely described in the literature. Health effects of moulds and associated metabolites are numerous: infection, allergy, toxi-infection, irritations. Prevalence and severity of declared diseases in the children and adults seem correlated with an increase of indoor contaminated surfaces. However, the characterization of occupant exposure remains underestimated.

The object of this work is essentially focused on the development of analytical methods to determine microbiological indoor quality, the definition and validation of survey indicators.

This research is thus both aimed at the development and improvement of sampling techniques and also on the conception and adaptation of direct and indirect measurements methods of metabolism products (Specific VOC) or of specific cellular components (Ergosterol, mycotoxins).

The study of VOC of fungus origin enabled the definition of relevant chemical tracers associated with fungus development. From these compounds, we established an index of fungus contamination in the indoor environments. Samplings realized in 12 houses allowed the validation of this index.

Besides, an original methodology of quantification of mould exposure was proposed taking into account the evaluation of biomass and airborne mycotoxins.

The transfer rate of material-air of a mycotoxin (the sterigmatocystin) was also studied.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, VOC, deoxynivalenol, moulds, ergosterol, mycotoxins, ochratoxin, *Penicillium brevicompactum*, indoor air, *Stachybotrys chartarum*, sterigmatocystin.

INTRODUCTION	17
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I Moisissures des environnements intérieurs : développement, biodegradation et impact sanitaire	19
I.1 Croissance et nutrition	20
I.1.A Etapes de multiplication	20
I.1.B Besoins nutritionnels	21
I.1.C Besoins en eau	21
I.1.D Rôle des différents facteurs de l'environnement	22
I.2 Mécanismes de biodégradation	23
I.3 Impact sanitaire	24
I.3.A L'aspergillose invasive nosocomiale	24
I.3.B Les maladies immuno-allergiques	25
I.3.C Les toxi-infections	25
I.3.D Effets irritatifs : rôle des composés organiques volatils (COV)	27
I.4 Contamination fongique de l'air et des surfaces	28
II Méthodologie d'Evaluation de la contamination fongique dans les environnements intérieurs	30
II.1 Examen visuel des locaux	30
II.2 Echantillonnage des moisissures	31
II.2.A Collecte des aérosols fongiques	31
II.2.B Prélèvements de surfaces	33
II.3 Analyses	37
II.3.A Méthode culturale	37
II.3.B L'observation microscopique	38
II.3.C Mesure des éléments constitutifs	38
III Composés Organiques Volatils	42
III.1 Echantillonnage et analyse des COV d'origine fongique : application aux environnements intérieurs	42
III.2 Biosynthèse des COV d'origine fongique	43
III.3 Nature des COV émis à partir de matériaux de construction contaminés	44
III.4 Occurrence des COV d'origine fongique dans l'habitat	46
III.5 Utilisation des COV comme traceurs	47
IV Les mycotoxines	48
IV.1 Prélèvement et préparation de l'échantillon : application aux environnements intérieurs	48
IV.2 Méthodes chromatographiques utilisées pour la détection des mycotoxines dans les environnements intérieurs	49
IV.3 Nature et biosynthèse des mycotoxines	50
IV.4 Production de mycotoxines sur des matériaux de construction	51
IV.5 Prélèvements in situ	53
DEMARCHE	55

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	59
I Montages expérimentaux	59
I.1 Chambres d'émission de COV	59
I.1.A Prélèvement actif	59
I.1.B Prélèvement passif	59
I.2 Montage d'aérosolisation	60
I.3 Chambre environnementale	61
I.4 Matériel biologique	62
I.5 Préparation des matériaux	63
II Techniques de prélèvement	64
II.1 Prélèvement des cov	64
II.1.A Prélèvement en laboratoire	64
II.1.B Prélèvement <i>in situ</i>	65
II.2 Prélèvement particulaire	66
II.2.A Utilisation de la coupelle rotative	66
II.2.B Échantillonnage par impaction	67
III Traitement des échantillons	67
III.1 Extraction de l'ergostérol	68
III.2 Extraction des mycotoxines	68
III.3 Techniques d'analyse	68
III.3.A Analyse des COV	68
III.3.B Analyse de l'ergostérol et des mycotoxines	69
IV Traitement des données relatives aux COV	70
IV.1 Quantification des COV	70
IV.2 Analyse statistique des données	71
IV.2.A Analyse en Composantes Principales (ACP)	71
IV.2.B La Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)	71
CHAPITRE III : RESULTATS	73
I Détection de la contamination fongique par la recherche de cibles chimiques	73
I.1 Méthodologie de caractérisation des émissions chimiques	74
I.2 Emissions chimiques des produits de construction	75
I.2.A Identification des principaux COV	75
I.2.B Emissions spécifiques liées à la dénaturation du matériau	76
I.3 Emissions chimiques liées à la biodégradation du substrat et au métabolisme fongique	78
I.4 Caractérisation des émissions liées aux développements fongiques	82
I.4.A Cinétique d'apparition des COV	82
I.4.B Concentration des principales émissions	85
I.5 Recherche des traceurs chimiques spécifiques	88
I.6 Proposition d'un indice chimique de contamination fongique	89
I.6.A Construction de l'indice	89
I.6.B Application à des mesures et investigations <i>in situ</i>	92
I.7 Détermination d'une variable de contamination par une étude statistique	96
I.7.A Analyse sur l'ensemble des essais	96
I.7.B Analyse par matériau	102
I.8 Analyses statistiques des données <i>in situ</i>	108
I.8.A Corrélation entre différents indicateurs	108
I.8.B Application de la variable de contamination	111

II	Caractérisation de l'exposition aux aérosols fongiques : mesure de l'Ergosterol et des mycotoxines aéroportées	116
II.1	Mesure de la biomasse fongique aéroportée	116
II.1.A	Caractérisation et validation de la technique.	116
II.1.B	Comparaison entre la mesure de l'ergostérol et la culture.	118
II.1.C	Mesures sur sites.	119
II.2	Mesure des mycotoxines aéroportées	121
II.2.A	Mise au point de la technique de dosage	122
II.2.B	Impact des matériaux sur la production des mycotoxines	125
II.2.C	Approche du transfert des mycotoxines substrat/air	128
II.2.D	Répartition de la stérigmatocystine selon les fractions particulières	131
	DISCUSSION GENERALE	135
	CONCLUSION	139
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	143

FIGURES

Figure I-1 : Classification simplifiée du règne Fungi (Chasseur et Nolard., 2003)	19
Figure I-2 : Cycle de vie asexuel d' <i>Aspergillus nidulans</i> (d'après Osheroov et May, 2001)	20
Figure I-3 : Quelques sources d'humidité dans le bâtiment (Singh, 1994).....	22
Figure I-4: Courbes d'efficacité de collection.....	32
Figure I-5: Formule développée de l'ergostérol	39
Figure I-6 : Spectre de l'ergostérol dans du méthanol.	39
Figure I-7 : formule développée de la chitine	41
Figure I-8 : Chemin métabolique de la biosynthèse des principaux COV et mycotoxines associées (ce schéma a été codé de la façon suivante : les COV sont soulignés, les mycotoxines produites sont surlignées en orange) (d'après Pasanen <i>et al.</i> , 1996)	44
Figure I-9 : Formules développées des trichothécènes de type A et de type B (de gauche à droite).....	51
Figure I-10 : Structure chimique de la stérigmatocystine, la T2-toxine, la déoxynivalénol et la statratoxine H.....	51
Figure I-11 : formule développée de l'ochratoxine A	54
Figure I-12 : Principales émissions de métabolites et de particules générées à chaque étape du développement fongique.....	55
Figure II-1 : Photographie du volume d'essai	59
Figure II-2: Schéma du montage d'aérosolisation	60
Figure II-3 : photographie du montage.....	60
Figure II-4 : Photographie du compteur optique GRIMM.....	61
Figure II-5 : Photographies de la chambre environnementale	62
Figure II-6 : (a) Relation entre turbidimétrie et concentration d'une suspension de spores d' <i>Aspergillus niger</i> . (b) observation, au microscope objectif (x10), de la cellule Thoma et des conidies d' <i>Aspergillus niger</i> à dénombrer.....	64
Figure II-7 : Corps diffusif Radiello.....	65
Figure II-8 : Schéma du préleveur CIP (fraction alvéolaire).....	66
Figure II-9 : Sélecteurs de particules a. fraction inhalable ; b. fraction thoracique ; c. fraction alvéolaire.	67
Figure III-1 : Schéma de principe du montage destiné à l'étude de l'émission des COV.....	74
Figure III-2 : Chromatogramme par spectrométrie de masse d'une chambre d'émission ne contenant pas de matériau (prélèvement sur Tenax TA et analyse en chromatographie en phase gazeuse)	74
Figure III-3 : Chromatogrammes superposés des émissions de la toile de verre sans (tracé noir) et avec développement d' <i>Aspergillus niger</i> (tracé rouge).	79
Figure III-4 : Agrandissement du chromatogramme Figure III-3 pris entre 20-30min en abscisse et 0-60 kcounts en ordonnée.....	79
Figure III-5 : Spectres de masse du sesquiterpène A (a), du sesquiterpène B (b), du sesquiterpène C (c) et du terpénoïde (d).....	82
Figure III-6 : Cinétiques d'apparition de COV émis dès le 2 ^{ème} jour d'incubation.	83
Figure III-7 : Cinétiques d'apparition de COV émis après 8 jours d'incubation	83
Figure III-8 : Cinétiques d'apparition du méthyl-2-éthylhexanoate et du 2-éthylhexanol.....	84
Figure III-9 : Schémas réactionnels supposés pour la formation du méthyl-2-éthylhexanoate (MeOH : méthanol)	85
Figure III-10 : Incrémentation de l'indice chimique de contamination fongique.....	91
Figure III-11 : Incrémentation spécifique au couple 2-éthylhexanol / méthyl-2-hexanoate.....	91
Figure III-12 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.	98
Figure III-13 : Plan principal de l'ACP sur 53 essais et 397 ions (distinction entre espèces fongiques et témoins).	99
Figure III-14 : Plan principal de l'ACP sur 53 essais et 397 ions (distinction entre matériaux)	100
Figure III-15 : Centre d'inertie des variables continues actives.....	101
Figure III-16 : Plans principaux des ACP sur chaque matériau (●Témoin, ● <i>Aspergillus niger</i> , ● <i>Aspergillus versicolor</i> , ● <i>Penicillium brevicompactum</i>)	103
Figure III-17 : Courbe de réponse des ions spécifiques (moyenne des aires) obtenue sur fibre de verre additionnée de solution nutritive	106
Figure III-18 : Courbes de réponses des ions spécifiques (moyenne des aires) obtenues sur dalle de plafond, plâtre, toile de verre et papier peint vinyl.	107
Figure III-19 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.	109
Figure III-20 : Plan principal de l'ACP sur le questionnaire	110
Figure III-21 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.	111
Figure III-22 : Plan principal de l'ACP sur 12 essais et 325 ions (prélèvement <i>in situ</i>)	112

Figure III-23 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.	113
Figure III-24 : Plan principal de l'ACP sur 12 essais et 59 ions (injection des ions spécifiques, prélèvement <i>in situ</i>)	114
Figure III-25 : Classification hiérarchique ascendante des 12 habitations.....	115
Figure III-26: Mesures simultanées de l'ergostérol aéroporté extérieur.	118
Figure III-27: (a) mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur une journée ; (b) mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur plus d'une semaine.	119
Figure III-28: Mesure de l'ergostérol aéroporté présent à l'intérieur et extérieur de différents locaux. Le prélèvement à l'intérieur du local est réalisé à 1 mètre du sol. Un autre, en référence, est systématiquement effectué à l'extérieur dans les mêmes conditions.	119
Figure III-29: mesure extérieure de la biomasse fongique aéroportée, année 2002-2003 sur le site de Champs-sur- Marne (France).....	120
Figure III-30 : Formules développées de la stérigmatocystine et de la	123
Figure III-31 : Chromatogramme d'une extraction obtenue sur papier peint vinyl contaminé par <i>Aspergillus</i> <i>versicolor</i> . La mesure est réalisée à 10 jours d'incubation (observation à 325 nm).	124
Figure III-32 : Corrélation entre l'aire des pics et la concentration en stérigmatocystine.....	124
Figure III-33 : Mesure de la stérigmatocystine produite par <i>Aspergillus versicolor</i> se développant sur différents matériaux (mesure réalisée après 10 jours d'incubation ; n=3)	126
Figure III-34 : Mesure de la stérigmatocystine et de l'ergostérol produites par <i>Aspergillus versicolor</i> se développant sur différents matériaux (mesure réalisée après 10 jours d'incubation ; n=3).....	127
Figure III-35 : Nombre de particules aérosolisées (0,3-20µm) par litre à partir d'une croissance d' <i>Aspergillus</i> <i>versicolor</i> sur différents substrats additionnés de solution nutritive (mesures réalisées après 10 jours d'incubation).....	129
Figure III-36 : Profil granulométrique des aérosols fongiques générés en fonction de différents supports	130
Figure III-37 : Quantités de stérigmatocystine aérosolisée par unité de surface de matériau contaminée (<i>Aspergillus versicolor</i> ; n=3).....	130
Figure III-38 : Profil granulométrique des aérosols produits à partir du papier peint vinyl encrassé dans la chambre environnementale	132

TABLEAUX

Tableau I-1: Activités hydriques minimales et températures de croissance optimales de quelques espèces fongiques isolées dans les environnements intérieurs (Yang et Johanning, 1997 ; Clarke <i>et al.</i> , 1999)	23
Tableau I-2 : Principaux allergènes de moisissures caractérisés ou admis comme référence (Gumowski, 1997)....	25
Tableau I-3 : Quelques moisissures toxiques, leurs métabolites secondaires et les effets sanitaires associés toutes voies de contamination confondues (Krishnamachari, 1975 ; Yang et Johanning, 1997 ; Hurst <i>et al.</i> , 1998 ; Alvarez <i>et al.</i> , 2004 ; Blumenthal, 2004)	26
Tableau I-4 : Moisissures les plus couramment isolées dans les environnements intérieurs.	28
Tableau I-5 : Synthèse de quelques espèces fongiques isolées à partir de divers matériaux (d'après Botton <i>et al.</i> , 1985; Samson <i>et al.</i> , 1994; Beguin et Nolard, 1994; Beguin, 1995).....	29
Tableau I-6 : Echelle d'évaluation des surfaces contaminées par des moisissures visibles à l'œil nu, proposée par le laboratoire Microbial (Québec) (d'après Chasseur et Nolard, 2003)	30
Tableau I-7 : Echantillonneurs d'aérosols fongiques (Crook, 1995 ; Pasanen, 2000 ; NF EN 13098, 2000).....	35
Tableau I-8 : Concentration d'ergostérol par spore pour différentes espèces fongiques (Miller et Young, 1997)...	40
Tableau I-9 : Impact de l'âge de la culture sur la concentration d'ergostérol	40
Tableau I-10 : Principales études traitant de l'émission des COV fongiques et appliquées à l'habitat	45
Tableau I-11 : COV fréquemment détectés lors d'une croissance fongique sur matériaux de construction.....	45
Tableau I-12: Emission de COVm par <i>Aspergillus versicolor</i> sur différent substrats utilisés fréquemment dans l'habitat (Schleibinger <i>et al.</i> , 2002)	46
Tableau I-13 : Mesure de la concentration de COV dans deux maisons présentant des signes de contamination fongique (Ström <i>et al.</i> , 1994).....	47
Tableau I-14 : Mycotoxines produites par les moisissures de l'habitat inoculées sur des matériaux de construction (d'après Nielsen, 2003).....	52
Tableau II-1: Caractéristiques du compteur optique de particules GRIMM 1.108	61
Tableau II-2 : Matériel biologique utilisé en fonction du montage expérimental	63
Tableau II-3 : Nature et conditionnement des matériaux utilisés en fonction du montage expérimental.....	64
Tableau II-4 : Caractéristiques du GC/FID/MS	69
Tableau II-5 : Contribution des atomes d'une molécule au nombre de carbone effectif (Wronski <i>et al.</i> , 1986)	71
Tableau III-1 : COV majoritaires émis par chaque matériau en l'absence de contamination fongique, par ordre de concentrations décroissantes (n représente le nombre d'essai)	76
Tableau III-2 : Composés émis spécifiquement après traitement de la toile de verre à l'oxyde d'éthylène (n=3) ...	77
Tableau III-3 : Composés émis par la toile de verre après élévation de la température (170°C durant 30 min ; n=2)	78
Tableau III-4 : plan d'expérimentation permettant de comparer 84 chromatogrammes (42 couples de matériau avec développement fongique / même matériau hors développement)	78
Tableau III-5 : Composés émis en présence d'un développement fongique sur divers produits de construction (les prélèvements sont réalisés après 7 jours d'incubation à 25°C)	81
Tableau III-6 : Concentration des COV émis lors du développement d' <i>Aspergillus niger</i> et <i>Penicillium brevicompactum</i> sur un support témoin et sur la toile de verre. <LD inférieur à la limite de détection, <LQ composé détecté mais inférieur à la limite de quantification.....	86
Tableau III-7 : Liste des COV fongiques émis par la croissance d' <i>Aspergillus versicolor</i> sur papier peint vinyl (n=3).....	87
Tableau III-8 : Elimination des COV potentiellement issus des produits de construction.....	88
Tableau III-9 : COV issus du métabolisme fongique comparé aux émissions sur un substrat témoin en présence d'un développement fongique d' <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. versicolor</i> et <i>Penicillium brevicompactum</i> (prélèvement réalisés après 7 jours d'incubation ; n=5)	89
Tableau III-10 : Synthèse des traceurs chimiques retenus.....	90
Tableau III-11 : Valeur d'indice pour chaque COV du métabolisme.....	92
Tableau III-12 : Liste des COV issus du métabolisme identifiés dans 12 habitations (0 = absence du composé, 1 = présence du composé).....	93

Tableau III-13 : Valeurs des indices attribuées à chaque habitation	95
Tableau III-14 : Résultat du questionnaire soumis aux propriétaires des habitations enquêtées (1=oui, 0=non) ...	96
Tableau III-15 : Poids des facteurs défini par l'ACP	97
Tableau III-16: Résultats de l'ACP par matériaux.....	102
Tableau III-17 : Ions spécifiques déterminés par l'ACP.....	104
Tableau III-18 : COV issus d'un développement fongique et ions spécifiques associés	105
Tableau III-19 : Intensités moyenne de la somme des ions spécifiques retenus (la moyenne est calculée à partir de 4 essais pour la fibre de verre, 5 sur la toile de verre, 3 sur le papier peint, 2 le plâtre, et 1 sur la dalle de plafond)	105
Tableau III-20 : Matrice des différents indicateurs fongiques.....	109
Tableau III-21 : Poids des facteurs défini par l'ACP	111
Tableau III-22 : Poids des facteurs défini par l'ACP	113
Tableau III-23 : Stabilité de l'ergostérol contenu dans les spores d' <i>Aspergillus niger</i> après 19 et 27 jours de stockage et 7 jours de collecte.....	117
Tableau III-24 : Comparaison entre la concentration d'ergostérol aéroporté et des mesures ponctuelles de la flore fongique cultivable.	118
Tableau III-25 : Valeur de l'indice de polarité défini par Snyder (Robards <i>et al.</i> , 1994)	122
Tableau III-26 : Statistiques descriptives.	125
Tableau III-27 : Quantités de stérigmatocystine contenues dans les différents sélecteurs de la fraction particulaire	132
Tableau III-28 : Quantités de stérigmatocystine recalculées en fonction des différentes fractions particulières ..	133

ACP	Analyse en Composantes Principales
Camphre	1,7,7-triméthyl-bicyclo-(2,2,1)-heptan-2-one
CE	Electrophorèse capillaire (EC)
CHA	Classification Hiérarchique Ascendante
CIP	Capteur Individuel de Poussière
COV	Composés Organiques Volatils
COV _m	Composés Organiques Volatils d'origine microbienne
CSTB	Centre Scientifique et Technique du Bâtiment
Da ₅₀	Diamètre aérodynamique de coupure
Dalton	Unité de masse correspondant à la masse d'un atome d'hydrogène, soit 1,66X10 ⁻²⁷ gramme.
DAS	Diacetoxyscirpentriol
DIBP	Diisobutyl phtalate
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
DON	Déoxynivalénol
d _{opt}	Diamètre optique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FID	Détection par ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
HEPA	High Efficiency Particulate Air
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)
Isoprène	2-méthyl-1,3-butadiène
LC	Chromatographie en Phase Liquide (CPL)
Limonène	1-méthyl-4-(1-méthyléthényle)-cyclohexène
MS	Spectrométrie de Masse (SM)
NIV	Nivalénol
OQAI	Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur
PTFE	Polytétrafluoroéthylène (Téflon [®])
RIA	Radio Immuno Assay
SBM	Syndrôme des bâtiments malsains

SPE	Extraction en Phase Solide (EPS)
SPME	microextraction en phase solide
ST	Stérigmatocystine
TLC	Chromatographie sur Couche Mince (CCM)
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra Violet

INTRODUCTION

Depuis les années 70 et le premier choc pétrolier, la politique d'économie d'énergie mise en œuvre a entraîné un confinement des habitations avec notamment l'isolation accrue des bâtiments. Cette politique associée à la généralisation d'équipements ménagers générateurs de vapeur (lave linge, sèche linge, ...), a eu pour conséquence une augmentation de l'humidité relative favorable à la prolifération des microorganismes, notamment des moisissures, sur la plupart des supports tels que les matériaux de construction.

Les locaux sont alors susceptibles de constituer des « niches écologiques » pour le développement de ce type de microorganismes. Ce phénomène s'est ainsi traduit par une augmentation du nombre de locaux contaminés par les moisissures depuis les 30 dernières années.

La présence de moisissures dans les environnements intérieurs n'est pas sans conséquences sanitaires. En effet, de nombreuses études ont démontré leur rôle à la fois dans la dégradation des matériaux et des ouvrages qu'elles colonisent, mais également dans l'apparition de symptômes chez les occupants de locaux moisis.

Au cours des 2 dernières décennies, de nombreuses études réalisées en Amérique du Nord et en Europe ont mis en évidence que, dans certaines circonstances d'exposition, ces microorganismes pouvaient être responsables de l'apparition de maladies notamment respiratoires telles que des allergies, infections ou toxi-infections (Kuhn et Ghannoum, 2003).

Actuellement, les méthodes les plus couramment employées pour réaliser l'analyse microbiologique de l'air et évaluer le niveau d'exposition des personnes sont principalement basées sur la culture des microorganismes.

Outre de sous-estimer la concentration des microorganismes dans la mesure où seuls ceux capables de se développer sur les milieux utilisés peuvent être comptabilisés, ces techniques peuvent s'avérer inadéquates pour évaluer l'exposition des personnes en ne tenant compte ni de l'exposition sur de longues périodes, ni de la toxicité des aérosols.

Les moisissures produisent, en continu, des métabolites et produits de dégradation (mycotoxines, composés organiques volatils - COV,...) inhalables et susceptibles d'être responsables de maladies (effets cancérogènes de certaines mycotoxines par exemple). Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles techniques qui, combinées aux méthodes classiques, permettraient de caractériser au mieux la contamination fongique des environnements intérieurs et les niveaux d'exposition des personnes.

Dans ce contexte, l'objet de ce travail de thèse a essentiellement porté sur le développement de méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des milieux, la définition et la validation d'indicateurs de surveillance de cette qualité.

Ainsi, cette recherche a porté à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement mais également sur la mise au point et l'adaptation de méthodes de dosage et de reconnaissance indirecte, basées en particulier sur la recherche des produits du métabolisme ou de constituants cellulaires spécifiques (COV spécifiques, ergostérol, mycotoxines).

Un état de l'art fera d'abord le point sur les aspects moisissures, métabolites secondaires et santé au sein des bâtiments. Cette étude bibliographique nous permettra de définir les espèces fongiques, les mycotoxines et les méthodes analytiques les plus pertinentes pour notre recherche.

Dans une seconde partie, nous détaillerons les techniques d'étude et bancs expérimentaux mis en place pour réaliser ce travail de recherche.

Ces outils seront mis en œuvre dans une troisième partie pour étudier l'émission des COV lors d'un développement fongique sur divers matériaux de construction.

Après avoir proposé un protocole de détection d'un développement fongique dans l'habitat par la mesure de ces traceurs chimiques, nous développerons une méthodologie originale permettant de caractériser l'exposition aux bioaérosols fongiques par l'évaluation de la biomasse et des mycotoxines aéroportées.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette synthèse bibliographique présente brièvement la nature, le développement et l'impact sanitaire des moisissures rencontrées dans les environnements intérieurs ainsi que les méthodologies d'évaluation de la contamination fongique dans les locaux.

La mesure et la production de métabolites fongiques secondaires dans l'habitat seront également développées dans ce chapitre.

I MOISSISSURES DES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS : DEVELOPPEMENT, BIODEGRADATION ET IMPACT SANITAIRE

Les champignons microscopiques, ou micromycètes, appartiennent au règne *Fungi* habituellement divisé en trois groupes au sein desquels on distingue :

- les champignons « primitifs »: *Myxomycètes*, *Oomycètes*
- les vrais champignons : les *Eumycètes*.

La classification simplifiée de ce règne est présentée dans la Figure I-1. L'identification et la classification des champignons sont à ce jour essentiellement basées sur des caractères morphologiques et chimiques, les *Eumycètes* ou encore champignons « vrais » étant subdivisés selon leur mode de reproduction, sexuée ou asexuée.

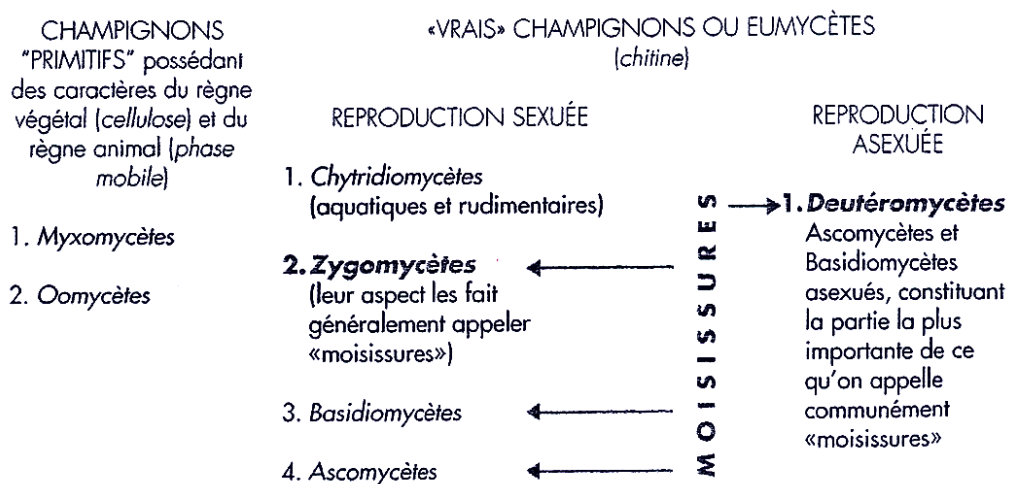


Figure I-1 : Classification simplifiée du règne Fungi (Chasseur et Nolard., 2003)

Notre problématique traitant des contaminations fongiques des environnements intérieurs, notre intérêt se portera sur les Deutéromycètes aussi appelés *Fungi imperfecti*, qui constituent la majeure partie de la flore fongique de ces milieux (Prescott *et al.*, 1995 ; Cahagnier 1998 ; Chasseur et Nolard, 2003).

Les moisissures sont des organismes filamenteux eucaryotes porteurs de spores et dépourvus de chlorophylle. Contrairement aux végétaux, ces microorganismes sont incapables de synthétiser la matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique et utilisent celle puisée dans le substrat comme source d'énergie, de carbone et d'électrons : ces microorganismes sont dits chimiohétérotrophes. Les nutriments, après avoir été digérés par les nombreuses enzymes excrétées, sont absorbés au travers de la paroi de leur appareil végétatif (Prescott *et al.*, 1995).

Ces microorganismes sont constitués de filaments longs, fins et ramifiés, à structure cellulaire, dénommés hyphes. Ceux-ci forment une masse emmêlée appelée mycélium ou thalle. La reproduction des mycètes, dont plus de 200 000 espèces sont connues à ce jour (Chasseur et Nolard, 2003), peut être sexuée ou asexuée, pour ces derniers : les deutéromycètes, leur multiplication est assurée par des particules microscopiques appelées conidies. Leur diamètre est compris entre 3 et 30 μm (Gravesen *et al.*, 1994 ; Madelin, 1994).

I.1 CROISSANCE ET NUTRITION

I.1.A Etapes de multiplication

Le développement d'une moisissure comporte 3 phases : germination, croissance, sporulation (puis dissémination). La phase végétative de croissance et la phase reproductive se produisent presque simultanément. Durant cette phase de croissance le micro-organisme dégrade les constituants du substrat nécessaires à son développement par l'émission d'enzymes et d'acides, pouvant induire la détérioration des supports.

En 2001, Osharov et May décrivent les différentes phases du cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Figure I-2). Les conidies sont produites par une structure spécialisée, le conidiophore. Après dispersion et contact avec un milieu adéquat, les conidies germent et donnent naissance à un hyphe. Le développement de cette structure forme un mycélium ramifié dont émerge un hyphe aérien porteur de conidiophores.

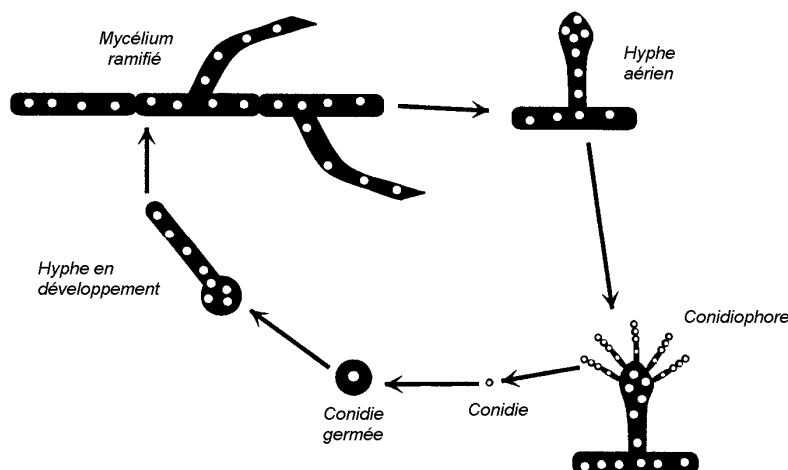


Figure I-2 : Cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (d'après Osharov et May, 2001)

La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de ceux-ci s'effectue par le sommet, ou apex, où se déroule l'essentiel des réactions de synthèse et de dégradation du métabolisme dit « primaire », indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les produits du métabolisme dits « secondaires », dans la mesure où ils ne sont pas indispensables au fonctionnement de la cellule pour sa survie, sont généralement stockés en région subapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les mycotoxines, les pigments, et certains composés organiques volatils (Prescott *et al.*, 1995 ; Yang et Johanning, 1997 ; Roquebert, 1998).

Les champignons sont des organismes généralement aérobies. La quantité d'oxygène disponible est donc un facteur influent de la croissance. Le métabolisme des champignons peut être modifié selon la teneur en oxygène environnemental; par exemple la production de mycotoxines (acide penicillique produit par *Penicillium brevicompactum* par exemple) décroît considérablement en conditions d'oxygénation faible (Roquebert, 1998).

I.1.B Besoins nutritionnels

Les moisissures sont susceptibles de se développer partout où de la matière organique est disponible. Les micromycètes sont capables de sécréter un fluide exocellulaire, contenant des enzymes hydrolytiques qui décomposent les substrats (protéines, polysaccharides, lipides, acides nucléiques, lignine ...) en monomères facilement assimilables par le microorganisme.

Les besoins nutritionnels requis sont divisés en deux catégories : les nutriments constitutifs, et les oligonutriments.

Les premiers, parmi lesquels figurent le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore, le potassium, l'azote, le soufre et le magnésium, sont nécessaires à des concentrations d'environ 10^{-3} mol/L. Le carbone, combiné à l'hydrogène, l'oxygène et l'azote, est l'élément structural majeur de l'organisme. L'hydrogène provient de l'eau contenue dans le support, l'oxygène est puisé dans l'ambiance (Janinska, 2000).

Concernant les oligonutriments, parmi lesquels figurent le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, ils sont nécessaires à des concentrations de 10^{-6} mol/L au maximum (10^{-6} mol/L pour le fer à 10^{-9} mol/L pour le molybdène). Certains sont des cofacteurs essentiels au bon fonctionnement enzymatique de la cellule. Des vitamines, telles que la thiamine (B1), la biotine (B7), l'inositol ($C_{16}H_{12}O_6$), sont également requises par ces microorganismes (Griffin, 1994).

I.1.C Besoins en eau

Les moisissures, comme tous les organismes ont besoin d'eau comme solvant. Les substrats et les enzymes sont tous en solution ou en suspension colloïdale, et aucune activité enzymatique n'existe en absence d'eau.

Le mouvement de l'eau, au travers des parois semi perméables des cellules et des hyphes, se fait par osmose. Parmi les différents termes utilisés pour décrire les forces impliquées dans ce phénomène figurent : la pression osmotique, le potentiel osmotique, le potentiel hydrique et l'activité de l'eau (a_w). L'activité de l'eau est assimilable à l'humidité relative, exprimée en pourcentage, lorsque l'équilibre entre le substrat et l'air adjacent est atteint. Elle correspond au rapport de la tension de vapeur d'eau du produit sur la tension de vapeur de l'eau pure à la même température. Elle varie de 0 (absence d'eau) à 1 (eau pure).

Adan, en 1994, assimile la teneur en eau des substrats à l'activité de l'eau ou à l'humidité relative de leur environnement, dans la mesure où le développement fongique est initialement un phénomène de surface et où l'existence d'hystérésis lié à l'historique du support ne permet pas de définir précisément, à partir des isothermes de sorption, ce facteur.

Les limites théoriques du développement fongique correspondent, pour la valeur supérieure à une a_w égale à 1 et pour la valeur inférieure à une a_w égale à 0,55, où l'ADN est probablement dénaturé (distorsion de la structure hélicoïdale de la molécule). Toutefois, à ce jour, aucun développement fongique n'a été constaté pour des valeurs d' a_w inférieures à 0,62 (germination d'*Eurotium echinulatum*) (Scott, 1957).

La nature de la flore fongique varie selon la teneur en eau du support. Une humidité croissante du substrat entraîne l'apparition successive de genres fongiques dits de première (*Aspergillus*, *Penicillium*), deuxième (*Cladosporium*, *Ulocladium*) et de troisième colonisation (*Stachybotrys*) (Grant *et al.*, 1989).

Essentiellement liée au bâti (erreurs de conception, mauvaise isolation, ventilation insuffisante ou inadaptée) et aux occupants (vapeur générée par le métabolisme et les activités quotidiennes : cuisson, nettoyage,...), la teneur en humidité d'un local peut également résulter de dégâts des eaux (Déoux, 2001). Quelques unes des sources d'humidité dans le bâtiment sont représentées sur la Figure I-3.

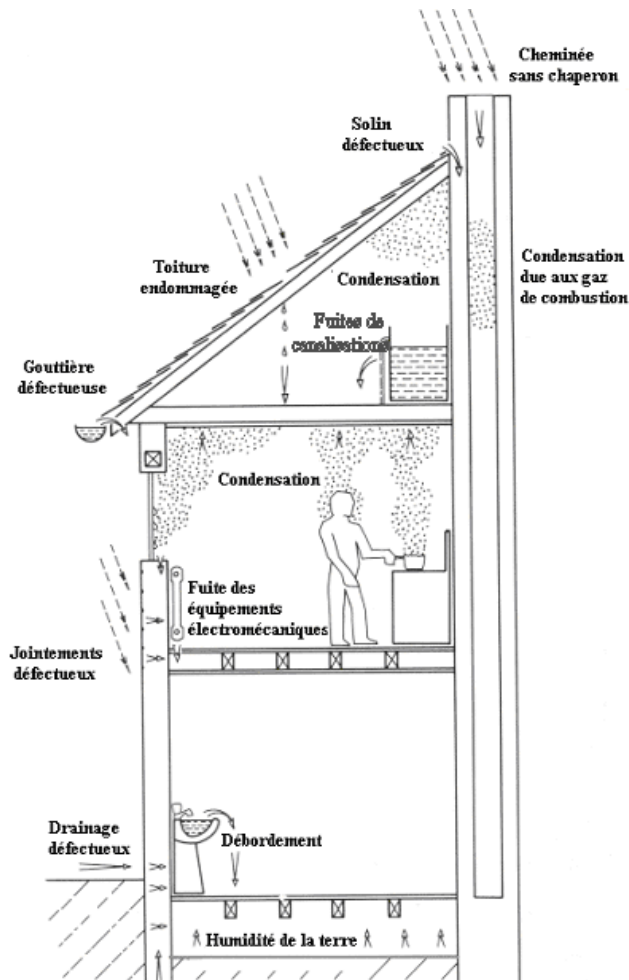


Figure I-3 : Quelques sources d'humidité dans le bâtiment (Singh, 1994).

I.1.D Rôle des différents facteurs de l'environnement

Impact de la température

La croissance des moisissures est possible sur une large gamme de température. La plage minimale requise se situe entre 0 et 10°C, les basses températures (inférieures à la minimale) affectent essentiellement leur croissance et non leur viabilité. La température maximale tolérée par les espèces isolées dans les locaux est comprise entre 35 et 52°C (Ayerst, 1966 ; Panasenکو, 1967), tandis que l'optimale s'observe généralement à 25°C (Tableau I-1).

Espèce fongique	a _w	Température (°C)	Espèce fongique	a _w	Température (°C)
<i>Absidia corymbifera</i>	0,88	25	<i>Mucor circinelloides</i>	0,90	25
<i>Alternaria citri</i>	0,84	25	<i>Paecilomyces variotii</i>	0,84	25
<i>Aspergillus candidus</i>	0,75	25	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,81	23
<i>A. flavus</i>	0,78	33	<i>P. chrysogenum</i>	0,79	25
<i>A. fumigatus</i>	0,82	25	<i>P. citrinum</i>	0,80	25
<i>A. niger</i>	0,77	35	<i>P. expansum</i>	0,83	23
<i>A. ochraceus</i>	0,77	25	<i>P. frequentans</i>	0,81	23
<i>A. restrictus</i>	0,75	25	<i>P. griseofulvum</i>	0,81	23
<i>A. sydowii</i>	0,78	25	<i>P. spinulosum</i>	0,80	25
<i>A. terreus</i>	0,78	37	<i>Rhizopus microsporus</i>	0,90	25
<i>A. versicolor</i>	0,78	37	<i>R. stolonifer</i>	0,84	25
<i>A. wentii</i>	0,84	25	<i>R. oryzae</i>	0,88	25
<i>Eurotium amstelodami</i>	0,70	25	<i>Stachybotrys chartarum</i>	0,97	5-30
<i>E. chevalieri</i>	0,71	33	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,84	25
<i>Emmericella nidulans</i>	0,78	37	<i>Wallemia sebi</i>	0,7	25

Tableau I-1: Activités hydriques minimales et températures de croissance optimales de quelques espèces fongiques isolées dans les environnements intérieurs (Yang et Johanning, 1997 ; Clarke *et al.*, 1999)

Effet du pH

La vitesse de croissance est maximum pour des substrats de pH acides à neutres (entre 4 et 7). La gamme de pH permettant la croissance est toutefois bien plus étendue avec des valeurs limites comprises entre 2,2 et 9,6 pour les espèces les plus communes, *Penicillium variable* possédant même des valeurs limites égales à 1,6 et 11,1 (Adan *et al.*, 1994).

L'impact du pH sur la viabilité fongique est méconnu, toutefois il serait susceptible de limiter l'activité enzymatique ou encore les systèmes de transport membranaire (Prescott *et al.*, 1995 ; Multon, 1998 ; Lesage-Meessen et Cahagnier, 1998 ; Weidenböner, 2001).

Rôle des radiations lumineuses

L'impact de la lumière sur le comportement fongique est un phénomène complexe, qui conduit Hawker à établir, en 1966, une classification des moisissures selon leur comportement vis-à-vis des radiations lumineuses. Cette répartition consiste en 4 groupes :

- les moisissures sporulant uniquement dans l'obscurité,
- celles sporulant aussi bien dans l'obscurité qu'à la lumière,
- celles ne formant pas de spores dans l'obscurité,
- celles dont la sporulation est inhibée par la lumière à certaines étapes de leur développement.

Les rayonnements lumineux peuvent donc avoir un effet stimulant ou inhibiteur sur la germination et la croissance fongique selon la longueur d'onde et l'espèce considérée. Cette propriété est d'ailleurs utilisée comme une technique potentielle de stérilisation. Ainsi, Nakamura (1987), a démontré que 79 % des spores d'*Aspergillus niger* soumises, durant 1 seconde à une irradiation de longueur d'onde égale à 254 nm, sont inactivées.

I.2 MECANISMES DE BIODEGRADATION

La colonisation des matériaux par les moisissures induit généralement leur biodégradation et résulte de deux types d'action, une première, physique, liée au développement des hyphes dans le matériau, conduisant à la rupture de la structure du support, l'autre, chimique, imputable à la production de divers métabolites agissant par assimilation ou dissimilation.

Concernant le processus physique ou mécanique, ses effets étudiés sur la pierre se traduisent par un arrachement des particules de matériaux qui sont entraînés par le mycélium au travers de la surface, les structures fongiques envahissent alors les pores ainsi créés et déstabilisent la structure minérale du matériau (Gomez-Alarcon et de la Torre, 1994).

Concernant l'action chimique, lors des processus d'assimilation, les constituants du matériau sont utilisés comme nutriments après avoir été réduits par diverses enzymes extracellulaires qui facilitent la pénétration des hyphes dans le matériau.

Les processus de dissimilation sont liés à la production d'acides organiques et de pigments. Les acides organiques, tels que les acides gluconique, citrique, oxalique, malique, succinique, itaconique..., produits en quantités variables durant l'activité métabolique sont capables de réagir avec le substrat par dissolution des cations ou par chélation des ions métalliques présents dans les peintures, par exemple. Cette dernière réaction peut conduire à la formation de sels. Ainsi, l'acide oxalique réagissant avec le calcium donne naissance à des oxalates de calcium.

Le dioxyde de carbone produit par tous les organismes aérobies et notamment les moisissures lors de la respiration joue également un rôle dans la dégradation des supports. En effet, à partir d'un certain taux d'humidité, ce gaz peut se transformer en acide carbonique, capable de dissoudre le calcium et le magnésium pour former des bicarbonates de calcium et de magnésium hydrosolubles.

Outre l'action directe de ces acides, leur production favorise la croissance d'espèces fongiques acidophiles qui pourront poursuivre la dégradation du support (Singh, 1994 ; Garg *et al.*, 1995 ; Sand, 1997).

Les moisissures produisent également des pigments organiques, résultant de l'activité métabolique, à l'origine de l'apparition de tâches sur les matériaux colonisés tels que les papiers peints (Gargani, 1968 ; Ionita, 1973 ; Agrawal *et al.*, 1988 ; Bassi et Giacobini, 2003), quasiment impossibles à éliminer sur des surfaces peintes, par exemple.

I.3 IMPACT SANITAIRE

Les effets induits par la présence de moisissures dans l'habitat sont généralement répartis en quatre catégories : les infections, les maladies immuno-allergiques, les toxi-infections, et les effets irritatifs.

I.3.A L'aspergillose invasive nosocomiale

Comme toute infection, l'aspergillose invasive nosocomiale résulte de l'entrée et de la multiplication d'agents biologiques chez un hôte. Cette maladie de l'appareil respiratoire est provoquée par l'inhalation de spores de moisissures *Aspergillus*, microorganismes ubiquitaires présents couramment dans le sol et les débris végétaux en décomposition.

La survenue d'épidémies d'aspergillose invasive, dont le pronostic est très sévère avec 50 à 100% de décès, au sein d'établissements hospitaliers, généralement chez des patients immunodéprimés (malades du SIDA, personnes sous immunodépresseurs) est souvent associée à des travaux de rénovation durant lesquels la concentration d'*Aspergillus* dans l'air et sur les surfaces augmente de façon considérable (Aisner *et al.*, 1976 ; Arnow *et al.*, 1978 ; Guide de l'AP-HP, 1993).

Lors d'une enquête épidémiologique réalisée entre 1994 à 1999 sur les hôpitaux parisiens, le Réseau Aspergillose de l'AP-HP a recensé 621 cas d'aspergillose invasive nosocomiale (AIN) dont 115 certaines et 506 probables (Cornet *et al.*, 2002).

I.3.B Les maladies immuno-allergiques

Elles sont induites par des allergènes fongiques. Il s'agit de protéines de poids moléculaire compris entre 10 et 80 kilodaltons. Les principaux allergènes fongiques sont répertoriés dans le Tableau I-2.

Source d'allergène	Allergène	PM (kD) (SDS-Page)
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a (ALT-I, Ag I)	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp f I (Ag 3, PI8) β	18
	Asp f II (P 40) β	40
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cla h I (Ag 32)	13
	Cla h II (Ag 54)	19
<i>Candida albicans</i>	Component I0 (P40*)	40
	P 73*	71-73
	P 69**	69

* antigène de surface, ** antigène cytoplasmique β antigène recombinant disponible

Tableau I-2 : Principaux allergènes de moisissures caractérisés ou admis comme référence (Gumowski, 1997)

Halewyn *et al.* (2003), indiquent que 5% des enfants d'âge scolaire réagissaient positivement aux tests d'extraits de moisissures, ce taux pouvant atteindre 10% de la population voire 21 à 27% chez les personnes souffrant d'asthme.

Parmi les quatre types d'hypersensibilités définis par Gell et Coombs, en 1963, trois peuvent être provoquées par l'exposition à des spores isolées, en amas ou encore des hyphes (Yang et Johanning, 1997):

- **L'hypersensibilité de type 1**, caractérisée par une réaction survenant immédiatement après le contact avec l'allergène. Cette hypersensibilité peut être la cause de réactions pathologiques aiguës telles qu'un asthme ou une rhinite (Roitt *et al.*, 1985 ; Yang et Johanning, 1997). Le développement de cette allergie implique dans la plupart des cas une prédisposition génétique.
- **L'hypersensibilité de type 3** qui apparaît lorsque de grandes quantités de complexes immuns (formés par les anticorps à la rencontre des antigènes) sont formées, ou lorsqu'ils ne peuvent pas être éliminés. Les complexes immuns peuvent se former dans les poumons après une inhalation répétée d'allergènes d'origine fongique. Cette situation est observée dans les cas d'alvéolites allergiques extrinsèques (maladie des poumons de fermiers due à l'exposition prolongée au foin moisi). Les symptômes apparaissent 6 à 8 heures après l'exposition entraînant un certain nombre de malaises de type grippal, courbatures, fièvre, perte de poids, avec une évolution vers une fibrose du parenchyme pulmonaire. La cessation de l'exposition, si le stade fibrose n'est pas encore atteint, permet de retourner à un statut antérieur (Gravesen *et al.*, 1994).
- **L'hypersensibilité de type 4**, ou hypersensibilité retardée, se manifeste lors d'un second contact des lymphocytes T avec l'antigène. Celle-ci induit une série de réactions inflammatoires.

I.3.C Les toxi-infections

La toxicité d'une moisissure est essentiellement due à la production de métabolites secondaires appelés mycotoxines (du grec *mycos* (champignon) et du latin *toxicum* (poison)). Ces substances chimiques induisent une réponse toxique chez les vertébrés. C'est seulement depuis les années 60, quand le caractère cancérogène des aflatoxines a été démontré, que le caractère pathologique des mycotoxines a été posé, notamment par la présence de mycotoxines dans les aliments (Frayssinet, 1998 ; Bertinchamps *et al.*, 2000).

Plusieurs de ces toxines sont stables et leur toxicité peut persister longtemps y compris lorsque les éléments fongiques ne sont plus viables. Il faut toutefois préciser qu'il n'existe actuellement pas de données sur la persistance de cette toxicité (Halewyn *et al.*, 2003).

Les voies de contamination sont l'ingestion d'aliments contaminés par des champignons (Cahagnier, 1998 ; Weidenbörner, 2001), le contact cutané, et l'inhalation de particules aérosolisées, ces métabolites étant suspectés de s'adsorber sur les poussières ou d'être contenus dans la paroi des spores et des fragments mycéliens (Weidenbörner, 2001 ; Fung et Hughson, 2002). La pénétration de ces composés dans l'organisme est facilitée par leur liposolubilité.

Parmi les 3000 métabolites secondaires fongiques connus et les 432 molécules toxiques répertoriées en 1985, plus de 100 étaient expérimentalement toxiques pour les mammifères (Scott *et al.*, 1989).

On distingue deux types d'intoxication aux mycotoxines, l'intoxication aiguë, qui est la conséquence d'une ingestion massive de la toxine, et l'intoxication chronique, qui se produit à long terme soit par inhalation, soit par ingestion (Gervaise *et al.*, 1999).

Les effets nocifs induits par les mycotoxines les plus fréquemment isolées dans l'habitat sont résumés dans le Tableau I-3.

Mycète	Mycotoxines	Effet sur la santé
<i>Penicillium</i> (>150 espèces)	Patuline	Hémorragie du poumon et du cerveau
	Citrinine	Dommages rénaux, vasodilatation, constriction bronchique, augmentation du tonus musculaire
	Ochratoxine A	Néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène, neurotoxique et cancérigène (classé 2B)
	Citroviridine	Neurotoxique
	Emodine	Réduction de l'oxygène cellulaire capturé
	Gliotoxine	Maladies pulmonaires, infection des patients atteints du SIDA
	Verruculogène	Neurotoxique, tremblements chez l'animal
	Acide sécalonique D	Pneumotoxique, tératogène chez le rongeur
<i>Aspergillus</i>	Patuline	Hémorragie du poumon et du cerveau
<i>Aspergillus flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxine B1	Cancer du foie (démonstré pour l'homme), cancer respiratoire
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine	Cancérigène par ingestion (2B), cytotoxique
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxine A	Néphrotoxique, hépatotoxique
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Trichothécènes (> 170 mycotoxines) :	Suppression immunitaire et dysfonctionnement cytotoxique
	Toxine-T2	
	Nivalénol (NIV)	
	Déoxynivalénol (DON)	
	Satratoxine H	Saignement, nécrose dermique
		Mortel à haute dose ou à faibles doses chroniques, tératogène, abortif chez l'animal
<i>Fusarium</i>	Zéaralénone	Altération possible des fonctions immunitaires

Tableau I-3 : Quelques moisissures toxiques, leurs métabolites secondaires et les effets sanitaires associés toutes voies de contamination confondues (Krishnamachari, 1975 ; Yang et Johanning, 1997 ; Hurst *et al.*, 1998 ; Alvarez *et al.*, 2004 ; Blumenthal, 2004)

Parmi ces mycotoxines, les trichothécènes présentent les effets toxiques les plus aigus. Hormis le trichodermol et la trichodermine, tous les trichothécènes sont cytotoxiques (Sorenson *et al.*, 1987). La toxine T2 et la DAS sont les plus toxiques (Trenholm *et al.*, 1986).

Mais si, pour des raisons historiques et économiques, la plupart des études de toxicité ont traité à l'ingestion d'aliments contaminés, l'inhalation de ces toxines peut également être à l'origine de troubles toxiques (Charmley *et al.*, 2000 ; Fung et Hughson, 2002). Des études récentes ont ainsi montré que des doses identiques de ces mycotoxines peuvent être plus toxiques inhalées qu'ingérées et que l'introduction de ces toxines dans l'appareil respiratoire peut entraîner des allergies graves ou des symptômes non spécifiques tels que maux de tête, de gorge, alopecie, grippe, diarrhée, fièvre... (Miller, 1990 ; Davies *et al.*, 1995 ; Yang et Johanning, 1997 ; Trucksess *et al.*, 2001).

Sorenson montre que, *in vitro*, des micro concentrations de certaines mycotoxines inactivent les cellules macrophages pulmonaires alvéolaires. Ainsi, la patuline et l'acide pénicillinique inhibent la phagocytose dans les macrophages alvéolaires respectivement à 10^{-7} mol/L et 10^{-5} mol/L (Sorenson *et al.*, 1987).

Les conséquences de l'inhalation de mycotoxines sont soupçonnées d'être particulièrement graves chez certaines catégories de personnes telles les nourrissons. Ainsi *Stachybotrys chartarum*, reconnu pour causer diverses mycotoxicoses, a été associé à des cas d'hémorragie pulmonaire chez les jeunes enfants lors d'une éclosion survenue à Cleveland (Ohio) en 1993-1994 causant la mort de plusieurs patients (Montana *et al.*, 1997).

La révision des études sur cette éclosion a fait ressortir que le lien étiologique n'était pas clairement établi. Toutefois, des signalements de cas similaires continuent d'être publiés et les lignes directrices sur l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur publiées par la ville de New York (Service d'hygiène de la ville de New York, 2000) recommandent que les nourrissons souffrant d'hémorragie pulmonaire venant d'un domicile contaminé n'y retournent qu'une fois les mesures correctives apportées.

Outre les mycotoxines, les conidies contiennent une substance biologiquement active : le $\beta(1-3)$ glucane. Ce polymère de glucose contenu dans la membrane cellulaire de la majorité des moisissures peut être associés à des molécules de chitine ou de mannane. Tout comme les mycotoxines, cette molécule serait impliquée dans l'apparition du syndrome toxique ODS (Syndrome Toxique des Poussières Organiques - Organic Dust Toxicity Syndrome) (Wan *et al.*, 1998 ; ACGIH, 1999 ; Thorne et Heederick, 1999). Le $\beta(1-3)$ glucane entraîne une réduction du nombre de macrophages et inhibe la phagocytose pulmonaire (Rylander et Goto, 1991). Ces sucres complexes peuvent également, 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.

I.3.D Effets irritatifs : rôle des composés organiques volatils (COV)

Potentiellement dues à l'activité bactérienne, ces substances sont principalement liées au développement de moisissures (Korpi *et al.*, 1997 ; Pasanen *et al.*, 1997).

Les réactions à l'inhalation de ces composés sont diverses, mais certains peuvent être la cause de problèmes sanitaires dans l'habitat (Davies *et al.*, 1995). Plusieurs études imputent au COV un rôle important dans l'apparition du Syndrome des Bâtiments Malsains ou SBS (Sick Building Syndrome) bien qu'une multitude de facteurs puissent en être la cause (Wessén *et al.*, 1995, Willkins, 1995 ; Bjurman, 1999).

Le SBS se définit par l'association de symptômes non spécifiques ressentis par les occupants d'habitations dites « malsaines » tels que fatigue, irritation des muqueuses oculaires et buccales, céphalées, gêne respiratoire... (Lyles *et al.*, 1991 ; Davies, 1995 ; Godish, 1995 ; Vincent et

Pradalier, 1997). De nombreux cas de SBS ont été signalés dans les locaux équipés d'un système de ventilation et de traitement d'air (Schleibinger et Rüdén, 1999). L'organisation mondiale de la santé estime que 30 % des bureaux neufs présentent des signes de SBS, et que 10 à 30 % des occupants de ces immeubles sont affectés (Lyles *et al.*, 1991).

Les COV, typiquement des alcools et des aldéhydes à chaîne courte, sont aussi responsables « d'odeurs désagréables » et donc d'inconfort olfactif (Schleibinger *et al.*, 2002). Ström, en 1994, a ainsi référencé certaines substances responsables de ce type de gênes : géosmine, 1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-octanol, 3-octanone et 2-méthyl-isobornéol dont l'odeur de moisi ou l'odeur terreuse est caractéristique (Gravesen *et al.*, 1994).

Cependant l'impact sanitaire des COV reste relatif. Lors d'une étude sur la cytotoxicité de certains COV, Kreja et Seidel ont comparé 13 COV avec la gliotoxine (une mycotoxine). Il a été établi que le COV le plus toxique de cette étude (le 1-décanol dont la toxicité est proche de celle du méthanesulfonate de méthyl (MMS)) a une toxicité 1000 fois moins élevée que celle de la gliotoxine sur des cellules de poumon humain (Kreja et Seidel, 2002).

Lors d'une autre étude, Pasanen a comparé les concentrations de COV en présence d'une contamination fongique et dans un environnement stérile. Le développement fongique n'induisait qu'une augmentation de 1% de ces composés (Pasanen *et al.*, 1998).

Toutefois il n'existe pas actuellement d'informations validées en matière d'effets à court ou à long terme de ces composés, même en faible quantités. De plus la présence de certains COV comme l'éthanol possèdent un fort pouvoir synergique vis-à-vis d'autres substances irritantes voire toxiques (Schmidt et Etkin, 1994).

I.4 CONTAMINATION FONGIQUE DE L'AIR ET DES SURFACES

La flore fongique des environnements intérieurs décrite dans la littérature peut varier considérablement selon les pays. Parmi les nombreux facteurs responsables des disparités constatées figurent le climat, les matériaux, ou encore les techniques de collecte et les difficultés d'identification de certaines espèces. Toutefois, Samson et Hoekstra indiquent qu'il existe des similitudes entre les résultats des études menées à travers le monde et dressent une liste des espèces les plus couramment isolées dans les locaux à partir des travaux réalisés en Europe du Nord, au Canada et au Japon (Tableau I-4). Selon différentes études menées dans divers pays d'Europe (Pologne, Belgique), 70 à 90% de la flore fongique des environnements intérieurs appartient aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Alternaria* (WHO Regional Office for Europe, 2004 ; Janinska, 2000 ; Nolard, 1997).

<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Geomyces pannorum</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Mucor plumbeus</i>
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> *	<i>Penicillium</i> spp.
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phialophora</i> spp.*
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Phoma</i> spp.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
<i>Emericella nidulans</i>	<i>Scopulariopsis fusca</i>
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>
<i>Exophiala jeanselmei</i> group*	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Trichoderma viride</i> .
<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Ulocladium chartarum</i>
<i>Eurotium rubrum</i>	<i>Ulocladium botrytis</i>
<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Wallemia sebi</i>

Tableau I-4 : Moisissures les plus couramment isolées dans les environnements intérieurs.

* : microorganismes souvent détectés dans les réservoirs d'eau, les systèmes humidificateurs...
(d'après Samson et Hoekstra, 1994)

Les microorganismes présents dans les environnements intérieurs sont pour la plupart issus de l'extérieur mais peuvent également provenir d'une source endogène. Ainsi, la plupart des matériaux de construction et de décoration constituent des supports de choix pour la croissance des moisissures, dès lors que ces microorganismes disposent de conditions environnementales favorables, notamment une teneur en eau supérieure à 0,7 (Flannigan *et al.*, 1996), les nutriments nécessaires au microorganisme étant fournis par le matériau lui-même ou par son encrassement.

Matériaux colonisés		Espèces fongiques isolées
Murs et revêtements muraux	Murs	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium glabrum</i>
	Peintures	<i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i>
	Papier peint	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>A. Versicolor</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i> <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Chaetomium globosum</i>
	Bois	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	Colle	<i>Aspergillus versicolor</i>
	Caoutchouc des cadres de fenêtre	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Systèmes de traitement d'air	Filtres et conduits	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Réservoir d'eau, humidificateur	<i>Exophiala jeanselmei</i>
Produits de décoration	Textiles	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>sphaerospermum</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>glaucus</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Wallemia sebi</i> ,
	Tapis	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. glaucus</i> <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
	Cuir	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. penicillioides</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>
	Archives	<i>Aspergillus glaucus</i> <i>Chaetomium globosum</i>
	Matériaux cellulosiques	<i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
	Caoutchouc vulcanisé	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i>
	Produits céramiques	<i>Aspergillus versicolor</i>
	Papier	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Wallemia sebi</i>
	Plastiques	<i>Penicillium glabrum</i>
	Polyuréthane, tapisserie renfermant de l'arsenic	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>

Tableau I-5 : Synthèse de quelques espèces fongiques isolées à partir de divers matériaux (d'après Botton *et al.*, 1985; Samson *et al.*, 1994; Beguin et Nolard, 1994; Beguin, 1995)

Parmi les nombreuses études réalisées sur la thématique "moisissures-matériaux", les recherches menées par Beguin et Nolard entre novembre 1981 et avril 1992, dans 130 habitations belges, ont montré que sur les murs et surfaces horizontales présentant une contamination fongique visible, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum* et *Stachybotrys chartarum* sont les espèces fongiques les plus couramment rencontrées (Beguin et Nolard, 1994). Le Tableau I-5 présente la flore fongique associée à divers substrats.

Plus récemment, Hyvärinen, définit et quantifie les genres fongiques isolés au sein de 1140 échantillons de matériaux de construction récupérés *in situ*. L'auteur répartit ces matériaux dans 8 catégories : papier, produits céramiques, matériaux d'isolation d'origine minérale, peintures, colle, plastiques, bois, et panneaux de construction en gypse (Hyvärinen *et al.*, 2002). Parmi les genres observés au sein de ces produits, *Penicillium* est le plus fréquemment isolé. Papiers et isolants minéraux apparaissent favorables à la croissance de *Cladosporium* tandis que *Stachybotrys* est observé le plus souvent dans les panneaux en gypse. *Aspergillus* et *Acremonium* ne semblent, quant à eux, pas spécifiques d'un substrat et sont identifiés sur des produits en céramique, peinture, colle ou encore produits à base de bois.

Les spores se retrouvent également à l'intérieur des systèmes de ventilation. Elles peuvent alors soit circuler dans l'air, soit se déposer sur les surfaces du système de ventilation pour s'y développer. Dans ce cas la ventilation devient une source de contaminants (Tulis et Thomann, 1998). Lors de ces traitements d'air, certaines conidies peuvent être retenues dans les filtres des systèmes de climatisation. En utilisant ces filtres comme supports et nutriments, les spores se développent en mycélium susceptible d'émettre des substances toxiques dans l'environnement. Les occupants peuvent alors présenter un certain nombre de pathologies sans qu'une contamination fongique n'ait pu être observée dans les locaux (Elixmann, 1989).

II METHODOLOGIE D'EVALUATION DE LA CONTAMINATION FONGIQUE DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

II.1 EXAMEN VISUEL DES LOCAUX

L'examen visuel est la première étape dans la détermination de la présence de moisissure au sein d'un local. Il consiste à rechercher tout indice d'une contamination fongique : tâches d'humidité, signes de dégâts des eaux (papier décollé, peinture cloquée), odeur suspecte, développement fongique visible... La détermination de la superficie des surfaces visiblement contaminées par les moisissures est utilisée par certains auteurs pour établir le niveau de risque sanitaire encouru par les personnes exposées (Tableau I-6).

Surfaces contaminées	Evaluation	Risques sanitaires
< 0,3 m ²	Contamination faible	Risques faibles mais pas exclus
Entre 0,3 et 3 m ²	Contamination moyenne	Risques à évaluer en fonction des espèces présentes et du contexte environnemental
>3 m ²	Contamination élevée	Risques élevés quelles que soient les espèces présentes

Tableau I-6 : Echelle d'évaluation des surfaces contaminées par des moisissures visibles à l'œil nu, proposée par le laboratoire Microbial (Québec) (d'après Chasseur et Nolard, 2003)

De manière plus pratique cette information conditionne le type de travaux d'élimination de ces microorganismes et les personnes habilitées à réaliser les opérations de nettoyage et de réfection des locaux contaminés. Ainsi concernant cet aspect, le service d'hygiène de la ville de New York, au travers de son document présentant les lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur, distingue 5 niveaux de travaux et de confinement selon la superficie mais également la localisation de la prolifération fongique, le dernier niveau concernant ainsi la colonisation des systèmes de chauffage, ventilation et conditionnement d'air.

II.2 ECHANTILLONNAGE DES MOISSURES

II.2.A Collecte des aérosols fongiques

On désigne par aérosol, des particules solides, liquides ou les deux, en suspension dans un milieu gazeux, dont la vitesse limite de chute est négligeable (≤ 25 cm/s). Leur taille est comprise entre 10^{-3} et $100 \mu\text{m}$ (Renoux et Boulaud, 1998). Un bioaérosol implique que l'aérosol ainsi désigné est de nature biologique et possède des propriétés spécifiques : viabilité, caractère allergénique voire infectieux.

Les méthodes de prélèvement mises en œuvre sont basées sur l'inertie des particules (sédimentation, impaction) et la filtration (interception, impaction).

La méthode de collecte la plus ancienne et longtemps utilisée est basée sur la **sédimentation**. Cette technique consiste à récupérer les particules sur une surface adhésive (scotch ou boîte de Pétri contenant un milieu nutritif). Il s'agit d'un prélèvement passif, non volumétrique, qui limite la collecte aux particules sédimentables et, par définition, n'est pas adaptée à la collecte des aérosols. Aussi, l'usage de cette méthode est aujourd'hui abandonné.

Les propriétés d'inertie des particules sont souvent utilisées pour les extraire d'un flux d'air. En effet dans le cas d'un écoulement curvilinéaire, l'inertie provoque la déviation des particules des lignes de courant du fluide. Ce mécanisme est mis en œuvre, notamment dans les impacteurs au sein desquels l'air est brusquement accéléré par passage au travers d'une section réduite et brutalement dévié par une surface de collection solide (gélose ou surface adhésive) ou liquide. Les particules selon leur inertie vont, soit suivre les lignes de courant soit s'impacter sur la surface de collection pour celles possédant l'inertie la plus importante.

L'impaction dépend de plusieurs facteurs tels que la taille, la densité et la vitesse initiale des particules ainsi que des paramètres physiques du dispositif de collecte (dimension de la buse, débit du gaz porteur, distance entre la buse et la surface de collection).

L'efficacité physique de ces biocollecteurs peut être figurée par le diamètre de coupure d_{50} qui correspond au diamètre aérodynamique des particules à partir duquel toutes les particules de diamètre supérieur sont théoriquement collectées.

Ainsi pour un impacteur, le diamètre de coupure est défini par :

$$d_{50} = \sqrt{\frac{9\pi\mu D^3 Stk}{4\rho_p Q Cu}}$$

où

μ : viscosité dynamique du gaz porteur (kg/m.s)

D : diamètre des orifices du crible de l'impacteur (m)

Q : débit volumique à travers l'orifice (m^3/s)

Stk : le nombre de Stokes

Cu : le coefficient de Cunningham

ρ_p : masse volumique de la particule (kg/m^3)

En pratique, des particules de diamètre inférieur à d_{50} sont également recueillies (Figure I-4).

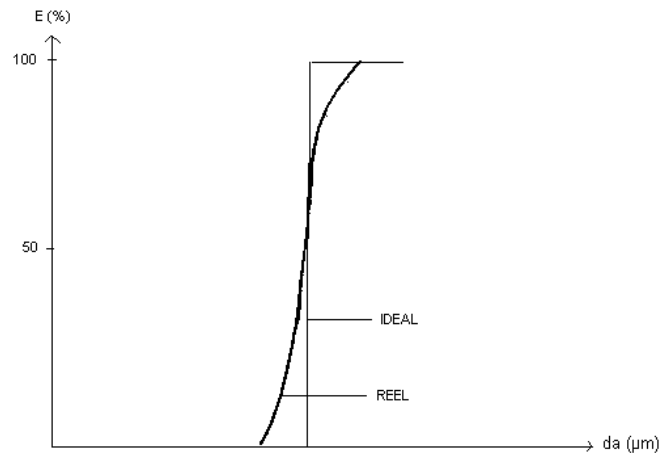


Figure I-4: Courbes d'efficacité de collection

L'impaction sur gélose permet d'estimer la concentration de microorganismes cultivables aérosolisés (UFC/m³ d'air prélevé). L'air est aspiré et accéléré par passage au travers de trous (impacteurs à crible type Andersen). Les particules entraînées par le flux d'air peuvent, suivant leur inertie, dévier des lignes de courant et venir s'impacter sur une surface placée sous la plaque perforée. L'avantage majeur de cette technique est sa simplicité d'utilisation. En revanche, le stress potentiel occasionné lors du prélèvement (vitesse d'impaction, dessèchement de la gélose) peut altérer la viabilité des microorganismes et conduire à une sous-estimation de leurs concentrations.

L'impaction sur support adhésif consiste à collecter au travers d'une fente (« Spores trap ») les particules aéroportées sur une surface adhésive placée sur un tambour rotatif. La vitesse du tambour conditionne la durée du prélèvement ainsi que le nombre de particules collectées.

L'identification des microorganismes se fait par observation microscopique directe des surfaces de collecte.

Lors de **l'impaction en milieu liquide**, l'air, aspiré au travers d'un tube capillaire est projeté à la surface d'un milieu liquide. Cette technique présente l'avantage du choix du milieu de récupération (eau, tampons, bouillon de culture), de la mise en œuvre de différentes méthodes d'analyses (culture, microscopie, tests biochimiques et immunologiques) et de pouvoir travailler en ambiances fortement contaminées. L'inconvénient est l'évaporation du milieu liquide, et le réentraînement des fines particules lors du prélèvement, ceci étant particulièrement vrai pour les spores de moisissures généralement hydrophobes qui restent à la surface du milieu de collecte.

La **filtration** est largement utilisée pour mesurer les aérosols. La collecte des particules repose sur l'action simultanée de plusieurs mécanismes : impaction inertielle, interception, diffusion, dont l'importance relative dépend de la dimension des particules et de la vitesse de l'écoulement. Ainsi, dans le cas d'une particule de 5 μm, les deux phénomènes intervenant sont l'interception et l'impaction.

L'air est aspiré au travers d'un média filtrant qui assure la séparation des aérosols du fluide vecteur. Le choix du média filtrant (porosité, matériau) dépend de la nature des particules échantillonnées (formes, taille) et des analyses ultérieures. Généralement, pour l'échantillonnage des bioaérosols, le support filtrant consiste en une membrane de polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 0,2 ou 0,45 μm.

En 2002, Willeke développe un **précipitateur électrostatique** adapté à la collecte des microorganismes aéroportés. La collecte des particules repose alors sur leurs charges électriques, qu'elles soient produites naturellement ou artificiellement. Dans un précipitateur électrostatique conventionnel, l'aérosol, une fois chargé grâce à un ioniseur d'air, est soumis à un champ électrostatique. Les particules, par passage au travers d'un champ électrostatique, vont, selon leur charge, suivre ou quitter le flux d'air porteur et venir s'impacter sur une surface de collection.

Nous avons répertorié, dans le Tableau I-7 les techniques de prélèvement les plus couramment utilisées dans le cadre de la collecte des aérosols fongiques.

II.2.B Prélèvements de surfaces

Adhésif

Un ruban adhésif est appliqué sur les surfaces planes suspectes. Les spores ainsi collectées peuvent être soit transférées sur un milieu de culture, soit être dénombrées et identifiées directement au microscope. Dans le cas d'une lecture directe au microscope, seules les spores de morphologie caractéristique peuvent être identifiées sans équivoque (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*...), alors que la grande masse des spores de faibles diamètres et présentant des ornements sombres ne peuvent être différenciées (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*) (Chasseur et Nolard, 2003).

Boîtes et lames « contact »

Le milieu nutritif est contenu dans une boîte de Pétri particulière qui permet de couler le milieu sous forme d'une surface en léger ménisque, afin que celle-ci puisse être en contact avec la surface à prélever. Après échantillonnage, la surface de gélose est protégée par un couvercle qui ne vient pas en contact avec la gélose. Le prélèvement est standardisable en durée et en terme de pression appliquée. Les valeurs communément utilisées sont une pression de 25g sur une surface de gélose de 20 cm², pendant 10 secondes. Seules les surfaces horizontales peuvent être ainsi prélevées. Certaines lames gélosées peuvent être utilisées avec une standardisation moins importante (Chasseur et Nolard, 2003).

Écouvillonnage

Cette technique consiste à collecter les microorganismes par frottement de la surface à étudier par un écouvillon généralement humide. Les microorganismes ainsi collectés sont déposés sur un milieu de culture adapté. Ce système peu coûteux permet de réaliser des échantillonnages dans toutes les circonstances et aboutit après culture au minimum à un résultat semi-quantitatif.

Echantillonneur	Principe	Exemple de dispositif	Capacité d'échantillonnage	Analyses possibles
Impacteurs à crible ou à fente	Impaction sur : - milieux de culture - surface adhésive, - lame de verre	- Burkard, - Rotorod, - Andersen (de 1 à 6 étages), - SAS, - Casella, - May, - Sierra Marple, - Hirst spore trap	Débit d'air : 2 – 180 L/min Durée d'échantillonnage : de quelques minutes à plusieurs heures, voire plus d'une semaine (Spore trap).	Mise en culture Analyses microscopiques
Echantillonneurs centrifuges	Centrifugation des particules conduisant à leur impaction sur une surface de collection ou directement sur les parois de l'appareil	- Reuter Centrifugal Sampler - Cyclone Aerojet	Débit d'air : 40 – 1000 L/min Durée d'échantillonnage : de quelques minutes à plusieurs heures	Mise en culture Analyses microscopiques Analyses biochimiques Tests immunologiques
Impinger	Combinaison de l'impaction sur une surface et de la dispersion qui s'ensuit dans un milieu liquide	- Echantillonneur Shipe (l'air entre dans la chambre avec un certain angle) - AGI-30 - Micro et mini-impingers - Impingers à multi-étages	Débit d'air : 0.1 – 55 L/min Durée d'échantillonnage : de quelques minutes à plusieurs heures	Mise en culture Analyses microscopiques Analyses biochimiques Tests immunologiques
Echantillonneur à filtre	Diffusion, interception, et impaction inertielle	Filtres de gélatine, PTFE, PVC, ester de cellulose, ou polycarbonate	Débit d'air : 1-1000 L/min. Durée d'échantillonnage : plusieurs heures	Mise en culture Analyses microscopiques Analyses biochimiques Tests immunologiques

Tableau I-7 : Echantillonneurs d'aérosols fongiques (Crook, 1995 ; Pasanen, 2000 ; NF EN 13098, 2000)

II.3 ANALYSES

II.3.A Méthode culturale

Cette technique permet de quantifier la fraction cultivable des microorganismes collectés. Si les mesures de micro-organismes viables sont pratiquées depuis plusieurs décennies, les consensus sont récents en Europe (CEN, 2000) comme aux Etats Unis (Jensen et Schaefer, 1998) et des travaux se poursuivent pour optimiser la reproductibilité et la représentativité des résultats. Ces méthodes restent indispensables malgré leur lourdeur et leurs insuffisances, car elles sont pour l'instant les seules qui permettent une identification des micro-organismes.

Cependant, il est clairement établi que la fraction cultivable des micro-organismes de l'air ne représente qu'une partie de leur pathogénicité, et une faible partie de leur nombre (0,1 à 10% selon les auteurs) (Eduard, 1997 ; Russell *et al.*, 1999).

Il existe plusieurs milieux de culture pour une même famille de champignons. Certains genres ont des besoins nutritifs spécifiques (cellulotiques, osmophiles) ou des conditions d'incubations spécifiques (thermophiles, psychrophiles).

Les milieux les plus utilisés sont :

- Milieu à l'extrait de malt (Malt Extract Agar ou MEA), considéré comme le plus adapté aux moisissures de l'environnement (Wu *et al.*, 2000 ; CEN, 2000 ; Jensen et Schaefer, 1998 ; Trudeau et Fernandez-Caldas, 1994). Il a pour inconvénient de faciliter l'envahissement par des souches à croissance rapide (*Rhizopus*, *Mucor*), risquant de masquer les autres colonies et de sous évaluer le nombre de colonies réel (Chang *et al.*, 1995).
- Le milieu Rose Bengale inhibe la croissance de ces espèces à croissance rapide et les colonies restent plus petites donc plus facilement dénombrables. Cependant il se décompose à la lumière et peut devenir toxique pour certaines espèces fongiques. De plus la pigmentation des colonies complique l'identification.
- Milieu DG18 (dichloran glycerol 18) : ce milieu adapté à tous les champignons, est de plus en plus utilisé et donnerait des résultats comparables ou supérieurs au MEA (inhibition partielle des espèces à croissance rapide et dénombrement et identification plus faciles) (Russell *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 2000).
- Milieu Sabouraud : classiquement utilisé pour la recherche de champignons en clinique, ce milieu reste utilisé dans certaines études environnementales.

Des antibiotiques (chloramphénicol et / ou gentamycine) destinés à inhiber la croissance bactérienne sont ajoutés à tous ces milieux.

Les températures d'incubation très variables selon les équipes par le passé, sont maintenant plus homogènes, entre 25 et 30°C pour les flores fongique globales (CEN, 2000 ; Jensen et Schaefer, 1998), 35-42°C pour le genre *Aspergillus*.

La durée d'incubation est comprise entre 7 et 14 jours avec une lecture à 3 jours puis une surveillance régulière de la croissance pour éviter l'envahissement des boîtes par certaines espèces.

Le dénombrement et l'identification des champignons repose sur un examen macroscopique et microscopique des colonies par des mycologues entraînés. L'examen macroscopique des colonies et l'observation microscopique de la morphologie des spores et du mycélium permettent d'identifier les moisissures collectées. Si l'identification du genre ne pose en général pas de problème à un mycologue, l'identification de l'espèce pose des problèmes délicats. Ainsi, certaines espèces aussi communes que les *Penicillium* restent d'identification

difficile et nécessite une batterie de milieux et une grande expertise. Le recours au séquençage de l'ADN, lorsque la séquence a déjà été décrite, peut s'avérer une aide précieuse.

II.3.B L'observation microscopique

Microscopie photonique

Des filtres ou lames peuvent être observés au microscope photonique. Cette méthode couplée éventuellement à un système d'analyse d'images permet, en principe, de dénombrer les spores totales (viables et non viables). Toutefois, une mauvaise répartition des spores sur le filtre peut induire des erreurs de comptage et nécessite l'observation de nombreux champs. Le pouvoir de différenciation de cette technique est faible, les spores d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ne peuvent par exemple pas être distinguées.

Microscopie à épifluorescence

Le principe de ce dispositif repose sur l'excitation par une source de rayons ultraviolets d'un composé (diacétate de fluorescéine ou acridine orange par exemple) fixé aux microorganismes qui, dans ces conditions, deviennent fluorescents et donc observables. En pratique, les particules collectées sur des filtres sont mises en suspension, colorées puis re-filtrées. Les filtres ainsi obtenus sont observés au microscope à fluorescence qui permet de distinguer, grâce à ce marquage, les micro-organismes des autres particules, et ainsi de dénombrer les micro-organismes totaux (viables et non viables).

Cette méthode présente l'avantage d'un dénombrement rapide (pas de délai d'incubation nécessaire). En revanche, elle ne permet pas l'identification des espèces recueillies (Palmgren *et al.*, 1986 ; Hysek *et al.*, 1991). Par ailleurs, certaines spores fongiques résistent au marquage (Eduard et Heederick, 1998). Des erreurs de comptage dues à des amas importants de micro-organismes ont également été décrites (Heldal *et al.*, 1996).

La microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy ou SEM)

La microscopie électronique à balayage utilise un faisceau d'électrons et permet un grossissement allant de 50 à 300 000, ce qui permet de distinguer des structures inférieures à 0,2 µm. Les images apparaissent en 3 dimensions et permettent de visualiser les micro-organismes et leur structure. Cette méthode est utilisée pour l'étude des spores fongiques et d'actinomycètes (Eduard, 1993 ; Eduard et Heederick, 1998) prélevés par filtration.

L'identification de certaines espèces est possible par la visualisation de détails morphologiques, mais des spores d'espèces différentes peuvent avoir le même aspect (Eduard et Heederick, 1998). Une identification de toutes les espèces présentes nécessite donc l'association d'une méthode par culture.

Pour l'instant cette technique reste peu utilisée car malgré sa fiabilité, elle nécessite un équipement coûteux et un personnel très spécialisé pour interpréter les images (Salmi, 2000).

II.3.C Mesure des éléments constitutifs

II.3.C.1 L'Ergostérol

Les moisissures contiennent dans leur membrane cellulaire un ester d'ergostérol dont l'alcool associé est commun à la majorité des Champignons microscopiques. Il s'agit d'un stérol cristallin de formule $C_{28}H_{43}OH$ (Figure I-5), transformé en vitamine D2 sous l'effet des rayonnements ultraviolets (Windaus) et dont le point de fusion est 163°C.

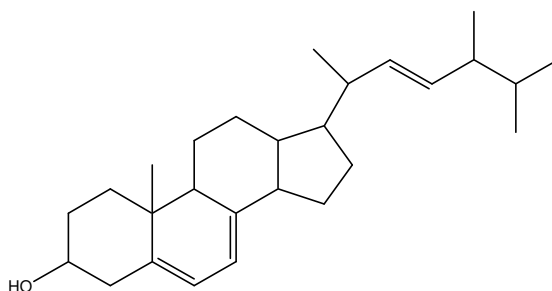


Figure I-5: Formule développée de l'ergostérol

Le dosage de l'ergostérol est couramment utilisé pour déterminer la contamination de substrats solides : céréales (Seitz *et al.*, 1979), sols (Grant et West, 1986), matériaux de construction (Pasanen *et al.*, 1999), poussières de maisons (Axelsson *et al.*, 1995), ce dosage commence également à être utilisé pour estimer la concentration fongique aéroportée des environnements intérieurs (Miller et Young, 1997).

Cette technique de dosage est plus sensible que celle consistant à mesurer la quantité de laccase extracellulaire (enzyme) ou de chitine (composant de la paroi cellulaire) (Matcham *et al.*, 1985).

Le dosage de l'ergostérol nécessite, au préalable l'extraction de l'ester d'ergostérol contenu dans la membrane cellulaire fongique et de la molécule d'ergostérol associée à l'ester.

Les techniques de dosage de l'ergostérol s'appuient sur une caractéristique de ce composé qui est son absorbance UV à 282 nm (Figure I-6).

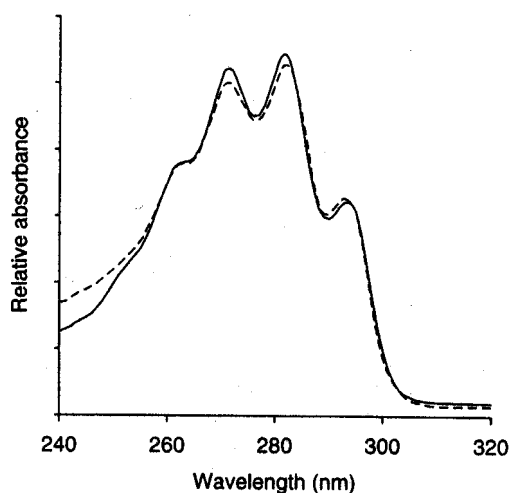


Figure I-6 : Spectre de l'ergostérol dans du méthanol.

- - - : ergostérol commercial (pureté>98%) ; — : extrait de moisissures colonisant l'humus d'un ruisseau (Gessner et Newell, 1999).

La littérature fait état de différentes techniques analytiques, plus ou moins adaptées, pour doser l'ergostérol :

- La chromatographie en phase liquide (HPLC) qui est la technique la plus couramment utilisée (Seitz *et al.*, 1979 ; Zill *et al.*, 1988 ; Gessner et Newell, 1996)
- La chromatographie en phase gazeuse (GC) associée à la spectrométrie de masse (Axelsson *et al.*, 1995)
- La spectrométrie UV (Zill *et al.*, 1988) qui se révèle difficilement exploitable dans le cas de la contamination de céréales, compte tenu du spectre d'absorbance UV des autres substances présentes (Matcham *et al.*, 1985).

Concernant les concentrations d'ergostérol mesurées au travers de quelques études menées sur ce sujet, en 1986, Grant indique des valeurs comprises entre 4 et 7 ng d'ergostérol/ μ g de mycélium dans son étude portant sur la mesure de l'ergostérol dans les sols. En 1995, Axelsson a déterminé qu'*Aspergillus fumigatus* en contenait 14,3 μ g/mg. Pour les autres espèces, la quantité d'ergostérol est comprise entre 2,5 et 8,8 μ g/mg. Des mesures réalisées dans une maison fortement contaminée avaient des valeurs allant de 6 à 45 μ g d'ergostérol/g de poussière et de 0 à 0,3 ng /L d'air.

Les résultats obtenus par Pasanen, en 1999, sur *Aspergillus versicolor* permettent d'établir, pour cette espèce, une relation entre le nombre de spores et la quantité d'ergostérol. Ainsi, l'auteur a déterminé qu'une spore d'*A. versicolor* contenait $1,3 \pm 0,2$ pg d'ergostérol/spore.

Lors d'une autre étude Miller et Young (1997) ont également établi les concentrations d'ergostérol par spore en fonction de différentes espèces fongiques (Tableau I-8).

Espèce fongique étudiée	Concentration d'ergostérol (pg/spore)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	$3,11 \pm 13,5$
<i>Aspergillus niger</i>	$1,71 \pm 19,9$
<i>A. sydowii</i>	$1,71 \pm 15,9$
<i>A. ustus</i>	$1,88 \pm 14,5$
<i>A. versicolor</i>	$2,54 \pm 7,5$
<i>Eurotium herbariorum</i>	$2,17 \pm 13,6$
<i>Penicillium brevicompactum</i>	$2,55 \pm 4,7$
<i>P. chrysogenum</i>	$5,11 \pm 26,6$
<i>P. commune</i>	$3,34 \pm 14,2$
<i>P. olsonii</i>	$2,12 \pm 6,4$
<i>P. viridicatum</i>	$2,21 \pm 8,4$

Tableau I-8 : Concentration d'ergostérol par spore pour différentes espèces fongiques (Miller et Young, 1997).

La quantité d'ergostérol par spore ou par masse sèche de mycélium peut varier jusqu'à 25% d'une espèce à l'autre (Miller et Young, 1997 ; Pasanen *et al.*, 1999).

En 1979, Seitz a déterminé l'influence de la durée d'incubation sur la concentration d'ergostérol pour une souche d'*Aspergillus* mettant en évidence l'influence de l'âge de la culture sur la production de ce composé (Tableau I-9).

Durée d'incubation (jours)	Masse de champignons (mg)	Concentration d'ergostérol (mg/g d'air sec)
2,1	65	2,3
7	110	3,3

Tableau I-9 : Impact de l'âge de la culture sur la concentration d'ergostérol

II.3.C.2 Chitine

Poly- β -1,4-N-acétyl glucosamine, la chitine (Figure I-10) est présente dans la paroi des micromycètes et est absente du matériel végétal.

Le principe du dosage de cette molécule, mis au point par Donald et Mirocha, en 1977 pour évaluer l'importance de la contamination fongique des grains, repose sur l'hydrolyse de la chitine en glucosamine, dosée par colorimétrie ou chromatographie.

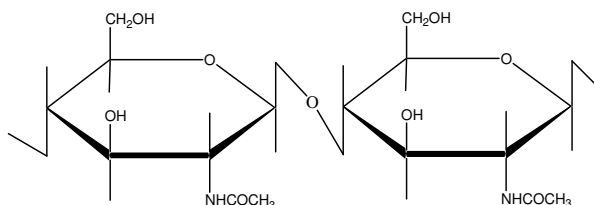


Figure I-7 : formule développée de la chitine

Les résultats obtenus en 5-6 heures rendent compte de la chitine du mycélium vivant ou mort, mais peuvent être biaisés dans la mesure où les moisissures ont des teneurs en chitine variable (de 1 à 25% du poids sec du mycélium) selon les espèces, l'âge du mycélium et la nature du substrat. La présence de certaines substances du substrat, tels que des hexosamines, peut également fausser le résultat (Matcham *et al.*, 1985).

II.3.C.3 β -glucanes

Les β -glucanes sont des constituants spécifiques de spores fongiques, présents dans la plupart des espèces fongiques. Leur dosage est fait par test LAL (Limulus Amebocyte Lysate) modifié ou test immunochimique (Enzyme immunoassay : EIA) (Pasanen, 2001).

Leur dosage est d'autant plus informatif que ces constituants ont probablement un rôle direct dans la réponse inflammatoire des personnes exposées, indépendamment d'une réaction immunologique (Rylander, 1997 ; Dillon *et al.*, 1999 ; Douwes *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2000 ; Walinder *et al.*, 2001). D'autre part, la méthode ne dépend pas de la viabilité des cellules.

La méthode par LAL est assez simple (commercialisée) et sensible, mais peu spécifique. La méthode par EIA est plus reproductible et plus spécifique mais n'est pas assez sensible pour les recherches dans l'air (Douwes *et al.*, 1996).

Ce dosage présente deux principaux inconvénients : il ne donne pas d'information sur les espèces et il n'y a pas de données de référence permettant l'interprétation.

II.3.C.4 Polysaccharides extracellulaires (EPS)

Les EPS sont des polymères hydrocarbonés excrétés par la plupart des moisissures. Ils sont considérés uniquement comme marqueurs d'exposition, sans effets propres sur la santé (Chew *et al.*, 2001).

Les EPS peuvent être utilisés pour caractériser plusieurs genres tel que *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Ils sont détectés par des méthodes immunochimiques (ELISA) (Parat, 2002). Cette méthode est rapide et peu spécifique à une espèce, cependant il existe des réactions croisées entre les genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui rendent difficile l'interprétation des résultats (Edouard et Heederick, 1998).

II.3.C.5 Détection par réaction Antigènes-allergènes

Les antigènes sont des molécules qui peuvent induire une réponse immunologique (production d'immunoglobines sériques) chez les mammifères. Les allergènes sont des antigènes qui peuvent causer une réaction allergique, en se liant à un anticorps spécifique.

Les méthodes immuno-chimiques utilisent cette propriété en détectant les antigènes au moyen de leurs anticorps associés. Un marquage préalable des anticorps (isotopique, enzymatique, fluorescent ou luminescent) permet de détecter et quantifier la présence de complexes antigène-anticorps.

La technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), qui combine un marquage enzymatique et l'utilisation de substrat chromogéniques, ne permet de rechercher qu'une seule espèce à la fois (Parat, 2002) et possède une sensibilité faible (Pasanen, 2001).

III COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS

Bouscaren (1998) définit les composés organiques volatils (COV) comme *des substances dont la tension de vapeur à la température ambiante est suffisamment élevée pour estimer justifiée l'affirmation selon laquelle ces composés sont presque totalement à l'état de vapeur. La définition de la tension de vapeur seuil à partir de laquelle un composé organique est considéré être volatil est purement arbitraire.*

Depuis le milieu des années 90, le nom de COVm (Composés Organiques Volatils d'origine microbienne) est donné aux composés organiques volatils issus d'une activité microbienne (fongique et bactérienne) (Pasanen *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1997 ; Kiviranta *et al.*, 1998).

III.1 ECHANTILLONNAGE ET ANALYSE DES COV D'ORIGINE FONGIQUE : APPLICATION AUX ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

La plupart des études appliquées à l'habitat consistent à mesurer en laboratoire l'émission à partir de matériaux de construction contaminés par une moisissure. Quelques auteurs ont cependant réalisé des études *in situ* dans des habitats contaminés : Wessén *et al.*, 1995 ; Fedoruk *et al.*, 2001 ; Keller *et al.*, 2001.

Dans tous les cas les techniques employées pour l'étude des COV engendrés par une croissance fongique sont identiques à celles mise en œuvre pour mesurer les COV en général.

Le plus souvent les échantillons d'air sont réalisés suite à un prélèvement actif. Ce type de prélèvement consiste à faire passer un débit d'air contrôlé, à l'aide d'une pompe, sur une phase solide (l'adsorbant) ou liquide (l'absorbant). En fonction de leur affinité avec cette phase, une partie des COV est plus ou moins retenue.

En 2002, Wady a échantillonné des COV issus d'un développement fongique sur des matériaux de construction en utilisant un prélèvement passif. Le protocole opératoire de ce type de prélèvement consiste à déposer une fibre SPME (Solid Phase Microextraction) dans le lieu de prélèvement (chambre d'essai dans ce cas). Les molécules sont alors adsorbées et le gradient de diffusion créé permet l'adsorption d'autres molécules.

Dans le cas de prélèvements actifs, le choix d'un absorbant ou d'un adsorbant est déterminé en fonction la nature des COV à mesurer : l'absorption sera parfois préférée pour l'étude des aldéhydes, et l'adsorption pour le reste des COV.

Dans le cas d'aldéhydes, certains auteurs utilisent une phase liquide pour absorber ces molécules. Il s'agit d'une solution de 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Pasanen *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1996, 1998 ; Schleibinger et Rüdén, 1997). Les aldéhydes sont ensuite élués avec de l'acétonitrile puis analysés en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Cette technique a l'avantage de permettre la détection de tous les aldéhydes. En revanche, elle reste spécifique à ce groupe de molécules.

Les autres COV sont piégés sur une phase solide. Les adsorbants utilisés sont le TENAX TA (Pasanen *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1996, 1998 ; Wilkins *et al.*, 2000 ; Keller *et al.*, 2001), le TENAX GR (Fischer, 1999), l'Anasorb 747 (Wessén *et al.*, 1995 ; Fedoruk *et al.*, 2001), le charbon actif (Ezeonu *et al.*, 1994) et le Chromosorb 102 (Börjesson *et al.*, 1990).

Les COV piégés sur adsorbant solide sont désorbés thermiquement. La séparation se fait par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse (MS) pour l'identification.

Notons que l'analyse des COV par GC/MS permet également l'analyse d'un grand nombre d'aldéhydes. Seuls ceux à petites chaînes carbonées ne sont pas séparés par GC.

III.2 BIOSYNTHESE DES COV D'ORIGINE FONGIQUE

D'après Wessén *et al.* (1995), l'émission de COV d'origine fongique intervient dès le début du développement de la moisissure. Ces molécules sont issues soit du métabolisme fongique, soit de la dégradation des supports de croissance par action mécanique ou chimique (enzymes, acides organiques)

En 1997, Korpi compare l'évolution du CO₂ et l'émission de COV dans des chambres d'essais contenant des matériaux contaminés par des moisissures. Par cette étude, Korpi confirme que la croissance fongique (associé à une augmentation de CO₂) s'accompagne de l'émission de plusieurs COV dont les principaux sont : le 2-pentanone, le 2-hexanone, le 2-heptanone, le limonène, le 2-méthylfurane, le formaldéhyde, l'acroléine, le nonanal, le 3-octanone, le 2-éthyl-1-hexanol, le 1-octen-3-ol, le 3-méthyl-1-butanol, le 3-méthyl-2-butanol, le camphène et l' α -pinène.

Wilkins, en 2002, différencie les COV issus d'une croissance fongique en fonction de leurs origines synthétiques. D'après cet auteur, les COV issus de la biosynthèse des microorganismes sont des molécules comportant de 2 à 20 atomes de carbones.

Ainsi, l'auteur indique que les groupes fonctionnels incluant des molécules de C₂ à C₄ sont synthétisés lors de processus fondamentaux tels que la glycolyse ou le cycle de Krebs. Tous les micro-organismes sont susceptibles de produire ce type de molécules, à des quantités dépendantes des conditions de croissance.

D'autres groupes, constitués de molécules complexes à 8 carbones ou plus, seraient plus spécifique d'une contamination fongique. Ces groupes incluent le 3-octanol, le 3-octanone, et le 1-octen-3-ol, résultent de la dégradation des acides gras.

Les composés les plus fréquemment rencontrés lors d'études sur des matériaux de construction contaminés par des moisissures sont le 2-méthylpropan-1-ol, le 2-méthyl-1-butanol, le 3-méthyl-1-butanol, l'octan-3-ol, le 1-octen-3-ol, le butan-2-one, l'hexan-2-one, le 2-heptanone, le 3-octanone, le 2-méthylsiobornéol, la géosmine, le limonène, , le 2,5-diméthylfurane, le 3-méthylfurane, le diméthyldisulfide, ainsi que plusieurs sesquiterpènes généralement pas identifiés avec certitude.

Pasanen, en 1996, démontre que la production de certains COV concorderait avec la formation d'autres métabolites secondaires (mycotoxines). A partir de plusieurs études portant sur la production de COV, Pasanen décrit la biosynthèse des principaux composés rencontrés (Figure I-8) :

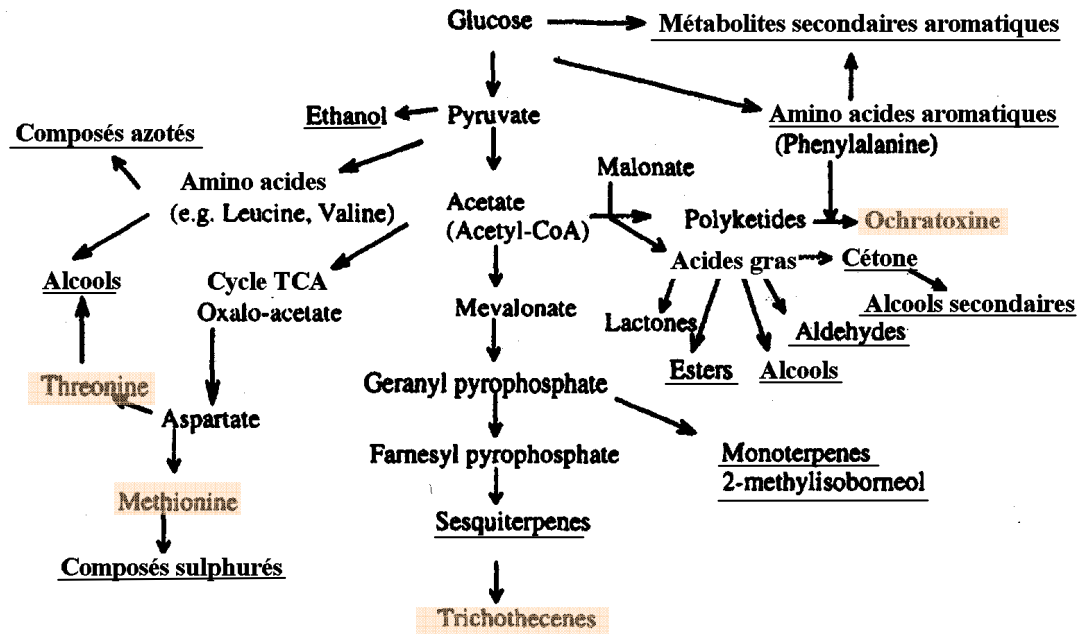


Figure I-8 : Chemin métabolique de la biosynthèse des principaux COV et mycotoxines associées (ce schéma a été codé de la façon suivante : les COV sont soulignés, les mycotoxines produites sont surlignées en orange) (d'après Pasanen *et al.*, 1996)

La production de COV et de certaines mycotoxines emprunte donc les mêmes chemins métaboliques. Par exemple, Pasanen montre que l'émission de sesquiterpènes volatils est associée à la production de trichothécènes (Pasanen *et al.*, 1996).

III.3 NATURE DES COV EMIS A PARTIR DE MATERIAUX DE CONSTRUCTION CONTAMINES

Depuis ces dix dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées à l'impact sanitaire potentiel lié à l'inhalation des composés volatils émis lors d'une croissance fongique. Dans ce contexte, des études menées pour identifier ces molécules ont consisté à analyser les COV émis par différentes espèces fongiques, isolées dans l'habitat et se développant sur divers matériaux de construction. Les composés émis à la suite de ce développement sont analysés en laboratoire (Ezeonu *et al.*, 1994 ; Wessén *et al.*, 1995 ; Pasanen *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1998 ; Wilkins *et al.*, 2000 ; Schleibinger *et al.*, 2002 ; Wady *et al.*, 2002) Les matériaux et les espèces utilisés par ces études sont référencés dans le Tableau I-10.

Référence	Support de croissance	Moisissures étudiées
Ezeonu <i>et al.</i> , 1994	Fibre de verre	<i>Acremonium obclavatum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>
Wessèn <i>et al.</i> , 1995	Fibre de verre et aggloméré	<i>Penicillium corymbifera</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aureobasidium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
Pasanen <i>et al.</i> , 1996	Bois et Papier peint	<i>Penicillium verrucosum</i> et <i>Fusarium sporotrichioides</i>
Korpi <i>et al.</i> , 1997	Poussières ménagères	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Monascus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i>
Korpi <i>et al.</i> , 1998	Panneau de plâtre, aggloméré, fibre de verre et céramique	<i>Acremonium furcatum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Eurotium herbariorum</i> , <i>Exophila dermatitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i> , <i>Sporotrichioides noseus</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
Wilkins, 1998	Panneau de plâtre, carton	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> ,
Wady, 2002	Panneau de plâtre, laine minérale, masonite	<i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Chaetomium globosum</i>
Schleibinger <i>et al.</i> , 2002	Panneau de plâtre avec fongicide, 2 sortes de bois, aggloméré avec papier peint, aggloméré avec papier peint et colle	<i>Aspergillus versicolor</i>

Tableau I-10 : Principales études traitant de l'émission des COV fongiques et appliquées à l'habitat

Les composés les plus fréquemment identifiés lors de ces études sont répertoriés dans le Tableau I-11 :

Famille chimique	Composés
Alcools	1-octen-3-ol, 2-méthyl-1-butanol, 3-méthyl-1-butanol, 2-méthyl-1-propanol, 1-pentanol, 2-heptanol, 2-nonanol, 1-hexanol, 2-éthyl-1-hexanol, 3-octanol
Cétones	2-pentanone, 2-haxanone, 2-heptanone, 3-octanone
Aldéhydes	Formaldéhyde, acétaldéhyde, acétone
Acides	Acide acétique
Terpènes	limonène, α -pinène, camphre, camphène, géosmine, germacrène
Composés divers	2-méthylfurane, diméthyldisulfide

Tableau I-11 : COV fréquemment détectés lors d'une croissance fongique sur matériaux de construction.

III.3.A.1 Impact du substrat et de l'espèce fongique

Schleibinger, en 2002, étudie l'émission de COV par *Aspergillus versicolor* sur différents matériaux de construction en laboratoire. Cette étude met en évidence que l'émission de certains COV dépend du support de croissance (Tableau I-12).

Matériaux COV	Bois (épicéa)	Bois (pin)	Aggloméré + papier peint + colle	Aggloméré + papier peint + colle spéciale à usage intensif
3-méthylfurane	++		+	+
2-méthylfurane			+	
2-pentanol	++	++	+	
3-méthylbutan-2-ol			+	+
3-méthylbutan-1-ol			+	
Pyrazine	++	+	+	
2-méthylbutan-1-ol	++	+	+	
2-butanonoxim	+			
1-octen-3-ol			++	
3-octanone			+	
3-octen-2-ol	++			
3-octanol				
2-octanol	++			
2-n-pentylfuran			++	
2-éthyl-1-hexanol	++	++	++++	++
Cis-3-octen-1-ol	++			

+ : 1-10 ng/Semaine ; ++ : 10-100 ng/Semaine ; +++ : 100-1000 ng/Semaine

Tableau I-12: Emission de COV_m par *Aspergillus versicolor* sur différent substrats utilisés fréquemment dans l'habitat (Schleibinger *et al.*, 2002)

Lors de cette étude, seul le 2-éthylhexanol a été détecté sur l'ensemble des matériaux.

En 2000, Wilkins réalise une étude en contaminant différents matériaux de construction avec trois espèces fongiques (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* et *Stachybotrys chartarum*). Cette étude met en évidence que l'émission de certains COV dépend de l'espèce fongique. Ainsi, le 1-butanol, le méthyl 2-méthylpropionate, l'anisole et le o-méthylanisole n'ont été détectés qu'en présence de *Stachybotrys chartarum*. Dans ces conditions d'essais, *Penicillium chrysogenum* était l'espèce la plus émissive et *Aspergillus versicolor* celle émettant le moins de COV.

III.4 OCCURRENCE DES COV D'ORIGINE FONGIQUE DANS L'HABITAT

En 1994, Ström a mesuré les concentrations de 15 COV, supposés par l'auteur spécifiques d'une contamination fongique ou bactérienne, à partir de prélèvements atmosphériques réalisés dans deux habitations contaminées. Les concentrations relevées variaient de 2 à 15600 ng/m³ selon les composés (Tableau I-13) :

Composés	Habitation A (ng/m ³)	Habitation B (ng/m ³)
3-méthyl furane	24	7
2-méthyl-1-propanol	1740	-
1-butanol	1557	2480
3-méthanol-1-butanol	377	175
3-méthanol-2-butanol	1187	190
2-pentanol	1331	12
2-hexanone	4160	498
2-heptanone	320	243
3-octanone	92	3020
3-octanol	7460	8860
1-octen-3-ol	3380	10020
2-octen-1-ol	1560	15600
2-méthyl-isoborneol	2800	410
Géosmine	6	551
2-isopropyl-3-méthoxy-pyrazine	600	9500

Tableau I-13 : Mesure de la concentration de COV dans deux maisons présentant des signes de contamination fongique (Ström *et al.*, 1994).
Les concentrations sont exprimées en ng/m³

Dans cette étude, la concentration de la majorité des COV retenus était de l'ordre du µg/m³. En comparant la somme des concentrations émises dans ces deux habitations avec une habitation ne comportant pas de signe visible de contamination, l'auteur montre également que la croissance fongique s'accompagne d'une augmentation sensible de la concentration globale de COV (26,5 et 51,6 µg/m³ pour les habitations « moisies » contre 7,9 µg/m³ dans l'habitation « saine »).

Lors d'un prélèvement *in situ* dans une maison contaminée réalisé par Wessén en 1995, l'auteur mesure des concentrations de COV comprises entre 0,1 et 17,4 µg/m³ en fonction du composé (généralement 1,0 µg/m³).

D'autres concentrations ont également été mesurées lors de prélèvements *in situ* menés par Fedoruk en 2001 (de 2 à 31,7 µg/m³) et par Keller en 2001 (de 0,1 à 740 µg/m³)

III.5 UTILISATION DES COV COMME TRACEURS

Dans leur discussion, plusieurs auteurs ont suggéré d'utiliser ces composés en tant qu'indicateurs d'une croissance fongique dans des bâtiments qui présenteraient un niveau élevé de contamination (Miller *et al.*, 1988 ; Sunnesson *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1998 ; Bjurman *et al.*, 1999)

C'est dans cette problématique que Keller, en 2001, réalise une étude afin de détecter des COV responsables de l'odeur de moisi (le 1-octen-3-ol, le 2-méthyl-1-propanol, le diméthylsulphide, le diméthyldisulfide, le diméthylsulphoxide, le 2-heptanone et la géosmine). Il réalise ainsi plusieurs prélèvements atmosphériques dans 131 habitations. Les COV incriminés ont été détectés dans l'ensemble des résidences présentant un signe de contamination fongique (odeur ou visible) (n=96).

Cependant, la multitude des sources autres que fongiques pouvant émettre des COV dans un environnement intérieur (matériaux, revêtements, microorganismes divers...) et le manque de connaissances à propos de la production par les moisissures de ces métabolites sur des produits de construction expliquent qu'à l'heure actuelle l'utilisation des COV comme traceurs n'est pas été développée.

IV LES MYCOTOXINES

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par les moisissures. Une fonction reconnue de ces toxines est de limiter le développement d'autres microorganismes présents sur le même support de croissance (Weidenbörner, 2001).

IV.1 PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON : APPLICATION AUX ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

Les prélèvements de mycotoxines sont réalisés soit à partir de matériaux de construction prélevés *in situ* ou contaminés artificiellement en laboratoire, soit dans des poussières échantillonnées sur le terrain à partir de différents supports (moquettes, conduits de ventilation) ou directement dans l'air à l'aide de filtres.

Dans tous les cas, les mycotoxines sont extraites de l'échantillon à l'aide d'un solvant organique. Le choix de ce solvant d'extraction dépend principalement du caractère polaire (telles que déoxynivalénol (DON), nivalénol (NIV), stérigmatocystine, trichothécènes du type B, ochratoxine A) ou apolaire (DAS, toxine T2) de la mycotoxine étudiée.

Les mycotoxines polaires sont généralement extraites avec du méthanol et/ou de l'acétonitrile (Smoragiewicz *et al.*, 1993 ; Richard *et al.*, 1999 ; Tuomi *et al.*, 2000 ; Engelhart *et al.*, 2002). Les autres toxines sont extraites avec du chloroforme, du dichlorométhane et/ou de l'acétate d'éthyle (Nielsen *et al.*, 1998, 2001 ; Vesper *et al.*, 2000 ; Nieminen *et al.*, 2002).

Dans certains cas (par exemple pour l'Ochratoxine A) l'acidification du milieu peut être envisagée afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction (Frisvad *et al.*, 1987 ; Smoragiewicz *et al.*, 1993).

Par conséquent, du fait de la diversité des caractéristiques physico-chimique de ces molécules, il n'est pas possible d'extraire la totalité des mycotoxines à partir d'une extraction unique.

De plus, la détection des mycotoxines à partir de tels échantillons est difficile pour trois raisons principales :

- les concentrations de mycotoxines dans l'habitat sont supposées faibles (de l'ordre du ppm dans des poussières d'après une étude réalisée par Richard en 1999 sur l'ochratoxine A)
- les composants de la matrice de l'échantillon sont nombreux et interfèrent dans l'analyse (matériaux, peintures, colles, poussières,...)
- les moisissures génèrent de nombreux métabolites secondaires susceptibles de gêner l'analyse.

Par conséquent, afin d'améliorer l'analyse chromatographique, plusieurs auteurs effectuent une purification préalable de l'échantillon. Trois techniques de purification sont décrites dans la littérature pour ce type d'analyse :

- **l'extraction en phase solide (SPE)** normale (gel de silice, florisil, alumine de charbon de bois, colonnes MycoSep) ou inverse (Tuomi *et al.*, 2000)
- **l'extraction à l'aide d'une colonne d'immunoaffinité** dans le cas d'études spécifiques à un groupe ou une mycotoxine donnée (par exemple pour l'Ochratoxine A) (Richard *et al.*, 1999)
- **l'utilisation de solvant organique** (hexane, cyclohexane ou éther de pétrole) pour une extraction chimique et l'élimination de polluants tels que des corps gras (Smoragiewicz *et al.*, 1993).

IV.2 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES UTILISEES POUR LA DETECTION DES MYCOTOXINES DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

La chromatographie liquide

Depuis les années 90 la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la technique la plus utilisée pour la mesure des mycotoxines. Elle peut être couplée soit à un à un spectromètre de masse (MS), soit à un détecteur ultraviolet (UV), pour la détection et l'identification des mycotoxines.

Le couplage entre l'HPLC et la spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique spécifique et semble donc être appropriée à la mesure de mycotoxines dans les environnements intérieurs (Nielsen *et al.*, 2003). Cependant, l'analyse des trichothécènes par LC-MS ou MS/MS peut être difficile du fait de leur labilité et leur tendance à former des adduits (produits d'une réaction entre plusieurs molécules) (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2002). Ainsi, comme le souligne Nielsen (2003), le rapport de Tuomi *et al.* (2000) pourrait contenir des faux-positifs liés à la technique analytique (GC-MS) puisque les échantillons contenant le T2-tetraol ne contenaient pas de T2-toxine (molécules pourtant issue du même chemin réactionnel), et ceux avec la 3-acétyl-DON n'étaient pas associés à la présence de DON.

Comme la plupart des composés aromatiques ou comportant un système électronique conjugué, les mycotoxines fluorescent sous rayonnement UV, cette propriété peut alors être utilisée pour leur détection. L'utilisation d'une HPLC couplée à une détection UV peut alors être utilisée. Cependant, seules les mycotoxines comportant un spectre d'absorption UV caractéristique peuvent être identifiées par cette technique (Vesper *et al.*, 2000).

La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (TLC) est la méthode chromatographique la plus ancienne. Elle requiert peu d'équipement et est relativement rapide.

Après séparation et traitement par un colorant, les mycotoxines sont révélées sous rayonnement UV.

Cette technique est principalement utilisée pour confirmer l'identification de mycotoxines (trichothécènes, stérigmatocystine, ochratoxine A, gliotoxine) (Smoragiewicz *et al.*, 1993 ; Johanning *et al.*, 1999 ; Richard *et al.*, 1999 ; Vesper *et al.*, 2000 ; Engelhart *et al.*, 2002 ; Nieminen *et al.*, 2002). Cependant, la TLC n'est pas suffisamment spécifique pour permettre une étude globale des trichothécènes par exemple.

La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) nécessite, du fait de l'instabilité thermique des mycotoxines, une étape de dérivation des groupements OH et NH. Cette technique, couplée à un MS est cependant très sensible. Cette méthode est principalement utilisée pour l'analyse des trichothécènes (Nielsen *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 1999).

Tests biologiques

Certains auteurs testent également la cytotoxicité des échantillons afin d'analyser les trichothécènes. Des tests immunologiques sont également mis au point pour identifier certaines mycotoxines. Ces techniques ont pour avantages d'être rapides et relativement simples d'utilisation (Smith *et al.*, 1992 ; Ruotsalainen *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 1999). Parmi ces méthodes, les plus couramment utilisées sont les tests RIA (Radio Immuno Assay : méthode de dosage d'un antigène radioactif) pour les aflatoxines, et ELISA (Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay : technique utilisée pour détecter les anticorps antibactériens ou antiviraux au moyen d'anticorps spécifiques conjugués à une enzyme) pour détecter la plupart des mycotoxines. Ce type de tests reste toutefois peu sensible (limite de détection de 0,2 ppm pour ELISA) compte tenu des quantités émises dans les environnements intérieurs (de l'ordre du ppb) (Bertinchamps *et al.*, 2000).

Les concentrations de trichothécènes peuvent également être estimées *via* l'inhibition de la traduction de protéines (Yike *et al.*, 1999).

L'électrophorèse capillaire

Depuis la fin des années 90, l'électrophorèse capillaire (CE) est utilisée pour la détection de mycotoxines particulièrement en raison d'un pouvoir de séparation supérieur à celui du capillaire d'un GC (Wheat *et al.*, 1997 ; Mc Comb *et al.*, 1998). La méthode a cependant un certain nombre de limites : ainsi, les composants non chargés ne peuvent pas être séparés à moins que la technique « micellar CE » ne soit utilisée, ce qui réduit fortement son pouvoir de séparation (Nielsen *et al.*, 1996). De plus, seuls de très petits volumes ($<1 \mu\text{L}$) peuvent être injectés dans la colonne, ce qui implique des problèmes de limite de détection, et ce, malgré l'existence de plusieurs méthodes de pré-concentration (Naylor et Tomlinson, 1998).

En conclusion, il n'existe pas de technique globale permettant l'analyse de toutes les mycotoxines potentiellement présentes dans un habitat.

IV.3 NATURE ET BIOSYNTHESE DES MYCOTOXINES

Les mycotoxines regroupent plus de 400 composés chimiques non volatils dont la masse moléculaire n'excède généralement pas 1500 Dalton (Nielsen *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 2002). La plupart d'entre elles sont des hétérocycles souvent insaturés, caractéristique en rapport avec la toxicité et les propriétés cancérigènes de certaines d'entre elles. L'hétéroatome le plus rencontré est l'oxygène (stérigmatocystine, déoxynivalénol, aflatoxines...).

Elles sont excrétées par les moisissures après la phase exponentielle de croissance et durant toute la phase stationnaire (Weidenbörner, 2001).

Ces toxines ont trois origines biosynthétiques principales : les polyacétates, les terpènes, et les acides aminés ce qui n'implique pas leur uniformité structurale (Weidenbörner, 2001).

Certaines d'entre elle peuvent toutefois être classé par famille selon des similitudes structurales, c'est le cas notamment des trichothécènes. Leur impact sanitaire en a fait la famille de mycotoxines la plus prospectée par les études appliquées aux environnements intérieurs. A l'heure actuelle plus de 170 trichothécènes ont été référencés.

Ils peuvent être macrocycliques ou simples (non-macrocycliques) et contiennent des anneaux sesquiterpènes caractérisés par un noyau 12,13-epoxy-trichothec-9-ène. Ils possèdent différents constituants aux positions 3, 4, 7, 8 et 15 de leur molécule.

Nielsen distingue quatre types de trichothécènes :

- Le type A (la Toxine-T2 par exemple), sont des trichothécènes simples dont la formule générale est représentée sur la Figure I-9 à gauche.
- Le type B (Déoxynivalénol, nivalénol, ...), sont des trichothécènes simples caractérisés par une fonction cétone sur le carbone 8 (Figure I-9 à droite). Ce groupe limite la toxicité de ces trichothécènes par rapport à ceux du type A.

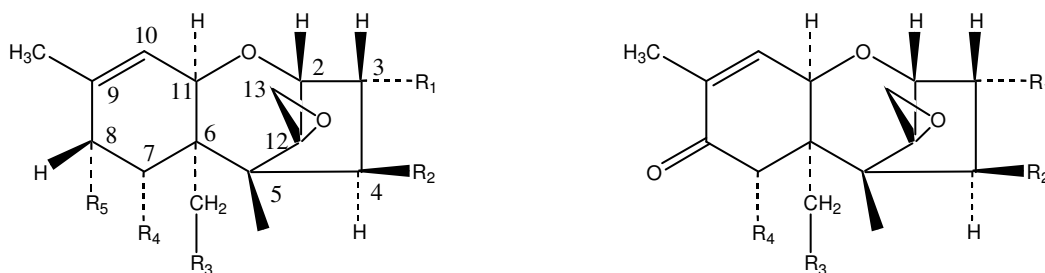


Figure I-9 : Formules développées des trichothécènes de type A et de type B (de gauche à droite)

- Les trichothécènes du type C sont généralement appelés trichothécènes macrocycliques (les satratoxines par exemple). Leur présence dans l'habitat est spécialement associée à la croissance de moisissures du genre *Stachybotrys*.
- Le type D : très rares, ils sont caractérisés par un groupe époxy sur les carbones 7 et 8 ou 9 et 10 (crotocine).

Les structures chimiques de mycotoxines fréquemment étudiées dans l'habitat (la stérigmatocystine, ainsi que trois types de trichothécènes) sont représentées dans la Figure I-10.

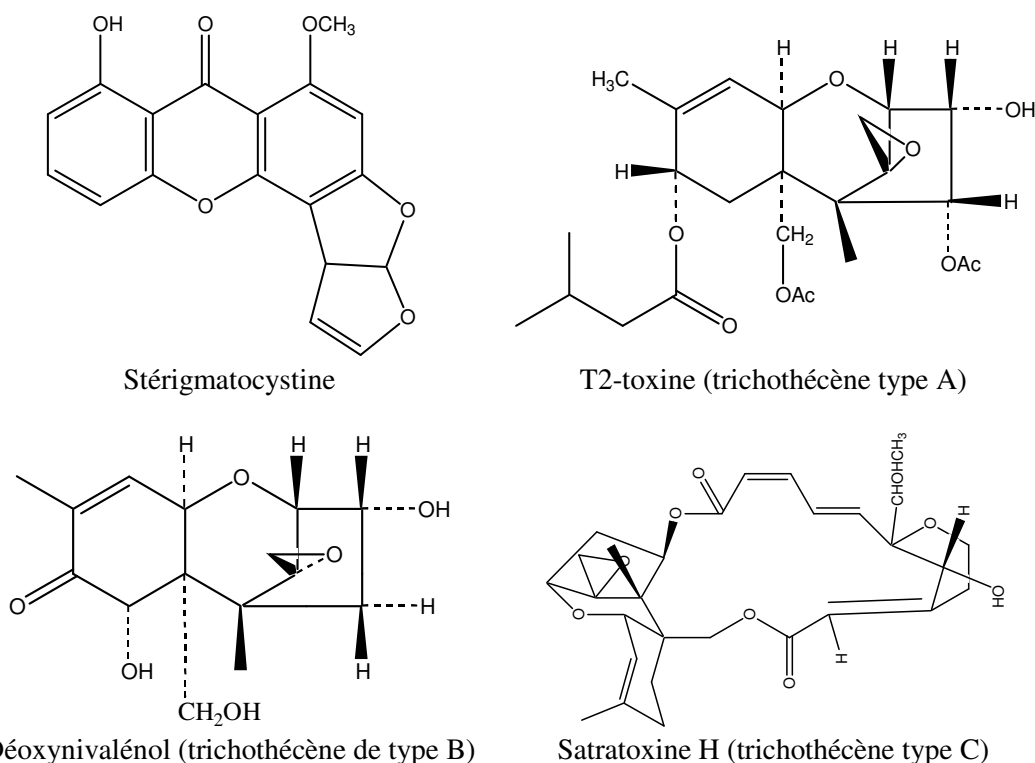


Figure I-10 : Structure chimique de la stérigmatocystine, la T2-toxine, la déoxynivalénol et la satratoxine H

IV.4 PRODUCTION DE MYCOTOXINES SUR DES MATERIAUX DE CONSTRUCTION

Pour des raisons historiques, la plupart des études traitant des mycotoxines sont appliquées au domaine agroalimentaire. Mais s'il existe de nombreuses publications traitant des mycotoxines dans l'alimentation, en revanche il existe peu d'études appliquées à la présence de ces toxines dans les bâtiments.

Dans cette problématique, certains auteurs ont étudié la production de mycotoxines lors d'une croissance fongique sur divers matériaux de construction. Les espèces fongiques ont été isolées dans des habitats présentant des signes visibles de contamination.

Nielsen, en 2003, a recensé les différentes mycotoxines détectées lors de ce type d'études

Tableau I-14 :

Espèces fongiques étudiées	Mycotoxines détectées sur matériaux de construction contaminés	Références bibliographiques
<i>Alternaria tenuissima</i>	Alternariol, alternariol monoéthyl éther	Nielsen <i>et al.</i> , 1999 ; Ren <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gliotoxine, verruculogen, acide helvolique	Nieminen <i>et al.</i> , 2002 Ren <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i>	Nigragilline, orlandine, naphtho- γ -pyrones et des composés tétracycliques	Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxine A, acide penicilique, xanthomegnine, viomelleine, vioxanthine	Frisvad et Thrane, 2002
<i>Aspergillus ustus</i>	Kotanine	Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine, 5-méthoxy-stérigmatocystine	Larsen et Frisvad, 1994 ; Nielsen <i>et al.</i> , 1998 Tuomi <i>et al.</i> , 2000
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetoglobosine A et C	Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>Memnoniella echinata</i>	Griseofulvine, dechlorogriseofulvine, epidechlorogriseofulvine	Nielsen, 2002
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Acide mycophenolique, asperphenamate.	Nielsen, 1999 Nielsen, 2002
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Chrysogine, 2-pyrovoylaminobenzamide, méléagrine	Nielsen, 1999 Nielsen, 2002
<i>Stachybotrys chartarum</i>	De nombreux trichothécènes, principalement : statratoxine G et H, T2-toxine, déoxynivalénol (DON), acétyl-DON, T2-tetraol, verrucarol, trichadernol, roridine E et L-2	Andersen <i>et al.</i> , 2002 ; Johanning <i>et al.</i> , 1996 ; Andersson <i>et al.</i> , 1997 ; Croft <i>et al.</i> , 1986 ; Jarvis <i>et al.</i> , 1998 ; Nielsen <i>et al.</i> , 1998 Vesper <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichoderma viride</i>	Trichothécènes	Nielsen <i>et al.</i> , 1998

Tableau I-14 : Mycotoxines produites par les moisissures de l'habitat inoculées sur des matériaux de construction (d'après Nielsen, 2003)

Toutefois, toutes les souches d'une même espèce ne sont pas nécessairement toxiques. Ruotsalainen, en 1998, a isolé dans des prélèvements d'air et de surfaces d'habitations contaminées, plusieurs souches de *Stachybotrys chartarum*. Après croissance sur un milieu de culture en laboratoire, seules une partie des souches se sont révélées cytotoxiques.

Outre la toxicité de la souche productrice, la synthèse de mycotoxines dépend également du substrat de croissance, de la température, de l'activité de l'eau, du pH, de la concentration d'oxygène et de la présence d'autres microorganismes (Nielsen *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 2002). Les mycotoxines détectées lors de ces études doivent donc être associées aux conditions d'essais.

De plus, la détection de ces toxines est largement influencée par la technique analytique employée, par exemple, Nielsen (2001), en utilisant une détection UV ne pouvait pas détecter

de malformine qui nécessite une analyse par LC-MS, pourtant cette molécule était susceptible d'être produite par les espèces fongiques présentes.

Par conséquent, aucune liste de mycotoxines créée à partir de ces essais ne peut être considérée comme exhaustive.

IV.5 PRELEVEMENTS IN SITU

Jusqu'à la fin des années 90, l'exposition des personnes aux mycotoxines était supposée être principalement liée à l'inhalation de spores et de fragments mycéliens (Sorenson, 1999). Par conséquent, l'exposition aux mycotoxines était évaluée en mesurant les concentrations de spores aéroportées et en identifiant les espèces fongiques présentes dans les locaux.

Cependant, les études réalisées en laboratoires ne reflètent pas forcément la production de mycotoxines dans des cas réels puisque cette production dépend des conditions de croissance de la moisissure.

De plus, Gorny en 2002 a démontré que des particules plus petites que des spores (inférieur à 0,3 µm) pouvaient être générées par une croissance fongique sur des matériaux de construction. Par conséquent la corrélation entre le nombre de particules aéroportées susceptibles de transporter des mycotoxines et la concentration de spores n'est pas évidente.

Les mycotoxines aéroportées ont été mesurées directement dans des environnements en présence de fortes concentrations de spores (fermes, compost, ...) (Fischer *et al.*, 1999 ; Sorenson, 1999). En revanche, les concentrations fongiques rencontrées dans l'habitat sont plus faibles et le dosage des mycotoxines est donc plus difficile.

Dans le but d'évaluer l'exposition réelle d'occupants de locaux contaminés, quelques équipes ont cherché à identifier des mycotoxines à partir de prélèvements d'airs ou de surfaces effectués directement dans des habitations contaminées.

Tuomi, en 2000, a recensé plusieurs mycotoxines produites sur 79 échantillons de supports prélevés dans des habitations ayant subi un dégât des eaux. Les mycotoxines détectées ont été la stérigmatocystine (24% des échantillons), des trichothécènes (19% des échantillons) (satratoxines G et H, diacétoxyscirpenol, déoxynivalénol (DON), 3-acétyl-DON, verrucarol, T2 tetraol), et la citrinine (4% des échantillons).

Toujours à partir de supports prélevés dans deux écoles et une habitation, Nielsen, en 1998, a détecté de la stérigmatocystine, de la 5-méthoxystérigmatocystine, ainsi que des trichothécènes macrocycliques (probablement satratoxine G et H) et du trichodermol dérivé de la molécule de trichodermine.

Depuis que l'association entre la croissance de *Stachybotrys chartarum* dans les bâtiments et l'apparition de cas d'hémophilie pulmonaire primitive idiopathique (IPH) chez des nourrissons a été publiée (Montana *et al.*, 1997 ; Jarvis *et al.*, 1998), la plupart de ces études ont cherché à mesurer les trichothécènes aéroportés. Les trichothécènes détectés sont : la T2-toxine, la tetraol T2, la toxine Ht-2, la diacétoxyscirphenol (DAS), la déoxynivalénol (DON), la roridine A, le scripentriol, le verrucarol, le trichodermol, et la satratoxine G. (Smoragiewicz *et al.*, 1993 ; Yike *et al.*, 1999 ; Vesper *et al.*, 2000 ; Johanning *et al.*, 2002 ; Nielsen, 2002).

Des mycotoxines ont également été détectées dans des poussières de résidences individuelles. Ainsi, Engelhart en 2002 a détecté de fortes concentrations de stérigmatocystine (4 ng de stérigmatocystine par gramme de poussière) dans 20 % des échantillons de poussières prélevées dans des moquettes.

Richard, en 1999 a isolé, pour la première fois dans des habitats, de l'ochratoxine A dans des poussières prélevées dans des conduits d'aération. La formule développée de cette mycotoxine est représentée sur la Figure I-11

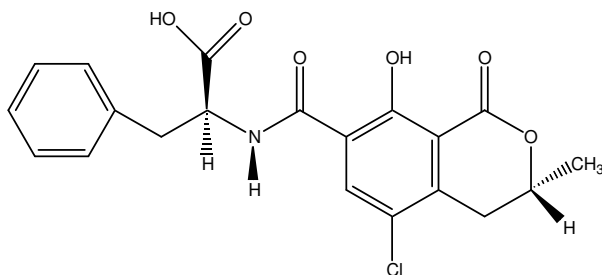


Figure I-11 : formule développée de l'ochratoxine A

Les mycotoxines les plus fréquemment détectées lors de prélèvement *in situ* sont donc la stérigmatocystine et plusieurs mycotoxines de la famille des trichothécènes.

Cependant, les techniques analytiques employées lors de ces études ne permettent pas l'identification de la totalité des mycotoxines. Par conséquent cette liste n'est pas exhaustive puisqu'un grand nombre d'autres métabolites n'a pas été recherché.

Par exemple, en 1998 Steyn montre que la biosynthèse de la stérigmatocystine peut s'accompagner de la production de plusieurs métabolites tels que l'acide norsolorique, l'averatine, l'hydroxyversicolorone, ou la versicolorine A. La poursuite de ces réactions peut également conduire à la formation d'aflatoxine B1 avec *Aspergillus flavus*.

La présence de stérigmatocystine est donc susceptible de s'accompagner de nombreux autres métabolites potentiellement toxiques et non détectés dans ces études.

DEMARCHE

Naturellement présents dans l'air, les champignons sont des biocontaminants courants des environnements intérieurs. En présence de conditions environnementales favorables, ils utilisent les matériaux de construction comme sources de nutriments et se développent à l'intérieur des locaux.

L'apparition de maladies chez les occupants d'environnements « moisissus » a été très largement décrite dans la littérature.

Les effets sur la santé des moisissures et métabolites associés sont nombreux : infections, allergies, toxi-infections, irritations. La prévalence et la sévérité des maladies déclarées chez l'enfant et l'adulte semblent corrélées avec une augmentation des surfaces contaminées dans l'habitat.

Cependant, la caractérisation de l'exposition des occupants de locaux contaminés reste méconnue. A l'heure actuelle, les techniques utilisées pour détecter une contamination fongique dans une ambiance s'appuient sur la culture de particules biologiques prélevées dans l'air ou sur les surfaces.

Dans ces conditions, seule la fraction cultivable des particules prélevées est alors accessible par ces techniques. Pourtant cette fraction ne représente qu'une partie des particules potentiellement dangereuses pour les occupants de locaux contaminés.

Par ailleurs, comme le représente la Figure I-12, durant toutes les phases de leur développement, les moisissures produisent également en continu des métabolites et produits de dégradation inhalables et susceptibles d'être responsables de maladies : effet irritant de composés organiques volatils (COV), effet cancérogène de certaines mycotoxines...

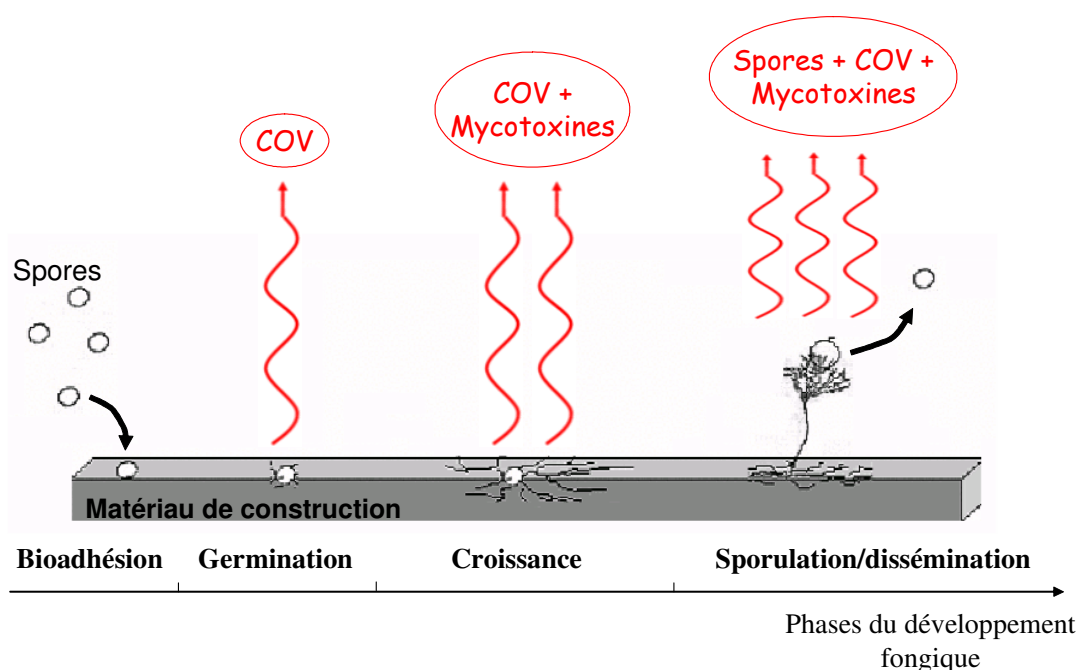


Figure I-12 : Principales émissions de métabolites et de particules générées à chaque étape du développement fongique

Les COV sont émis dès la germination de la moisissure et durant toute la phase de croissance. Ces composés volatils sont issus soit du métabolisme fongique, soit de la dégradation du

matériau engendrée par le développement fongique (action mécanique liée à la pénétration du mycélium dans le matériau, action biochimique due à l'excrétion d'enzymes ou d'acides).

A la fin de la phase exponentielle de croissance et durant toute la phase stationnaire, les moisissures produisent et excrètent des mycotoxines. Ces métabolites contenus dans la biomasse fongique ou sur le matériau sont susceptibles d'être inhalées par l'intermédiaire de poussières sur lesquelles elles s'adsorbent (fragments mycéliens, particules de matériaux, poussières...).

Durant l'étape de sporulation de grandes quantités de conidies sont émises dans l'atmosphère. Cette étape s'accompagne de plusieurs métabolites contenus dans ces spores (mycotoxines, allergènes...), ainsi que de l'émission de COV résiduels issus de la dégradation du support.

L'objet de ce travail de thèse porte essentiellement sur le développement de méthodes d'analyse de la qualité microbiologique de l'air, la définition et la validation d'indicateurs de surveillance de cette qualité.

Ainsi, cette recherche porte à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement mais également sur la mise au point et l'adaptation de méthodes de dosage et de reconnaissance indirecte, basées en particulier sur la recherche des produits du métabolisme ou de constituants cellulaires spécifiques (COV spécifiques, ergostérol, mycotoxines).

La première phase de notre étude consistera à élaborer une stratégie de détection d'une contamination fongique basée sur la mesure de traceurs chimiques : les COV.

Classiquement les études sur les COV sont essentiellement axées sur l'impact sanitaire ou sensoriel de ces molécules. Ces recherches définissent les composés émis en présence de moisissures mais il existe peu de données sur la nature des émissions de COV et notamment sur leur origine (dégradation, métabolisme), informations essentielles pour permettre de juger de la pertinence du choix d'un ou plusieurs de ces composés comme traceur d'un développement fongique.

Afin de répondre à notre problématique, nous nous attacherons d'abord à identifier la nature des COV émis lors d'une croissance fongique sur des matériaux de construction. D'un point de vue expérimental, nous travaillerons avec 5 matériaux, de compositions différentes, couramment utilisés dans les bâtiments (toile de verre à peindre, papier peint vinyl, liège, dalle de plafond et plaque de plâtre) ainsi qu'un matériau de référence peu émissif sur lequel nous ajouterons une solution de nutriments dont les concentrations seront contrôlées (fibre de verre).

Cette étude a été réalisée avec trois espèces fongiques. *Aspergillus niger*, moisissure rencontrée dans des bâtiments, a été largement référencée dans la littérature. Son utilisation permettra donc de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. *Aspergillus versicolor* et *Penicillium brevicompactum* ont été sélectionnés en raison de leur présence courante dans les locaux ainsi que pour leur impact sanitaire.

Cette partie de l'étude sera réalisée en laboratoire afin de maîtriser les conditions de croissance et ainsi de caractériser la production et l'émission de ces métabolites.

Puis, nous catégoriserons ces COV en fonction de leur origine synthétique afin de définir une liste de traceurs chimiques pertinents permettant de détecter la présence d'un développement fongique.

A partir de ces prélèvements, nous chercherons à déterminer une variable globale de contamination fongique en effectuant une analyse statistique de l'ensemble des résultats obtenus par la spectrométrie de masse. Afin de juger de la présence ou non d'une contamination fongique dans un local, nous élaborerons également un indice chimique de contamination construit à partir des résultats obtenus lors de nos essais.

Des mesures réalisées *in situ* seront utilisées afin de valider la variable globale de contamination ainsi que l'indice chimique élaboré. Pour cela nous utiliserons des prélèvements effectués dans 12 habitations (5 présentant des signes visibles de contamination fongique et 7 n'en présentant pas).

La seconde phase de notre recherche consistera à caractériser l'exposition des personnes aux aérosols fongiques dans les locaux.

Les techniques classiques, basées sur la culture de microorganismes en laboratoire, ne permettent pas d'accéder à la biomasse totale puisque seule la partie cultivable est considérée. De plus, les valeurs d'aérobiocontamination obtenues par culture permettent essentiellement d'apprécier un instantané du niveau de contamination dans la mesure où l'échantillonnage excède rarement 2 minutes de collecte et un maximum de 0,2 m³ d'air prélevé. Pourtant, la contamination biologique des locaux est un phénomène discontinu soumis à l'aérodynamique et à la formation momentanée de « bouffées » polluantes difficilement mesurables par une collecte de la fraction cultivable.

Pour palier ce manque, nous développerons une méthode de mesure d'un constituant de la paroi cellulaire : l'ergostérol.

Dans un premier temps, nous mettrons en place une technique de collecte adaptée à des prélèvements réalisés sur de longues périodes (de l'ordre de la semaine). Une technique d'analyse sera également mise au point afin de doser l'ergostérol contenu dans ces prélèvements.

Dans un second temps, nous validerons ce dosage en mesurant les concentrations extérieures d'ergostérol aéroporté corrélativement à la flore fongique cultivable.

Nous réaliserons également des dosages d'ergostérol à partir de prélèvements d'air effectués dans différents locaux.

Afin d'obtenir une caractérisation complète de l'exposition des personnes aux aérosols fongiques, nous associerons au dosage de la biomasse la mesure des mycotoxines aéroportées. Par conséquent, les deux dosages doivent pouvoir être réalisés à partir d'un même prélèvement.

Dans ce but, nous mettrons au point une technique de dosage des mycotoxines aéroportées adaptée à la méthode de prélèvement utilisée pour la mesure de l'ergostérol. D'un point de vue expérimental, nous développerons cette technique en utilisant les solutions étalons de trois mycotoxines identifiées autour de la littérature comme pertinentes pour notre étude :

- La **stérigmatocystine** : l'impact sanitaire de cette toxine a été largement évoqué dans la littérature. De plus, *Aspergillus versicolor* (moisissure fréquemment isolée dans l'habitat) produit de grandes quantités de cette toxine (jusqu'à 1% de sa biomasse totale). La stérigmatocystine est également un précurseur d'une autre mycotoxine, l'aflatoxine B1, incriminée dans des cas de cancer du poumon après inhalation.

- La **déoxynivalénol** (DON) : ce métabolite fait partie de la famille des trichothécènes. L'impact sanitaire lié à la présence de ce groupe de mycotoxines dans l'habitat a été largement décrit dans la littérature. *Stachybotrys chartarum* est le principal producteur de trichothécènes dans les environnements intérieurs.
- L'**ochratoxine A** : les effets immunotoxiques par inhalation de cette mycotoxine ont été démontrés chez le rat (Alvarez *et al.*, 2004). Elle est classée cancérigène 2B (cancérigène possible pour l'homme) par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC). Elle est produite par *Aspergillus niger* ainsi que par *Penicillium sp.*

Afin de caractériser la production de stérigmatocystine par la moisissure (influence du matériau, approche du transfert matériau-air), nous étudierons le développement d'une souche d'*Aspergillus versicolor* sur divers matériaux fréquemment rencontrés dans l'habitat (papier peint, papier peint vinyl, toile de verre à peindre). Ces matériaux pourront être additionnés d'une solution de nutriments afin de varier les conditions de croissance pour un même substrat. Nous utiliserons également un matériau de référence inerte vis-à-vis de ce type de microorganismes (la fibre de verre).

Après avoir sélectionné le matériau le plus favorable à la production de stérigmatocystine, nous simulerons une « bouffée » polluante sur ce support contaminé par *Aspergillus versicolor*. Pour cela, nous adapterons une chambre environnementale dont le volume permet de réaliser les prélèvements avec l'appareillage utilisé *in situ*. Cet essai permettra de valider la technique de dosage de cette mycotoxine.

De manière à évaluer la quantité de stérigmatocystine selon la taille des particules produites, nous réaliserons des mesures en chambre environnementale avec des préleveurs permettant de distinguer, au sein de l'aérosol généré, les fractions inhalables, thoracique et alvéolaire.

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

I MONTAGES EXPERIMENTAUX

Lors de notre étude nous avons mis en place différents bancs d'essais :

- deux chambres destinées à l'étude d'émission de COV, l'une pour les prélèvements actifs et l'autre pour les prélèvements passifs
- un montage d'aérosolisation destiné à évaluer la quantité de mycotoxines aéroportées produite par un matériau contaminé de dimensions réduites selon la biomasse fongique aéroportée
- une chambre environnementale de 1 m³, destinée à caractériser le transfert des mycotoxines du matériau vers l'air.

I.1 CHAMBRES D'EMISSION DE COV

I.1.A Prélèvement actif

Le dispositif comporte deux pièces maîtresses :

- Une chambre d'émission en verre de 300 mL, inerte vis-à-vis des COV, dans laquelle est placé l'échantillon à analyser.
- Un adsorbant (Tenax TA) situé en sorti de chambre qui assure le piégeage des COV.

Une chaîne de filtration composée de charbon actif et d'un filtre anti-particulaire (HEPA) est située en amont de la chambre d'émission et assure un renouvellement d'air « propre » tandis qu'une pompe, placée en aval de la chambre, permet le prélèvement à un débit de 100 mL/min. L'ensemble des connections (tubes, raccords) sont en PTFE non émissif.

L'humidité de la chambre est maintenue à saturation durant l'essai.

I.1.B Prélèvement passif

Ce montage est constitué d'un volume d'essai étanche en Makrolon (matériau résistant à l'autoclave et peu émissif). Les dimensions internes de ce volume sont 40 x 16 x 17 cm (11 L) (Figure II-1). Les composés sont piégés, par diffusion, sur un adsorbant (Tenax TA) placé au centre de la chambre. L'humidité dans la chambre est maintenue proche de 100%.

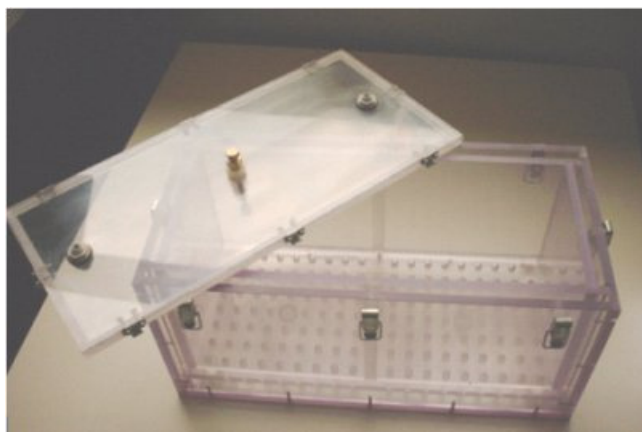


Figure II-1 : Photographie du volume d'essai

Les parois verticales du volume d'essai sont recouvertes de matériau contaminé par suspension liquide d'*Aspergillus niger* (IHEM 05077). La chambre est ensuite placée à l'étuve, à une température de 25°C et à l'abri de la lumière, pour incubation.

I.2 MONTAGE D'AEROSOLISATION

Ce montage (Figure II-2 et Figure II-3) qui comporte une chaîne de production de l'aérosol fongique et un dispositif de mesure de l'aérosol disposé en aval de la chaîne de production, permet d'obtenir un aérosol fongique à partir de matériaux contaminés.

Ce banc fonctionne en dynamique avec des débits équilibrés. Par mesure de sécurité, l'ensemble du montage est placé sous un poste de sécurité microbiologique, PSM Classe II (BHA 72, *Faster*).

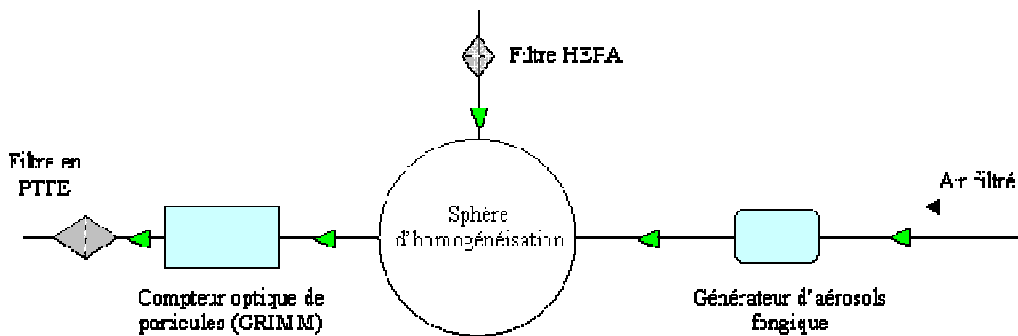


Figure II-2: Schéma du montage d'aérosolisation

L'aérosol fongique est produit par le soufflage d'un air filtré et sec à un débit de 5 L/min sur une culture fongique. L'aérosol est ensuite acheminé vers une sphère d'homogénéisation d'un volume de 6 L. Sa concentration et sa granulométrie sont mesurées à l'aide d'un compteur optique de particules (GRIMM G1.108) (Figure II-4), dont le débit d'aspiration est égal à 1,2 L/min.

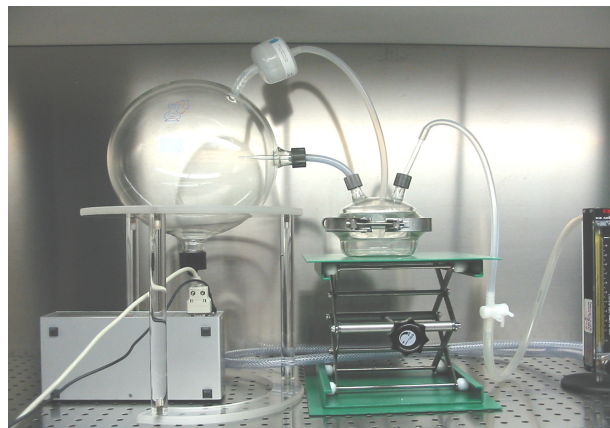


Figure II-3 : photographie du montage

Le principe du compteur optique consiste à envoyer un rayon lumineux (laser) sur un petit volume de mesure à travers lequel les particules sont aspirées à un débit d'air donné. La quantité de lumière diffusée par chaque particule, mesurée par un photodétecteur est ensuite rapportée à sa dimension. L'amplitude du signal est enregistrée par un analyseur multicanaux, qui l'affecte au canal approprié. La fréquence des impulsions reçues dans chacun des canaux,

permet d'obtenir la concentration dans l'air pour chaque classe (taille) de particules. L'air échantillonné traverse ensuite une membrane filtrante (filtre PTFE 47 mm de diamètre, porosité 1,2 μm) où les particules sont collectées.

Le traitement et l'analyse du filtre permettent de relier la quantité de mycotoxines dosée à la quantité d'aérosols mesurée.



Figure II-4 : Photographie du compteur optique GRIMM

Les caractéristiques de l'appareillage utilisé sont présentées dans le Tableau II-1 :

Diamètre optique des particules (μm)	0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,65 / 0,8 / 1 / 1,6 / 2 / 3 / 4 / 5 / 7,5 / 10 / 20
Limites du comptage	1 à $2 \cdot 10^6$ particules / litre
Sensibilité	1 particule / litre
Débit d'échantillonnage	1,2 litres / minute
Reproductibilité	$\pm 2\%$
Limites de températures	+4°C à +45°C

Tableau II-1: Caractéristiques du compteur optique de particules GRIMM 1.108

I.3 CHAMBRE ENVIRONNEMENTALE

Il s'agit initialement d'un volume d'essai *Weiss Technik* de 1 m³ destiné à la mesure des COV émis par des matériaux soumis à différentes conditions environnementales (température, humidité). Les parois internes de la chambre sont en acier inoxydable électro-poli afin d'éviter l'adsorption des composés volatils.

Pour l'adapter à notre problématique nous avons fixé une façade en makrolon sur laquelle nous avons ajouté des gants de sécurité (Figure II-5). La chambre est ainsi fermée hermétiquement durant toute la durée de l'essai et des manipulations peuvent être effectuées sans ouvrir l'enceinte.

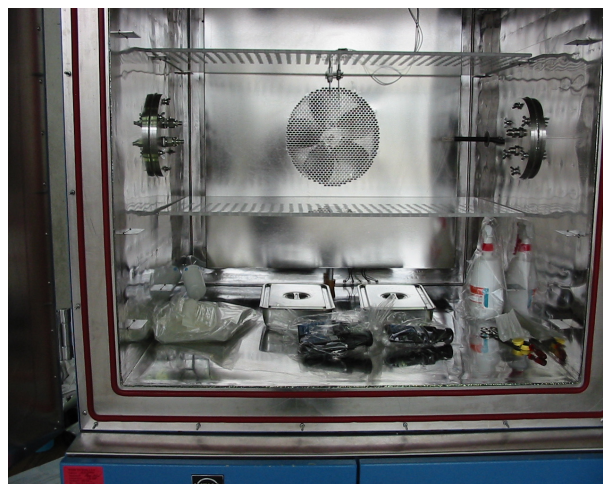


Figure II-5 : Photographies de la chambre environnementale

La température est régulée à 25°C et l'humidité relative maintenue proche de 100 % durant l'incubation des microorganismes.

Un ventilateur situé dans le volume permet un brassage de l'air dans la chambre. Sa vitesse peut être réglée de 0 à 100 tr/min. Cette ventilation permet d'une part l'homogénéisation de l'enceinte et d'autre part la génération d'aérosols.

Les matériaux contaminés sont déposés sur des étagères criblées en makrolon.

Un système d'arrivée d'air sec filtré et de fuite couplée à un filtre HEPA-CAP (*Whatman*) a aussi été installé. Celui-ci permet d'obtenir un air sans microorganismes en début de manipulation, de diminuer l'humidité relative de la chambre et de décontaminer l'enceinte.

I.4 MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches utilisées sont issues de la collection de l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Bruxelles – section mycologie :

- *Aspergillus niger* (IHEM 05077)
- *Aspergillus versicolor* (IHEM 18884)
- *Penicillium brevicompactum* (IHEM 04891)
- *Stachybotrys chartarum* (IHEM 16703)

Ces souches sont conservées à 4°C sur milieu S10 (Bouillon de Sabouraud glucosé à 2% dilué ; *Merck*). Avant utilisation elles sont repiquées tous les 7 jours, alternativement sur milieu nutritif pauvre S10 et riches : PDA (Agar glucosé à la pomme de terre, *Merck*) pour les essais mycotoxines, avoine (CELNAT)- Agar (DIFCO) pour les essais COV.

Quel que soit le milieu nutritif, les cultures sont incubées à 25°C dans l'obscurité.

Des dosages préalables de mycotoxines (stérigmatocystine, DON, et Ochratoxine A) que nous avons réalisé à partir de suspensions de spores de chacune de ces souches a montré que, dans nos conditions d'essais, seule l'*Aspergillus versicolor* était productrice d'une de ces toxines

(la stérigmatocystine). Par conséquent, seule cette souche sera utilisée pour l'étude des mycotoxines aérosolisées.

Dans le Tableau II-2 nous avons présenté la ou les souches utilisées en laboratoire selon le montage mis en œuvre.

Montage expérimental	Matériel biologique utilisé
Chambres d'émissions de COV :	
–Prélèvement actif	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Penicillium brevicompactum</i>
–Prélèvement passif	<i>Aspergillus niger</i>
Montage d'aérosolisation	<i>Aspergillus versicolor</i>
Chambre environnementale 1 m³	<i>Aspergillus versicolor</i>

Tableau II-2 : Matériel biologique utilisé en fonction du montage expérimental

I.5 PREPARATION DES MATERIAUX

Au cours des expériences réalisées, 2 types de supports ont été utilisés, un support témoin et des matériaux du commerce couramment rencontrés dans les environnements intérieurs.

Le support témoin est un filtre en fibres de verre sans liant (fibre compressée) circulaire de 90 mm de diamètre (Whatman, VWR International). Ce matériau est inerte vis-à-vis des moisissures.

Concernant les produits du commerce, il s'agit de toile de verre à peindre, de papier peint, de liège, de dalle de plafond acoustique, de placoplâtre et de papier peint vinyl.

Ces matériaux sont découpés et stérilisés (121°C, 45 min, chaleur humide) avant d'y ajouter soit de l'eau distillée soit une solution de nutriments dont la composition est détaillée en annexe I.

La contamination des surfaces est réalisée par suspension liquide dont la concentration est mesurée par turbidimétrie. Cette méthode utilise le principe de la diffusion de la lumière des particules en suspension liquide. Un modèle HI 93703 (Hanna Instruments) a été utilisé. La plage de mesure de cet appareil est comprise entre 10^{-3} et 1 F.T.U. (Formazine Turbidity Unit). Une corrélation entre la concentration de spores et la turbidité de la suspension (Figure II-6 a) a été établie. Le nombre de spores est évalué à l'aide d'une cellule de Thoma. Les conidies sont comptées, par observation au microscope, dans 5 carrés représentant un volume de $1/250 \text{ mm}^3$ (Figure II-6 b).

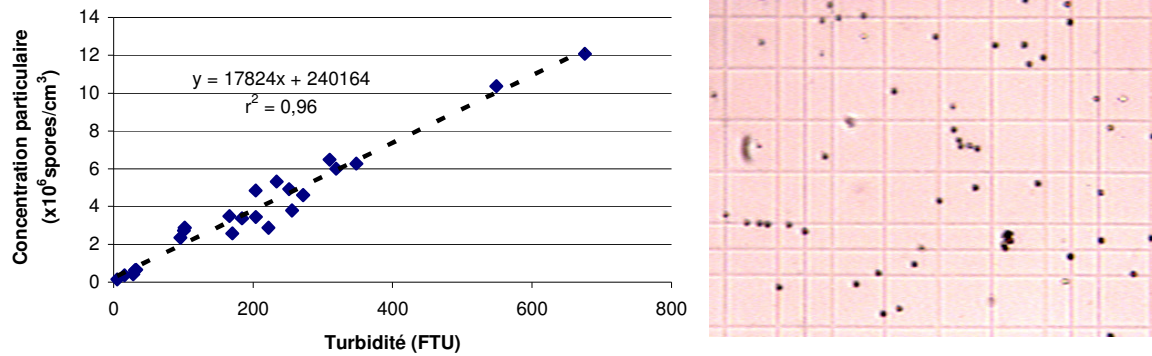


Figure II-6 : (a) Relation entre turbidimétrie et concentration d'une suspension de spores d'*Aspergillus niger*. (b) observation, au microscope objectif (x10), de la cellule Thoma et des conidies d'*Aspergillus niger* à dénombrer.

Le Tableau II-3 précise le ou les matériaux utilisés selon le montage expérimental ainsi que leur conditionnement.

Montage expérimental	Matériau utilisé	Conditionnement
Chambres d'émissions de COV :		
- Prélèvement actif	filtres en fibres de verre, toile de verre à peindre, liège, dalle de plafond acoustique, placoplâtre et papier peint vinyl	5 échantillons de 5 x 2 cm par chambre + 5mL de solution de nutriments pour le matériau témoin et 5mL d'eau distillée pour les autres matériaux
- Prélèvement passif	toile de verre à peindre	Recouvrement des parois verticales de la chambre. Le matériau est imbibé d'eau distillée
Montage d'aérosolisation	filtres en fibres de verre, toile de verre à peindre, papier peint, papier peint vinyl	Cercle de 90 mm de diamètre imbibé de solution de nutriments
Chambre environnementale 1 m³	papier peint vinyl	Rectangle de 0,5 x 1 m imbibé de solution de nutriments

Tableau II-3 : Nature et conditionnement des matériaux utilisés en fonction du montage expérimental

II TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

Dans cette partie nous distinguerons les méthodes utilisées pour le prélèvement des COV de celles destinées à la collecte des particules biologiques aéroportées à partir desquelles seront dosées l'ergostérol et les mycotoxines.

II.1 PRELEVEMENT DES COV

II.1.A Prélèvement en laboratoire

Qu'il s'agisse de prélèvement actif ou passif, les COV sont piégés dans des tubes en acier inoxydable de 9 cm de long, 5 mm de diamètre interne et 6 mm de diamètre externe contenant un adsorbant en charbon actif, le Tenax TA (15 g par tube).

Concernant les conditions de prélèvement, les échantillonnages actifs sont effectués en dynamique avec un débit de 100 mL/min durant 30 min.

Ces paramètres permettent d'avoir un taux de renouvellement de 20 volumes par heure pour les chambres d'émissions. On s'assure ainsi que l'air des chambres est entièrement renouvelé durant l'essai (volume renouvelé 10 fois).

Pour les prélèvements passifs, les composés sont piégés par diffusion sur l'adsorbant placé au centre de la chambre, celui-ci étant renouvelé cinq fois sur une période de 25 jours.

II.1.B Prélèvement *in situ*

Les prélèvements de COV réalisés *in situ* dans des logements ont été réalisés par échantillonnage diffusif sur un adsorbant solide de type carbograph 4.

Le prélèvement est assuré par un tube à diffusion de la marque Radiello (Fondazione Salvatore Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione – IRCCS, Centre de Recherche Environnementale, via Svizzera, 16 – I 35127 PADOVA). L'échantillonneur est composé d'une cartouche, d'un corps diffusif et d'un adaptateur.

La cartouche est cylindrique (40-60 mesh s.s. net), de diamètre externe 4,8 mm, et contenant 300 mg de charbon graphitisé (Carbograph 4). Cette cartouche est placée avant le prélèvement dans un corps diffusif en polyéthylène (Figure II-7). La partie centrale ne doit pas être touchée. L'ensemble est ensuite vissé sur un portoir à l'aide d'un support clippable.



Figure II-7 : Corps diffusif Radiello

Les tubes passifs sont exposés sur site pendant une durée de 7 jours. Le point de prélèvement se situe entre 0,5 et 1 m de hauteur. Après exposition, les cartouches sont conservées au réfrigérateur avant analyse.

II.2 PRELEVEMENT PARTICULAIRE

II.2.A Utilisation de la coupelle rotative

La collecte des particules aéroportées est effectuée à l'aide de capteurs individuels de particules (CIP, ARELCO). L'air est aspiré à un débit de 7 L/min pour la fraction thoracique et 10 L/min pour les autres fractions (Figure II-8).

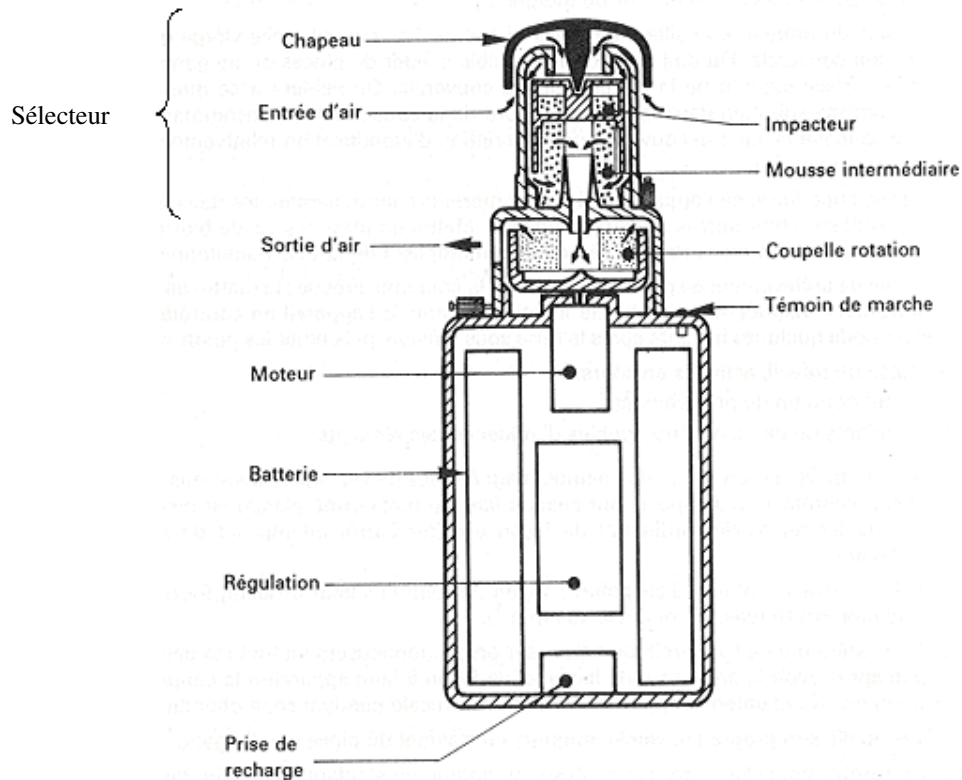


Figure II-8 : Schéma du préleveur CIP (fraction alvéolaire)

Les capteurs sont munis d'une coupelle rotative contenant une mousse en polyuréthane surmontée d'une tête de prélèvement spécifique (sélecteur) permettant de sélectionner une des fractions respirables (inhalable, thoracique et alvéolaire) (Figure II-9).

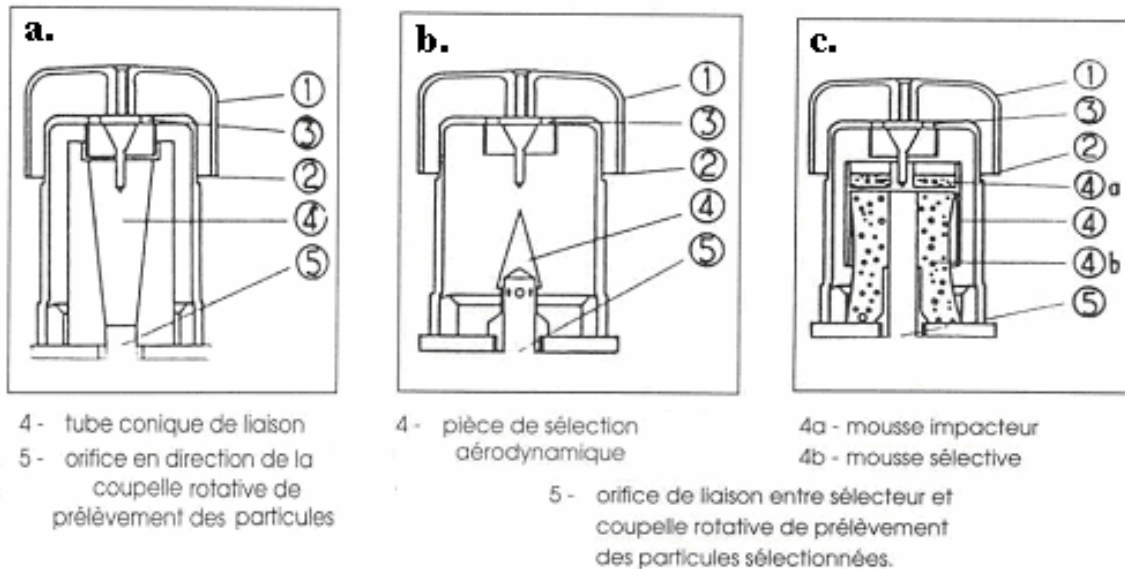


Figure II-9 : Sélecteurs de particules a. fraction inhalable ; b. fraction thoracique ; c. fraction alvéolaire.

1 : chapeau protecteur, 2 : fente d'aspiration omnidirectionnelle, 3 : orifices d'entrée sélecteur)
(d'après le Manuel d'utilisation, ARELCO)

La sélection des particules inhalables ($Da_{50} < 100\mu m$) est réalisée dans le CIP 10-I (Figure I-9 a) au niveau de la fente d'aspiration omnidirectionnelle et des orifices d'entrée du sélecteur. Le tube conique guide ensuite celles-ci vers la coupelle rotative de prélèvement des particules sélectionnées.

La sélection des particules thoraciques ($Da_{50} < 10\mu m$) est réalisée dans le CIP 10-T (Figure II-9 b) par déflexion à 90° des filets d'air en direction de 8 orifices distribués radialement sur la périphérie d'un tube cylindrique en acier inoxydable. Les plus grosses particules présentant des forces d'inertie importantes ne sont pas déviées et sont captées à la base du sélecteur.

La sélection des particules respirables alvéolaires ($Da_{50} < 4,25\mu m$) est réalisée dans le CIP 10-R (Figure II-9 c) par impact sur une mousse de polyuréthane de grade 45 (45 pores par pouce linéaire) suivie d'une filtration sélective par une autre mousse de même grade. Les plus grosses particules pénétrant dans le sélecteur sont arrêtées dans la mousse impacteur. La mousse sélective proprement dite affine la sélection.

II.2.B Échantillonnage par impaction

Un impacteur (Andersen Instruments Incorporated) a également été utilisé pour juger de l'aérobiocontamination fongique. L'étage n°4 a été utilisé, l'air y est aspiré à un débit de 28,3 L/min pendant 2 minutes, (diamètre des trous 0,71 mm; $d_{50}=3,3\mu m$). Les particules sont collectées sur un milieu de culture Sabouraud (S10). Les colonies sont dénombrées après 7 jours d'incubation à l'obscurité ($25^\circ C$).

III TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude des émissions chimiques des moisissures (COV) mais également à la production de mycotoxines par ces microorganismes en tenant compte de la biomasse fongique, assimilée à la quantité d'ergostérol. Aussi, dans ce chapitre nous présenterons :

- Le protocole d'extraction de l'ergostérol
- Les procédures d'extraction et de purification des mycotoxines

Concernant les COV, ils sont désorbés thermiquement (260 °C pendant 20 min) des tubes de prélèvement à l'aide d'un échantillonneur (ATD 400, Perkin Elmer). Les cartouches sont balayées par un flux d'hélium à un débit de 10 mL/min. Les COV désorbés sont séparés en chromatographie en phase gazeuse (GC) (Varian 3800), détectés par ionisation de flamme (FID) puis identifiés par spectrométrie de masse (MS) (Saturn 2000, Varian).

III.1 EXTRACTION DE L'ERGOSTEROL

Les champignons contiennent dans leur membrane cytoplasmique de l'ergostérol. Après extraction des structures fongiques (spores et hyphes), ce composé est dosé par HPLC. Ce dosage, qui s'appuie sur l'absorbance de cette molécule à 281 nm dans l'UV, permet la détection et la quantification de la biomasse fongique collectée.

Le protocole d'extraction consiste à placer les échantillons contaminés dans 15 mL de solvant (eau-méthanol (50:50) si on associe cette mesure au dosage des mycotoxines et méthanol dans les autres cas), puis à les soumettre aux ultrasons (BRANSON 2510, Branson) durant 1 heure. L'extrait est filtré (inorganic membrane filter ANOTOP, 0,2 µm, Whatman) puis dosé en Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur ultra violet (HPLC/UV).

III.2 EXTRACTION DES MYCOTOXINES

Le protocole d'extraction consiste à placer les échantillons contaminés dans 15 mL d'un mélange eau-méthanol (50:50, v:v), puis à les soumettre aux ultrasons (BRANSON 2510, Branson) durant 1 heure. L'extrait est filtré (inorganic membrane filter ANOTOP, 0,2 µm, Whatman).

L'extraction et la purification des mycotoxines à partir du filtrat sont réalisées en phase solide (SPE), le protocole mis en œuvre comporte trois phases :

- Percolation de la solution à travers une cartouche de silica gel C18, en phase inversée (Supelclean ENVI 18, *SUPELCO*) préalablement conditionnée avec 2 mL de méthanol (PROLABO, Chromanorm pour HPLC) et 2 mL d'eau ultrapure. La mycotoxine est piégée dans la cartouche tandis que les solvants et une partie des impuretés sont éliminés.
- Rinçage des impuretés résiduelles avec 4 mL d'eau ultrapure.
- Elution de la mycotoxine par désorption sélective avec 2 mL de méthanol

III.3 TECHNIQUES D'ANALYSE

Nous distinguerons les méthodes appliquées à l'analyse des COV et celles dédiées au dosage de l'ergostérol et des mycotoxines.

III.3.A Analyse des COV

La chaîne analytique utilisée pour analyser les COV consiste en la combinaison de trois techniques :

- la chromatographie en phase gazeuse (GC) utilisée pour séparer les COV
- l'ionisation de flamme (FID) qui permet la détection des diverses molécules
- la spectrométrie de masse (MS) employée pour identifier ces composés.

Les caractéristiques de la chaîne d'analyse sont précisées dans le Tableau II-4.

Paramètres	Conditions analytiques	
	Tubes tenax	Tubes Radiello
Thermo-désorbeur	ATD 400 (Perkin Elmer)	Turbomatrix ATD (Perkin Elmer)
Température de désorption	260 °C	370 °C
Débit de désorption	50 ± 2 mL/min, Azote N50	200 mL/min Azote N50
Durée de désorption	15 min	15 min
Température du piège froid (Tenax TA)	-30 °C	- 30 °C
Température d'injection (40°C/s)	280 °C	300 °C
Température de la ligne de transfert	220 °C	220 °C
Chromatographe gaz / Spectromètre de masse	3800 gas chromatograph / Saturn 2000 (Varian)	Autosystem XL / Turbomass (Perkin Elmer)
Colonne capillaire	SGE BPX5	CP-SIL PONA CB
Gaz vecteur	Hélium N60	Hélium N60
Pression constante	30 psi	37,5 psi
Cycle de température	- 40 °C pendant 1 min - 3 °C/min jusqu'à 200 - 250 °C pendant 10 min	- 40 °C pendant 5 min - 3 °C/min. jusqu'à 70 °C - 2,7 °C/min. jusqu'à 130 °C - 10 °C/min jusqu'à 225 °C
Température FID	270 °C	270 °C
Paramètres du spectromètre de masse	Quadripôle mode EI, Balayage (35 - 425)	Quadripôle mode EI, Balayage (33 - 400)

Tableau II-4 : Caractéristiques du GC/FID/MS

Les spectres obtenus sont comparés à une bibliothèque de spectres de masse (NIST, 1998), seul le 2-méthylisoborneol, absent de cette base de données, a été identifié à l'aide d'un standard de pureté 98% (*SIGMA-ALDRICH*).

III.3.B Analyse de l'ergostérol et des mycotoxines

La chaîne analytique utilisée pour le dosage de l'ergostérol et des mycotoxines est une HPLC de la marque Waters. Elle est composée d'un système de contrôle (Waters 600 Controller) et d'un détecteur UV (Waters 996 Photodiode Array Detector), l'ensemble de l'appareillage est piloté par le Logiciel Empower.

Une colonne LICHROSPHER RP18 de 100 Å (société Merks) a été employée pour ces deux dosages. Sa longueur est de 25 cm, son diamètre interne de 4,6 mm, avec une granulométrie moyenne de 5 µm.

Les paramètres de l'analyse l'ergostérol sont les suivants :

- Débit de la phase mobile (méthanol - 100 %) de 1,5 mL/min (équilibré en 4 min),
- Une température constante de 38 °C,
- Pourcentage du temps de dégazage durant les manipulations (Sparge) : 50 %
- Volume de la boucle : 200 µL

L'analyse des mycotoxines a été réalisée avec les paramètres suivants :

- Débit de la phase mobile (méthanol/eau - 85/15 %) de 1 mL/min (équilibré en 4 min),
- Une température constante de 30 °C,
- Pourcentage du temps de dégazage durant les manipulations (Sparge) : 50 %
- Volume de la boucle de 200 µL

Hors utilisation, la colonne est conservée dans un mélange de méthanol et d'eau (40/60), l'eau évitant l'assèchement et le méthanol la prolifération des micro-organismes dans la colonne.

IV TRAITEMENT DES DONNEES RELATIVES AUX COV

Dans ce paragraphe nous présenterons les méthodes utilisées pour quantifier les COV et réaliser l'analyse multidimensionnelle des données obtenues par GC/MS.

IV.1 QUANTIFICATION DES COV

La quantification des COV utilise comme référence le toluène dont les quantités (en ng) sont calculées selon l'équation suivante :

$$Y = R^{ref} X + b \quad (1)$$

où X est la quantité du Toluène (en ng), Y est la surface de pic obtenu en GC (sans unité), R^{ref} est le coefficient de réponse du Toluène (égal à 2039,7 dans nos essais) et b l'ordonnée à l'origine.

Pour connaître la quantité réelle des composés étudiés, on remplace dans l'équation (1) le R^{ref} par le coefficient de réponse de la molécule considérée (R) calculé à l'aide de l'équation (2).

$$R = \frac{C_{effectif}}{C_{effectif}^{ref}} \times \frac{M^{ref}}{M} \times R^{ref} \quad (2)$$

où :

$C_{effectif}$:	nombre de carbone effectif du composé
$C_{effectif}^{ref}$:	nombre de carbone effectif du Toluène (= 7)
M :	masse moléculaire du composé
M^{ref} :	masse moléculaire du Toluène (92 g/mol)
$\frac{C_{effectif}}{C_{effectif}^{ref}}$:	réponse molaire relative au Toluène

Le nombre de carbone effectif du composé considéré est calculé à l'aide du Tableau II-5.

Atome	Type	Contribution au nombre de carbone effectif
C	Aliphatique	1,0
C	Aromatique	1,0
C	Oléfinique	0,95
C	Acétylénique	1,30
C	Carbonyl (C=O)	0,0
C	Nitrile	0,3
O	Éther	- 1
O	Alcool primaire	- 0,6
O	Alcool secondaire	- 0,75
O	Alcool tertiaire ou ester	- 0,25
Cl	2 ou plus sur un même atome de C aliphatique	- 0,12 chaque
Cl	Sur C oléfinique	+ 0,05
N	Amine	Comme pour O dans le cas des alcools

Tableau II-5 : Contribution des atomes d'une molécule au nombre de carbone effectif (Wronski *et al.*, 1986)

IV.2 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

IV.2.A Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une technique de description statistique conduisant à des représentations graphiques approchées du contenu d'un tableau de données : description simultanée des liaisons entre variables et des similitudes entre individus (projection dans un espace réduit). Cette représentation permet par conséquent de mettre en évidence l'existence de groupes de variables ou d'individus, dans notre cas la distinction entre matériau contaminé et non contaminé. L'ACP conduit à une réduction de l'information par regroupement des variables en facteurs indépendants : les composantes principales qui sont des combinaisons linéaires de variables. L'ACP est décrite en détail dans le livre *Statistique exploratoire multidimensionnelle* (Lebart *et al.*, 1997).

Afin d'effectuer cette analyse nous avons utilisé le logiciel d'analyse des données SPAD version 3.5 (*décisia*).

IV.2.B La Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)

Cette méthode permet de réorganiser les similitudes en catégories discrètes et donc de définir des groupes homogènes distincts entre eux (l'inertie intraclasse est minimisée et l'énergie interclasse maximisée). L'agrégation successive des éléments permet de construire un système de partitions en classes emboîtantes, présenté généralement sous la forme d'un dendrogramme (ou arbre de classification).

Selon le critère d'agrégation, différents dendrogrammes sont obtenus. La méthode de Ward utilisée minimise la somme des carrés de tous les couples (hypothétiques) de classes pouvant être formés à chaque étape.

C'est une méthode complémentaire à l'analyse en composantes principale, qui permet de compléter et de nuancer l'interprétation de la structure des données (Lebart *et al.*, 1997).

CHAPITRE III RESULTATS

I DETECTION DE LA CONTAMINATION FONGIQUE PAR LA RECHERCHE DE CIBLES CHIMIQUES

Lors de son développement, la moisissure émet des COV. Ces composés peuvent être issus soit de la biodégradation du support, soit directement de son métabolisme.

Concernant les COV issus de la biodégradation, il s'agit de constituants du support libérés lors de la détérioration de sa matrice. Ces molécules ne sont, de fait, pas spécifiques du microorganisme contrairement à celles issues de son métabolisme.

Afin d'identifier les COV émis lors d'une croissance de moisissures dans un habitat, nous avons choisi d'étudier l'émission chimique de trois espèces fongiques se développant sur cinq produits de construction de composition différente, couramment rencontrés dans ce type d'environnements. Ne pouvant pas étudier l'ensemble des matériaux susceptibles d'être présent dans des habitats, il était nécessaire que notre choix soit suffisamment diversifié pour être représentatif d'un système réel constitués d'un grand nombre de matériaux.

Les supports choisis (toile de verre, papier peint, plâtre, liège et dalle de plafond) sont à la fois vulnérables aux moisissures et fréquemment rencontrés dans les environnements intérieurs. De plus, ils présentent des matrices chimiques de compositions suffisamment différentes pour simuler l'émission d'un mélange complexe de COV susceptible d'être rencontré dans un espace clos.

La démarche expérimentale consiste, dans un premier temps, à identifier les composés émis par ces matériaux hors développement fongique. Dans ce cas, une altération artificielle : thermique et chimique, est utilisée. Puis, les émissions liées à la prolifération des espèces fongiques considérées sur ces produits de construction sont évaluées. Ainsi, les émissions intrinsèques des supports de celles liées spécifiquement à un développement fongique sont différenciées.

Cependant, si la détection de ces molécules dans un environnement implique la présence d'un développement fongique, en revanche l'absence de certains de ces composés ne permet pas de statuer sur l'absence d'un développement fongique du fait de leur spécificité potentielle à une espèce et/ou un matériau. Aussi, nous avons caractérisé l'impact de la souche fongique, d'une part, et du matériau, d'autre part, sur la nature des traceurs émis.

Par ailleurs, la mesure des taux d'émission ainsi que leur vitesse d'apparition nous permettra de préciser le domaine d'application de ces traceurs. Notamment, si leur utilisation permet ou non d'apprécier le niveau de contamination des locaux, ou encore si la chronologie d'apparition des composés précise l'historique du développement fongique.

Pour formaliser les informations relatives aux COV issus du métabolisme, nous proposons un indice chimique de contamination fongique permettant de renseigner sur la présence d'un développement de moisissures dans un environnement intérieur. Cet indice sera confronté à des mesures de terrain permettant ainsi d'éprouver sa pertinence.

Compte tenu que les traceurs retenus sont susceptibles d'être masqués par l'émission totale liée principalement aux matériaux, nous définirons, également, une variable globale de

contamination fongique sans préjuger de la nature des molécules. Pratiquement cette approche consistera en l'analyse statistique des ions fragments détectés.

I.1 METHODOLOGIE DE CARACTERISATION DES EMISSIONS CHIMIQUES

Le produit de construction est placé pendant 7 jours à l'intérieur d'une chambre en verre de 300 mL non émissive. Cette chambre est maintenue à saturation en humidité et à une température de 25°C. Après 7 jours, le volume de la chambre est prélevé 10 fois à l'aide d'un adsorbant permettant de piéger les COV. Nous avons prélevé 30 minutes à 100 mL/min et vérifié que ce temps était bien inférieur au volume de perçage de l'adsorbant qui a été mesuré à 5 L. La surface des produits de construction testés de 50 cm² permettait d'avoir un taux de charge, défini comme le rapport entre la surface contaminée et le volume de la chambre, de 17 m²/m³. Un schéma de principe de ce montage expérimental ainsi que le chromatogramme de la chambre d'émission obtenu par GC/MS sont représentés respectivement sur les Figure III-1 et Figure III-2.

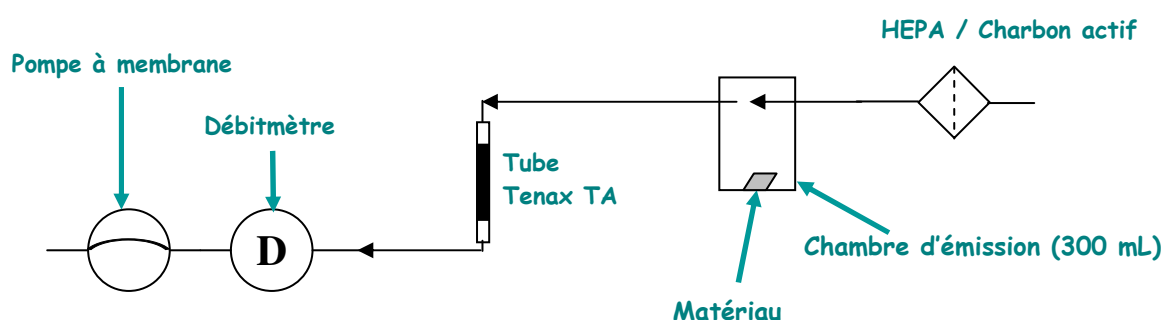


Figure III-1 : Schéma de principe du montage destiné à l'étude de l'émission des COV

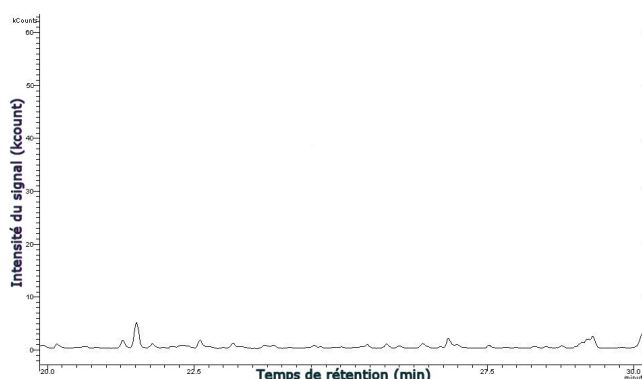


Figure III-2 : Chromatogramme par spectrométrie de masse d'une chambre d'émission ne contenant pas de matériau (prélèvement sur Tenax TA et analyse en chromatographie en phase gazeuse)

Lors de l'analyse des COV, nous avons seulement considéré les composés ayant une aire de pic supérieure à 3 fois la valeur de σ_b (écart type du bruit). Cette limite a été définie à partir des fluctuations de la ligne de base constatée lors des différentes analyses.

L'adsorbant solide utilisé (Tenax TA) limite le prélèvement à des composés organiques volatils présentant un point d'ébullition supérieur à 60°C, ce qui d'un point de vue pratique a limité notre champ d'investigation aux composés de C₄ à C₂₀. Les composés très volatils et inorganiques ne sont ainsi pas retenus par cet adsorbant.

D'après Wilkins (2002), les composés organiques spécifiques d'un développement fongique sont des molécules dont la chaîne carbonée varie de C_2 à C_{20} . Par conséquent l'adsorbant utilisé permet le piégeage de la plupart de ces composés. De plus, la même étude montre que les molécules des groupes C_2 à C_4 émises par les moisissures sont également produites par de nombreux organismes vivants suite à des processus fondamentaux tels que la glycolyse ou le cycle de Krebs. Du fait de leur manque de spécificité, ces molécules ne seront pas retenues dans le cadre de notre étude.

I.2 EMISSIONS CHIMIQUES DES PRODUITS DE CONSTRUCTION

I.2.A Identification des principaux COV

Il s'agit d'évaluer les molécules émises par les matériaux en absence de contamination fongique.

Comme attendu, de nombreux COV ont été émis et identifiés : 172 COV sur la toile de verre, 162 sur le plâtre, 151 sur le papier peint vinyl et 108 sur le liège et la dalle de plafond. Ils appartiennent aux principales familles chimiques : alcane, alcool, cétone, alcène, aldéhyde, terpènes, démontrant la diversité des constituants des matériaux utilisés.

A titre d'exemple, le Tableau III-1 recense les 15 composés majoritaires (par ordre de concentrations décroissantes).

Parmi ces composés majoritaires, seuls les 2-éthylhexanol et benzène (surlignés respectivement en jaune et bleu dans le Tableau III-1) sont communs à l'ensemble des matériaux testés.

Toile de verre (n=5)	Papier peint vinyl (n=5)	Plâtre (n=2)	Liège (n=1)	Dalle de plafond (n=1)
Diméthyl cyclopentasiloxane	Benzène	2-éthylhexanol	Toluène	Triméthylsilanol
Octaméthyl cyclotetrasiloxane	Heptane	Pyridoxine-tri TMS	1-butanol	2-éthylhexanol
Hexaméthyl cyclotrisiloxane	Nonane	Hexaméthyl cyclotrisiloxane	Butyl acétate	2-méthyléthanol
2-éthylhexanol	2,2-diméthylheptane	2,4-diméthyl-decane	2-butanone	octane
Pyridoxine-tri TMS	2,4-diméthylheptane	Octane	furfural	4-méthyldecane
2,2,4,6,6-pentaméthyl-3-heptène	4-nonene	4-méthyl-décane	hexanal	Acétophénone
Aniline	3-éthylhexane	7-hexadecene	2-éthylhexanol	7-hexadécène
Tétrahydrofurane	2,3,3-triméthylpentane	2,4,6-heptadecene	2-pentylfurane	2,4-diméthyl-1-heptène
Benzène	3-éthylheptane	Acétophénone	2,4-hexdiène	Cyclopentanone
Triméthyl silanol	2-éthylhexanol	Undecane	Nonanal	Benzène
Disulfide de carbone	2,3,4-triméthylpentane	Tetrahydrofurane	Decanal	1-butanol
2,4,6-triméthyl-1,3-phenylenediamine	1-tetradecene	2-pentanone	Styrène	Tridecane
Acétophénone	4-méthyldecane	Tridecane	Pentanal	4-méthylbutyl-benzène
1-octadécène	4-méthyl-1-decene	3,5-diméthyl-2-cyclohexène	2,4-hexadiène	Dodecane
Tridecane	Tridecane	Benzène	2-hexylbenzène	1,1-diméthylbutyl-benzène

Tableau III-1 : COV majoritaires émis par chaque matériau en l'absence de contamination fongique, par ordre de concentrations décroissantes (n représente le nombre d'essai)

Certains COV ont été associés dans la littérature à la présence de moisissures, notamment le 2-éthylhexanol et le benzène (Ezeonu *et al.*, 1994 ; Sunesson *et al.*, 1994 ; Schleibinger *et al.*, 2002). Or, ces deux composés ont largement été émis, hors développement fongique, par les 5 produits de constructions que nous avons testé. La littérature recèle de COV qui seraient en partie attribués à leur développement, cependant les nombreuses émissions des produits de construction forment un mélange complexe dont il est difficile d'extraire des composés spécifiques à la croissance des moisissures.

Dans ce but, nous avons choisi de réaliser une étude systématique des émissions. Tous les COV émis par les matériaux non contaminés sont comparés, par juxtaposition des chromatogrammes, aux mêmes produits présentant un développement fongique.

I.2.B Emissions spécifiques liées à la dénaturation du matériau

Durant leur développement, les moisissures altèrent les matériaux qu'elles colonisent (croissance du mycélium dans la matrice du matériau, libération d'enzymes et d'acides par la moisissure...). Cette altération de la matrice s'accompagne de la libération de COV dans l'environnement. Afin d'estimer la nature de ces composés nous avons procédé à la dénaturation chimique et thermique de l'un de nos matériaux d'essais le plus émissif : la toile de verre.

Dégradation chimique

Expérimentalement, la toile de verre est placée sous un flux d'oxyde d'éthylène, un puissant oxydant gazeux. Puis, les émissions sont évaluées comme décrit précédemment. Les essais sont renouvelés trois fois. Les composés émis spécifiquement après traitement à l'oxyde d'éthylène sont répertoriés dans le Tableau III-2.

Alcanes	Acides & esters
2,3,3-trimethyl-pentane	Acide acétique
2,3,4-trimethyl-pentane	Triméthylacétate de méthyle
3-methyl-heptane	éthylène glycol
octane	Alcools
2,2-dimethyl-octane	2-chloroéthanol ?
3,3-dimethyl-octane	2-iodoéthanol ?
tetradecane	Cétones
docosane	4-hydroxy-2-pentanone
décane	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone
tridecane	2,5-dihydro-3,5-dimethyl-2-furanone
Alcènes	4-methyl-2-heptanone
2,4-dimethyl-1-heptene	4,6-dimethyl-2-heptanone
3-ethyl-hexène	Composés divers
Oxyde d'éthylène	(3,3-dimethylbutyl)-benzène
	tetrahydro-2,2,5,5,-tetraméthyl-furane
	3,5-dimethyl-benzaldehyde

Tableau III-2 : Composés émis spécifiquement après traitement de la toile de verre à l'oxyde d'éthylène (n=3)

Parmi ces 26 composés, 24 sont associés à la dégradation du substrat, l'oxyde d'éthylène et l'éthylène glycol (surlignés en jaune dans le Tableau III-2) étant des résidus du traitement d'oxydation.

Dégradation thermique :

Afin de libérer les composés de la matrice du matériau, nous avons également dénaturé la toile de verre en la soumettant à une température de 170°C durant 30 min. Les COV spécifiques liés à la dégradation thermique sont répertoriés dans le Tableau III-3.

Alcanes	Acides & esters
2,3,3-trimethyl-pentane 2,3,4-trimethyl-pentane 3-methyl-heptane octane 2,2-dimethyl-octane 3,3-dimethyl-octane tetradecane	Acide acétique Triméthylacétate de méthyle éthylène glycol Alcools 2-chloroéthanol ? 2-iodoéthanol ? Cétones 4-hydroxy-2-pentanone 4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone 2,5-dihydro-3,5-diméthyl-2-furanone 4-méthyl-2-heptanone 4,6-diméthyl-2-heptanone Composés divers (3,3-diméthylbutyl)-benzène tetrahydro-2,2,5,5-tetraméthyl-furane 3,5-diméthyl-benzaldehyde
docosane	
décane tridecane Alcènes 2,4-diméthyl-1-heptène 3-éthyl-hexène Oxyde d'éthylène	
Alcanes	Acides & esters

Tableau III-3 : Composés émis par la toile de verre après élévation de la température (170°C durant 30 min ; n=2)

La nature des COV émis lors cette dégradation est différente, seuls 3 composés sont communs aux deux types de traitements appliqués : l'acide acétique, le 2-chloroéthanol et le 4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone.

In fine, les dégradations chimique et thermique réalisées sur la toile de verre ont permis l'identification de 54 nouveaux constituants du matériau. Si ces molécules devaient se retrouver lors du développement fongique, elles pourraient être en partie attribuées à la dénaturation du matériau.

I.3 EMISSIONS CHIMIQUES LIEES A LA BIODEGRADATION DU SUBSTRAT ET AU METABOLISME FONGIQUE

Nous avons analysé les émissions engendrées par le développement d'*Aspergillus niger*, *A. versicolor*, et *Penicillium brevicompactum* sur 5 matériaux : la toile de verre (n=5), le papier peint vinyl (n=5), le plâtre (n=2), la dalle de plafond (n=1), et le liège (n=1). Nous avons choisi de tester chaque souche indépendamment, des essais préalables réalisés en mélange avaient abouti à la croissance d'une seule souche, en l'occurrence *A. niger*.

Matériaux/ souches	<i>A. niger</i>					<i>A. versicolor</i>					<i>P.brevicompactum</i>				
<i>Toile de verre</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Papier peint vinyl</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Plâtre</i>	X		X			X		X			X		X		
<i>Dalle de plafond</i>	X					X					X				
<i>Liège</i>	X					X					X				

Tableau III-4 : plan d'expérimentation permettant de comparer 84 chromatogrammes (42 couples de matériau avec développement fongique / même matériau hors développement)

Les chromatogrammes des matériaux présentant un développement fongique sont comparés systématiquement à ceux du même matériau hors contamination.

La superposition du chromatogramme de la toile de verre avec celui du même matériau contaminé par *Aspergillus niger* est présentée à titre d'exemple sur la Figure III-3.

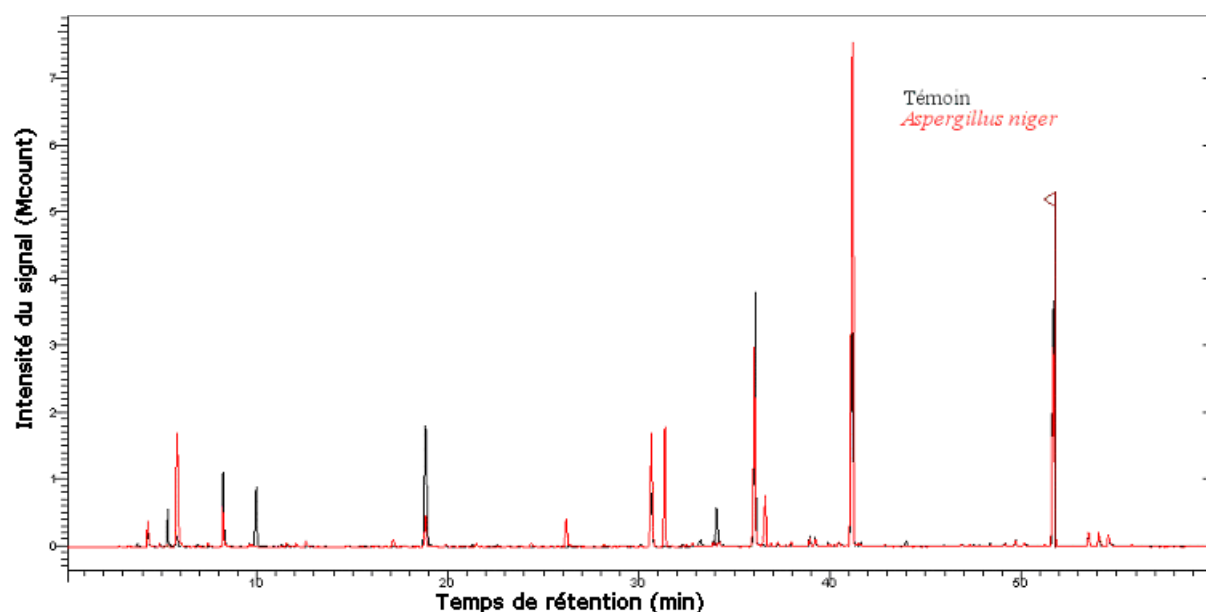


Figure III-3 : Chromatogrammes superposés des émissions de la toile de verre sans (tracé noir) et avec développement d'*Aspergillus niger* (tracé rouge).

A l'échelle de l'analyse de la Figure III-3 peu de différences, entre les matériaux contaminés et de référence, sont constatées. La caractérisation des mêmes chromatogrammes est réalisée à une échelle beaucoup plus fine. Sur la Figure III-4 est présenté les faibles émissions d'une section du précédent chromatogramme : entre 20-30 minutes en abscisse et 0-60 kcounts en ordonnées.

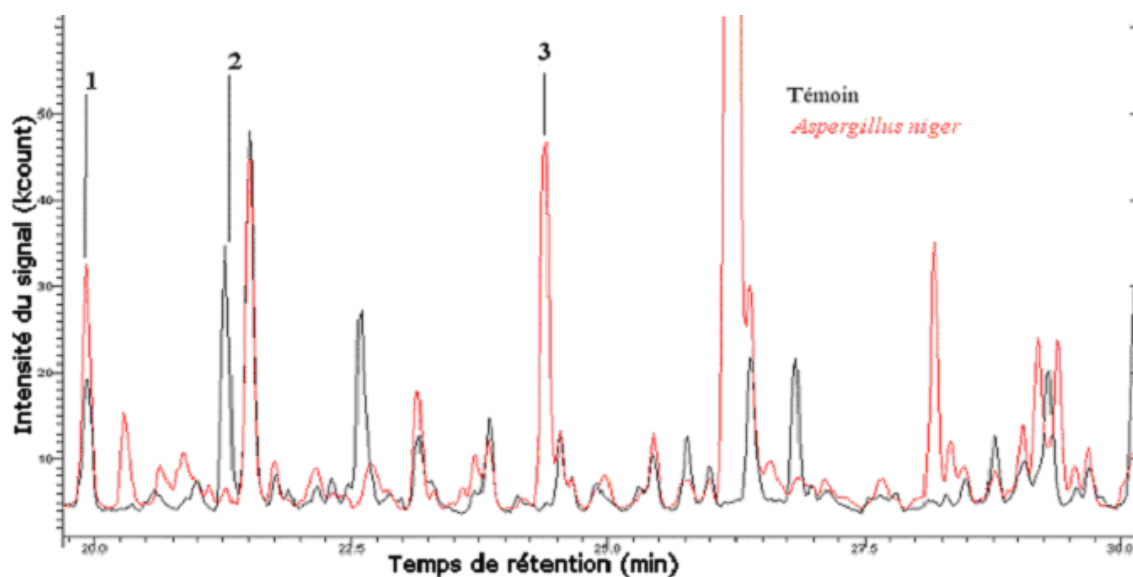


Figure III-4 : Agrandissement du chromatogramme Figure III-3 pris entre 20-30min en abscisse et 0-60 kcounts en ordonnée

A cette échelle, nous constatons des profils d'émission significativement différents. Les disparités observées se distinguent selon 3 cas :

1. En présence d'un développement fongique, la proportion du COV déjà présent sur le matériau de référence augmente (pic 1). Il s'agit soit d'un constituant du support dont la libération est favorisée par la biodégradation. Soit les émissions d'un même composé émis simultanément par le matériau et la moisissure sont sommées.
2. En présence d'un développement fongique la proportion du COV déjà présente sur le matériau de référence diminue (pic 2). Le composé est alors très certainement consommé par le microorganisme ou il se transforme suite à une réaction avec un composé produit par le champignon.
3. En présence d'un développement fongique, un nouveau COV apparaît (pic 3). Il s'agit alors de composés liés au métabolisme de la moisissure.

Seuls les COV de biodégradation ou du métabolisme seront pris en compte (cas 1 et 3) dans le reste de l'étude. Le cas 2, qui correspond à la disparition d'un COV ne pouvant être utilisé comme traceur.

L'analyse des spectres de masse associés à chaque pic nous a permis d'établir la liste des composés émis lors d'une croissance fongique sur les différents matériaux de construction testés. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau III-5.

Près de 28 composés spécifiques ont été identifiés, 4 sont des COV déjà présents sur les matériaux et le développement fongique augmente leur proportion d'un facteur 2 à 6 (cas 1), et 24 composés sont issus du métabolisme fongique. La plupart des familles chimiques sont représentées avec pour le cas 1 : alcools et terpènes ; et pour les émissions liées au métabolisme : Esters, alcools, alcènes et diènes, terpènes et terpénoïdes, cétones, composés sulfurés et aromatiques.

Nous constatons que la toile de verre (en jaune dans le Tableau III-5) a permis l'émission de la totalité des 28 COV fongiques spécifiques répertoriés. Nous avons choisi d'employer ce matériau dans la suite de l'étude pour la caractérisation des émissions.

Ces résultats mettent en évidence qu'*Aspergillus niger* se distingue des deux autres espèces fongiques puisque 6 composés sont émis spécifiquement par cette espèce (en vert dans le Tableau III-5).

Aspergillus versicolor ne possède que deux COV spécifiques (en rouge dans le Tableau III-5): le méthoxy-benzène et le 2(5H)-furanone, le 4-heptanone étant commun aux deux *Aspergillus* étudiés. En revanche, concernant *Penicillium brevicompactum* aucun COV spécifique à cette espèce n'a été constaté.

Nous constatons également que la production de certains COV semble dépendante du support de croissance. En effet, des COV issus du métabolisme fongique sont uniquement produits en présence de certains nutriments *a priori* spécifiques contenus dans les matériaux de construction. Les autres composés sont indépendants de la nature du substrat.

Composés		<i>Aspergillus niger</i>					<i>Aspergillus versicolor</i>					<i>Penicillium brevicompactum</i>				
		TV	PV	D	PI	L	TV	PV	D	PI	L	TV	PV	D	PI	L
Cas n°1	2-éthylhexanol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Camphre	X		X		X	X		X		X	X		X		X
	Isoprène	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Limonène	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cas n°3	1,3-octadiène	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	1-octen-3-ol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2(5H)-furanone						X									
	2-heptène	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X
	2-méthyl-1-butanol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2-méthylfurane	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2-méthylisobornéol	X	X	X	X	X										
	3,5-diméthyl-2-cyclohexen-1-one	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	3-éthyl-3-hexène	X					X					X				
	3-heptanol	X	X	X	X	X										
	3-méthyl-1-butanol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4-heptanone	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	Diisobutyl phtalate (DIBP)	X					X					X				
	Diméthyldisulfide	X		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X
	Isobornyl acétate	X					X					X				
	Méthoxy-benzène						X			X						
	Méthyl-2-éthylhexanoate	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	o-hydroxyphenyl	X					X					X				
	Sesquiterpène A (PM 204)	X	X	X	X	X										
	Sesquiterpène B (PM 204)	X	X	X	X	X										
	Sesquiterpène C (PM 204)	X	X	X	X	X										
	Terpénoïde (PM 222)	X	X	X	X	X										
	trans 2-octène	X		X			X		X			X		X		
	α-pinène	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tableau III-5 : Composés émis en présence d'un développement fongique sur divers produits de construction (les prélèvements sont réalisés après 7 jours d'incubation à 25°C)
[TV=toile de verre ; PV=papier peint vinyl ; D=dalle de plafond et L=liège]

Par ailleurs, nous n'avons pu identifier formellement le terpénoïde (PM 222) et les 3 sesquiterpènes désignés par A, B et C (PM 204) du Tableau III-5. Les spectres de ces 4 composés sont présentés sur la Figure III-5. L'identification la plus probable concerne 6 molécules : le cububène, le cadiène, le copaène, le ylangène, le germacrène D et le muurolane.

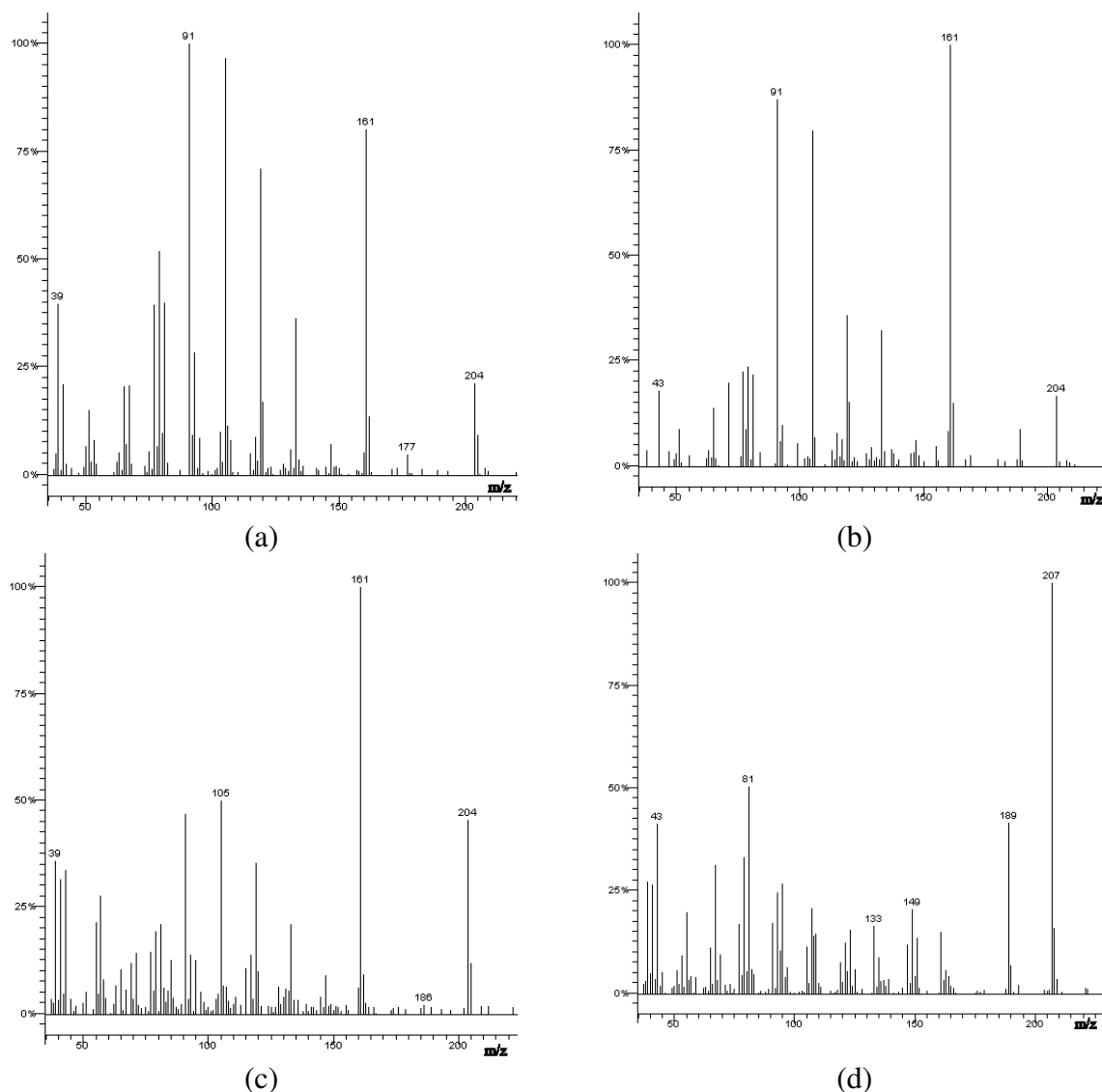


Figure III-5 : Spectres de masse du sesquiterpène A (a), du sesquiterpène B (b), du sesquiterpène C (c) et du terpénoïde (d)

I.4 CARACTERISATION DES EMISSIONS LIEES AUX DEVELOPPEMENTS FONGIQUES

I.4.A Cinétique d'apparition des COV

Afin de caractériser la cinétique d'émission des COV fongiques, nous avons suivi l'évolution des concentrations sur 25 jours des 28 composés spécifiques préalablement identifiés.

Expérimentalement, un échantillon de toile de verre contaminé par *Aspergillus niger* est placé à l'intérieur d'une enceinte non émissive de 11 L (taux de charge de 17 m²/m³). Cinq tubes passifs contenant un adsorbant (tenax) sont utilisés pendant 25 jours et retirés après différents temps.

Dans ces conditions d'essais, 15 des COV fongiques répertoriés dans le Tableau III-5 ont pu être quantifiés, les 13 autres étant détectés mais non quantifiables.

L'évolution de la concentration de ces molécules est représentée sur la Figure III-6 (composés émis rapidement dès le 2^{ème} jour d'incubation) et la Figure III-7 (composés émis après 8 jours)

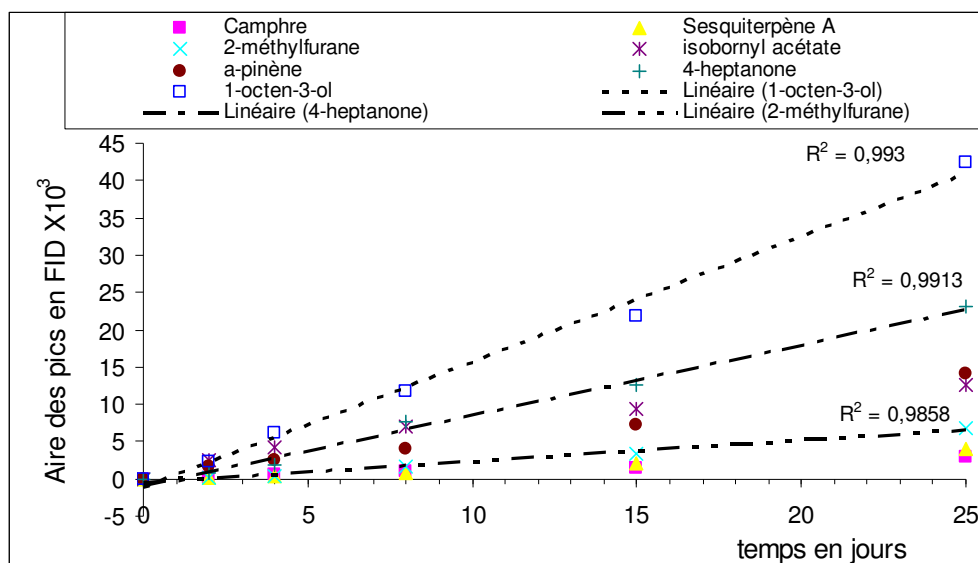


Figure III-6 : Cinétiques d'apparition de COV émis dès le 2^{ème} jour d'incubation.

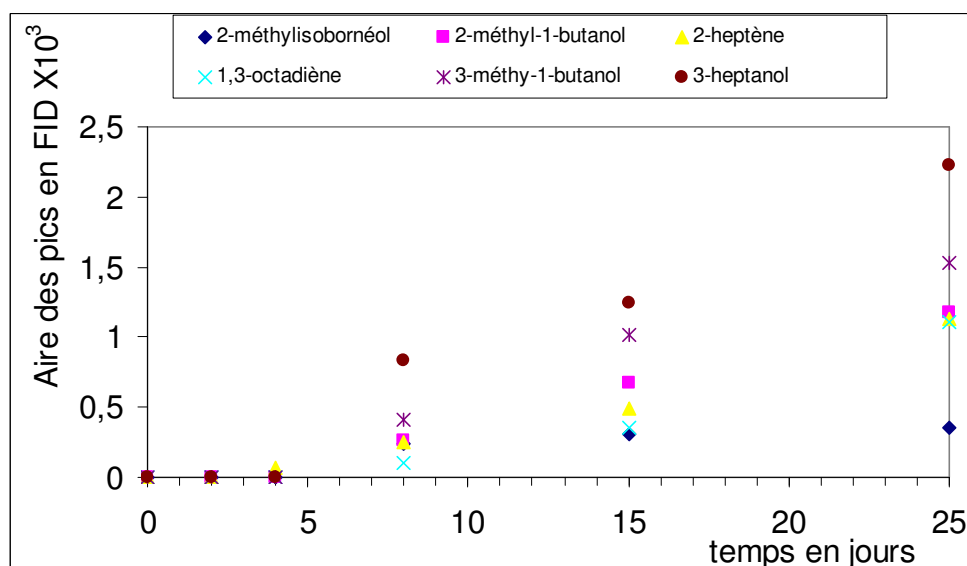


Figure III-7 : Cinétiques d'apparition de COV émis après 8 jours d'incubation

Les cinétiques d'apparition des premiers COV apparaissent linéaires (Figure III-6). Sur 25 jours d'étude, nous n'avons pas constaté de ralentissement de l'émission. Les 7 premiers composés sont observés dès le 2^{ème} jour d'incubation corrélativement à la croissance fongique avec l'observation des premiers hyphes visibles d'*Aspergillus niger*. Au 8^{ème} jour les 15 composés deviennent quantifiables.

Bien qu'elle soit directement liée à la vitesse de croissance des espèces fongiques ces résultats laissent envisager un moyen d'évaluer précocement une contamination fongique.

Deux composés se démarquent par leurs cinétiques d'émissions, il s'agit des 2-éthylhexanol et méthyl-2-éthylhexanoate.

L'émission du 2-éthylhexanol se ralentit après 4 jours d'incubation tandis que celle du méthyl-2-éthylhexanoate débute après 4 jours (Figure III-8).

Nous supposons que le 2-éthylhexanol se transforme en méthyl-2-éthylhexanoate par une réaction d'estérification qui nécessiterait la présence d'acide formique non détectable par la méthode d'analytique utilisée.

Dans ces conditions, le méthyl-2-éthylhexanoate serait produit par la moisissure uniquement en présence de son précurseur : le 2-éthylhexanol. Ces 2 COV apparaissent ainsi comme des cibles chimiques intéressantes et seront utilisés dans la définition d'un indice de contamination.

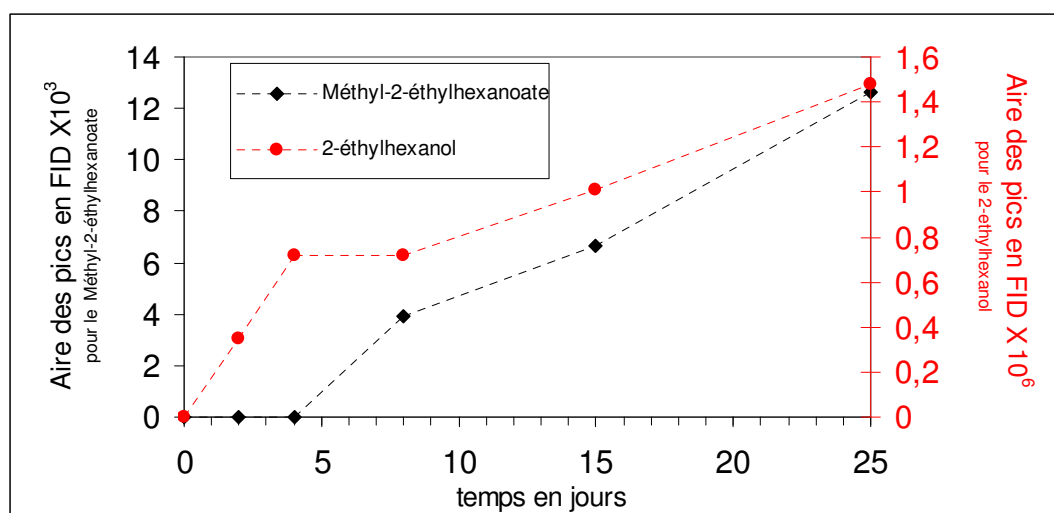


Figure III-8 : Cinétiques d'apparition du méthyl-2-éthylhexanoate et du 2-éthylhexanol

Nous supposons que le 2-éthylhexanol se transforme en méthyl-2-éthylhexanoate par une réaction d'oxydation préalable en acide 2-éthylhexanoïque lequel serait estérifié en méthyl-2-éthylhexanoate par réaction avec du méthanol (non détectable par la méthode d'analytique utilisée). Une autre hypothèse serait que l'acide 2-éthylhexanoïque proviendrait directement du précurseur du 2-éthylhexanol, un plastifiant courant : le di-2-éthylhexylphtalate. Dans ce cas, une attaque enzymatique du plastifiant par la moisissure serait envisagée.

Dans ces conditions, le méthyl-2-éthylhexanoate serait produit par la moisissure uniquement en présence de son précurseur : le 2-éthylhexanol. Ces 2 COV apparaissent ainsi comme des cibles chimiques intéressantes et seront utilisés dans la définition d'un indice de contamination.

La Figure III-9 synthétise les schémas réactionnels liés à ces hypothèses. Le code couleur utilisé sur cette figure est le suivant : les composés en noir n'ont pas été mesurés lors de nos essais, le composé en bleu a été émis en présence et en l'absence de développement fongique, celui en rouge uniquement en présence de moisissure.

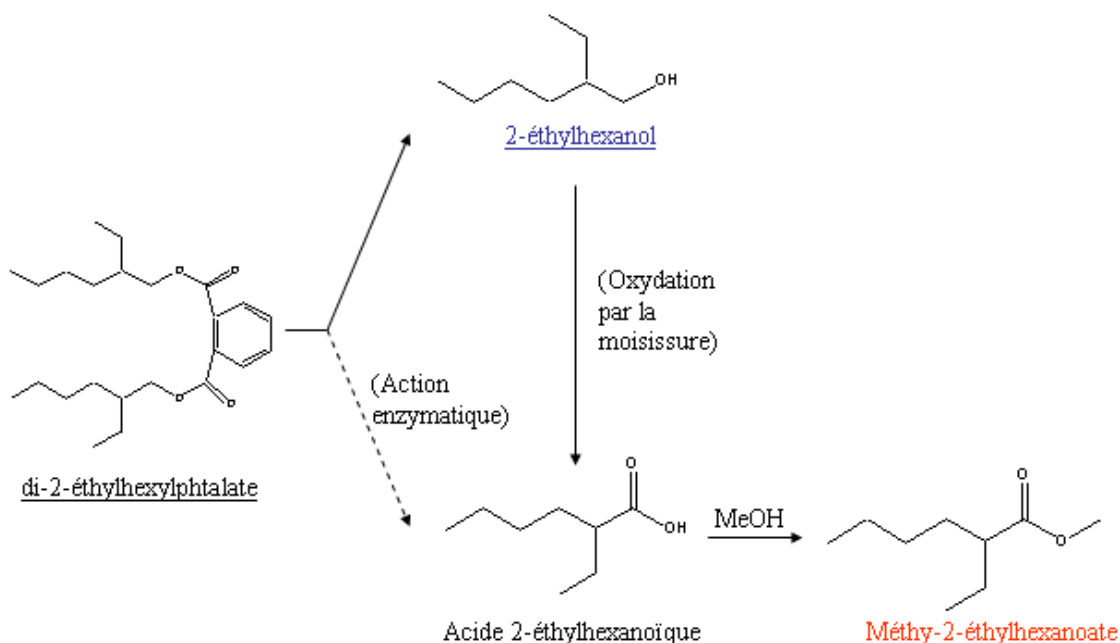


Figure III-9 : Schémas réactionnels supposés pour la formation du méthyl-2-éthylhexanoate (MeOH : méthanol)

I.4.B Concentration des principales émissions

Nous avons caractérisé quantitativement les émissions des COV issus d'un développement fongique. Nous avons comparé le taux de production en fonction des souches et de la nature du support.

Dans la pratique, nous avons employé *Aspergillus niger* et *Penicillium brevicompactum* pour contaminer de la toile de verre, qui est par ailleurs le matériau d'essais le plus émissif, et un support témoin. Ce dernier est composé de fibre de verre non émissive et de nutriments (composition en annexe). Après une incubation de 7 jours les concentrations de COV émis sont quantifiées, les résultats sont synthétisés dans le Tableau III-6 et sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Composés		Concentrations des COV ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)			
		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium brevicompactum</i>	
		Matériau témoin	Toile de verre	Matériau témoin	Toile de verre
Cas n°1	2-éthylhexanol	5,19	1153,35	3,61	41,11
	Camphre	5,86	6,41	8,61	5,23
	Isoprène	Non quantifiable	Non quantifiable	Non quantifiable	Non quantifiable
	Limonène	89,8	22,90	40,18	63,51
Cas n°3	1,3-octadiène	2,09	24,90	25,25	1,31
	1-octen-3-ol	13,23	6,06	203,54	9,68
	2-heptène	<LD	41,75	<LD	0,98
	2-méthyl-1-butanol	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	2-méthylfurane	71,68	0,95	31,22	2,62
	2-méthylisobornéol	13,23	0,49	<LD	<LD
	3,5-diméthyl-2-cyclohexen-1-one	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	3-éthyl-3-hexène	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	3-heptanol	<LD	7,34	<LD	<LD
	3-méthyl-1-butanol	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	4-heptanone	<LD	33,60	<LD	<LD
	Diisobutyl phtalate (DIBP)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Diméthyldisulfide	1,46	3,71	0,90	4,42
	Isobornyl acétate	<LD	2,79	<LD	2,80
	Méthoxy-benzène	<LD	<LD	<LD	<LD
	Méthyl-2-éthylhexanoate	0,04	2,13	0,03	1,39
	Sesquiterpène A (PM 204)	1,326	0,11	<LD	<LD
	Sesquiterpène B (PM 204)	1,38	1,72	<LD	<LD
	Sesquiterpène C (PM 204)	2,07	1,26	<LD	<LD
	Terpénoïde (PM 222)	4,14	7,20	<LD	<LD
	trans 2-octène	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	α -pinène	2,83	21,32	3,76	16,89

Tableau III-6 : Concentration des COV émis lors du développement d'*Aspergillus niger* et *Penicillium brevicompactum* sur un support témoin et sur la toile de verre. <LD inférieur à la limite de détection, <LQ composé détecté mais inférieur à la limite de quantification

Parmi les COV quantifiables, nous avons observé une plage de concentration de 0,03 à $1153,35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (valeurs surlignées en vert dans le Tableau III-6).

Pour une même espèce fongique, la quantité de COV élaborée dépend du substrat de croissance. Ainsi, l'émission du 2-méthylfurane par exemple (en jaune dans le Tableau III-6) est 70 fois plus élevée sur le matériau témoin que sur la toile de verre. Le niveau d'émission dépend également de la souche considérée, ainsi, l'émission du 2-heptène sur la toile de verre (en bleu sur le Tableau III-6) est 40 fois plus forte avec le développement d'*Aspergillus niger* que celui de *Penicillium brevicompactum*.

Ainsi, cette variabilité du taux d'émission en fonction de la souche ou du matériau ne nous permettra *a priori* pas d'utiliser ces traceurs chimiques pour une évaluation quantitative de la contamination d'un espace clos.

Impact du taux de charge

Nous avons vérifié que le taux de charge n'influait pas la nature des composés émis. En effet, les chambres d'émission utilisées lors de nos essais ont été conçues afin d'obtenir de fortes concentrations de COV. Pour cela, nous avons utilisé un taux charge important : surface contaminée/volume de la chambre d'essais de $17 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Afin de vérifier que ce taux n'influaient pas la nature des composés émis en favorisant par exemple d'éventuelles réactions entre molécules, nous avons abaissé ce taux de charge à $0,5 \text{ m}^2/\text{m}^3$.

Pratiquement, nous avons contaminé $0,5 \text{ m}^2$ d'un papier peint vinyl avec *Aspergillus versicolor* et placé ce substrat dans une chambre d'essais de 1 m^3 . Après 10 jours d'incubation, les COV émis sont identifiés (Tableau III-7).

Emissions de COV spécifiques
α -pinène
1,3-octadiène
1-octène-3-ol
2-éthylhexanol
2-heptène
2-méthyl-1-butanol
2-méthylfurane
3,5-diméthyl-2-cyclohexen-1-one
3-méthyl-1-butanol
4-heptanone
Isoprène
Limonène
Méthyl-2-éthylhexanoate
Méthoxybenzène

Tableau III-7 : Liste des COV fongiques émis par la croissance d'*Aspergillus versicolor* sur papier peint vinyl (n=3).

Nous constatons que les 14 molécules déjà identifiées avec un taux de charge de $17 \text{ m}^2/\text{m}^3$ sont également présentes dans ces conditions plus proches de la réalité.

Application numérique

Pour apprécier le niveau de détection que nous pourrions avoir dans un habitat dont un mur serait contaminé, nous avons réalisé une simulation numérique d'émission à partir d'une chambre modèle:

Volume de la chambre		17,4 m^3
Surface	sol	7 m^2
	mur	24 m^2
	joint	0,2 m^2
Taux de renouvellement (TRA)		0,5 vol/h
Surface contaminée		0,1 m^2
Taux de charge (L)		0,00057471 m^2/m^3
Taux de ventilation spécifique $Q=\text{TRA}/L$		2,87 $\text{m}^3/\text{m}^2/\text{h}$

Ainsi si nous prenons le cas du 4-heptanone, dont la cinétique d'émission est constante pendant 25 jours et a été mesurée après 7 jours à $33,60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (surface contaminée de 50 cm^2). Le facteur d'émission de cette molécule est calculé à $0,40 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$. En prenant en considération le taux de renouvellement de la chambre et avec un mur contaminé de $0,1 \text{ m}^2$, la

concentration de ce COV spécifique serait de $1,392 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ce niveau de concentration s'avère accessible par les méthodes de prélèvement et d'analyse que nous employons.

I.5 RECHERCHE DES TRACEURS CHIMIQUES SPECIFIQUES

Comme attendu, les COV émis en présence d'un développement fongique peuvent avoir deux origines : le métabolisme de la moisissure et la biodégradation du support de croissance.

Les COV issus de la biodégradation fongique sont des constituants du matériau libérés dans l'environnement après une action mécanique (croissance mycélienne) ou biochimique (libération d'enzymes, d'acides,...). Ces COV sont peu spécifiques car susceptibles d'être émis quel que soit le type de dégradation (suite au vieillissement du matériau par exemple). Ainsi, ces composés sont susceptibles d'être émis en présence mais également en l'absence d'une croissance fongique. Aussi, nous ne retiendrons pas ces molécules comme traceurs de la croissance fongique. Pratiquement, nous éliminons tous les COV issus des produits de construction testés. Sur la première liste établie de 28 COV spécifiques du développement fongique, dix composés sont écartés (Tableau III-8).

1,3-octadiène	COV également présents sur le support en absence de développement fongique, nous éliminons : - 2-éthylhexanol, - camphre, - isoprène, - limonène.	1,3-octadiène
1-octen-3-ol		1-octen-3-ol
2(5H)-furanone		2(5H)-furanone
2-éthylhexanol		2-heptène
2-heptène		2-méthyl-1-butanol
2-méthyl-1-butanol		2-méthylfuran
2-méthylfuran		2-méthylisobornéol
2-méthylisobornéol		3-heptanol
3,5-diméthyl-2-cyclohexen-1-one		3-méthyl-1-butanol
3-éthyl-3-hexène		4-heptanone
3-heptanol	COV détectés après la dénaturation artificielle du matériau, les COV suivants ne seront pas retenus : - o-hydroxyphenyl, - trans-2-octène, - 3,5-diméthyl-2-cyclohexen-1-one, - isobornyl acétate, - 3-éthyl-3-hexène, - diisobutyl phtalate	Diméthylsulfide
3-méthyl-1-butanol		Méthoxy-benzène
4-heptanone		Méthyl-2-éthylhexanoate
Camphre		Sesquiterpène A (PM 204)
Diisobutyl phtalate (DIBP)		Sesquiterpène B (PM 204)
Diméthylsulfide		Sesquiterpène C (PM 204)
Isobornyl acétate		Terpénoïde (PM 222)
Isoprène		trans 2-octène
Limonène		α -pinène
Méthoxy-benzène		
Méthyl-2-éthylhexanoate		
o-hydroxyphenyl		
Sesquiterpène A (PM 204)		
Sesquiterpène B (PM 204)		
Sesquiterpène C (PM 204)		
Terpénoïde (PM 222)		
trans 2-octène		
α -pinène		

Tableau III-8 : Elimination des COV potentiellement issus des produits de construction

Une liste de 18 composés issus spécifiquement du métabolisme fongique a donc été retenue. De manière à clairement distinguer les COV issus du métabolisme et leur potentielle

dépendance du substrat, nous avons comparé tous les COV produits avec les 5 matériaux et avec ceux issus d'un substrat de croissance témoin. Ce dernier est essentiellement constitué d'un support en fibre de verre non émissif et de nutriments simples (composition en annexe).

Composés	COV émis après croissance sur les 5 produits de construction	COV émis sur le substrat témoin
1,3-octadiène	+	+
1-octen-3-ol	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+
2-méthylfuran	+	+
2-méthylisobornéol	+	+
3-méthyl-1-butanol	+	+
Diméthyldisulfide	+	+
Méthoxy-benzène	+	+
Méthyl-2-éthylhexanoate	+	+
Sesquiterpène A (PM 204)	+	+
Sesquiterpène B (PM 204)	+	+
Sesquiterpène C (PM 204)	+	+
Terpénoïde (PM 222)	+	+
α -pinène	+	+
2(5H)-furanone	+	
2-heptène	+	
3-heptanol	+	
4-heptanone	+	

Tableau III-9 : COV issus du métabolisme fongique comparé aux émissions sur un substrat témoin en présence d'un développement fongique d'*Aspergillus niger*, *A. versicolor* et *Penicillium brevicompactum* (prélèvement réalisés après 7 jours d'incubation ; n=5)

Nous constatons qu'en dehors de 4 COV : le 3-heptanol, le 2-heptène, le 4-heptanone et le 2(5H)-furanone, tous les autres COV issus du métabolisme fongique sont produits avec le matériau témoin. Ce résultat montre l'indépendance par rapport au substrat des 14 premiers COV listés dans le Tableau III-9. Nous supposons ainsi que, quelque soit la nature du support de croissance, ces composés seront des traceurs de choix pour la détection des moisissures.

I.6 PROPOSITION D'UN INDICE CHIMIQUE DE CONTAMINATION FONGIQUE

I.6.A Construction de l'indice

Nous avons établi un indice de contamination permettant de regrouper l'ensemble des informations fournies par la présence des traceurs identifiés.

Les précédents résultats ont montré que la présence ou l'absence de ces COV n'avait pas la même importance selon leurs origines (dégradation ou métabolisme) et selon leur spécificité à une espèce ou un matériau.

Nous avons synthétisé dans le Tableau III-10 la liste des 18 traceurs retenus ainsi que leurs spécificités.

COV issu du métabolisme fongique		
COV indépendants de l'espèce et du support	COV dépendants du support et /ou du champignon	
	spécifiques du fongique	spécifiques du support
1,3-octadiène 1-octen-3-ol 2-méthyl-1-butanol 2-méthylfuran 3-méthyl-1-butanol α -pinène Méthyl-2-éthyl-hexanoate	2 (5H)-furanone 3-heptanol 4-heptanone Méthoxybenzène	
	2-méthylisobornéol Sesquiterpène A Sesquiterpène B Sesquiterpène C Terpénoïde	2-heptène Diméthyldisulfide

Tableau III-10 : Synthèse des traceurs chimiques retenus.

Afin de construire cet indice, nous avons tenu compte des observations suivantes :

- Les COV issus de la biodégradation ne permettent pas de conclure sur la présence d'une croissance fongique, car ils sont susceptibles d'être à l'origine de toutes les autres formes de dégradation.
- La présence de COV issus du métabolisme fongique qui seraient indépendants de l'espèce et du substrat. L'absence de ces composés la rend peu probable.
- La présence de COV du métabolisme dépendant de l'espèce ou du matériau implique la croissance. L'absence de ces composés ne permet pas de conclure.

Afin de formaliser l'ensemble de ces observations, un indice est calculé en fonction de la présence ou de l'absence de chacun de ces 18 COV. La méthode d'incrémentation de cet indice est schématisée sur la Figure III-10 :

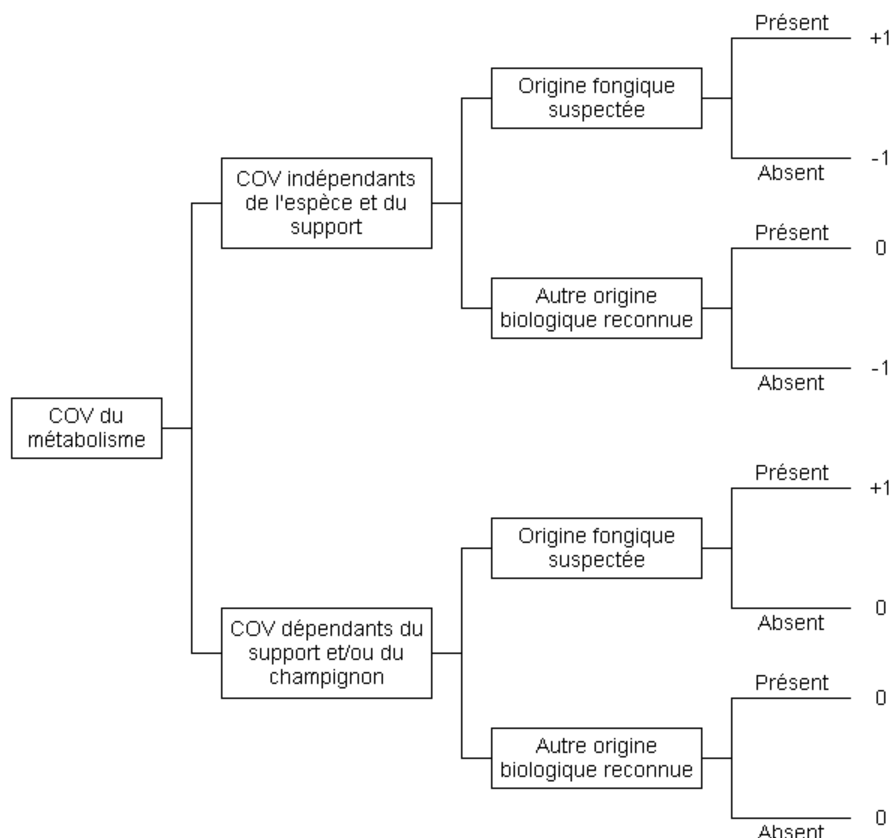


Figure III-10 : Incrémentation de l'indice chimique de contamination fongique

Concernant le méthyl-2-hexanoate, nous avons pris en compte que la formation de cette molécule pourrait être due à la transformation de 2-éthylhexanol par la moisissure. La règle d'incrémentation que nous avons appliquée dans ce cas est décrite dans la Figure III-11.

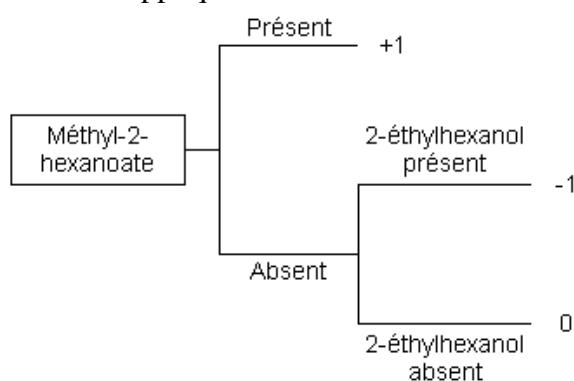


Figure III-11 : Incrémentation spécifique au couple 2-éthylhexanol / méthyl-2-hexanoate

D'après la construction de cet indice, une valeur élevée rend probable la présence d'un développement fongique, *a contrario*, une valeur faible l'exclut. La liste de traceurs retenus implique un indice couvrant une échelle allant de -7 (aucun traceur n'est détecté) à +15 (tous les traceurs sont détectés).

Toutefois, compte tenu de la spécificité de plusieurs traceurs, à un matériau ou une espèce, il est peu probable que l'ensemble des COV spécifiques soit présent, même dans le cas d'une contamination fongique. Par conséquent, la valeur maximale de l'indice n'est pas attendue.

Par ailleurs il est important de noter que la valeur de cet indice ne dépend pas des concentrations des COV mesurées. Par conséquent, la valeur absolue de cet indice n'indique pas un niveau de contamination mais est liée à une probabilité de présence fongique.

Les indices attribués à chaque composé sont répertoriés dans le Tableau III-11

COV issus du métabolisme	Incrémentation de l'indice		Observations
	Présent	Absent	
1-octen-3-ol	1	-1	COV du métabolisme dont l'origine fongique a été validé de façon fragmentaire dans la littérature
1,3-octadiène	1	-1	
2-méthylfurane	1	-1	
α -pinène	0	-1	COV du métabolisme dont l'origine biologique autre que fongique limite leur interprétation à leur seule absence
3-méthyl-1-butanol	0	-1	
2-méthyl-1-butanol	0	-1	
2-méthylisobornéol	1	0	Spécifique d'un développement fongique mais leur spécificité vis-à-vis de l'espèce et/ou du support limite leur interprétation à leur seule présence
Sesquiterpène A	1	0	
Sesquiterpène B	1	0	
Sesquiterpène C	1	0	
Terpénoïde	1	0	
2-heptène	1	0	
diméthyldisulfide	1	0	
4-heptanone	1	0	
3-heptanol	1	0	
2(5H)-furanone	1	0	
Méthoxybenzène	1	0	
Méthyl-2-éthylhexanoate	1	*	COV dont l'interprétation prend en compte la présence d'un précurseur éventuel (Figure III-11)

Tableau III-11 : Valeur d'indice pour chaque COV du métabolisme

I.6.B Application à des mesures et investigations *in situ*

I.6.B.1 Mesure des COV spécifiques dans des habitats

Nous avons analysé les chromatogrammes de prélèvements réalisés lors d'une étude sur la qualité de l'air menée par l'OQAI. 12 habitations sur 369 ont été choisies : 5 prises au hasard avec au moins une pièce ayant une tache de moisissure visible supérieure à 1 m² (habitation 1, 2, 3, 4, et 5) et 7 prises au hasard sans signe visible de contamination fongique (habitation 7, 8, 9, 10, 11, et 12). Les résultats obtenus sont référencés dans le Tableau III-12.

Composés	Habitation avec contamination visible					Habitation sans contamination visible						
	Hab. 1	Hab. 2	Hab. 3	Hab. 4	Hab.5	Hab.6	Hab.7	Hab.8	Hab.9	Hab.10	Hab.11	Hab.12
1-octen-3-ol	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1,3-octadiène	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
méthyl-2-éthylhexanoate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-éthylhexanol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
α -pinène	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-méthylfurane	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
3-méthyl-1-butanol	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-méthyl-1-butanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diméthyldisulfide	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2-héptène	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
2-méthylisobornéol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sesquiterpène A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sesquiterpène B	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
Sesquiterpène C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Terpénoïde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-heptanone	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-heptanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Méthoxybenzène	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2(5H)-furanone	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau III-12 : Liste des COV issus du métabolisme identifiés dans 12 habitations (0 = absence du composé, 1 = présence du composé)

Nous constatons la présence systématique de l' α -pinène et du 3-méthyl-1-butanol. Cette observation confirme l'hypothèse que ces composés possèdent de nombreuses sources d'émission (moisissures, bactéries, plantes).

I.6.B.2 Application de l'indice de contamination

L'indice de contamination établi précédemment a été calculé pour chaque habitation. Les valeurs de cet indice sont répertoriées dans le Tableau III-13:

Habitation avec contamination visible	Valeur de l'indice	Habitation sans contamination visible	Valeur de l'indice
H1	4	H6	-3
H2	3	H7	-4
H3	2	H8	-3
H4	3	H9	2
H5	3	H10	0
		H11	0
		H12	-4

Tableau III-13 : Valeurs des indices attribuées à chaque habitation

Les habitations présentant une contamination visible ont toutes un indicateur supérieur ou égal à 2. Cette valeur positive de l'indice confirme donc la présence probable d'un développement fongique dans ces habitations.

A l'exception de l'habitation n°9, les habitations sans contamination visible ont des indicateurs inférieurs ou égaux à 0. La valeur des indices est donc corrélée à la présence d'un développement fongique.

D'après cette étude, un indice supérieur ou égale à 2 permet de suspecter une présence fongique dans un habitat. A l'inverse, un indice négatif ou nul permet de conclure à l'absence de développement fongique.

L'habitation n°9, classée dans les logements a priori « sains », se comporte, en termes de traceurs chimiques, de la même manière que les habitations dont la contamination fongique est avérée (indicateur égal à 2). La présence de plantes sur lesquelles des moisissures peuvent se développer ou d'une contamination non visible (récente ou masquée) pourrait expliquer ce résultat inattendu.

Pour vérifier ces hypothèses nous associons ces résultats à un questionnaire soumis aux occupants de chaque habitation. Parmi les différentes questions, six pouvaient être associées à la présence de nos traceurs. Ces questions ainsi que les réponses associées pour chaque habitation sont répertoriées dans le Tableau III-14 :

	Moississures visibles sur plus 1m ²	Présence d'humidité dans l'habitation	Infiltrations d'eau au cours des 12 derniers mois	Traitement contre l'humidité	Présence de plantes	Odeur de moisi détecté par les enquêteurs
Habitation 1	1	1	0	0	0	1
Habitation 2	1	1	1	0	1	1
Habitation 3	1	1	1	1	1	1
Habitation 4	1	1	1	0	1	0
Habitation 5	1	1	1	0	1	0
Habitation 6	0	0	0	0	1	0
Habitation 7	0	0	0	0	1	0
Habitation 8	0	0	0	0	1	0
Habitation 9	0	0	1	0	1	0
Habitation 10	0	0	0	0	0	0
Habitation 11	0	0	0	0	1	0
Habitation 12	0	0	0	0	1	0

Tableau III-14 : Résultat du questionnaire soumis aux propriétaires des habitations enquêtées
(1=oui, 0=non)

Nous constatons que l'habitation n°9 (sans signe visible mais avec un indice positif) a subi des infiltrations d'eau au cours des 12 mois précédant le prélèvement (réponse surlignée dans le Tableau III-14). Il est probable que ces infiltrations aient engendré une contamination fongique qui n'a pas été détectée visuellement. Par conséquent, l'indice établi a permis de détecter une contamination avant les premières traces visibles d'une croissance fongique.

Les prélèvements terrains ont donc permis la validation de l'indice de contamination établi. Ainsi, un score inférieur ou égal à 0 semble exclure la présence d'une croissance fongique, alors qu'un score supérieur ou égal à 2 la confirme.

I.7 DETERMINATION D'UNE VARIABLE DE CONTAMINATION PAR UNE ETUDE STATISTIQUE

Compte tenu des faibles proportions dans lesquelles sont émis les COV du métabolisme, certains composés risquent d'être masqués par les émissions plus importantes du matériau et une partie de l'information peut être totalement cachée.

Afin de compléter l'indice précédemment établi, nous proposons de définir une variable globale de contamination fongique sans préjuger de la nature des molécules.

Pour cela, nous proposons une approche originale basée sur l'analyse statistique des données obtenues lors des prélèvements réalisés précédemment sur les matériaux contaminés, en considérant le spectre global de la totalité de chaque chromatogramme obtenu par GC/MS. L'outil statistique utilisé permettra alors de définir un comportement caractéristique d'un environnement moisi indépendant du reste de l'émission.

I.7.A Analyse sur l'ensemble des essais

A partir des résultats obtenus par spectrométrie de masse, nous sommes pour chacun des 53 essais et sur toute la durée d'analyse, fixée à 80 minutes, l'intensité du signal associée à chaque ions fragments.

Compte tenu des techniques analytiques utilisées, seuls les ions possédant un rapport (masse sur charge) compris entre 35 et 425 seront considérés, soit 390 ions fragments.

Les résultats se présentent sous forme d'une matrice de 53 lignes ou observations (essais) et 390 colonnes ou variables (ions). L'intersection d'une ligne et d'une colonne représente la somme des signaux obtenus pour chaque ion sur l'ensemble du chromatogramme.

Les dimensions de cette matrice de données sont telles qu'il n'est pas possible de repérer directement les similitudes de comportements statistiques entre les essais (individus) ou les ions (variables). Afin d'analyser ces résultats, nous avons choisi d'utiliser l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette technique permet une représentation statistique de l'ensemble des données sans émettre d'hypothèse et sans utiliser de modèle a priori. L'ACP conduit à des représentations graphiques approchées et optimales du nuage de points représentant la matrice de données. Chaque facteur de l'ACP est une combinaison linéaire de variables représentant le maximum de variance dans le nuage de points. Les facteurs sont orthogonaux entre eux de manière à ne prendre en compte que des sources de variance indépendantes. Deux espaces sont ainsi construits avec les mêmes facteurs : un espace vectoriel des variables et un espace des observations. Deux facteurs définissent un plan sur lequel les points (observations) ou les vecteurs sont projetés. La proximité entre deux vecteurs (variables) indique une corrélation linéaire forte entre ces deux variables, de même pour la proximité entre deux points. Les groupes d'observations et de variables ainsi définis permettent d'appréhender la structure des données peu évidente au premier abord.

L'ACP est normée (sur données centrées réduites).

L'ACP a donc été utilisé comme un outil exploratoire qui permet de visualiser et d'expliquer les relations entre les données.

Dans un premier temps l'ACP permet, au travers de calculs statistiques de déterminer le repère le plus représentatif de nos données. Le Tableau III-15 représente le poids des axes (facteurs) définis par l'ACP.

Axes	Valeurs propres	Pourcentages	Pourcentages cumulés
1	224.0	57.30	57.30
2	61.3	15.68	72.97
3	35.5	9.07	82.05
4	22.93	5.84	87.89
5	14.1	3.61	91.5

Tableau III-15 : Poids des facteurs défini par l'ACP

Les valeurs propres représentent le poids des variables par rapport à un axe. Ainsi l'axe 1 est représentatif de 224 variables sur 390. Les deux premiers facteurs retenus totalisent plus de 70% de la variance globale, le plan principal regroupe donc l'essentiel de l'information et sera retenu pour la représentation graphique.

Afin d'identifier les variables responsables des comportements observés, nous projetons les 390 ions sur le cercle de corrélation (Figure III-12). La longueur des vecteurs obtenus informe sur leur représentativité dans le cercle défini par le plan principal.

Ainsi, une variable est d'autant mieux représentée dans le plan choisi que la norme du vecteur est proche du cercle unitaire de valeur 1.

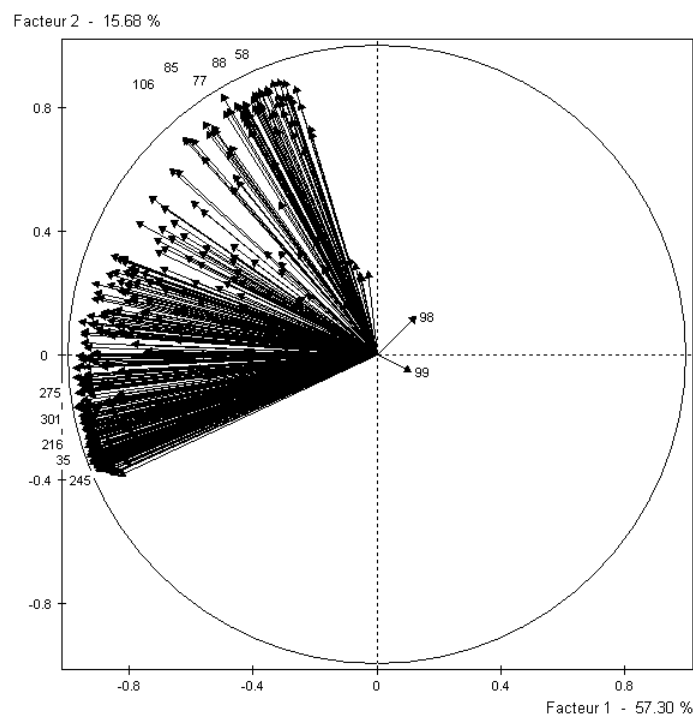


Figure III-12 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.

Les ions 98 et 99, respectivement indépendant et anti-corrélé par rapport aux autres ions, sont mal représentés dans le plan principal. Par conséquent, il n'est pas possible de tirer de conclusions à propos de leur comportement « atypique ».

Le plan principal est présenté Figure III-13, les points représentent les différents essais. Le code utilisé dans ce graphique est le suivant : les essais avec *Aspergillus niger* sont en noir, ceux avec *Penicillium brevicompactum* en rouge, *Aspergillus versicolor* en bleu et les matériaux non contaminés (témoins) en gris. La taille des points est proportionnelle à leur $\cos^2$, qui définit la qualité de leur projection sur le plan. Ainsi plus le point est gros mieux il est représenté.

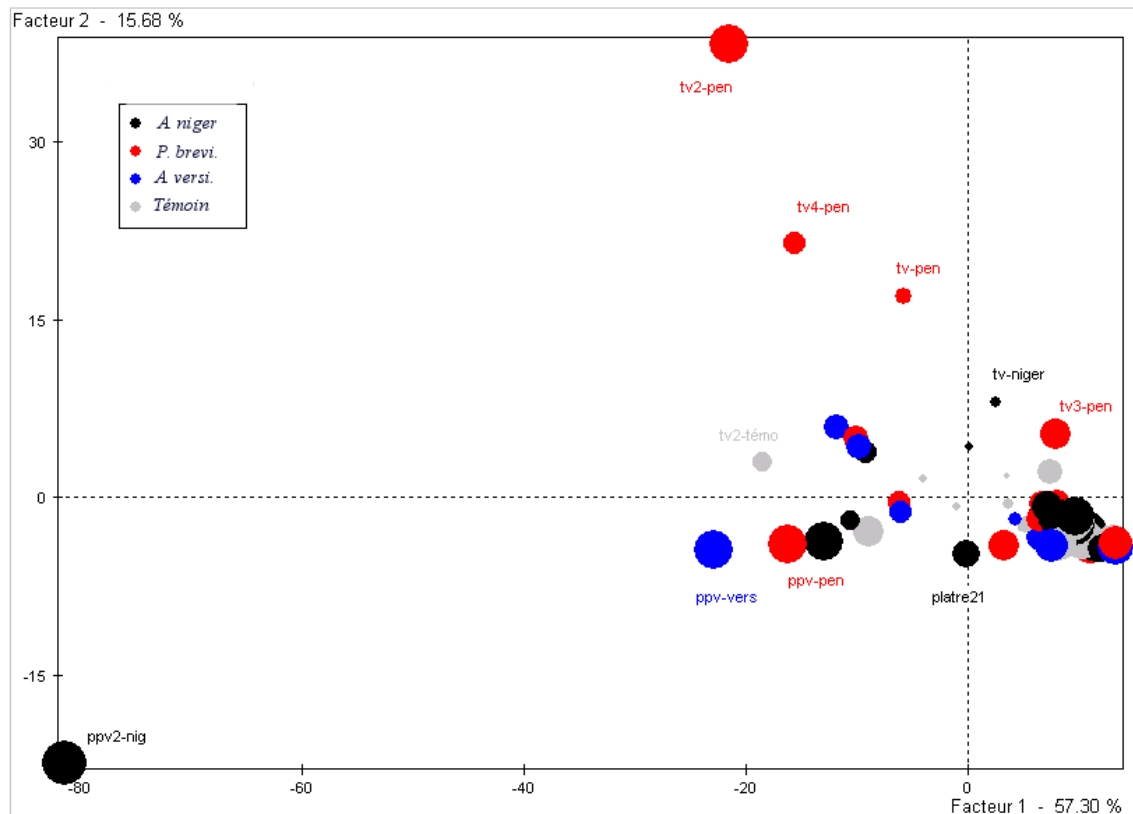


Figure III-13 : Plan principal de l'ACP sur 53 essais et 397 ions (distinction entre espèces fongiques et témoins)

Nous constatons que la plupart des points sont dispersés dans l'espace sans distinction entre les témoins et les matériaux contaminés. Par conséquent, l'impact de la croissance fongique ne ressort pas de l'émission globale. Les différences liées à la croissance fongique sont masquées par les différences liées au matériau.

En considérant la même représentation d'un point de vue matériaux et non plus moisissure, nous constatons des similitudes statistiques pour un même matériau. La Figure III-14 représente le plan principal en tenant compte de cette nouvelle approche. La manière de coder les essais est la suivante : les essais sur fibre de verre sont en bleu, toile de verre en vert foncé, papier peint vinyl en prune, dalle de plafond en vert claire et plâtre en gris.

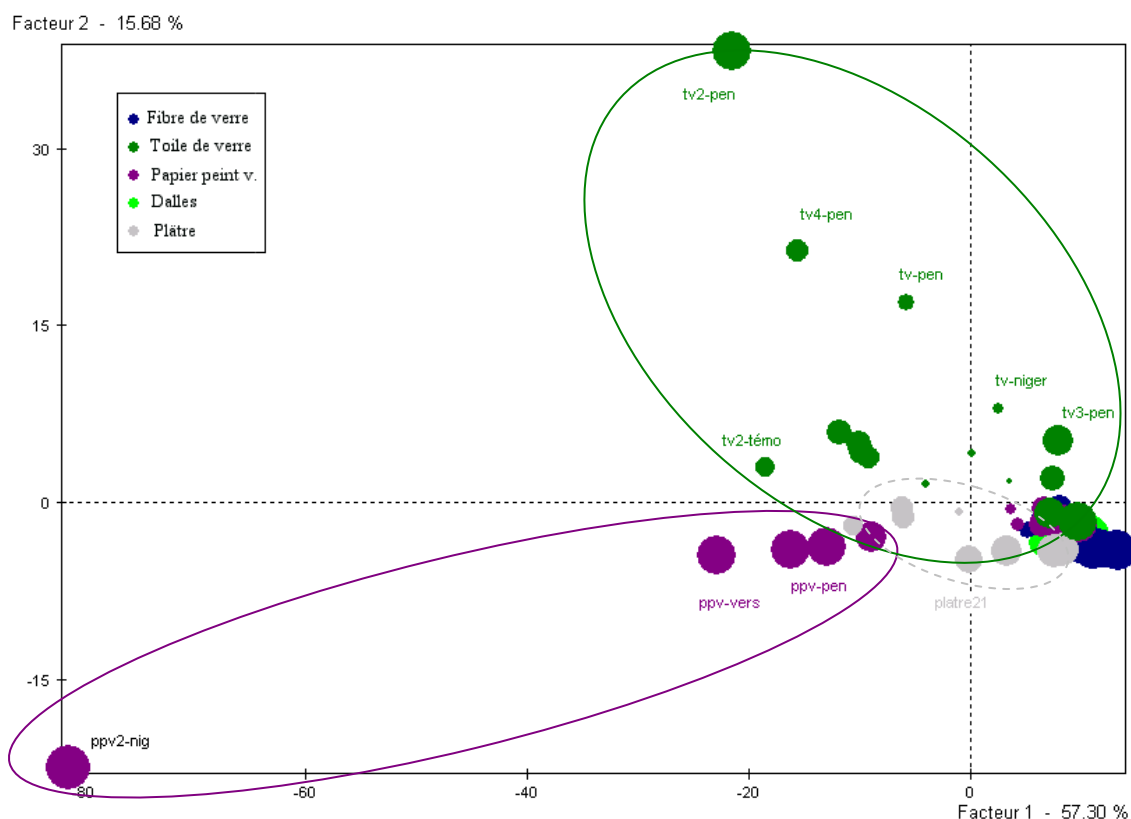


Figure III-14 : Plan principal de l'ACP sur 53 essais et 397 ions (distinction entre matériaux)

Nous observons 4 groupes distincts : La toile de verre, le papier peint, le plâtre et les deux autres matériaux. La dalle et la fibre de verre, les matériaux les moins émissifs, ne semblent pas se distinguer sur ce plan.

Nous confirmons ainsi que les forts niveaux d'émission des matériaux masquent les émissions fongiques.

Pour confirmer cette observation, les essais sont regroupés par matériaux et par contamination (variables illustrative). Les points de chaque catégorie sont alors remplacés par leur centre d'inertie (Figure III-15).

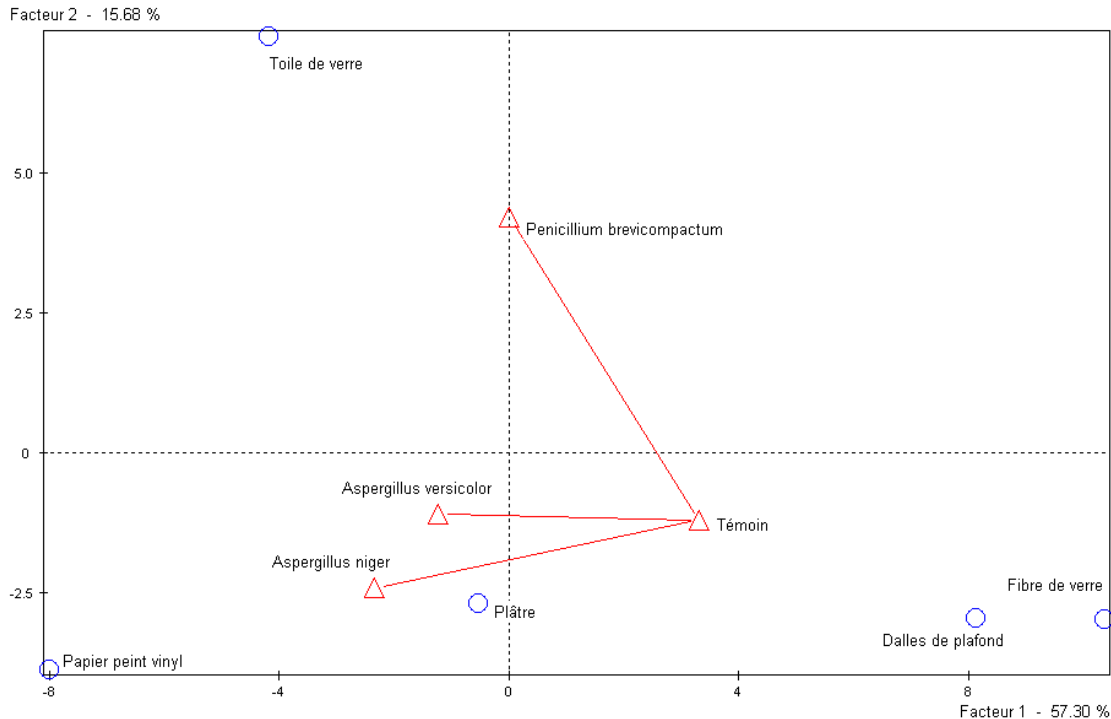


Figure III-15 : Centre d'inertie des variables continues actives

Nous constatons que les écarts entre les points associés aux matériaux sont plus importants que ceux des contaminations. Les différences sont donc principalement dues à l'émission du support.

Le facteur 1 permet de séparer les matériaux stériles des contaminés. Le facteur 2, représentatif d'environ 15% des données, est à l'origine des différences observées entre *Penicillium brevicompactum* et les 2 espèces d'*Aspergillus*. La représentation des variables continues actives (Figure III-12) permet de distinguer 2 groupes de variables : une tendance générale propice au facteur 1 (vecteurs proches de l'axe des abscisses) et une seconde tendance liée au facteur 2 (vecteurs proche de l'axe des ordonnées). Ces variables sont donc à l'origine des différences observées sur la Figure III-15.

Bien que les émissions dues aux matériaux masquent le reste de l'information, il existe donc une variable de contamination fongique liée à l'axe 2. La faible représentativité de cet axe explique le faible impact de la croissance sur l'émission globale.

En comparant les trajectoires définies par les couples témoin-moisissure sur la Figure III-15 et les vecteurs formés par les variables (Figure III-12), nous pouvons attribuer les différences observées à des ions. Ainsi, en superposant les origines des axes de ces deux graphiques nous constatons que certains vecteurs sont parallèles aux directions témoin-moisissure. Les ions associés à ces vecteurs expliquent les différences de comportements constatées :

Penicillium brevicompactum : 47, 126, 130, 157, 282, 341.

Aspergillus niger : 184, 206, 214, 219, 236, 242, 246, 260, 261, 279.

Aspergillus versicolor : 160, 200, 270, 237.

Ainsi, nous constatons que les différences de comportements observées entre les matériaux en présence et en l'absence d'un développement fongique sont principalement dues à des ions de masse supérieure à 200, caractéristique de sesquiterpènes ou de molécules cycliques.

L'ensemble de ces résultats montre que des différences peuvent être observées à condition que l'on s'affranchisse des émissions liées aux matériaux. Il semble donc possible de déterminer une variable de contamination.

I.7.B Analyse par matériau

Afin de s'affranchir des différences liées aux matériaux et ainsi détecter celles liées aux moisissures, nous construisons des matrices différentes pour chaque matériau. De plus, pour ne pas avoir des points influencés par un essai, nous ne retenons que les essais ayant des niveaux d'émission globale comparables.

Les nouvelles matrices sont donc construites à partir des mêmes colonnes que la matrice générale, mais en sélectionnant uniquement les essais sur un même matériau (lignes).

Ainsi, deux essais ont été sélectionnés pour le papier peint vinyl ainsi que pour le plâtre et un essai pour la fibre de verre, la toile de verre, ainsi que la dalle de plafond.

Une analyse en composante principale (ACP) a été appliquée à ces matrices. Le Tableau III-16 représente le poids des facteurs définis par l'ACP.

Axes	Valeurs propres	Pourcentages	Pourcentages cumulés
Papier peint vinyl			
1	335,9729	85,93	85,93
2	43,7907	11,2	97,13
Plaque de plâtre			
1	330,963	84,65	84,65
2	38,0988	9,74	94,39
Dalle de plafond			
1	258,6621	66,15	66,15
2	82,3926	21,07	87,23
Fibre de verre encrassée			
1	329,0742	84,16	84,16
2	80,3370	20,55	88,61
Toile de verre			
1	329,0742	84,16	84,16
2	33,1867	8,49	92,65

Tableau III-16: Résultats de l'ACP par matériaux.

Pour l'ensemble des matériaux, les axes principaux permettent de décrire à eux seuls plus de 85% de la matrice. Ils seront donc retenus.

Le plan principal est présenté Figure III-13. Le codage utilisé dans ces graphiques est le suivant : les essais avec *Aspergillus niger* sont en noir, ceux avec *Penicillium brevicompactum* en rouge, *Aspergillus versicolor* en bleu et les témoins en gris.

Les projections des nuages de points pour chaque matériau sont représentées sur la Figure III-16 :

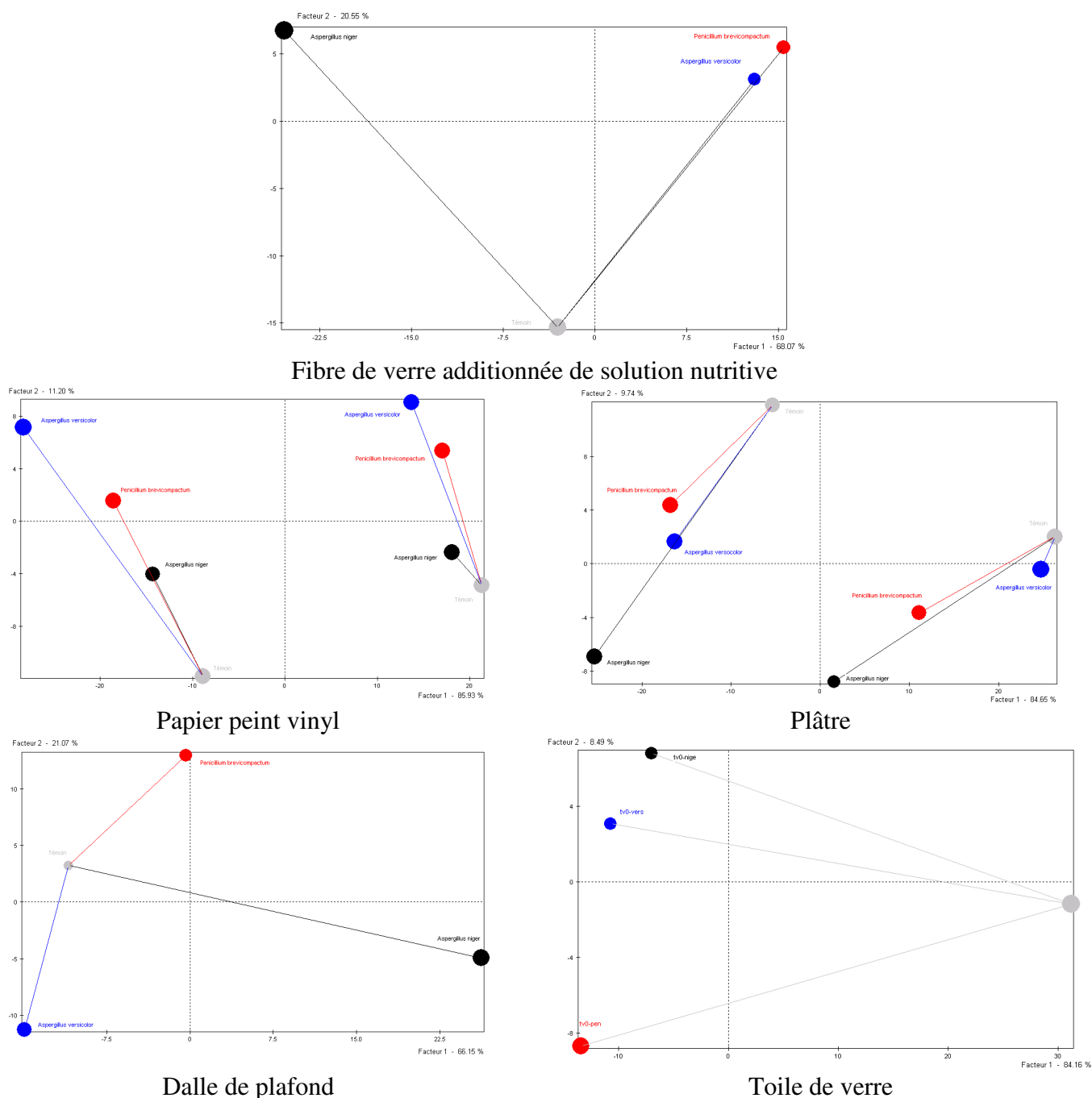


Figure III-16 : Plans principaux des ACP sur chaque matériau (●Témoin, ●*Aspergillus niger*, ●*Aspergillus versicolor*, ●*Penicillium brevicompactum*)

Nous constatons que le facteur 2 montre pour la plupart des matériaux une différence entre le témoin et les matériaux contaminés. Ceci confirme que l'impact du matériau masquait l'information liée à la moisissure.

Sur la fibre de verre additionnée d'une solution nutritive, support sur lequel l'émission est principalement liée au métabolisme, l'*Aspergillus niger* montre une opposition avec les deux autres moisissures sur le facteur 1. Cette espèce semble donc avoir une émission spécifique de COV issus du métabolisme. Nous avons d'ailleurs constatée cette observation précédemment en déterminant plusieurs molécules cibles spécifiques d'*Aspergillus niger*, principalement des terpènes.

Dans le cas de la toile de verre, du plâtre et du papier peint vinyl, nous constatons des tendances liées à une contamination fongique. Seule la dalle de plafond ne présente pas de tendance générale. Sur ce matériau, le facteur 1 (d'une contribution de plus de 65%) sépare l'*Aspergillus niger* des autres essais. La dalle de plafond étant le matériau le moins vulnérable de l'étude, seul l'*Aspergillus niger* a eu une croissance forte. Ceci explique que les deux autres moisissures soient plus proches du témoin. Les différences observées sur ce matériau sont donc liées à une différence de croissance.

Les ions associés à ces tendances sont déterminés en comparant les directions témoin-moisissure aux vecteurs représentatifs des variables. Le Tableau III-17 recense les 59 ions spécifiques d'une contamination fongique :

Matériau	Espèce fongique		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Papier peint vinyl	209, 252, 326		283 et 358
Plaque de plâtre	322, 332, 338	341, 425	264, 325, 344, 423
Dalle de plafond	56, 70, 110, 112, 113	168, 355	38, 49, 66, 390
Fibre de verre	58, 140, 237, 240, 397	36, 168, 411, 413	
Toile de verre	179, 188, 194, 224, 225, 269, 301, 331, 346, 375, 397	146, 162, 183, 213, 218, 246, 261, 265, 267, 292, 317, 390	46, 62, 64, 79, 80, 93, 110

Tableau III-17 : Ions spécifiques déterminés par l'ACP

Nous constatons qu'il s'agit en majorité d'ions dont le rapport (masse/charge) est supérieur à 200. Ces ions sont caractéristiques de molécules telles que les sesquiterpènes ou d'autres molécules cycliques. Ce type de molécules est donc spécifique d'une croissance fongique.

Le Tableau III-18 associe les molécules cibles retenues aux ions ainsi définis :

COV	Ions spécifique associé
2(5H)-furanone	38
Diméthyldisulfide	46
2-méthylfuran	49, 81
2-heptène	56
3-méthyl-1-butanol	56, 70
2-méthyl-1-butanol	56, 70
2-méthylisobornéol	56, 58, 68, 79, 80, 93, 168
Méthoxybenzène	62, 64
1,3-octadiène	68, 81, 110
1-octen-3-ol	68
terpénoïde	81, 207, 341
teroinéol	81, 93
α -pinène	93
Sesquiterpène A	162
Sesquiterpène B	162, 283, 355
Sesquiterpène C	162, 283, 355

Tableau III-18 : COV issus d'un développement fongique et ions spécifiques associés

Une partie des molécules cibles que nous avons définies semble être à l'origine des tendances dégagées. Par conséquent ce résultat confirme la pertinence de nos traceurs.

Toutefois, la plupart des ions ayant un rapport masse/charge supérieur à 200 n'ont pu être associés à nos traceurs. Ces molécules n'ont donc pas été détectées par l'analyse classique, le traitement des résultats par l'ACP fournit donc une information complémentaire.

Afin de construire une variable globale de contamination à partir de ces 59 ions, nous avons calculé l'intensité moyenne des ions spécifiques considérés. Les résultats obtenus sont traités matériau par matériau et sont synthétisés dans le Tableau III-19.

	Intensité moyenne de la somme des ions spécifiques ($\times 10^5$)				
	Fibre de verre + solution nutritive	Toile de verre	Papier peint vinyl	Plâtre	Dalles de plafond
Sans développement fongique	0,24	4,50	6,79	2,29	11,34
<i>Aspergillus niger</i>	0,92	9,19	11,75	12,83	11,37
<i>Aspergillus versicolor</i>	2,80	9,83	18,92	5,27	11,61
<i>Penicillium brevicompactum</i>	5,58	10,88	14,39	6,26	12,78

Tableau III-19 : Intensités moyenne de la somme des ions spécifiques retenus (la moyenne est calculée à partir de 4 essais pour la fibre de verre, 5 sur la toile de verre, 3 sur le papier peint, 2 le plâtre, et 1 sur la dalle de plafond)

Afin d'étudier la réponse liée au métabolisme de la moisissure, nous analysons les résultats obtenus sur fibre de verre additionnée de solution nutritive.

Nous avons vu précédemment que ce matériau contaminé génère peu de produits de dégradation. Les émissions liées à ce matériau sont donc principalement des COV du métabolisme du champignon. Les résultats obtenus sur fibre de verre permettent donc d'étudier le comportement intrinsèque des moisissures vis-à-vis des ions spécifiques.

Les résultats sur fibre de verre sont représentés sous forme graphique sur la Figure III-17 :

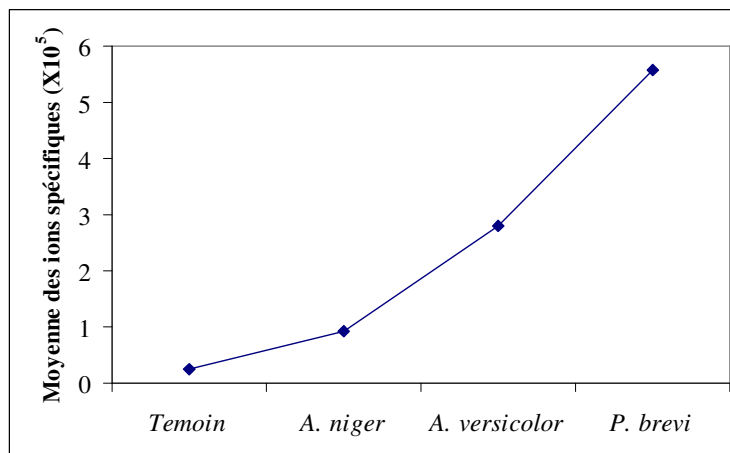


Figure III-17 : Courbe de réponse des ions spécifiques (moyenne des aires) obtenue sur fibre de verre additionnée de solution nutritive

La moyenne du témoin est faible, ce qui confirme le caractère peu émissif de ce matériau.

Nous constatons une différence significative entre le témoin et le support contaminé. Les ions spécifiques permettent donc d'obtenir une signature de la croissance fongique.

Sur ce support l'*Aspergillus niger* est l'espèce dont le développement a été le plus rapide. Par conséquent, les différences de niveau d'émissions observées sur chaque espèce ne sont pas directement associées à des différences de vitesse de croissance.

Les trois espèces ont des comportements différents : l'impact de ces ions sur *Penicillium brevicompactum* est plus important que pour *Aspergillus versicolor* puis *Aspergillus niger*.

Afin de déterminer si les ions spécifiques permettent une séparation témoin-contaminé en présence de produit de dégradation, nous avons calculé la moyenne générée par ces ions sur les autres matériaux : la dalle de plafond, le plâtre, la toile de verre et le papier peint vinyl. La représentation graphique des résultats est présentée Figure III-18.

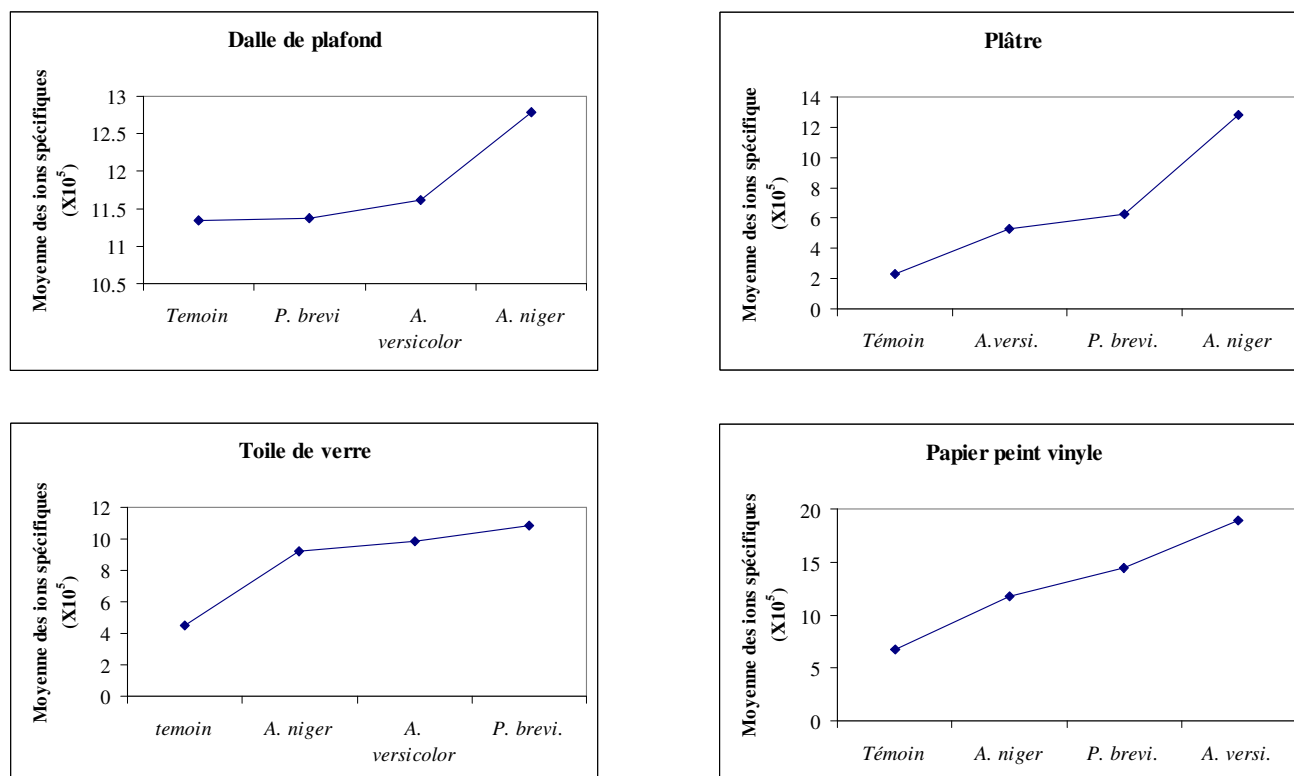


Figure III-18 : Courbes de réponses des ions spécifiques (moyenne des aires) obtenues sur dalle de plafond, plâtre, toile de verre et papier peint vinyle.

L'utilisation des ions spécifiques sur la dalle de plafond n'a pas permis de distinguer *Penicillium brevicompactum* et *Aspergillus versicolor* du témoin. Ce matériau étant peu vulnérable, nous pouvons supposer que cette observation est due à une faible croissance de ces deux moisissures. En revanche, dans le cas d'*Aspergillus niger* (espèce ayant le développement le plus important), les différences témoin/contaminé sont significatives. Par conséquent, sur ce matériau le taux d'émission de molécules spécifiques semble principalement lié au niveau de croissance de la moisissure.

En ce qui concerne les autres matériaux (plâtre, toile de verre et papier peint vinyl), nous constatons une distinction significative créée par la croissance fongique. L'injection des 59 ions spécifiques a donc permis de s'affranchir en partie de l'émission du matériau.

La disposition des matériaux par rapport au témoin change en fonction du support. Ainsi, en classant les espèces par ordre croissant d'émission des ions spécifiques nous obtenons :

- Dalle de plafond : *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor* et *A. niger*
- Plâtre : *Aspergillus versicolor*, *Penicillium brevicompactum* et *A. niger*
- Toile de verre : *Aspergillus niger*, *A. versicolor* et *Penicillium brevicompactum*
- Papier peint : *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum* et *A. versicolor*

Il n'existe donc pas de tendance indépendante du matériau liée à une espèce. La variable de contamination créée à partir des ions spécifiques ne permet pas de différencier les espèces.

Les ions sélectionnés sont donc spécifiques d'une contamination fongique globale. Ayant été déterminés à partir de matériaux fréquemment rencontrés dans l'habitat, ces ions devraient

permettre de révéler un développement fongique à partir d'un prélèvement réalisé dans des locaux contaminés.

En 1998, Pasanen a comparé la concentration globale de COV en présence d'une contamination fongique avec celle d'environnements stériles. L'étude a montré que le développement fongique n'induisait qu'une augmentation de 1% de la concentration totale des composés.

L'ACP réalisée sur l'ensemble de nos essais a également montré que l'émission de COV spécifiques pouvait être masquée par l'émission globale. Par conséquent, il ne semble pas possible de détecter un développement fongique à partir de l'émission totale de COV.

Cependant, cette même ACP a également montré des différences entre les environnements contaminés et non contaminés. Cette variation est liée à la nature de certains COV spécifiques d'une contamination fongique (spécificité confirmée par plusieurs études). Il est donc nécessaire de s'affranchir de la majorité des composés et d'étudier uniquement certains COV ou ions spécifiques.

I.8 ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES *IN SITU*

I.8.A Corrélation entre différents indicateurs

Nous souhaitons comparer l'indice de contamination avec d'autres indicateurs fongiques. Pour cela, nous avons extrait du questionnaire les indicateurs potentiels de la présence de moisissures dans chacune des 12 habitations. Nous en avons identifié 5 :

- Moisissures visibles sur plus de 1 m²
- Humidité des locaux
- Odeur de moisi
- Infiltrations d'eau
- Indice chimique strictement positif

Les plantes étant susceptibles d'émettre des COV, nous avons également comparé la corrélation entre la présence de plantes d'intérieur et un indicateur positif. La question liée à la présence de plantes est alors ajoutée.

Les résultats obtenus se présentent sous forme d'une matrice de 6 lignes (questions) et 12 colonnes (habitations). L'intersection d'une ligne et d'une colonne correspond à une réponse de forme binaire (0=non, 1=oui) (Tableau III-20).

	Moississures visibles	d'humidité des locaux	Infiltrations d'eau	Présence de plantes	Odeur de moisi
Habitation 1	1	1	0	0	1
Habitation 2	1	1	1	1	1
Habitation 3	1	1	1	1	1
Habitation 4	1	1	1	1	0
Habitation 5	1	1	1	1	0
Habitation 6	0	0	0	1	0
Habitation 7	0	0	0	1	0
Habitation 8	0	0	0	1	0
Habitation 9	0	0	1	1	0
Habitation 10	0	0	0	0	0
Habitation 11	0	0	0	1	0
Habitation 12	0	0	0	1	0

Tableau III-20 : Matrice des différents indicateurs fongiques

Une analyse en composante principale (ACP) a été appliquée à cette matrice. Les corrélations entre ces facteurs sont représentées sur la **Figure III-19**

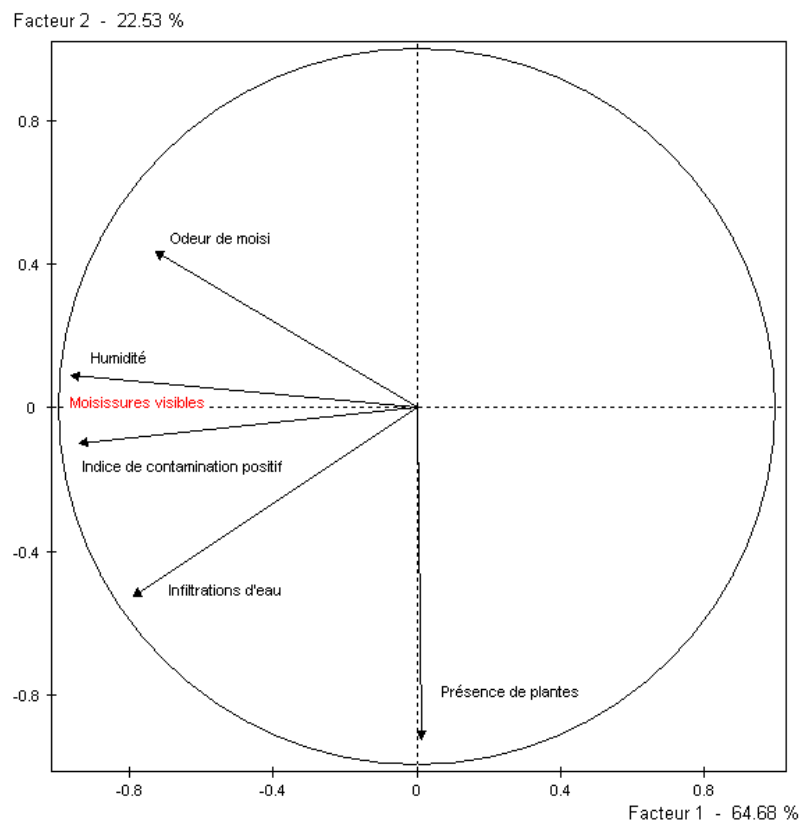


Figure III-19 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.

Notons que la présence de moisissures visibles implique forcément une contamination fongique. Cet indicateur est donc « sûr », contrairement à l'odeur de moisi, l'humidité et les infiltrations d'eau qui n'impliquent pas forcément la présence de moisissures.

L'humidité, corrélée aux moisissures visibles, reste un facteur subjectif car il n'est pas associé à une mesure. Nous devons donc rester prudents sur les conclusions à tirer de cette corrélation.

L'indice de contamination positif est l'indicateur le plus corrélé à l'indicateur « sûr » (vecteurs presque parallèles). L'écart constaté avec la présence de moisissures visibles est expliqué par la détection d'une contamination « masquée » dans l'habitat n°9.

La perpendicularité entre le vecteur « indice de contamination positif » et le vecteur « présence de plantes », montre l'indépendance de ces deux facteurs. Ce résultat montre d'une part que l'émission de COV induite par les plantes n'interfère pas dans le calcul de notre indice et d'autre part que les moisissures pouvant se développer dans la terre des plantes d'intérieures n'ont pas une émission suffisante pour être détectées.

L'indice de contamination défini est donc bien spécifique à la croissance de moisissures et est adapté aux environnements intérieurs.

Le plan principal est présenté Figure III-20, les points représentent les différentes habitations de l'étude. Le code utilisé dans ce graphique est le suivant : les habitations avec des moisissures visibles sont en vert, celles sans contamination visible en rouge.

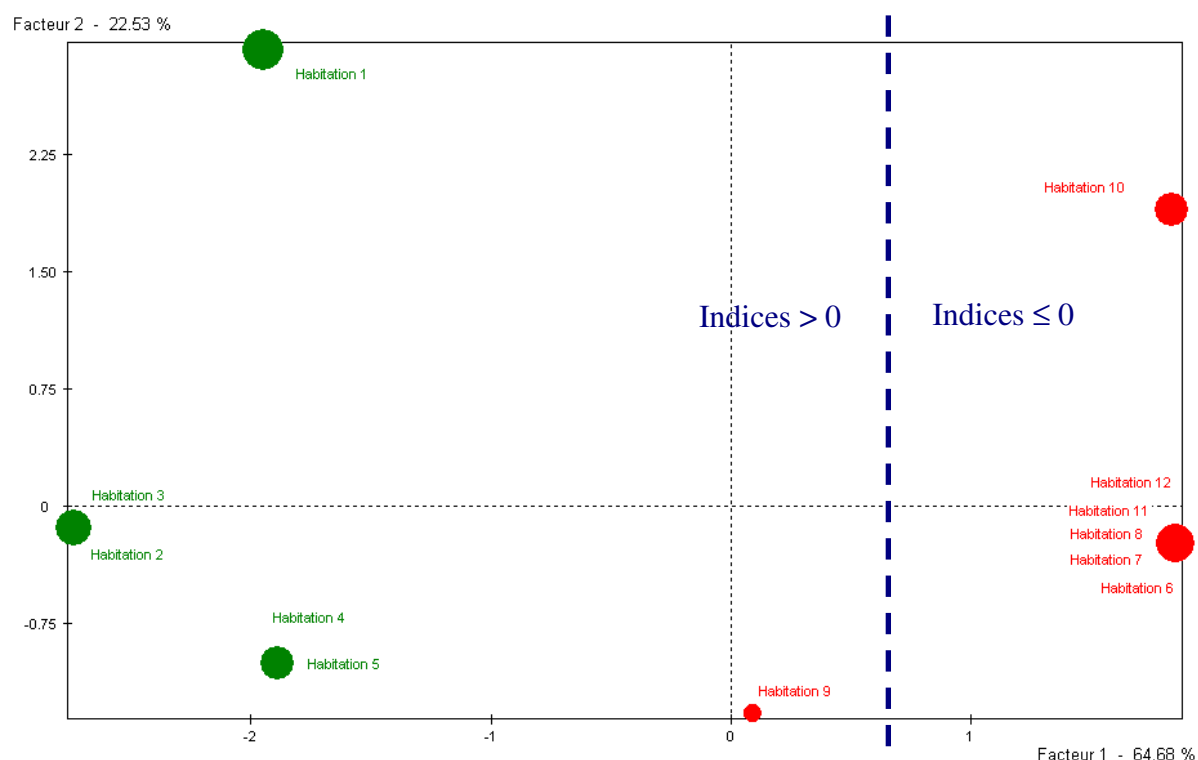


Figure III-20 : Plan principal de l'ACP sur le questionnaire

Le premier facteur (représentatif de plus de 64 % des contributions), permet de distinguer les habitations avec des moisissures visibles (à gauche) des autres habitations (à droite). Ce même facteur permet également de distinguer les habitations avec un indice strictement positif de celles avec un indice négatif ou nul.

I.8.B Application de la variable de contamination

Afin d'appliquer la variable de contamination dans un environnement réel, les signaux obtenus par la spectrométrie de masse, lors d'essais *in situ*, sont extraits. Les résultats obtenus se présentent sous forme d'une matrice de 12 lignes (habitations) et 365 colonnes (ions). L'intersection d'une ligne et d'une colonne représente la somme des signaux obtenus pour chaque ion sur l'ensemble du prélèvement.

Une analyse en composante principale (ACP) a été appliquée à cette matrice. Le Tableau III-21 représente le poids des facteurs définis par l'ACP.

Numéro	Valeur propre	Pourcentages	Pourcentages cumulés
1	250.0807	68.33	68.33
2	56.7644	15.51	83.84
3	21.5298	5.88	89.72

Tableau III-21 : Poids des facteurs défini par l'ACP

Les deux premiers facteurs retenus totalisent plus de 80 % de la variance globale, le plan principal regroupe donc l'essentiel de l'information et sera choisi pour l'analyse de la matrice.

La projection des variables sur les axes principaux est représentée Figure III-21

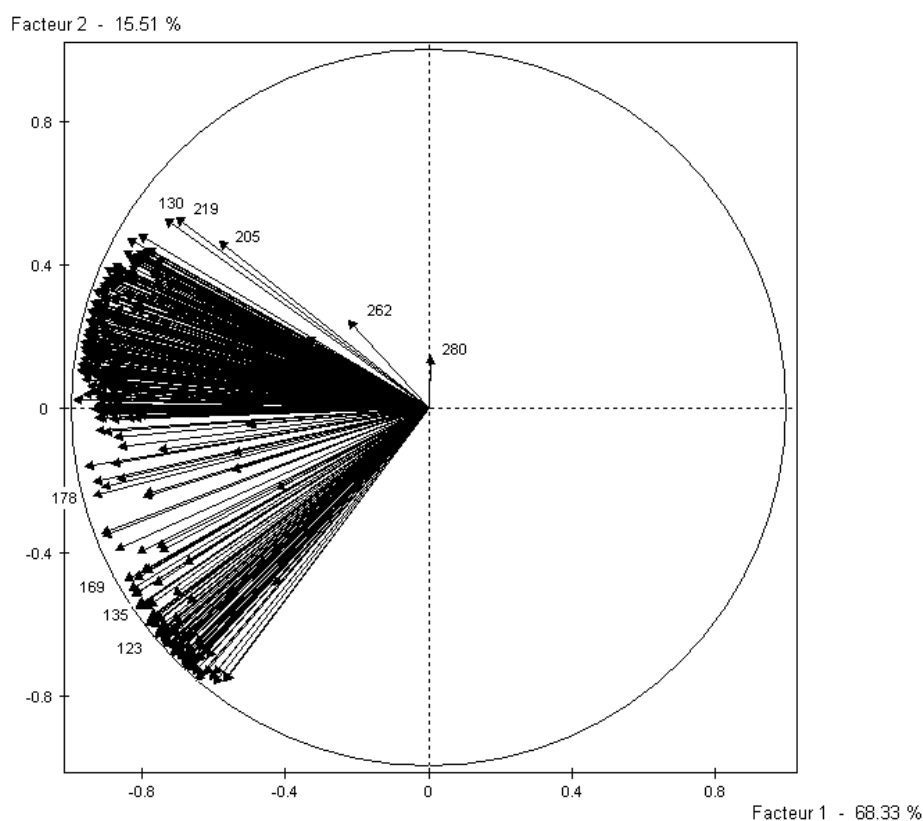


Figure III-21 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.

Le plan principal est présenté Figure III-22, les points représentent les différentes habitations. Le code utilisé dans ce graphique est le suivant : les habitations ayant un indice négatif ou nul sont en rouge, celles ayant un indice strictement positif sont en vert. Le numéro des habitations est suivi de la valeur de l'indice de contamination entre parenthèses.

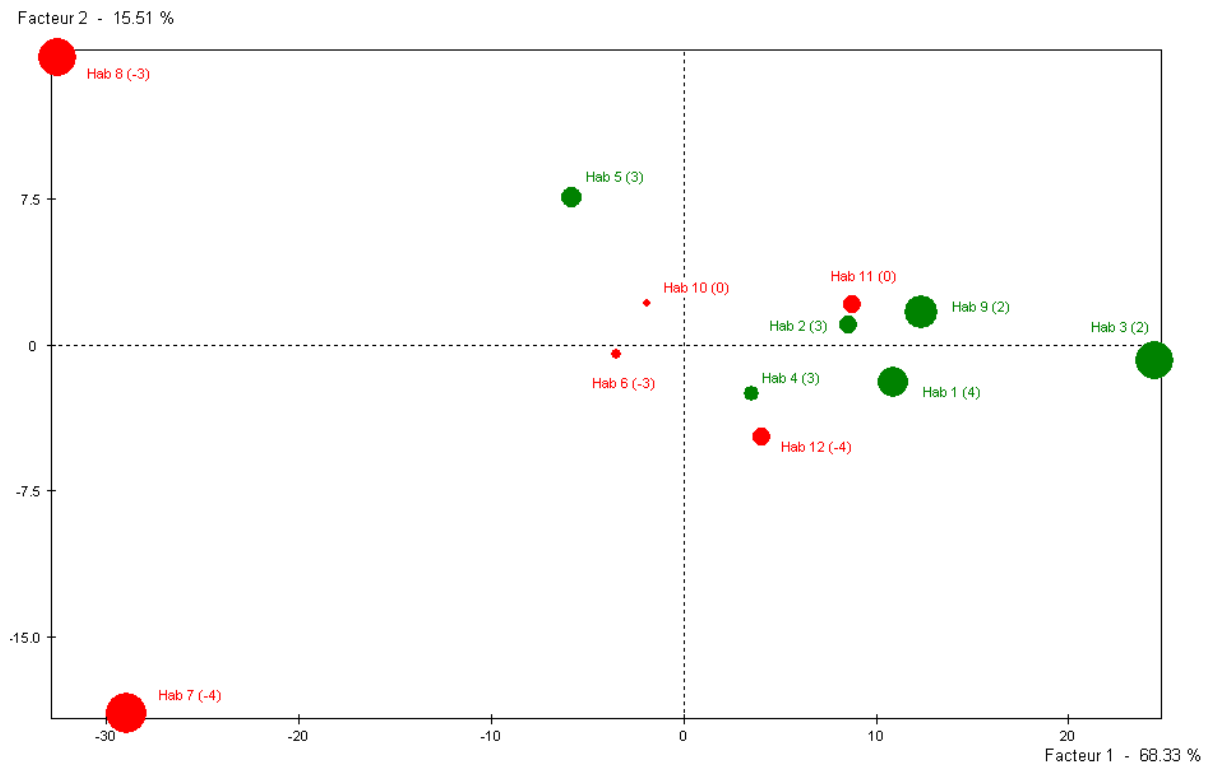


Figure III-22 : Plan principal de l'ACP sur 12 essais et 325 ions (prélèvement *in situ*)

Les points hab 2, 4, 5, 6, 10 et 12 sont plus petits et donc moins bien représentés sur ce plan. Les axes principaux ne permettent donc pas une représentation uniforme de l'ensemble des essais.

De plus, les habitations 1, 2 et 3 (contaminées), ne se distinguent pas des habitations 11 et 12 (non contaminées). Nous ne parvenons pas à réellement différencier les deux types d'habitations, par conséquent aucune variable de contamination ne s'est dégagée avec cette matrice.

La projection des variables (ions) sur le cercle de corrélation (Figure III-21) montre que les différences sont liées à l'axe 1 (représentatif de plus de 68 % de l'information).

Dans la mesure où l'analyse de la matrice totale ne permet pas de faire ressortir un comportement caractéristique d'une habitation contaminée, nous avons reconstruit une nouvelle matrice à partir des ions spécifiques déterminés précédemment. Cette matrice est composée de 12 lignes (habitations) et 59 colonnes (ions spécifiques). L'intersection d'une ligne et d'une colonne représente la somme des signaux obtenus pour chaque ion sur l'ensemble du prélèvement.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée à cette matrice. Le poids des facteurs montre encore une fois que l'axe principal donne une bonne représentation de la matrice totale (plus de 47 variables sur 59 ; Tableau III-22)

Numéro	Valeur propre	Pourcentage	Pourcentage cumulé
1	36.236	64.71	64.71
2	10.7963	19.28	83.99
3	3.4479	6.16	90.14

Tableau III-22 : Poids des facteurs défini par l'ACP

La projection des variables et la nouvelle projection du nuage de points sont représentés respectivement Figure III-23 et Figure III-24, le même code est utilisé pour ce graphique : habitation « contaminées » en vert et habitation « non contaminées » en rouge.

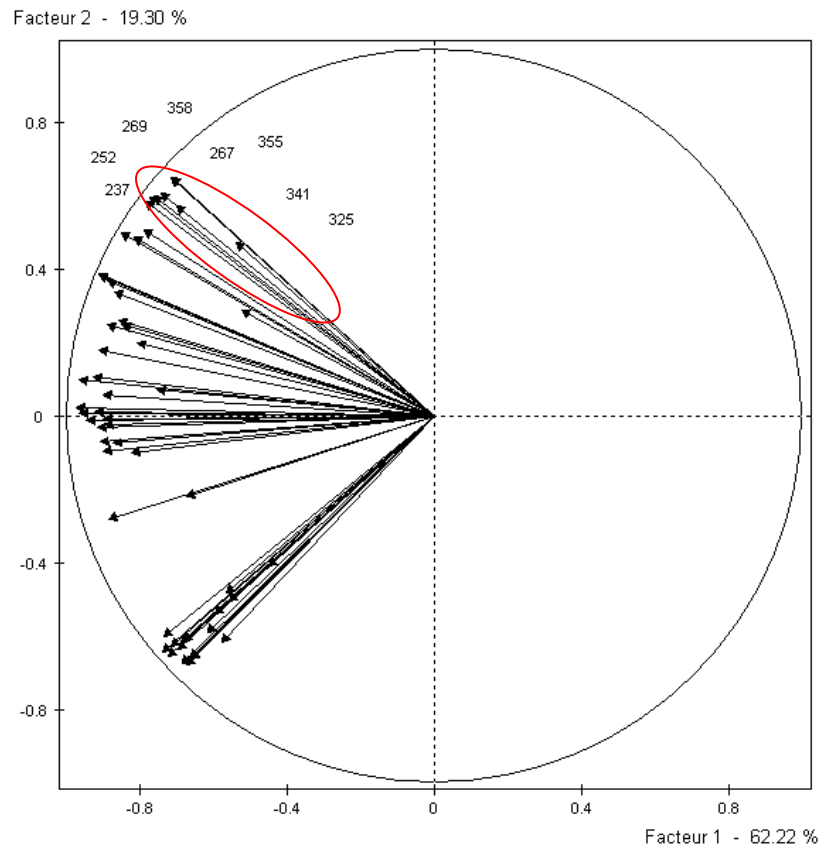


Figure III-23 : Représentation des variables actives dans le plan des facteurs 1 et 2.

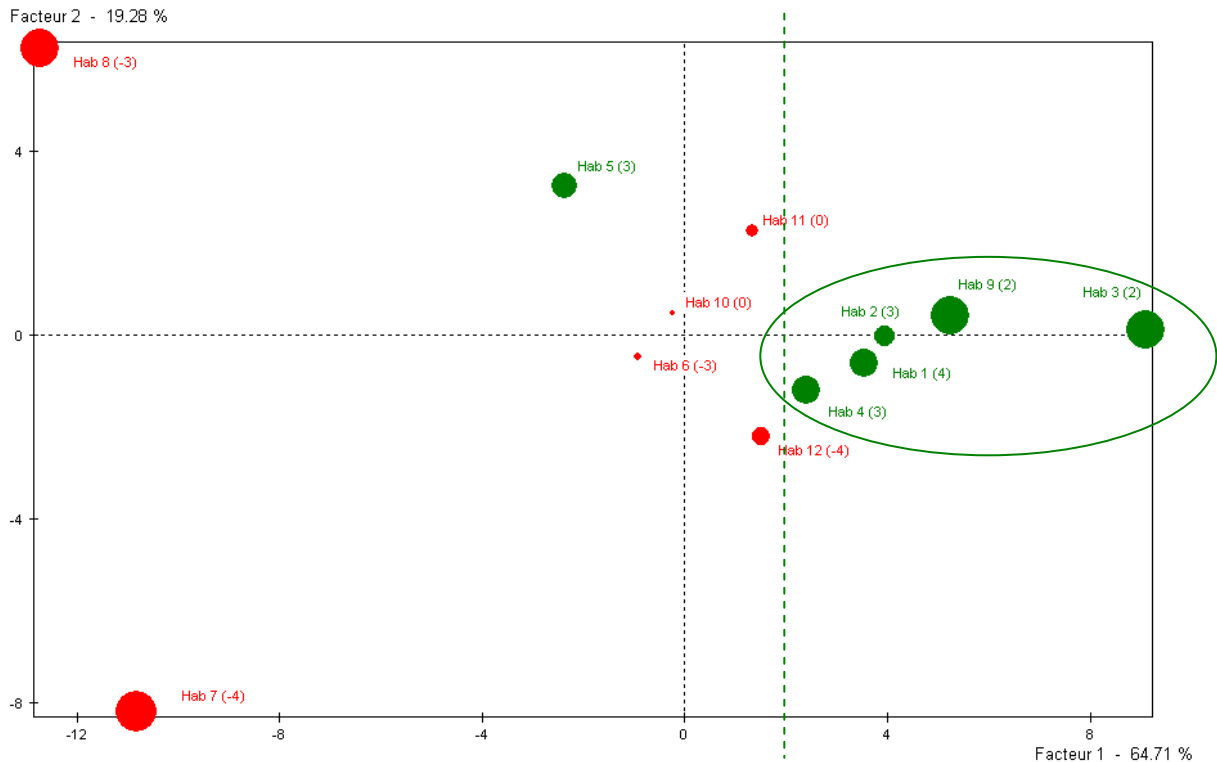


Figure III-24 : Plan principal de l'ACP sur 12 essais et 59 ions (injection des ions spécifiques, prélèvement *in situ*)

L'ensemble des points associés aux locaux contaminés ont une bonne représentation et sont homogènes (de même taille).

A l'exception de l'habitation n°5, l'axe 1 permet de différencier les habitations ayant un indice de contamination strictement positif des autres. En revanche, les valeurs absolues des indices ne sont distinguées par aucun axe.

La projection des variables (ions) sur le cercle de corrélation (Figure III-23) permet de mettre en évidence les ions responsables du décalage observé pour l'habitation 5 : 252, 237, 267, 269, 325, 341, 355, et 358. Toutefois ces ions ne permettent pas de distinguer un matériau ou une espèce particulière pour expliquer le comportement de l'habitation n°5.

Sur la majorité des essais, l'injection des ions spécifique dans l'ACP a permis de différencier, par le facteur 1, les habitations ayant un indice strictement positif des autres.

Par cette méthode, nous mettons en évidence un comportement similaire des habitations contaminées. Les 59 ions spécifiques définis permettent donc, dans le cas de prélèvements *in situ*, de déterminer une variable de contamination.

Une classification hiérarchique ascendante (CHA) permet de visualiser les groupes d'habitations différenciés dans l'espace (Figure III-25) :

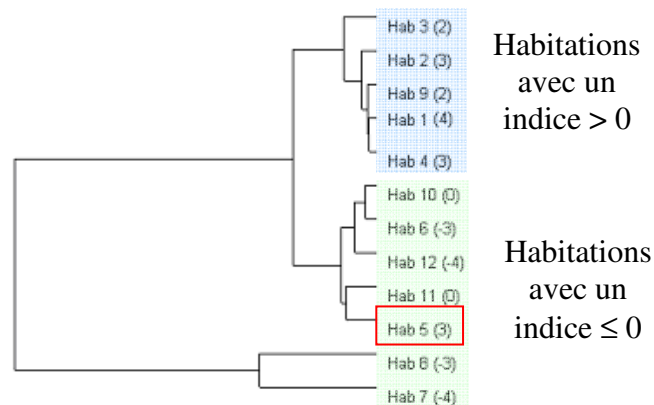


Figure III-25 : Classification hiérarchique ascendante des 12 habitations

Deux groupes d'habitations sont mis en évidence par la CHA. Cette distinction se fait par la valeur de l'indice.

L'exception de l'habitation 5 montre que la variable de contamination créée avec les ions spécifiques comporte des risques d'erreur. Afin de diminuer ces risques, il est nécessaire de réaliser cette étude sur un plus grand nombre de matériaux et de souches afin d'être mieux représentatif d'un habitat.

L'évaluation de ce risque ne peut se faire qu'en multipliant les prélèvements *in situ*.

Malgré cette incertitude, nous sommes parvenus, par une méthode statistique, à élaborer une variable globale de contamination sans distinction entre espèces ou matériaux. Cette variable, construite avec des ions spécifiques, permet de mettre en évidence une contamination fongique à partir d'un prélèvement *in situ*. Cette variable a été validée pour 11 habitations sur 12.

II CARACTERISATION DE L'EXPOSITION AUX AEROSOLS FONGIQUES : MESURE DE L'ERGOSTEROL ET DES MYCOTOXINES AEROPORTEES

II.1 MESURE DE LA BIOMASSE FONGIQUE AEROPORTEE

L'inhalation de spores, fragments de mycélium, particules de matériaux ou poussières contaminées peut entraîner l'apparition de nombreux effets sur la santé. Ces manifestations semblent corrélées avec une augmentation des surfaces contaminées dans l'habitat. La plupart des études épidémiologiques démontrent une association entre la prévalence de symptômes respiratoires et la présence d'humidité excessive et de moisissures dans ces espaces. Cependant, il existe très peu de données concernant l'exposition aux moisissures en milieu intérieur, notamment en raison des difficultés inhérentes à la métrologie de ces biocontaminants (Madelin 1994 ; Flannigan, 1997). Ainsi, concernant la dose d'exposition, il n'existe à l'heure actuelle pas d'éléments fiables permettant d'établir un seuil au-dessous duquel il n'y a pas d'effet sur la santé ni de liste de références permettant de juger du niveau de risque selon les espèces de moisissures rencontrées.

La définition d'indicateurs biologiques et le développement de méthodes de mesures adaptées font partie d'une étape préliminaire indispensable pour accéder à l'évaluation du niveau d'exposition des occupants. L'effort métrologique doit porter à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement mais également sur la mise au point ou l'adaptation de méthodes de marquage et de reconnaissances indirectes, basées en particulier sur la recherche des produits du métabolisme ou de constituants cellulaires spécifiques.

Ainsi, les conidies et fragments mycéliens, vecteurs de dispersion des moisissures, contiennent un ester d'ergostérol commun et spécifique à la majorité des champignons microscopiques. Le dosage de cette molécule a essentiellement été utilisé pour déterminer la contamination de substrats solides comme les céréales, les sols... (Seitz *et al.*, 1979 ; Grant et West, 1986 ; Zill *et al.*, 1988 ; Gessner et Schmitt, 1996). Plus récemment, cette molécule a été mesurée dans les poussières, les produits de construction et l'air de maisons (Axelson *et al.*, 1995 ; Miller et Young 1997 ; Pasanen *et al.*, 2000).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé l'ergostérol comme un marqueur de la présence fongique dans l'air intérieur. Il s'agissait d'établir et développer en laboratoire une méthodologie susceptible d'évaluer la globalité des champignons microscopiques et de valider *in situ* cette technique.

II.1.A Caractérisation et validation de la technique.

II.1.A.1 Collecte des aérosols fongiques

Afin de collecter les aérosols fongiques auxquels les personnes sont susceptibles d'être exposés, nous avons choisi d'utiliser un Capteur Individuel de Poussières (CIP) permettant de sélectionner les particules de la fraction inhalable, en conformité avec les normes CEN 481 et ISO TR 7708.

Cet appareil, validé par ailleurs, permet en outre de réaliser des prélèvements avec un débit élevé (10L/min) et stable ($\pm 0,5\%$) durant plus d'une semaine sans être saturé (jusqu'à 50 mg de poussières prélevées).

II.1.A.2 Incertitude et limite de quantification.

Pour une gamme étalon de solutions d'ergostérol de concentrations comprises entre 0 et 10 mg/L, la relation entre l'aire des pics et la concentration en ergostérol est linéaire avec un coefficient de corrélation r^2 de 0,99. La dispersion du résultat d'analyse a été calculée à partir de 31 manipulations réalisées de façon identique avec une solution étalon à 6 mg/L. Il est admis qu'une méthode est répétable lorsque le rapport de l'écart-type à la moyenne est faible. Le coefficient de variation calculé, inférieur à 1 %, apparaît très satisfaisant.

Par ailleurs, en utilisant des solutions d'ergostérol de concentration décroissante à partir de 1 mg/L, la valeur moyenne de la limite de quantification a été évaluée à 0,04 mg/L ($n=33$; σ 0,005). Le coefficient de variation calculé pour cette limite est égal à 12,5 %.

II.1.A.3 Conservation des échantillons et vérification de l'impact de la rotation lors de la collecte.

Après échantillonnage, la coupelle garnie de la mousse en polyuréthane est acheminée directement au laboratoire. Elle est nécessairement protégée et conservée dans un emballage étanche à l'abri de la lumière. L'ergostérol est une molécule stable se dégradant essentiellement lorsqu'elle est exposée aux rayonnements UV. Une solution d'ergostérol (étalon) peut être conservée par exemple à 4 °C à l'abri de la lumière pendant une période de 2 mois sans être altérée.

Néanmoins, nous avons contrôlé la stabilité des prélèvements pendant la période de stockage. Ainsi, quatorze coupelles de prélèvement ont été artificiellement dopées avec une même quantité de spores (*A.niger*) puis placées dans une chambre froide à 4 °C pendant 19 et 27 jours. Comparé à la référence, aucun changement significatif de la concentration d'ergostérol pendant ces durées n'a été observé (Tableau III-23).

	Conservation de l'échantillon			Effet de la collecte	
	T 0	T 19 jours	T 27 jours	T0	7 jours de fonctionnement
Moyenne en mg/L	0,359	0,294	0,375	0,279	0,237
Ecart-type	0,042	0,064	0,019	0,006	0,087
nbr. Echantillon	8	3	3	3	3

Tableau III-23 : Stabilité de l'ergostérol contenu dans les spores d'*Aspergillus niger* après 19 et 27 jours de stockage et 7 jours de collecte.

Nous avons également vérifié que l'étape de collecte n'altérerait pas l'ergostérol des conidies. Une quantité identique et connue de spores a été distribuée dans six coupelles. Trois ont été placées dans l'appareillage et mises en rotation pendant 7 jours à l'abri de toute pollution fongique tandis que les trois autres étaient conservées à 25 °C pendant la même durée. Nous n'avons noté aucune variation significative de la concentration (Tableau III-23). L'étape de collecte ne semble ainsi pas dégrader la molécule d'ergostérol.

II.1.A.4 Dispersion de la mesure.

De manière à évaluer la dispersion de la mesure entre différents appareillages, nous avons disposé sur un même site extérieur 5 appareillages et collecté l'ergostérol pendant deux semaines (198 m³). L'incertitude cumulée du prélèvement et de l'analyse s'étend sur une plage de 19 %.

Bien que ce test soit soumis aux fluctuations spatiales de la concentration du site, il permet d'apprécier la relative bonne dispersion des mesures pour un prélèvement environnemental (m 1,87, n 5, σ 0,28).

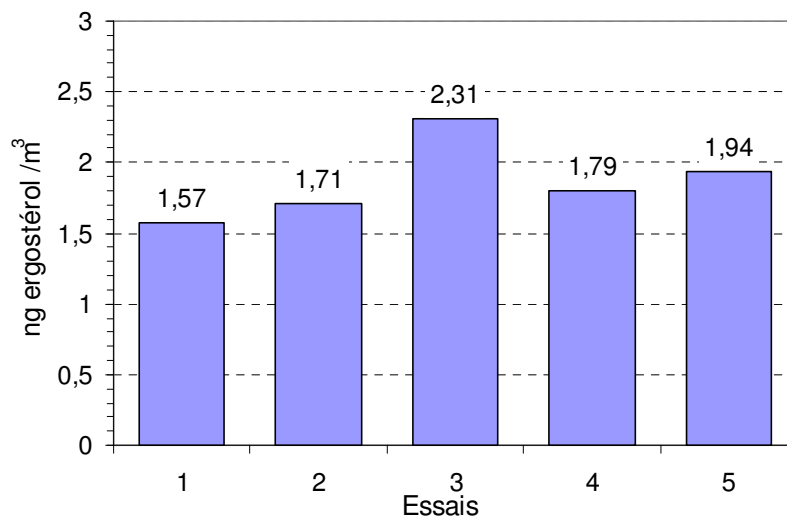


Figure III-26: Mesures simultanées de l'ergostérol aéroporté extérieur.

II.1.B Comparaison entre la mesure de l'ergostérol et la culture.

La concentration extérieure d'ergostérol aéroportée a été mesurée corrélativement à la flore fongique cultivable. La mesure de l'ergostérol a été réalisée après 7 jours de prélèvement et pendant cette même période 4 prélèvements ponctuels ont été effectués à l'aide de l'impacteur. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-24.

Prélèvement.	UFC/m ³	Ergostérol ng/m ³ du 30/07 au 6/08/01	Type de moisissures isolées.
30/07/01	40	2,74	<u>Espèces majoritaires</u> 95 %:
31/07/01	320		<i>Cladosporium</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i>
02/08/01	1190		sp.,
03/08/01	440		Espèces minoritaires 5 %:

Tableau III-24 : Comparaison entre la concentration d'ergostérol aéroporté et des mesures ponctuelles de la flore fongique cultivable.

Pour une valeur moyenne de 498 UFC/m³ [40-1190], nous avons mesuré une concentration de 2,74 ng d'ergostérol/m³. Une précédente étude de Miller et Young (1997) a estimé la quantité moyenne d'ergostérol par spore des trois espèces majoritaires à 2,45 ng/spore. Nous avons mesuré pour *Alternaria alternata* IHEM 3183 (résultat non publié) : 4,62 pg/spore (n 6, σ 1,54). Cette quantité plus importante est liée à la grande taille des spores d'*Alternaria*. Cette variation liée à la dimension des conidies avait déjà été observée pour d'autres espèces par ce même auteur.

Si l'on considère les pourcentages respectifs des différentes espèces isolées (95 et 5%), on peut estimer la quantité moyenne d'ergostérol par spore à 2,56 pg, soit une valeur théorique de 1070 spores/m³. Cette dernière concentration théorique est deux fois supérieure à la valeur moyenne de la fraction cultivable. Cette différence est probablement liée à la fraction non cultivable collectée. De plus, la concentration extérieure fluctue largement, on observe sur la journée une variation d'un facteur 2 à 3 et sur la semaine de près de 100 (Figure III-27). Les valeurs d'aérobiocontamination obtenues par culture permettent essentiellement d'apprécier un instantané du niveau de contamination. L'échantillonnage excède rarement les 2 minutes

de collecte, et selon les appareillages employés représente un maximum de 0.2 m^3 d'air prélevé. À l'opposé, la mesure de l'ergostérol intègre une semaine de prélèvement, soit près de 100 m^3 d'air.

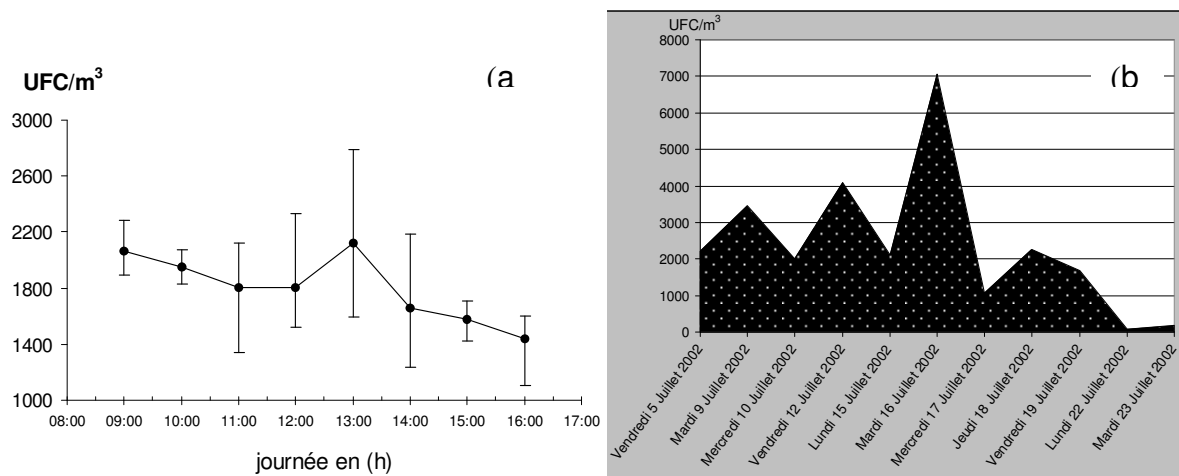


Figure III-27: (a) mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur une journée ; (b) mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur plus d'une semaine.

II.1.C Mesures sur sites.

Des prélèvements d'air ont été réalisés dans différents sites: un laboratoire (ventilation double flux avec filtration haute efficacité de l'air), dans un bureau paysager occupé (ventilation double flux) et dans 6 logements et 2 écoles.

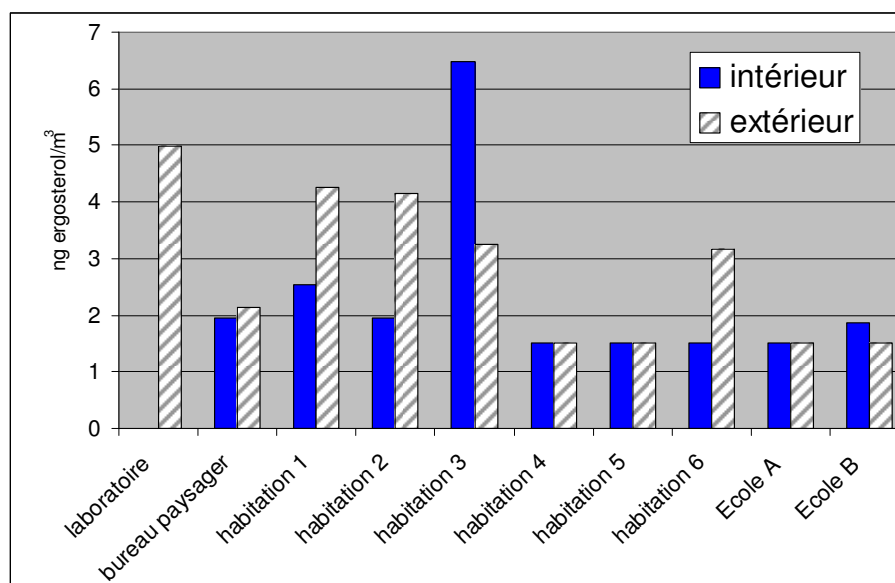


Figure III-28: Mesure de l'ergostérol aéroporté présent à l'intérieur et extérieur de différents locaux. Le prélèvement à l'intérieur du local est réalisé à 1 mètre du sol. Un autre, en référence, est systématiquement effectué à l'extérieur dans les mêmes conditions.

Les concentrations d'ergostérol mesurées lors de cette campagne ont atteint un maximum de 6.47 ng/m^3 (Figure III-28). Plusieurs situations d'aérobiocontamination ont été observées : Pour 5 sites (habitats 4, 5 ; Ecoles A, B et le bureau), les concentrations extérieures et intérieures ne sont pas significativement différentes. Les locaux évalués sont *a priori* exempts

de sources endogènes fongiques. Les champignons microscopiques présents dans l'air intérieur sont principalement issus de l'extérieur. Le niveau de contamination atteint dans ces environnements est alors essentiellement le résultat de variations saisonnières (Figure III-29), les concentrations fongiques extérieures les plus importantes étant relevées en été.

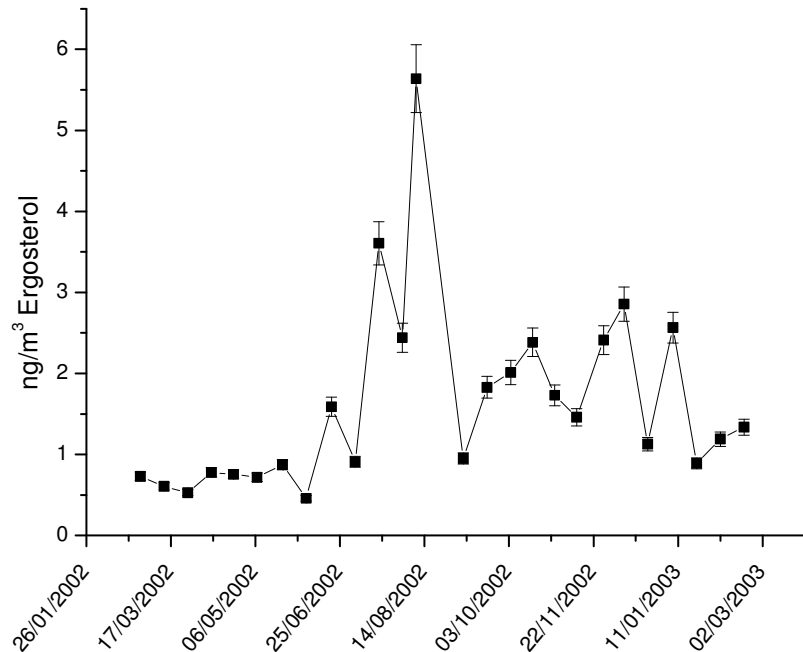


Figure III-29: mesure extérieure de la biomasse fongique aéroportée, année 2002-2003 sur le site de Champs-sur-Marne (France).

Nous avons observé sur 4 sites (1, 2, 6 et le laboratoire) une teneur à l'intérieur plus faible qu'à l'extérieur. Il n'existe pas de source endogène dans ces locaux. Le système de ventilation et éventuellement de climatisation assure alors une réduction du transfert d'environ 50 % de la pollution fongique extérieure. Le laboratoire équipé d'un système de filtration spécifique (filtre très haute efficacité) limite totalement la pénétration de l'ensemble des contaminations fongiques.

Dans le cas du logement 3, la concentration intérieure est deux fois plus importante que le niveau de contamination extérieur. Il doit exister une source dans le local: matériaux contaminés, plantes ou encore une contamination du système de ventilation.

Ainsi, les principales situations de contamination intérieure ont été examinées. La mesure de l'ergostérol semble être une méthode robuste susceptible d'évaluer quantitativement la flore fongique aéroportée.

Ainsi, le présent travail s'est attaché à établir une métrologie capable d'estimer la globalité de la flore fongique aéroportée. Une méthode de dosage d'un constituant cellulaire spécifique des champignons a été adaptée et mise au point.

En utilisant conjointement ce dosage et un appareil de collecte validé par ailleurs, la mesure de la flore fongique globale a été rendue possible. Comparé aux méthodes traditionnelles utilisant la culture, le dosage de l'ergostérol est une mesure intégrée. La culture permet d'apprécier un instantané du niveau de contamination tandis que la mesure de l'ergostérol évalue près d'une semaine d'exposition cumulée. Concernant la détection de la fraction cultivable, la méthode proposée reste moins sensible avec une limite de détection proche de 150 spores/m³ (0,4 ng/m³, échantillonnage de 100 m³). Cependant, la fraction des spores non cultivables est susceptible d'entraîner des manifestations immuno-allergiques voire toxiques.

De plus, la contamination biologique des locaux est un phénomène discontinu soumis à l'aéraulique et à la formation momentanée de « bouffées » polluantes difficilement mesurables par une collecte instantanée de la fraction cultivable.

D'autre part, les mesures de l'ergostérol réalisées sur sites ont montré qu'elles permettaient d'appréhender les différentes situations d'expositions des occupants à une flore fongique aéroportée. L'utilisation de cette technique apparaît donc adaptée à une évaluation quantitative de l'exposition des personnes. Elle doit cependant être appuyée par une approche qualitative. La culture serait alors utilisée, car elle seule permet l'identification des moisissures les plus allergisantes.

II.2 MESURE DES MYCOTOXINES AEROPORTEES

Dans le cadre de l'évaluation de l'exposition des personnes aux mycotoxines dans les environnements intérieurs, la méthode adoptée classiquement consiste à rechercher et à identifier les souches toxigènes. Or, la production de toxines par ces souches n'est pas systématique. La littérature fait en effet référence à de nombreux facteurs qui pourraient influencer leur production : la température, l'activité de l'eau, le pH, la concentration d'oxygène et la présence d'autres microorganismes (Nielsen *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 2002). A notre connaissance, aucune méthode permettant d'accéder aux mycotoxines potentiellement inhalées n'a encore été proposée. Or la mesure des aérosols de mycotoxines nous apparaît le moyen le plus direct pour évaluer le danger lié à l'exposition de ces moisissures toxiques. Nous proposons dans ce chapitre une méthodologie pour accéder à la mesure de trois mycotoxines aéroportées.

Pratiquement, nous mettrons au point une technique de dosage des mycotoxines en chromatographie liquide (HPLC). Nous avons choisi de doser conjointement ces toxines et l'ergostérol à partir d'un échantillon unique. Trois mycotoxines sont étudiées:

- **La stérigmatocystine** : précurseur de l'aflatoxine B1 reconnue cancérigène par ingestion pour l'homme et responsable de cancers des voies respiratoires, la stérigmatocystine est également cytotoxique par inhalation (Krishnamachari *et al.*, 1975, Nielsen, 2001). Cette mycotoxine est produite en grandes quantités par *Aspergillus versicolor* (jusqu'à 1% de la biomasse), moisissure fréquemment isolée dans l'habitat.
- **La déoxynivalénol (DON)** appartient à la famille des trichothécènes reconnue comme étant la famille présentant les effets toxiques les plus aigus (Sorenson *et al.*, 1987).
- **L'ochratoxine A** est à l'origine d'effets immunotoxiques par inhalation démontrés chez le rat (Alvarez *et al.*, 2004). Elle est classée cancérigène 2B (cancérigène possible pour l'homme) par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC).

La technique de dosage sera d'abord élaborée à partir d'un standard de stérigmatocystine, puis appliquée aux deux autres mycotoxines.

Afin de caractériser la production des mycotoxines, nous étudierons également l'impact du support de croissance. Pour cela, nous choisirons des matériaux de construction vulnérables : toile de verre, papier peint et papier peint vinyl. Un support témoin en fibre de verre et dépourvu de liant sera également utilisé comme référence.

Nous étudierons ensuite le transfert des mycotoxines entre ces matériaux et l'air. Pour ce faire, nous produirons des aérosols fongiques directement à partir de matériaux contaminés et caractériserons ces aérosols en termes de taille (fractions inhalable, thoracique et alvéolaire) et de concentration en mycotoxine.

II.2.A Mise au point de la technique de dosage

II.2.A.1 Etape d'extraction : Choix du solvant

De manière à pouvoir analyser à partir d'un même prélèvement l'ergostérol et les mycotoxines, nous avons recherché une méthode d'extraction et des solvants compatibles avec ces deux composés. Nous avons choisis 5 solvants aux polarités différentes. Le Tableau III-25 présente les valeurs de l'indice de polarité défini par Snyder (Robards *et al.*, 1994) pour chaque solvant testés.

Solvant	Méthanol + eau (50:50)	Acétonitrile	Chloroforme	n-pentane
Indexe de polarité	7,7	5,8	4,1	0,1

Tableau III-25 : Valeur de l'indice de polarité défini par Snyder (Robards *et al.*, 1994)

Une suspension de spores d'*Aspergillus versicolor*, à une concentration connue (17.10^6 spores/cm³), est introduite séparément dans les 5 solvants choisis. La sonication (1h) de chaque suspension est opérée pour extraire la stérigmatocystine des spores. Celles-ci sont ensuite filtrées et la stérigmatocystine recherchée par HPLC.

Nous avons constaté que la quantité la plus importante de stérigmatocystine (4,54µg) a été obtenue en utilisant le mélange méthanol-eau (50:50). Avec le chloroforme, seule 95% de cette quantité est extrait et seules 40 et 55 % de cette valeur est obtenue en utilisant respectivement l'acétonitrile et le pentane.

Nous conserverons donc le mélange méthanol/eau comme solvant d'extraction dans la suite de l'expérimentation. Par ailleurs, nous avons vérifié qu'une durée de sonication de 1 heure préconisée par Hikley et Jarvis (2001) n'altérerait pas la molécule de stérigmatocystine.

II.2.A.2 Etape de purification / concentration

La purification et la concentration de l'échantillon sont des étapes importantes, compte tenu des faibles quantités de mycotoxines susceptibles d'être aéroportées (de l'ordre du ng/g de poussière d'après Engelhart *et al.* en 2002).

Nous avons évalué le rendement de trois techniques classiques de concentration :

- rotavapeur,
- évaporation sous flux d'azote,
- chauffage au bain marie.

Ces techniques sont utilisées classiquement pour concentrer ce type d'échantillon. Le principe de ces techniques repose sur la diminution du volume de l'échantillon par évaporation du solvant.

Expérimentalement, une solution étalon de stérigmatocystine est diluée dans du méthanol puis totalement évaporée à l'aide des trois techniques. Les échantillons obtenus sont ensuite dissous à nouveau dans du méthanol. La stérigmatocystine recueillie avec chaque technique est alors dosée par HPLC/UV.

L'évaporation réalisée sous vide à l'aide d'un rotavapeur s'est avérée plus efficace avec un taux de récupération de 80%, tandis que le flux d'azote ou le chauffage au bain marie ne nous permettaient de récupérer respectivement que 61 et 40%.

L'utilisation du rotavapeur présente un taux de récupération suffisant. Cependant, l'identification des mycotoxines est difficile car de nombreuses autres impuretés interfèrent sur l'analyse (co-élution).

Nous avons opté pour l'emploi d'une autre méthode de concentration : l'extraction en phase solide (SPE : Solid Phase Extraction). Cette technique est *a priori* plus performante dans la mesure où elle associe une étape de purification à la concentration de l'échantillon. Pratiquement, la stérigmatocystine en solution avec un mélange eau-méthanol (50:50) est retenue quantitativement par la cartouche SPE en phase inversée puis éluée avec du méthanol (2 mL). Dans ces conditions nous avons mesuré un taux de récupération de 97% tout en limitant largement les « pollutions » restées en grande partie dans la cartouche SPE.

II.2.A.3 Détermination des conditions d'analyse

Lors de l'analyse initiale par HPLC de la stérigmatocystine produite par *Aspergillus versicolor*, nous avons constaté la présence d'un pic proche de celui de la stérigmatocystine, souvent co-élué, correspondant à un composé de formule chimique proche et identifié, grâce à son spectre UV, comme étant la 5-méthoxystérigmatocystine (Nielsen, 2001) (Figure III-30).

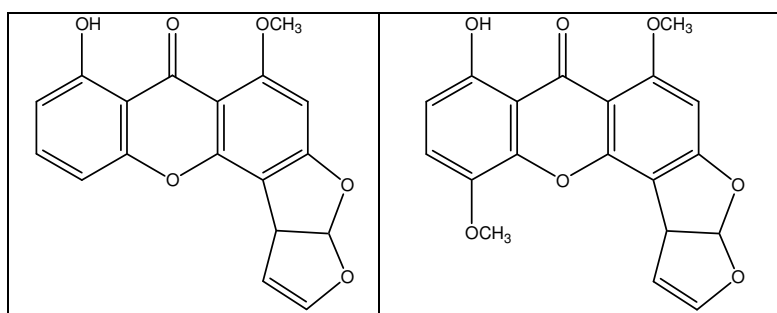


Figure III-30 : Formules développées de la stérigmatocystine et de la 5-méthoxystérigmatocystine (de gauche à droite)

La présence de ce pic pouvant empêcher la quantification de la stérigmatocystine, nous avons testé différents modes d'analyse HPLC (gradients et isocratiques) à partir de trois solvants (eau, méthanol et acétonitrile). La meilleure séparation a été obtenue en mode isocratique avec une phase mobile composée d'eau et de méthanol (15:85, v:v). Le chromatogramme d'une extraction réalisée à partir d'un échantillon de papier peint contaminé par *Aspergillus versicolor* est représenté dans la Figure III-31. Les pics de la 5-méthoxystérigmatocystine et de la stérigmatocystine sont associés à leurs spectres UV respectifs.

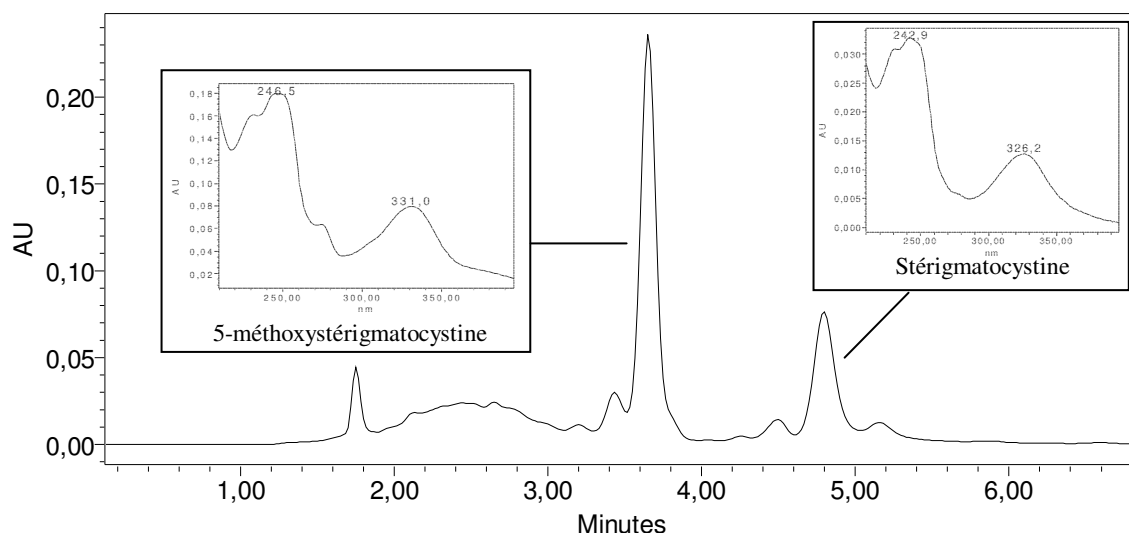


Figure III-31 : Chromatogramme d'une extraction obtenue sur papier peint vinyl contaminé par *Aspergillus versicolor*. La mesure est réalisée à 10 jours d'incubation (observation à 325 nm).

Gamme d'étalonnage

Afin de quantifier la stérigmatocystine dans les échantillons étudiés, nous avons construit une droite d'étalonnage à partir d'une gamme étalon de solution standard de stérigmatocystine de concentrations croissantes comprises entre 0 et 500 µg/L. La relation entre l'aire des pics et la concentration en stérigmatocystine est représentée sur la Figure III-32

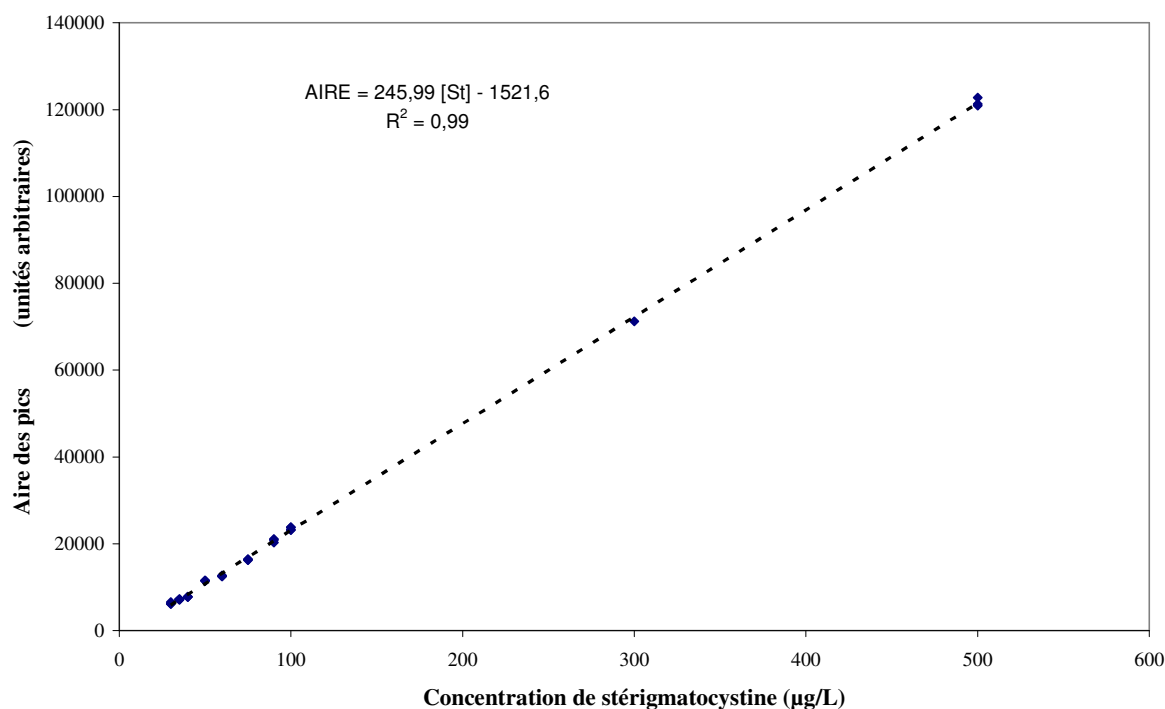


Figure III-32 : Corrélation entre l'aire des pics et la concentration en stérigmatocystine

Nous constatons que la relation entre l'aire des pics et la concentration de stérigmatocystine est linéaire (r^2 de 0,99) sur cette gamme de concentrations :

$$\text{Aire} = 246 [\text{Stérigmatocystine}] - 1521,6$$

Par ailleurs, nous avons calculé l'écart type du bruit (fluctuation de la ligne de base), σ_b , autour du temps de rétention de la stérigmatocystine, en effectuant l'analyse de 15 blancs (méthanol) : $\sigma_b = 125,8$.

La limite de détection instrumentale (LD) est définie comme la concentration correspondant à une aire de pic égale à 3 fois la valeur de σ_b , soit par extrapolation sur la droite de calibration égale à 8,5 $\mu\text{g/L}$ (correspondant à une quantité de 1,7 ng de stérigmatocystine). Enfin, la limite de quantification (LQ) a été estimée à 30 $\mu\text{g/L}$ (6 ng de stérigmatocystine, soit 60 pg/m^3 d'air avec un prélèvement de 100 m^3). Elle a été déterminée pour un coefficient de variation satisfaisant (<5%) entre plusieurs répétitions (Tableau III-26),

Concentration de la solution ($\mu\text{g/L}$)	6	7	10	15	20	30
Moyenne	1584,6	2112,7	3159,7	4527	4424,3	6152,8
Ecart-type	392,6	153,9	218,8	304,0	264,5	241,5
Coefficient de variation	25%	7,2%	6,9%	6,7%	6,0 %	3,9 %
Nombre d'échantillons	5	5	5	5	5	30

Tableau III-26 : Statistiques descriptives.

Il est admis qu'une méthode est répétable lorsque le rapport de l'écart type à la moyenne est faible. Le coefficient de variation calculé, inférieur à 4%, apparaît satisfaisant.

Cette même méthode a été appliquée à des standards de déoxynivalénol et d'ochratoxine A. Ce dosage s'est avéré applicable pour ces deux autres toxines. La sensibilité de la technique reste du même ordre de grandeur avec une limite de quantification de 20 $\mu\text{g/L}$ (soit 40 pg/m^3 d'air pour un prélèvement de 100 m^3) pour ces 2 mycotoxines. Les coefficients de variation correspondant sont de 5,5% pour la déoxynivalénol et 7,6% pour l'ochratoxine A.

II.2.B Impact des matériaux sur la production des mycotoxines

De manière à caractériser la production de stérigmatocystine, nous avons suivi sa formation sur un support témoin et trois produits de construction vulnérables aux moisissures : toile de verre, papier peint et papier peint vinyl. Nous avons utilisé comme souche toxigène : *Aspergillus versicolor*. La production de cette toxine est mesurée après 10 jours d'incubation (une fois la phase stationnaire de croissance atteinte) et exprimée en $\mu\text{g/g}$ de matériau. Les essais sont réalisés en triplicata.

Ces mesures sont comparées à la surface contaminée (pourcentage de recouvrement) pour chaque matériau (Figure III-33). En effet, les niveaux d'ergostérol mesurés étaient inférieurs à la limite de quantification, mis à part pour la toile de verre pour lequel la concentration d'ergostérol était de 3 $\mu\text{g/g}$ de matériau.

Par ailleurs, nous avons vérifié à l'aide d'un témoin de contamination (matériau en fibre de verre dépourvu de toute source de nutriment) que la contamination initiale des éprouvettes n'apportait pas de mycotoxine.

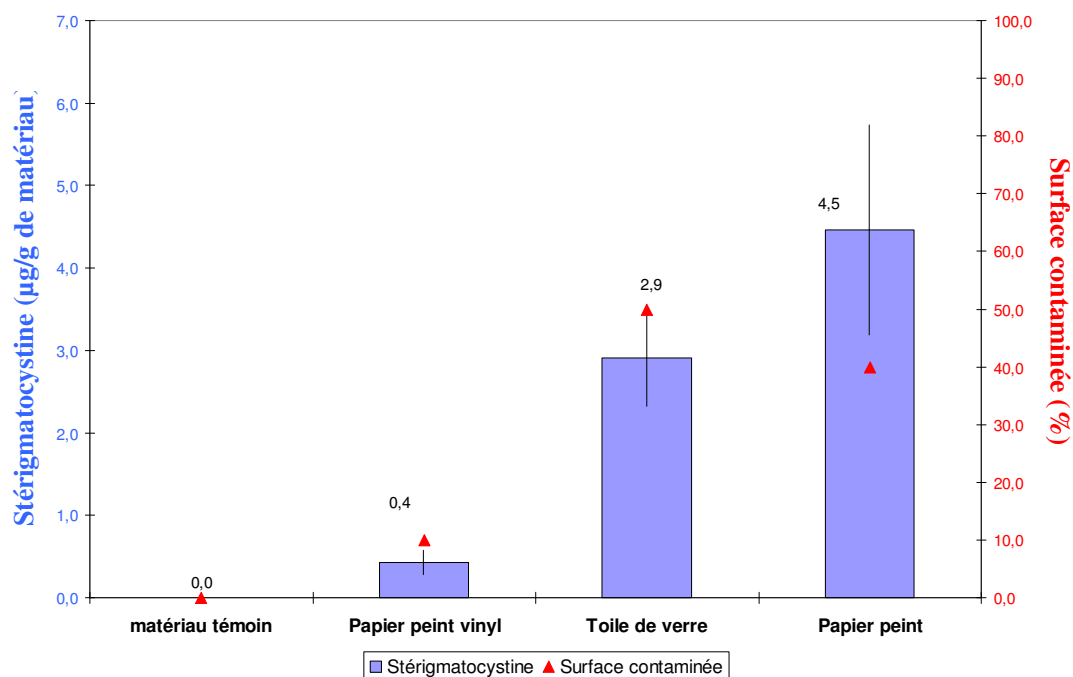


Figure III-33 : Mesure de la stérigmatocystine produite par *Aspergillus versicolor* se développant sur différents matériaux (mesure réalisée après 10 jours d'incubation ; n=3)

Pour les mêmes conditions de contamination et d'incubation, nous constatons que les quantités de stérigmatocystine dépendent du support de croissance et de la biomasse formée. Afin de vérifier si la production de stérigmatocystine dépend plus des constituants du matériau que des conditions de croissance de la moisissure, nous avons renouvelé les tests précédents en ajoutant aux matériaux une solution de nutriments. Parallèlement au dosage de la stérigmatocystine, nous avons mesuré les quantités d'ergostérol pour déterminer le niveau de croissance. Les résultats sont présentés sur la Figure III-34.

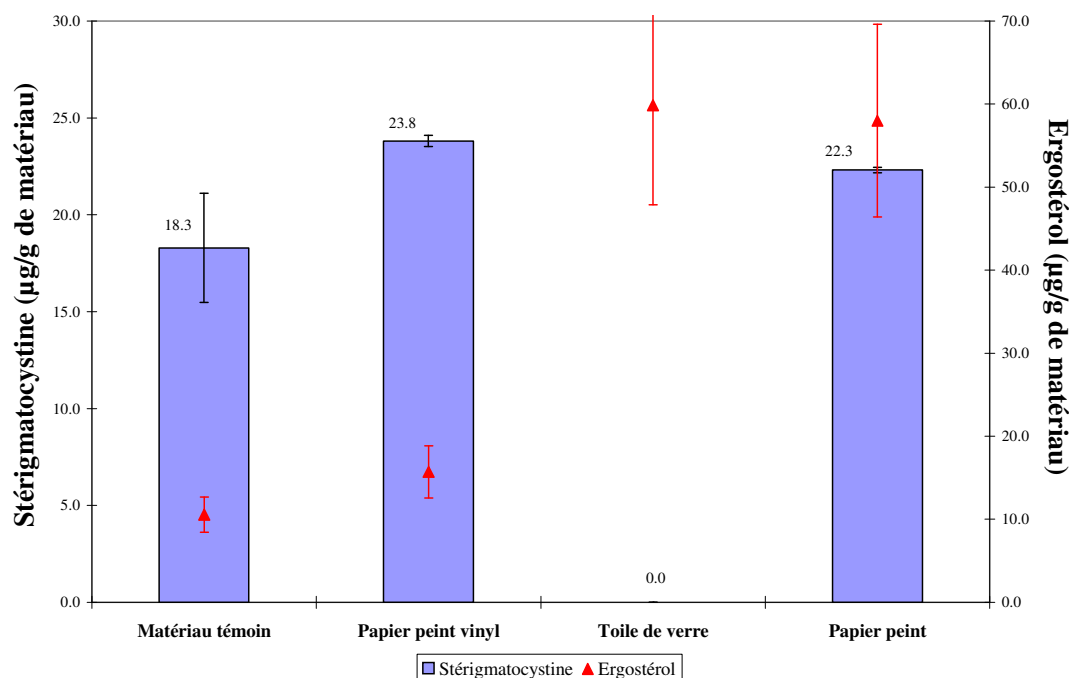


Figure III-34 : Mesure de la stérigmatocystine et de l'ergostérol produites par *Aspergillus versicolor* se développant sur différents matériaux (mesure réalisée après 10 jours d'incubation ; n=3)

Comme attendu, la solution nutritive a eu pour effet d'augmenter, à l'exception de la toile de verre, la biomasse ainsi que la quantité de stérigmatocystine produite.

Toutefois, la quantité d'ergostérol mesurée est différente entre les matériaux malgré la présence de nutriments en quantité identique. Les nutriments ne représentant plus un facteur limitant, le niveau d'ergostérol aurait dû être identique pour l'ensemble des matériaux testés. Les niveaux d'ergostérol observés mettent en évidence un écart entre les matériaux plutôt inertes (matériau témoin et papier peint vinyl) et les matériaux plus vulnérables (toile de verre et papier peint). Une hypothèse pour expliquer ces différences serait que la quantité de nutriments était soit insuffisante, soit indisponible au développement de la moisissure. Une autre hypothèse serait que le matériau limite le développement fongique malgré l'apport de nutriments.

Nous constatons sur le matériau témoin que les nutriments seuls permettent la production de stérigmatocystine. De plus, l'ajout de nutriments a largement augmenté la production de cette mycotoxine, avec par exemple une augmentation d'un facteur 5 pour le papier peint.

Par ailleurs, l'ajout de nutriment sur la toile de verre a favorisé la croissance de la moisissure mais semble avoir complètement inhibé la production de cette toxine. Aucune explication n'a pu être avancé à ce jour pour expliquer ce phénomène.

Un rôle reconnu des mycotoxines est de ralentir voire d'inhiber le développement d'espèces en compétition pour un même substrat. Nous pouvons émettre l'hypothèse que lorsque la moisissure se retrouve « stressée », elle accroît sa production de mycotoxines.

Dans ce cas, des conditions nutritives très favorables à la croissance fongique pourraient impliquer l'utilisation de voies métaboliques plus accessibles n'impliquant pas la production de mycotoxines. *A contrario*, un matériau peu vulnérable impliquerait des métabolismes moins accessibles conduisant à la production de mycotoxines.

Par conséquent, pour une même souche, la production de stérigmatocystine dépendrait à la fois de la biomasse produite, mais également du support de croissance et notamment des nutriments disponibles.

Ces résultats montrent l'intérêt de rechercher directement les mycotoxines aéroportées car une expertise qui se limiterait à identifier uniquement les souches toxigènes ne permettrait pas de conclure à l'exposition aux mycotoxines.

II.2.C Approche du transfert des mycotoxines substrat/air

Le transfert de la stérigmatocystine, contenue sur le support ou le matériel biologique, vers l'air est susceptible de dépendre essentiellement de trois facteurs : la nature du matériau (rétention physico-chimique, dégradation physique, taille des particules,...), les conditions environnementales (humidités, aérauliques,...) et la nature de la contamination (espèces et souches fongiques, âge de la culture,...).

Afin de caractériser ce transfert, nous avons choisi d'étudier l'impact d'un de ces paramètres : la nature du matériau.

Expérimentalement, nous avons utilisé le banc de production d'aérosols fongiques mis en place et décrit en détail dans le chapitre II.

Ce banc expérimental consiste à souffler de l'air filtré au dessus d'une culture fongique. Les aérosols ainsi générés sont caractérisés à l'aide d'un compteur optique de particules qui est également équipé d'un filtre permettant de prélever puis doser la stérigmatocystine.

Nous avons généré cet aérosol fongique à partir de cultures d'*Aspergillus versicolor* âgées de 10 jours réalisées sur les 4 matériaux additionnés de solution nutritive (les matériaux bruts ne produisant pas assez de biomasse pour générer des quantités suffisantes d'aérosols fongiques). Le nombre de particules aérosolisées en fonction de chaque matériau est décrit dans la Figure III-35.

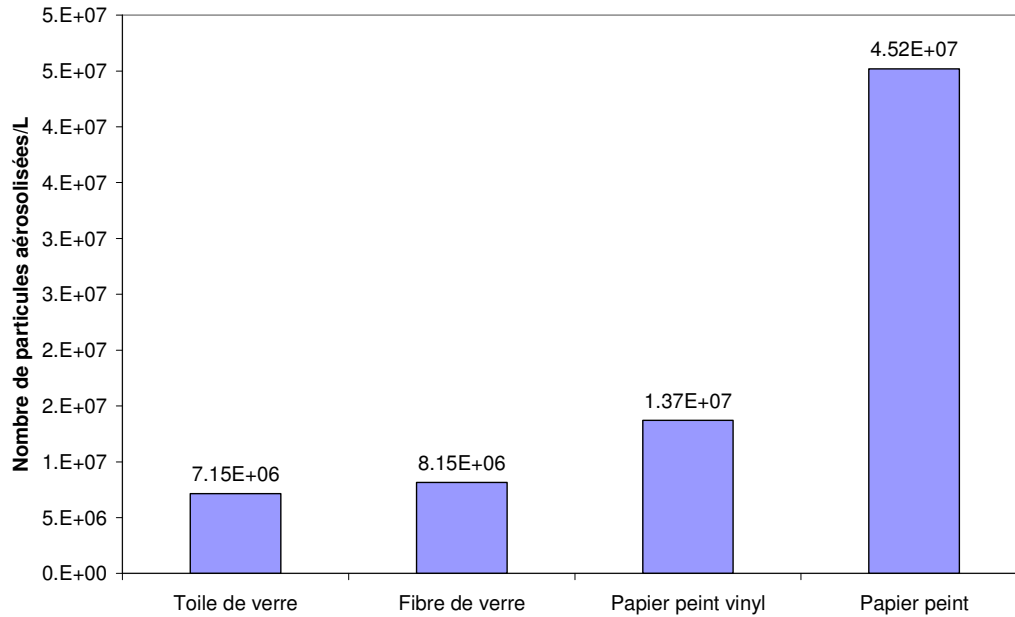


Figure III-35 : Nombre de particules aérosolisées (0,3-20 μ m) par litre à partir d'une croissance d'*Aspergillus versicolor* sur différents substrats additionnés de solution nutritive (mesures réalisées après 10 jours d'incubation)

Le nombre de particules générées le plus important est obtenu à partir du papier peint, substrat présentant la biomasse la plus importante.

Les profils granulométriques des particules aérosolisées à partir de ces différents supports sont représentés sur la Figure III-36. Nous observons un mode compris entre 2 et 3 μ m, cette valeur est cohérente avec le diamètre moyen d'une spore d'*Aspergillus versicolor* précisé dans la littérature (Roquebert, 1998).

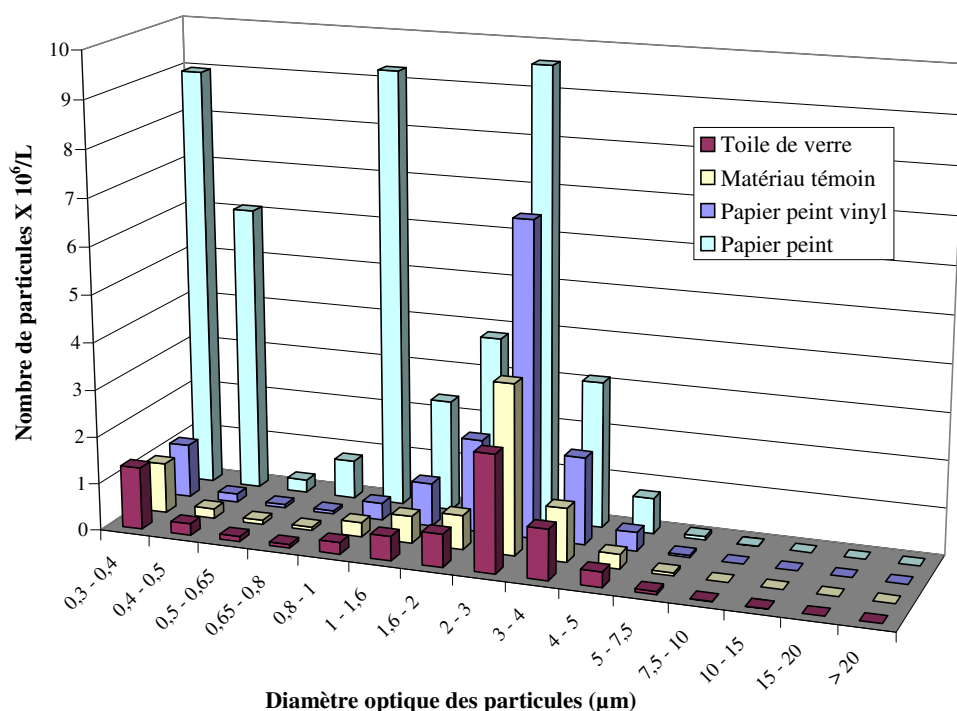


Figure III-36 : Profil granulométrique des aérosols fongiques générés en fonction de différents supports

Pour l'ensemble des matériaux, la majorité des particules présentent un diamètre optique compris entre 0,8 et 5 μm. Seul le papier peint présente plusieurs maxima. Les particules les plus fines (d_{opt} compris entre 0,3 et 1 μm) sont soit d'origine fongique (mycélium) soit des particules inertes (fragments de matériau).

L'analyse des filtres nous a permis de déterminer les quantités de stérigmatocystine contenues dans l'aérosol. Les résultats sont synthétisés sur la Figure III-37 et sont exprimés en masse de stérigmatocystine par surface contaminée (ng/cm²).

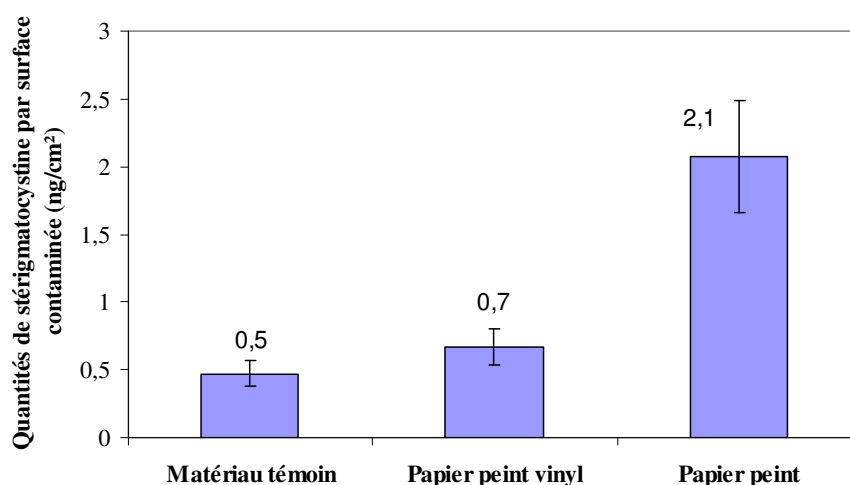


Figure III-37 : Quantités de stérigmatocystine aérosolisée par unité de surface de matériau contaminée (*Aspergillus versicolor* ; n=3)

Concernant la toile de verre et compte tenu qu'*Aspergillus versicolor* ne produit pas de stérigmatocystine sur ce support (§ III.2.B.), cette molécule est, comme attendu, absente dans les aérosols produits à partir de ce matériau.

Les quantités maximales de stérigmatocystine ont été relevées sur le papier peint (2,1 ng/cm²). Les deux autres matériaux se comportent sensiblement de la même façon : le papier peint vinyl 0,7 ng/cm² et la fibre de verre 0,5 ng/cm².

Les différences observées sur le papier peint peuvent être attribuées à un plus grand nombre de particules générées. Par conséquent, concernant les matériaux servant de base à la production de stérigmatocystine, l'impact du substrat sur les quantités de stérigmatocystine aéroportées semble principalement lié au nombre de particules générées.

Par ailleurs, nous avons mesuré les quantités de stérigmatocystine restantes sur le matériau : 26,3 ng sur le matériau témoin, 49,3 ng sur le papier peint vinyl et 34,9 ng sur le papier peint). Les proportions de stérigmatocystine aéroportées par rapport aux quantités contenues sur le matériau sont alors calculées : 1,2% pour le matériau témoin, 0,9% pour le papier peint vinyl et 3,7% pour le papier peint.

II.2.D Répartition de la stérigmatocystine selon les fractions particulières

De manière à explorer le mode d'exposition des personnes aux mycotoxines nous avons, dans une enceinte de 1m³, simulé une perturbation aéraulique sur un matériau contaminé par *Aspergillus versicolor*. Dans ce même volume était positionné quatre capteurs simulant nos voies respiratoires et surtout les différentes fractions particulières susceptibles d'être inhalées (fractions inhalable, thoracique et alvéolaire).

La fraction inhalable regroupe les particules ayant un diamètre aérodynamique de coupure (Da₅₀) inférieur à 100 µm, la fraction thoracique un Da₅₀ inférieur à 10 µm, et la fraction alvéolaire un Da₅₀ inférieur à 4,25 µm (AFNOR, 1996).

Dans cette approche, nous avons utilisé comme substrat de croissance le papier peint vinyl additionné de solution nutritive, ce matériau ayant été identifié, au travers des essais précédents, comme étant :

- L'un des substrats les plus propices au développement d'*Aspergillus versicolor*,
- le matériau pour lequel la production de stérigmatocystine par unité de biomasse est la plus importante,
- représentatif de la plupart des matériaux étudiés en terme de profil granulométrique des particules émises (Figure III-36).

La surface de matériau utilisée est de 0,5 m², ce qui, selon certains auteurs, représente une contamination dite « moyenne » pouvant engendrer des risques sanitaires (Chasseur & Nolard, 2003).

Après 10 jours d'incubation, nous procédons à l'aérosolisation avec une vitesse d'air de 100 cm/s (148 m/s avec le banc d'aérosolisation utilisé précédemment), puis nous collectons les particules aérosolisées. Le profil granulométrique de l'aérosol produit par cette perturbation est présenté sur la Figure III-38.

L'air de la chambre environnementale est renouvelé 32 fois par les CIP afin de récupérer l'ensemble des particules générées.

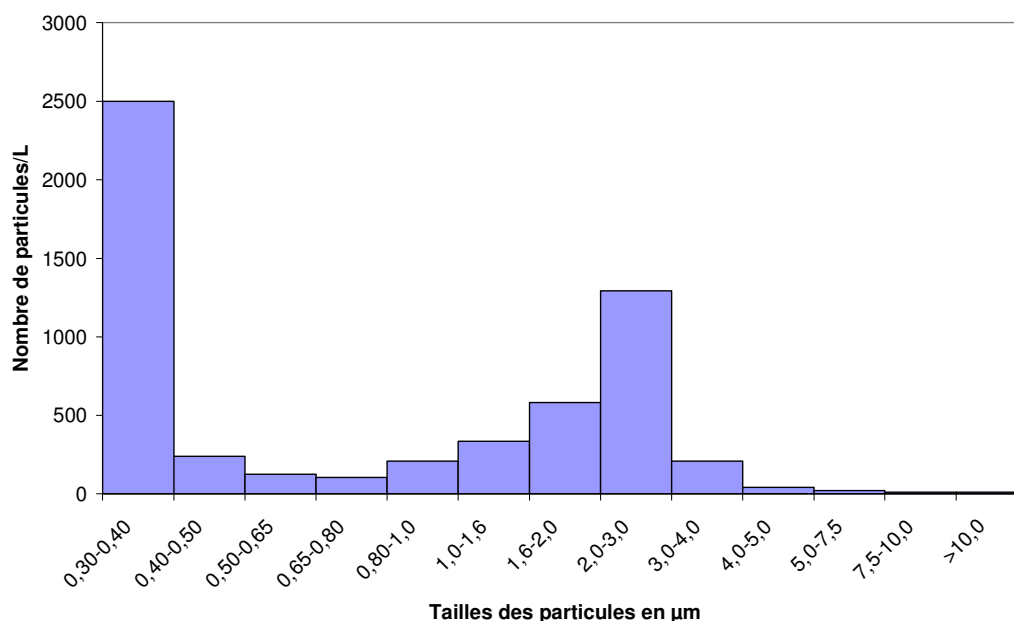


Figure III-38 : Profil granulométrique des aérosols produits à partir du papier peint vinyl encrassé dans la chambre environnementale

Par comparaison avec le profil du papier peint vinyl obtenu précédemment qui présentait un mode unique centré sur les particules de 2-3 μm (Figure III-35) nous constatons un second maximum produit par les particules les plus fines ($d_{\text{opt}} < 0,4 \mu\text{m}$).

Le dosage de la stérigmatocystine dans les différents sélecteurs (1 inhalable, 1 thoracique et 2 alvéolaires) est ensuite réalisé à partir des différentes fractions collectées. Le **Tableau III-27** Présente ces résultats :

Sélecteurs	ST (ng)
Inhalable	$28,9 \pm 2$
Thoracique	$18,9 \pm 1$
Alvéolaire 1	$23,9 \pm 5$
Alvéolaire 2	$20,4 \pm 5$

Tableau III-27 : Quantités de stérigmatocystine contenues dans les différents sélecteurs de la fraction particulaire

Les quatre capteurs fonctionnent simultanément durant l'essai (7L/min pour la fraction thoracique 10L/min pour les trois autres, c'est-à-dire un débit total de 37 L/min) en collectant chacun l'ensemble des fractions particulaires. Par conséquent, en tenant compte des différents débits de collecte, la répartition de stérigmatocystine totale devient :

Fraction	ST (ng)
Inhalable ($Da_{50} < 100\mu m$)	$28,9 \times \frac{37}{10} = 107$
Thoracique ($Da_{50} < 10\mu m$)	$18,9 \times \frac{37}{7} = 100$
Alvéolaire ($Da_{50} < 4.25\mu m$)	$(23,9+20,4) \times \frac{37}{20} = 82$

Tableau III-28 : Quantités de stérigmatocystine recalculées en fonction des différentes fractions particulaires

Ces mesures mettent en évidence que dans ces conditions d'essais la stérigmatocystine est contenue ou adsorbée sur l'ensemble des particules thoraciques. De plus, une quantité importante (environ 80%) de cette toxine est adsorbée sur la fraction alvéolaire.

Par conséquent cette toxine est susceptible de s'introduire dans l'ensemble du système respiratoire.

Ces essais démontrent qu'une perturbation aéraulique située à proximité d'une surface contaminée permet la génération d'un aérosol de stérigmatocystine.

Nous constatons par ailleurs que ces résultats permettent de confirmer que la technique employée a permis la quantification de la stérigmatocystine aéroportée. Par conséquent, à travers cet essai le capteur de poussières utilisé *in situ* pour la mesure de l'ergostérol (CIP-10) ainsi que la technique de dosage de la stérigmatocystine mise au point semblent efficaces pour l'étude de mycotoxines aéroportées dans des locaux.

L'analyse de la quantité de stérigmatocystine produite sur le matériau avant l'aérosolisation indique qu'après 10 jours d'incubation, la moisissure a produit 29 ng de cette toxine par cm^2 de matériau ce qui, ramené à la dimension de l'échantillon ($5000 cm^2$) correspond à une masse totale de stérigmatocystine sur le support égale à 145 μg .

Par conséquent, il apparaît que dans ces conditions d'essais seuls 0,07% des quantités de stérigmatocystine produite ont été aérosolisées, contre 0,9% lors des essais réalisés précédemment avec le banc expérimental. Cette différence s'explique simplement par les différences de perturbations et notamment la vitesse d'air plus importante sur le banc d'essai (148 m/s) que dans la chambre environnementale (100 cm/s).

Afin d'apprécier le niveau de concentration de stérigmatocystine que nous pourrions avoir avec une telle perturbation dans un habitat dont un mur serait contaminé, nous avons réalisé une simulation numérique d'émission à partir d'une chambre modèle:

Volume de la chambre		17,4 m ³
Surface	sol	7 m ²
	mur	24 m ²
	joint	0,2 m ²
Surface contaminée		0,1 m ²

Ainsi, une perturbation d'air à une vitesse de 100 cm/s générerait théoriquement une quantité de stérigmatocystine aéroportée de 20,3 ng, soit une concentration après homogénéisation de la pièce de 1,2 ng/m³. Ce niveau de concentration s'avère accessible par les méthodes de prélèvement et d'analyse que nous employons.

DISCUSSION GENERALE

La croissance fongique s'accompagne de la production de Composés Organiques Volatils (COV), de l'excrétion de mycotoxines et de la dissémination de conidies (Wessén, 1995 ; Osharov et May, 2001 ; Weidenböcker, 2001), susceptibles de provoquer diverses maladies notamment respiratoires chez les personnes exposées. Pourtant, la caractérisation de cette exposition reste à ce jour méconnue.

Le principal objectif de notre recherche a consisté d'une part à définir puis valider des indicateurs de surveillance de la qualité microbiologique des locaux et d'autre part à développer des méthodes d'analyse de cette qualité en se basant en particulier sur la recherche de constituants cellulaires spécifiques ou de produits du métabolisme (ergostérol, mycotoxine).

L'un des axes de notre démarche expérimentale a été de définir des traceurs chimiques spécifiques d'une contamination fongique sur des matériaux de construction.

Nous avons utilisé pour cela divers matériaux fréquemment isolés dans les bâtiments : la toile de verre, le papier peint vinyl, le plâtre, la dalle de plafond acoustique et le liège. La diversité de ces produits vis-à-vis de leurs constituants nous permet d'avoir une bonne représentativité d'un environnement intérieur réel composé d'un grand nombre de produits de construction souvent émissifs.

Nous avons également utilisé trois souches fongiques : *Aspergillus niger* dont la croissance rapide sur les matériaux nous a paru propice à l'émission de COV, ainsi qu'*Aspergillus versicolor* et *Penicillium brevicompactum* qui sont des espèces fréquemment isolées dans l'habitat (Samson et Hoekstra, 1994).

A ce jour, les techniques préconisées pour détecter la présence de moisissures dans les bâtiments reposent sur la reconnaissance visuelle d'un développement fongique et la mise en culture de conidies prélevées dans l'air ou sur les surfaces (Chasseur et Nolard, 2003). Or, la présence de ces micro-organismes peut se révéler difficile à diagnostiquer, quand, par exemple, les contaminations se situent au niveau du système de ventilation ou encore dans les structures du bâtiment. Invisibles alors à la surface des produits de construction, et indétectables par l'analyse microbiologique de l'air, les moisissures produisent néanmoins, en continu, des métabolites et produits de dégradation inhalables et responsables dans certains cas de maladies (effets cancérogènes de certaines mycotoxines).

De plus, la réponse de ces techniques de mesure est longue puisqu'il est nécessaire d'attendre la croissance des microorganismes prélevés en laboratoire avant de pouvoir réaliser l'analyse.

Dans ce contexte, nous avons défini plusieurs traceurs fongiques et proposé un protocole d'application permettant leur utilisation dans des environnements intérieurs.

Le prélèvement est alors réalisé en déposant un adsorbant (tube radiello) dans l'environnement à étudier. Après quelques jours, le tube est récupéré puis analysé en chromatographie en phase gazeuse. Cet échantillonnage simple et peu onéreux par rapport aux méthodes culturales permet d'obtenir une réponse rapide en ce qui concerne la présence ou non d'un développement fongique dans la pièce analysée.

Les COV étant volatils, ils ne sont pas retenus par les matériaux poreux, par conséquent, contrairement aux méthodes usuelles, l'identification de traceurs chimiques spécifiques

pourrait permettre la détection d'une contamination quand d'autres signes ne sont pas visibles (Korpi *et al.*, 1998). Lors de notre étude, nous avons validé cette application à travers la détection par la mesure de nos traceurs d'une contamination dans un des logements ne présentant pas de signes visibles de développement fongique.

Nous avons également mis en évidence que l'émission de COV spécifiques débute dès le début du développement fongique. Ces résultats sont en accords avec l'étude de Wessén *et al.* (1995) indiquant que l'émission de COV commence dès la phase de germination de la moisissure. Par conséquent et contrairement à la reconnaissance visuelle, cette mesure présente également l'avantage de permettre de détecter un développement fongique récent avant que les premiers signes visibles de contamination ne soient détectés.

Afin de rendre applicable l'utilisation de COV comme indicateurs d'une croissance fongique, nous avons proposé une approche originale basée sur l'élaboration d'un indice chimique de contamination calculé en fonction de l'origine et de la spécificité de chaque traceur retenu. Cet indice a notamment permis de tenir compte de la dépendance de certaines de ces molécules vis-à-vis du couple moisissure-matériau constatée par différents auteurs (Wilkins *et al.*, 1995 ; Sunesson *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 1998). De plus, cet indice prend en compte le caractère peu spécifique, constaté par Kiviranta *et al.* (1998), de certains COV émis également en présence d'autres organismes vivants.

Cette approche permet donc une application efficace et simplifiée de la mesure de traceurs chimiques dans l'habitat.

Cet indice, construit à partir de réponses de types binaires (présence ou non des composés), ne tient pas compte de données quantitatives telles que la concentration des COV par exemple. Par conséquent, son utilisation ne permet pas d'accéder au niveau de contamination d'un local. Toutefois, lors de notre étude nous avons mis en évidence que les concentrations de COV fongiques émises dépendent à la fois de l'espèce et du support de croissance. Par conséquent, dans un environnement contaminé réel présentant une flore fongique diversifiée et de nombreux produits de construction, les concentrations de COV ne sont pas directement proportionnelles au niveau de croissance, confirmant ainsi les résultats de Wilkins, en 2002, soulignant qu'il n'existe pas de relation entre la concentration de COV et la biomasse et donc que l'accès au niveau de contamination d'un local par la mesure de cette concentration ne semble pas possible.

La variable de contamination fongique que nous avons extraite à partir de l'analyse globale de nos données permet également l'exploitation de la mesure des COV dans les environnements intérieurs. Contrairement aux traitements de données classiques basés sur l'identification des composés émis, cette autre approche considère l'ensemble du chromatogramme sans préjuger de la nature des produits et permet d'amplifier et de dévoiler des comportements spécifiques habituellement masqués par l'émission des matériaux.

Cette technique appliquée à un plus grand nombre d'échantillons incluant plus de matériaux et plus d'espèces fongiques conduirait *in fine* à la modélisation d'une variable de contamination fongique formée par des ions spécifiques.

La seconde phase de notre recherche a consisté à caractériser les aérosols fongiques susceptibles d'être inhalés par les occupants d'environnements moisissés.

Pour cela, nous avons dans un premier temps établi une métrologie capable d'estimer la globalité de la flore fongique aéroportée. A ce jour, la méthode culturale est préconisée pour l'évaluation de l'exposition des personnes aux aérosols fongiques dans l'habitat (Halewyn *et*

al., 2002). Cependant, cette mesure ne permet d'obtenir qu'un cliché du niveau de contamination, les échantillonnages associés à cette méthode excédant rarement 2 minutes de collecte. De ce fait, cette technique nous semble mal adaptée à l'évaluation de la biocontamination des locaux soumise à des perturbations discontinues et à la génération de « bouffés » polluantes ponctuelles difficilement mesurables par une mesure instantanée.

Contrairement aux méthodes usuelles, le dosage en chromatographie liquide d'un constituant de la membrane cellulaire, l'ergostérol, couplé à un appareil de collecte à coupelle rotative nous a permis d'évaluer près d'une semaine d'exposition cumulée.

La limite de quantification atteinte est de 0,4 ng d'ergostérol par m³ d'air prélevé, soit une valeur théorique de 150 spores/m³.

La méthode culturale ne permet pas d'accéder à la biomasse totale puisque seule la fraction cultivable est considérée. Pourtant, cette fraction ne représente qu'une faible proportion des particules susceptibles d'entraîner des manifestations immuno-allergiques ou toxique, de 0,1 à 10% selon les auteurs (Flannigan, 1996 ; Eduard *et al.*, 1997 ; Russell *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la fraction cultivable, la méthode que nous proposons reste moins sensible que les techniques usuelles, en revanche elle seule permet l'évaluation de la biomasse totale en mesurant également la fraction non cultivable.

Dans un second temps, nous avons développé le dosage de mycotoxines aéroportées.

Lors de nos essais, nous avons démontré que la production de stérigmatocystine dépend du support de croissance et notamment des conditions d'encrassement de celui-ci. Les concentrations de mycotoxines générées ne sont donc pas directement proportionnelles à la biomasse produite. Par conséquent, la mesure des concentrations d'aérosols fongiques, même couplée à l'identification des espèces, ne suffit pas à évaluer avec précision l'exposition des personnes aux mycotoxines aéroportées, montrant ainsi l'intérêt de doser directement ces toxines dans les habitats.

Il existe peu d'études ayant développé des méthodes de dosage et d'analyse des mycotoxines à partir de prélèvements atmosphériques dans l'habitat. De plus, depuis que l'association entre la croissance de *Stachybotrys chartarum* dans les bâtiments et l'apparition de cas d'hémossidérose pulmonaire primitive idiopathique (IPH) chez des nourrissons a été publiée (Jarvis *et al.*, 1996 ; Montana *et al.*, 1997), ces recherches se focalisent sur la famille de mycotoxine majoritaire de cette moisissure, les trichothécènes.

Par conséquent, les techniques développées dans la littérature restent spécifiques à cette famille et ne permettent pas la détection d'autres familles de mycotoxines (Croft, 1986 ; Johanning, 2002).

S'il est vrai que les trichothécènes sont particulièrement intéressants dans le cas d'une contamination par *Stachybotrys* ou éventuellement *Memnoniella*, la présence de ces espèces dans de tels environnements étant peu fréquente, comme le soulignent Samson et Hoekstra (1994), nous avons développé une méthode permettant de doser d'autres mycotoxines et notamment la stérigmatocystine, la 5-méthoxystérigmatocystine et l'ochratoxine A qui ont pour point communs d'être des molécules polaires. Cette technique permet également le dosage de la déoxynivalénol appartenant à la famille des trichothécènes.

En fait, notre dosage basé sur une rétention préalable des mycotoxines sur une colonne SPE en phase inverse doit permettre la mesure d'un grand nombre de ces molécules à condition qu'elles soient polaires.

Le banc expérimental mise au point nous a permis de générer des aérosols de stérigmatocystine à partir de la croissance d'une espèce de moisissure sur trois matériaux de construction (toile de verre et 2 types de papiers peints). Nous avons utilisé pour cela une souche d'*Aspergillus versicolor*, cette espèce fréquemment isolée dans les habitats pouvant être toxigène en produisant notamment une mycotoxine cytotoxique : la stérigmatocystine.

Le dosage de cette toxine à partir des aérosols générés avec ce banc d'essai nous a permis de mettre en évidence que le transfert entre le support contaminé et l'air dépendait du matériau toutes conditions égales par ailleurs (entre 0,9 et 3,7% selon le support étudié). Aussi, la relation entre les quantités de mycotoxines contenues sur les supports et les concentrations inhalables par les personnes n'est pas évidente.

A ce jour, la majorité des études référençant les mycotoxines dans l'habitat évaluent la concentration de ces toxines sur des matériaux contaminés ou dans des poussières collectées dans des moquettes ou des gaines de ventilation (Johanning *et al.*, 1998 ; Nielsen *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 1999 ; Tuomi *et al.*, 2000 ; Engelhart *et al.*, 2002). Or, dans le cas de maladies respiratoires induites par ce type d'agents, le mode d'exposition des personnes est l'inhalation de particules (Charmley *et al.*, 2000 ; Fung et Hughson, 2002). Par conséquent seul le dosage des mycotoxines directement dans l'air semble permettre d'évaluer l'exposition des personnes dans des environnements réels où la nature des produits de construction n'est généralement pas définie.

Afin d'évaluer et de caractériser les aérosols de mycotoxines susceptibles d'être retrouvées dans les habitats, nous avons développé un volume d'essai permettant de simuler des « bouffées » polluantes à partir d'un matériau contaminé.

Ainsi, ce montage expérimental nous a permis de démontrer qu'une perturbation d'air située à proximité d'une surface contaminée était responsable de l'aérosolisation de stérigmatocystine. Dans nos conditions d'essai, nous avons généré des concentrations de 100 nano grammes de stérigmatocystine par mètre cube d'air réparties dans l'ensemble des fractions particulaires dont 80% dans la fraction alvéolaire. Les alvéoles étant la dernière ramification bronchique avant la zone d'échanges gazeux, ces résultats démontrent que certaines mycotoxines sont susceptibles d'accéder à l'ensemble de l'appareil respiratoire.

Différent auteurs ont montré que l'introduction de mycotoxines dans l'appareil respiratoire peut entraîner des allergies graves ou des symptômes non spécifiques tels que maux de tête, de gorge, alopecie, diarrhée, fièvre... (Miller, 1990 ; Davies *et al.*, 1995 ; Yang et Johanning, 1997 ; Trucksess *et al.*, 2001). Par conséquent l'accès à l'exposition aux mycotoxines permet d'évaluer un risque sanitaire pour les occupants de lieux contaminés par des moisissures.

CONCLUSION

L'objectif de notre recherche consistait à développer des méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des environnements intérieurs et à définir puis valider des indicateurs de surveillance de cette qualité.

Ainsi, notre travail a porté à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement, mais également sur la mise au point et l'adaptation de méthodes de dosage et de reconnaissance indirecte, basées en particulier sur la recherche de produits du métabolisme ou de constituants cellulaires spécifiques (COV spécifiques, ergostérol et mycotoxines).

Le premier axe de notre démarche expérimentale a consisté à caractériser les Composés Organiques Volatils (COV) émis par la présence d'un développement fongique sur des matériaux de construction.

Nous avons déterminé une liste de 18 molécules issus du métabolisme fongique : le méthyl-2-éthylhexanoate, le 1-octen-3-ol, le 3-heptanol, le 3-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-butanol, le 1,3-octadiène, le 2-(5H)-furanone, le 2-heptène, l' α -pinène, le 2-méthylisobornéol, le 4-heptanone, le 2-méthylfuran, le diméthyldisulfide, le méthoxybenzène, ainsi qu'un terpénoïde et trois sesquiterpènes.

La détermination de l'origine de ces composés et de leurs spécificités à un substrat ou une espèce fongique nous a permis d'élaborer un indice chimique de contamination calculé en fonction de leur absence ou de leur présence dans un local.

Contrairement à une approche globale traitant de l'émission totale, l'utilisation de cet indice possède deux avantages :

- la multiplication des traceurs permet de diminuer le risque d'erreurs lié à la détection d'un composé émis par d'autres sources.
- la sélection de molécules spécifiques permet de limiter l'impact des émissions liées aux matériaux.

L'application de cet indice à des prélèvements *in situ* a permis de différencier des logements contaminés et des logements « sains », validant ainsi cet outil.

De plus, le calcul d'indice a permis également la détection d'une contamination supposée mais non visible à l'intérieur d'un de ces logements. Ce cas prouve que cette stratégie est susceptible de dévoiler la présence d'une contamination fongique lorsque d'autres signes ne sont pas visibles.

La détection de ces molécules pourrait notamment permettre d'une part l'identification d'une croissance dès le début du développement fongique et d'autre part la détection de contaminations « masquées » pour lesquelles les spores ne sont pas émises dans l'environnement et donc non accessibles par les techniques classiques employant la culture.

Mais ces traceurs sont émis en faibles quantités (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{m}^3$) par rapport au reste des émissions de COV d'un environnement intérieur et leur présence risque par conséquent d'être masquée.

Afin de s'affranchir des émissions majoritaires des matériaux, nous avons par ailleurs déterminé une série d'ions spécifiques d'un développement fongique à partir de l'analyse statistique de l'ensemble de nos résultats. La sélection de ces ions pour le traitement des prélèvements effectués dans les logements nous a permis de définir un comportement caractéristique des locaux contaminés.

Cette approche originale de l'analyse des échantillons permet d'obtenir une méthode de détection d'un développement fongique indépendante du reste de l'émission.

La deuxième phase de notre démarche a consisté à caractériser l'exposition des personnes aux aérosols fongiques dans les locaux.

A partir de la mise au point d'une méthode de dosage d'un constituant cellulaire spécifique des champignons, l'ergostérol, nous avons établi une métrologie capable d'estimer la globalité de la flore fongique aéroportée.

En utilisant conjointement ce dosage et un appareil de collecte validé par ailleurs, la mesure de la flore fongique globale a été rendue possible. Comparé aux méthodes traditionnelles utilisant la culture et permettant ainsi d'apprécier un instantané du niveau de contamination, le dosage de l'ergostérol évalue près d'une semaine d'exposition cumulée et permet également de comptabiliser la fraction de spores non cultivables et susceptible d'entraîner des manifestations immuno-allergiques voire toxiques.

Cette technique semble adaptée à la contamination biologique des locaux qui est un phénomène discontinu soumis à l'aéraulique et à la formation ponctuelle de « bouffées » polluantes difficilement mesurables par une collecte instantanée de la fraction cultivable.

D'autre part, les mesures d'ergostérol réalisées sur sites ont montré qu'elles permettaient d'appréhender les différentes situations d'expositions des occupants à une flore fongique aéroportée. L'utilisation de cette technique apparaît donc adaptée à une évaluation quantitative de l'exposition des personnes. Elle doit cependant s'accompagner d'une approche qualitative. La culture serait alors utilisée, car elle seule permet l'identification des moisissures les plus allergisantes et/ou toxigènes.

Afin d'évaluer la toxicité potentielle de ces aérosols, nous avons mis au point une technique analytique permettant d'associer le dosage des mycotoxines aéroportées à celui de l'ergostérol. Cette technique nous a permis de caractériser la production d'une mycotoxine, la stérigmatocystine, en fonction du support de croissance. Les résultats ont mis en évidence que la production de mycotoxines, pour une même souche fongique, dépendait de la disponibilité des nutriments contenus dans le matériau contaminé. Les concentrations de mycotoxines produites ne sont donc pas uniquement liées à la biomasse fongique mais également aux conditions de croissance de la moisissure. Par conséquent, l'identification des espèces couplée à la quantification des conidies aéroportées ne suffit pas à évaluer l'exposition des personnes aux mycotoxines.

La mise au point d'un banc expérimental permettant de générer des aérosols fongiques a permis de mettre en évidence l'aérosolisation des mycotoxines à partir d'une croissance fongique sur des matériaux de construction. Cette étude a également montré que le taux de transfert substrat-air des mycotoxines était dépendant du support de croissance. Par conséquent, le dosage de ces toxines à partir de prélèvements de biomasse sur les matériaux contaminés ne permet pas d'évaluer l'exposition des occupants, seul le dosage des mycotoxines dans l'air permet de l'appréhender.

Le développement d'un volume d'essai a permis la simulation de « bouffées » polluantes sur un matériau de construction contaminé par une moisissure. Nous avons ainsi démontré qu'une perturbation d'air située à proximité d'une surface contaminée (vitesse d'air 10 cm.s^{-1} ; surface contaminée $0,5 \text{ m}^2$) pouvait entraîner l'aérosolisation de stérigmatocystine.

L'utilisation de ce volume ($V=1\text{m}^3$) a également permis la validation de notre technique de collecte pour le dosage des mycotoxines dans l'air.

L'analyse des différentes fractions inhalables a permis de démontrer que, dans nos conditions d'essai, plus de 80% des quantités de stérigmatocystine aérosolisées était contenue dans les particules de la fraction alvéolaire. Les mycotoxines sont donc susceptibles de pénétrer dans l'ensemble de l'appareil respiratoire.

In fine, l'identification des COV et le dosage simultané de l'ergostérol et de mycotoxines aéroportées permettent la détection d'une croissance fongique dans un habitat ainsi que l'évaluation de l'exposition d'occupants de locaux contaminés.

Dans l'avenir, pour compléter l'approche de la détection d'une contamination par la mesure de COV, il serait intéressant de développer un modèle exprimant le degré de contamination d'un environnement moisi applicable à tout type de bâtiment (écoles, bureaux, hôpitaux...). La mise au point de capteurs pourrait alors être envisagée pour permettre une automatisation de l'analyse.

En ce qui concerne la caractérisation des aérosols fongiques, le développement de l'étude et du dosage d'un plus grand nombre de mycotoxines permettrait à terme de mieux caractériser leur toxicité et ainsi d'accéder aux niveaux d'exposition des personnes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACGIH (1999).

Bioaerosols: assessment and control.

American Conference of Industrial Hygienists (Cincinnati).

ADAN, O ; SAMSON, R and WIJNEN, J (1994).

Fungal resistance tests of gypsum based interior finishes under steady-state air humidities.

in Health implication of fungi in indoor environments. Ed. RA Samson, B Flannigan, ME Flannigan. **2** pp. 451-484.

AFNOR, (1996).

Qualité de l'air - Définitions des fractions de taille des particules pour l'échantillonnage lié aux problèmes de santé.

NF ISO 7708.

AGRAWAL, O ; DHAWAN, K ; GARG, F ; SHAHEEN, N ; PATHAK and MISRA, A, (1988).

Study of Biodeterioration of the Ajanta Wall Paintings.

International Biodeterioration and Biodegradation, **24** pp.121-129.

AISNER, J ; SCHIMPF, SC ; BENNETT, JE ; YOUNG, VM and WIERNIK, PH, (1976).

Aspergillus infections in cancer patients, association with fireproofing materials in a new hospital.

The Journal of the American Medical Association, **235**, (4), pp.411-412.

ALVAREZ, L ; GIL, AG ; EZPELETA, O ; GARCIA-JALON, JA and LOPEZ DE CERTAIN, A, (2004).

Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration.

Food and Chemical Toxicology, **42** pp.825-834.

ANDERSEN, B and NISSEN, A, (2002).

Evaluation of media for detection of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged building.

International Biodeterioration and Biodegradation, **46** pp.111-116.

ANDERSON, M ; NIKULIN, M ; KOLJALG, U ; ANDERSON, M ; RAINEY, F ; REIJULA, K ; HINTIKKA, E and SALKINOJA-SALONEN, M, (1997).

Bacteria, moulds, and toxins in water-damaged building materials.

Applied Environmental Microbiology, **63** pp.387-393.

ARNOW, PM ; ANDERSEN, RL ; MAINOUS, PD and SMITH, EJ, (1978).

Pulmonary Aspergillosis during hospital renovation.

American Review of Respiratory Disease, **118** pp.49-53.

AXELSSON, B-O ; SARAF, A and LARSSON, L, (1995).

Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry.

Journal of Chromatography B, **1** pp.77-84.

AYERST, G, (1966).

Influence of physical factors on deterioration by moulds.
Society of Chemical Industry Monograph, **23** pp.14-20.

BASSI, M and GIACOBINI, C, (2001).

Scanning electron microscopy : a new technique in the study of the microbiology of works of art.
International Biodeterioration and Biodegradation, **48** pp.55-66.

BEGUIN, H, (1995).

Mould biodiversity in homes. II. Analysis of mattress dust.
Aerobiologia, **11** pp.3-10.

BEGUIN, H and NOLARD, N, (1994).

Mould biodiversity in homes. I. Air and surface analysis of 130 dwellings.
Aerobiologia, **10** pp.157-166.

BERTINCHAMPS, F ; DEMOULIN, O and DUPONT, J (2000).

Approche de la problématique des mycotoxines : Partie méthodologie analytique.
 Université Catholique de Louvain 62.

BJURMAN, J (1999).

Release of MVOCs from microorganisms.
In Organic Indoor Air Pollutants. T SALTHAMMER WILEY-VCH pp. 259-273.

BLUMENTHAL, CZ, (2004).

Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei* : justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations devrived from the three fungi.
Regulatory Toxicology and Pharmacology, **39** pp.214-228.

BÖRJESSON, T ; STÖLLMAN, U and SCHNÜRER, J, (1990).

Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substates.
Applied and Environmental Microbiology, **56**, (12), pp.3705-3710.

BOTTON, B ; BRETON, A ; FEVE, M ; GUY, P ; LARPENT, JP and VEAU, P (1985).

Moisissures nuisibles.
In Moisissures utiles et nuisibles- Importance industrielle. Masson. Paris.

BOUSCAREN, P (1998).

Nature et sources de COV.
In Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement. P LE CLOIREC. Paris
 Ecole des mines de Nantes pp.59-85.

BUNGER, J ; WESTPHAL, G ; MONNICH, A ; HINNENDAHL, B ; HALLIER, E and MULLER, M, (2004).

Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins.
Toxicology, **202** pp.199-211.

CAHAGNIER, B, (1998).

Moisissures des aliments peu hydratés. Paris.

CEN (2000).

EN 13098 : Workplace atmospheres - Guideline for measurement of airborne microorganisms and endotoxin. Comité Européen de Normalisation, CEN TC 137, Bruxelles.

CHANG, JCS ; FOARDE, KK and VANOSDELL, DW, (1995).

Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles. *Atmospheric Environment*, **29** ,(17), pp.2331-2337.

CHARMLEY, LL and TRENHOLM, HL (2000).

Les mycotoxines.

Agence canadienne d'inspection des aliments, 6 p.

CHASSEUR, C and NOLARD, N, (2003).

Les champignons dans l'habitat.

CSTC magazine, pp.3-15.

CHEW, GL ; DOUWES, J ; DOEKES, G ; HIGGINS, KM ; STRIEN, Rv ; SPITHOVEN, J and BRUNEKREEF, B, (2001).

Fungal extracellular polysaccharides, β (1-3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust.

Indoor Air, **11** pp.171-178.

CLARKE, JA ; JOHNSTONE, CM ; KELLY, NJ ; MCLEAN, RC ; ANDERSON, JA ; ROWAN, NJ and SMITH, JE, (1999).

A technique for the prediction of the conditions leading to mould growth in buildings.

Building and Environment, **34** pp.515-521.

CORNET, M ; FLEURY, L ; MASLO, C ; BERNARD, J and BRUCKER, G, (2002).

Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area".

Journal of Hospital Infection, **51** ,(4), pp.288-296.

CROFT, WA ; JARVIS, BB and YASTAWARA, CS, (1986).

Airborne outbreak of trichothecene toxicosis.

Atmospheric Environment (1967), **20**, (3), pp.549-552.

CROOK, B (1995).

Inertial samplers : biological perspectives.

In Bioaerosols handbook. CS Cox and CM Wathes. London Lewis publishers p.621.

DAVIES, R ; SUMMERBELL, R ; HALDANE, D ; DUFOUR, A ; YU, K ; BRODER, I; DALES, R ; KIRKBRIDE, J ; KAURI, T and ROBERTSON, W (1995).

Contamination fongique dans les immeubles publics. Guide facilitant la détermination et la gestion des problèmes.

Ottawa, Comité fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail, Santé Canada 90.

DEOUX, S, (2001).

Humidité et air intérieur : situation préoccupante.

CSTB Magazine, **133** pp.3-6.

DILLON, HK ; MILLER, JD ; SORENSON, WG ; DOUWES, J and JACOBS, RR, (1999).

Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children.

Environmental Health Perspectives, **107**, (3), pp.473-480.

DONALD, WW and MIROSHA, CJ, (1977).

Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed.

Cereal Chemistry, **54**, (3), pp.466-474.

DOUWES, J ; DOEKES, G ; MONTIJN, R ; HEEDERIK, D and BRUNEKREEF, B, (1996).

Measurement of $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans in occupational and home environments with an inhibition enzyme immunoassay.

Applied and Environmental Microbiology, **62**, (9), pp.3176-3182.

DOUWES, J ; ZUIHOF, A ; DOEKES, G ; Van der ZEE, S ; WOUTERS, I ; BOEZEN, H and BRUNEKREEF, B, (2000).

(1 $\rightarrow$ 3)- β -D glucan and endotoxins in house dust and peak flow variability in children.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **162** pp.1348-1354.

EDUARD, W (1993).

Assessment of mould spore exposure and relations to symptoms in wood trimmers.

The Netherlands, University of Wageningen.

EDUARD, W (1997).

Exposure to non infectious microorganisms and endotoxins in agriculture.

Annals of Agricultural and Environmental Medicine, **4** pp.179-186.

EDUARD, W and HEEDERIK, D, (1998).

Methods for quantitative assessment of airborne levels of non-infectious microorganisms in highly contaminated work environments.

American Industrial Hygiene Association Journal, **59** pp.113-127.

ELIXMANN, JH ; LINSKENS, HF ; SCHATA, M and JORDE, W, (1989).

Can airborne fungal allergens pass through an air conditioning system?

Environment International, **15**, (1-6), pp.193-196.

ENGELHART, S ; LOOCK, A ; SKUTLAREK, D ; SAGUNSKI, H ; LOMMEL, A ; FÄRBER, H and EXNER, M, (2002).

Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and Sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments.

Applied and Environmental Microbiology, **68**, (8), pp.3886-3890.

EZEONU, IM ; PRICE, DL ; SIMMONS, RB ; CROW, SA and AHEARN, DG, (1994).
Fungal production of volatiles during growth on fiberglass.
Applied and Environmental Microbiology, **60**, (11), pp.4172-4173.

FEDORUK, M ; UHLMAN, S ; BAKER, D and YANG, H (2001).
Analysis of microbial contamination of a ventilation system detected by measurement of microbial volatile organic compounds.
In Bioaerosols, fungi and mycotoxins : health effects, assessment, prevention and control. E JOHANING. New York pp.386-395.

FISCHER, G ; SCHWALBE, R ; MÖLLER, M ; OSTROWSKI, R and DOTT, W, (1999).
Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility.
Chemosphere, **39**, (5), pp.795-810.

FLANNIGAN, B, (1996).
Air sampling for fungi in indoor environments.
Journal Aerosol Science, **28**, (3), pp.381-392.

FRAYSSINET, C (1998).
Les mycotoxines.
In Moisissures des aliments peu hydratés. B CAHAGNIER. Paris pp.157-183.

FRISVAD, J and THARNE, U (2002).
Mycotoxin production by common filamentous fungi.
In Introduction to food and Airborne Fungi. R SAMSON, E HOEKSTRA, J FRISVAD and O FILTENBORG. Utrecht Centraal bureau voor Schimmelcultures pp.321-330.

FRISVAD, JC and THRANE, U, (1987).
Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection).
Journal of chromatography, **404** pp.195-214.

FUNG, F and HUGHSON, WG (2002).
Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure.
9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California.

GARG, KL ; JAIN, KK and MISHRA, AK, (1995).
Role of fungi in the deterioration of wall paintings.
The Science of the Total Environment, **167** pp.255-271.

GARGANI, G, (1968).
Fungus contamination of Florence art master pieces before and after the 1966 disaster.
Biodeterioration of Materials, pp.252-257.

GELL, P and COOMBS, R (1963).
The classification of allergic reactions underlying disease.

In Clinical aspects of immunology. P Gell, R COOMBS and P LACHMANN. Oxford pp. 761-781.

GERVAISE, M (1999).

Les mycotoxines. Comment les détecter?
SGS Laboratoire Crepin 2.

GESSNER, MO and NEWELL, Sy (1996).

Bulk quantitative methods for the examination of eukaryotic organoosmotrophs in plant litter.
in Manual of environmental microbiology. M McInerney, L Stetzenbach, C Hurst, G Knudsen and M Walter. Washington, DC. ASM Press pp. 295-308.

GODISH, T, (1995).

in Sick Buildings : Definition, Diagnosis and Mitigation, Lewis Publishers, 416 p.

GOMEZ-ALARCON, G and ANGELES de la TORRE, M (1994).

The effect of filamentous fungi on stone monuments : the Spanish experience.
In Building Mycology. J Singh E and FN SPON pp. 295-309.

**GORNY, RL ; REPONEN, T ; WILLEKE, K ; SCHECHEL, D ; ROBINE, E ;
BOISSIER, M and GRINSHUPUN, SA, (2002).**

Fungal fragments as indoor air biocontaminants.
Applied and Environmental Microbiology, **68** ,(7), pp.3522-3531.

GRANT, C ; HUNTER, CA ; FLANNIGAN, B and BRAVERY, AF, (1989).

The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings.
International Biodeterioration and Biodegradation, **25** pp.259-284.

GRANT, WD and WEST, AW, (1986).

Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil : evaluation as indicators of microbial biomass.
Journal of microbiological methods, **6** pp.47-53.

GRAVESEN, S ; FRISVAD, J and SAMSON, R (1994).

Microfungi.
in Microfungi, Copenhagen, Munksgaard Press, 168 p.

GRIFFIN, DH, (1994).

in Fungal physiology. New York, Wiley-Liss, 485 p.

GUMOWSKI, PL, (1997).

Hypersensibilité aux moisissures atmosphériques : Approches diagnostiques et thérapeutiques.
Expression, pp.10-15.

**HALEWYN, M-A ; LECLERC, J-M ; KING, N ; BELANGER, M ; LEGRIS, M and
FRENETTE, Y (2003).**

Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur.
Institut national de santé publique du Québec, 166 p.

HAWKER, LE (1966).

Environmental influences on reproduction.

in *The fungi, an advanced treatise*. AINSWORTH GC and SUSSMAN AS. New York and London Academic Press, pp. 435-469.

HINKLEY, SF and JARVIS, BB (2001).

Chromatographic method for *Stachybotrys* toxins.

In *Mycotoxin protocols*. TRUCKESS MW and POHLAND AE. Washington. **157** pp. 173-194.

HURST, WJ and MARTIN, RA, (1998).

High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up.

Journal of chromatography A, **810** pp.89-94.

HYSEK, J ; FISAR, Z ; ZIZKA, Z ; KOFRONOVA, O ; BINEK, B ; a, Amm and comparison of several methods, iandctZM-*, (1991).

Airborne microorganism monitoring : a comparison of several methods, including a new direct counting technique.

Zentralbl Mykrobiol, **146** pp.435-443.

HYVÄRINEN, A ; MEKLIN, T ; VEPSÄLÄINEN, A and NEVALAINEN, A, (2002).

Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity.

International Biodeterioration and Biodegradation, **49**, (1), pp.27-37.

IONITA, I, (1973).

Contribution to the study of the biodeterioration of works of art and historic monuments, IV.

Fungi involved in the deterioration of mural paintings from the monastery of Moldavia.

Revue Roumaine Biologie, Serie de botanique, **18** pp.179-189.

JANINSKA, B, (2000).

Environmental requirements for fungi.

Journal of Thermal Envelope and Building Science Publisher, **23** pp.339-48.

JANSON, R ; SERVES, CD and ROMERO, R, (1999).

Emission of isoprene and carbonyl compounds from a boreal forest and wetland in Sweden.

Agricultural and forest meteorology, **98-99** pp.671-681.

JARVIS, BB ; SORENSON, WG ; HINTIKKA, E-L ; NIKULIN, M ; ZHOU, Y ;

JIANG, J ; WANG, S ; HINKLEY, S ; ETZEL, RA and DEARBORN, D, (1998).

Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants.

Applied and Environmental Microbiology, **64**, (10), pp.3620-3625.

JESSEN, P and SCHAEFER, M, (1998).

Sampling and characterization of bioaerosols.

NIOSH Manual of Analytical Methods, 4th ed., pp.82-112.

JOHANNING, E ; BIAGINI, R ; HULL, D ; MOREY, P ; JARVIS, B and

LANDSBERGIS, P, (1996).

Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment.

International Archives of Occupational and Environmental Health, **68** pp.207-218.

JOHANNING, E ; GAREIS, M ; NIELSEN, K ; DIETRICH, R and MARTLBAUER, E (2002).

Airborne mycotoxin sampling and screening analysis.

9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California.

JOHANNING, E ; LANDSBERGIS, P ; GAREIS, M ; YANG, C and OLMESTED, E, (1999).

Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure.

Environmental Health Perspectives, **107**, (3), pp.489-494.

KELLER, R ; SENKPIEL, K and OHGKE, H (2001).

Use of MVOC measurement and odours perception as indicator of mould in indoor areas.

In Bioaerosols, fungi and mycotoxins : health effects, assessment, prevention and control.

E JOHANING. New York pp.532-537.

KIVIRANTA, H ; TUOMAINENE, A ; REIMAN, M ; LAITINEN, S ; LIESIVUORI, J and NEVALAINEN, A, (1998).

Quantitative identification of volatile metabolites from two fungi and three bacteria species cultivated on two media.

Central European Journal of Public Health, **6**, (4), pp.296-299.

KORPI, A ; PASANEN, A-L and PASANEN, P, (1998).

Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions.

Applied and Environmental Microbiology, **64**, (8), pp.2914-2919.

KORPI, A ; PASANEN, A-L ; PASANEN, P and KALLIOKOSKI, P, (1997).

Microbial growth and metabolism in house dust.

International Biodeterioration and Biodegradation, **40**, (1), pp.19-27.

KREJA, L and SEIDEL, H-J, (2002).

On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549.

Chemosphere, **49** pp.105-110.

KRISHNAMACHARI, KAV ; BHAT, RV ; NAGARAJAN, V and TILAK, TBG, (1975).

Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in western India.

The Lancet, **1** pp.1061-1063.

LARSEN, TO and FRISVAD, JC (1994).

Production of volatiles and presence of mycotoxins in conidia of common indoor *Penicillia* and *Aspergillii*.

In Health Implications of Fungi in Indoor Environments. RA SAMSON, M FLANNIGAN, E FLANNIGAN *et al.*, Amsterdam. **2** pp.251-279.

LEBART, L ; MORINEAU, A and PIRON, M (1997).

In Statistique exploratoire multidimensionnelle - 2^{ème} édition, 436 p.

LESAGE-MEESSEN, L and CAHAGNIER, B (1998).

Mécanismes d'adaptation des micromycètes aux activités de l'eau réduite.

In Moisissures des aliments peu hydratés. B CAHAGNIER. Paris pp. 19-35.

LYLES, WB ; GREVE, KW ; BAUER, RM ; WARE, MR ; SCHRAMKE, CJ ; CROUCH, J and HICKS, A, (1991).

Sick building syndrome.

Southern Medical Journal, **84**, (1), pp.65-71.

MADLIN, T, (1994).

Fungal aerosols : a review.

Journal of Aerosol Science, **25**, (8), pp.1405-1412.

MATCHAM, SE ; JORDAN, BR and WOOD, DA, (1985).

Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods.

Applied Microbiology Biotechnology, **21** pp.108-112.

Mc COMB, ME ; KRUTCHINSKY, N ; WERNER, E ; STANDING, KG and PERREAULT, H, (1998).

Sensitive high-resolution analysis of biological molecules by capillary zone electrophoresis coupled with reflecting time-of-flight mass spectrometry.

Journal of chromatography A, **800** pp.1-11.

MILLER, J ; LAFLAMME, A ; SOBOL, Y ; LAFONTAINE, P and GREENHALGH, (1988).

Fungi and fungal products in some Canadian houses.

International Biodeterioration and Biodegradation, **24** pp.103-120.

MILLER, JD, (1990).

Fungi as contaminants in indoor air.

Indoor air, pp.51-64.

MILLER, JD and YOUNG, JC, (1997).

The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air.

American industrial hygiene association journal, **58** pp.39-43.

MONTANA, E ; ETZEL, R ; ALLAN, T ; HORGAN, T and DEARBORN, D, (1997).

Environmental risk factors associated with pediatric Idiopathic Pulmonary Hemorrhage and Hemosiderosis in a Cleveland Community.

Pediatrics, **99**, (1), pp.1-8.

MULTON, JL (1998).

L'état thermodynamique de l'eau dans les milieux biologiques et alimentaires.

In Moisissures des aliments peu hydratés. B CAHAGNIER. Paris pp. 1-18.

NAKAMURA, H, (1987).

Sterilization efficacy of ultraviolet irradiation on microbial aerosols under dynamic airflow by experimental air conditioning systems.

The Bulletin Board of Tokyo Medical and Dental University, **34** pp.25-40.

NAYLOR, S and TOMLINSON, AJ, (1998).

Membrane preconcentration-capillary electrophoresis tandem mass spectrometry (mPC-CE-MS/MS) in the sequence analysis of biologically derived peptides.

Talanta, **45** pp.603-612.

NFEN13098, (2000).

Atmosphère des lieux de travail - Règles pour le mesurage de microorganismes et d'endotoxine en suspension dans l'air.

Norme européenne

NIELSEN, FK (2001).

Mould growth on building materials.

The Mycology Group. Lyngby, Technical University of Denmark 106.

NIELSEN, K ; GRAVESEN, S ; NIELSEN, P ; ANDERSEN, B ; THRANE, U and FRISVAD, J, (1999).

Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials.

Mycopathologia, **145** pp.43-56.

NIELSEN, KF, (2003).

Mycotoxin production by indoor molds.

Fungal genetics and biology, **39** pp.103-117.

NIELSEN, KF ; HANSEN, MO ; LARSEN, TO and THRANE, U, (1998).

Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings.

International Biodeterioration and Biodegradation, **42** pp.1-7.

NIELSEN, KF and SMEDSGAARD, J, (2003).

Fungal metabolite screening : database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology.

Journal of Chromatography A, **1002** pp.111-136.

NIELSEN, KF ; THRANE, U ; LARSEN, TO ; NIELSEN, PA and GRAVESEN, S, (1998).

Production of mycotoxins on artificially inoculates building materials.

International Biodeterioration and Biodegradation, **42** pp.9-16.

NIELSEN, MS ; NIELSEN, PV and FRISVAD, JC, (1996).

Micellar electronic capillary chromatography of fungal metabolites resolution optimized by experimental design.

Journal of Chromatography A, **721** pp.337-344.

NIEMINEN, SM ; KÄRKI, R ; AURIOLA, S ; TOIVOLA, M ; LAATSCH, H ; LAATIKAINEN, R ; HYVÄRINEN, A and WRIGHT, Av, (2002).

Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials.

Environmental Microbiology, **68**, (10), pp.4871-4875.

NOLARD, N, (1997).

Moisissures et allergies respiratoires.

Expression, **5** pp.7-16.

NOLARD, N and BEGUIN, H (2003).

Moisissures.

In *Traité d'allergologie*. Flammarion. **Chapitre 34** pp. 441-461.

OSHEROV, N and MAY, G, (2001).

The molecular mechanisms of conidial germination.

FEMS Microbiology Letter, **199**, (2), pp.153-160.

PALMGREN, U ; STROM, G ; BLOMQUIST, G ; MALMBERG, P ; and 401-406., CoamoNfeaa-CmJAB, (1986).

Collection of airborne microorganisms on Nuclepore filters estimation and analysis - CAMNEA method.

Journal of Applied Bacteriology, **61** pp.401-406.

PANASENKO, VT, (1967).

Ecology of microfungi.

The botanical review, **33** pp.189-215.

PARAT, S (2002).

Mesure de l'aérocontamination dans les bâtiments des secteurs résidentiels et tertiaires : état des connaissances et des pratiques.

Chambéry, Air et Bio 49.

PASANEN, A, (2000).

Evaluation of indoor fungal exposure.

Proceedings Healthy Buildings 2000, **3** pp.25-38.

PASANEN, A-L, (2001).

A review : fungal exposure assessment in indoor environments.

Indoor Air, **11** pp.87-98.

PASANEN, A-L ; KORPI, A ; KASANEN, J-P and PASANEN, P, (1998).

Critical aspects on the significance of microbial metabolites as indoor air pollutants.

Environment International, **24**, (7), pp.703-712.

PASANEN, A-L ; LAPPALAINEN, S and PASANEN, P, (1996).

Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins.

The analyst, **121** pp.1949-1953.

PASANEN, A-L ; YLI-PIETILÄ, K ; PASANEN, P ; KALLIOKOSKI, P and TARHANEN, J, (1999).

Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials.
Applied and environmental microbiology, **65**, (1), pp.138-142.

PASANEN, P ; KORTI, A ; KALLIOKOSKI, P and PASANEN, A-L, (1997).

Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust.
Environment International, **23**, (4), pp.425-432.

PRESCOTT, LM ; HARLEY, JP and KLEIN, DA, (1995).

In Microbiology. De Boeck Université, Bruxelles.

RAZZAZI-FAZELI, E ; RABUS, B ; CECON, B and BOHM, J, (2002).

Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry.
Journal Chromatography A, **968** pp.129-142.

REN, P ; AHEARN, D and CROW, S, (1998).

Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles.
Journal International Microbiology, **20** pp.53-54.

RENOUX, A and BOULAUD, D, (1998).

In Les aérosols - Physique et métrologie. Paris Lavoisier.

RICHARD, JL ; PLATTNER, RD ; MAY, J and LISKA, SL, (1999).

The occurrence of ochratoxine A in dust collected from a problem household.
Mycopathologia, **146** pp.99-103.

ROBARDS, K ; HADDAD, P and JACKSON, P, (1994).

In Principles and practice of modern chromatographic methods. New York Academic Press.

ROITT, IM ; BROSTOFF, J and MALE, DK, (1985).

In Immunologie fondamentale et appliquée. Paris MEDSI.

ROQUEBERT, MF (1998).

Taxonomie des moisissures.

In Moisissures des aliments peu hydratés. B CAHAGNIER. Paris pp. 38-91.

RUOTSALAINEN, M ; HIRVONEN, M-R ; HYVÄRINEN, A ; MEKLIN, T ; SAVOLAINEN, K and NEVALAINEN, A, (1998).

Cytotoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys* sp. from moldy buildings in RAW264.7 macrophages.
Environmental toxicology and pharmacology, **6** pp.193-199.

RUSSELL, C ; MITCHELL, J and GODISH, T (1999).

Apparent viability of airborne mould spores/particles determined from culturable/viable and total mould spore sampling methods.

8th international conference on indoor air quality and climate, Indoor air'99.

RYLANDER, R, (1997).

(1→3)-β-D-glucan and airway disease in a day-care center before and after renovation.
Archives of Environmental Health, **52** pp.281-285.

RYLANDER, R and GOTO, H (1991).

First glucan lung toxicity workshop.
Committee on organic dusts. Sweden, ICOH 20.

SALMI, T, (2000).

Suitability of an electron microscope in assessing quality of indoor air.
Proceedings of Healthy Building, **1** pp.381-386.

SAMSON, RA. and HOEKSTRA, E (1994).

Common fungi occurring in indoor environments.
In Health implications of fungi in indoor environments. Amsterdam, **2** pp. 541-546.

SAND, W, (1997).

Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates-A general mechanistic overview.
International Biodeterioration and Biodegradation, **40** ,(2-4), pp.183-190.

SCHLEIBINGER, H ; BRATTIG, C ; MANGLER, M ; SAMWER, H ; LAUBMANN, D ; EIS, D ; BRAUN, P ; MARCHL, D ; NICKELMANN, A and RUDEN, H (2002).

Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC) as indicators for fungal damage.
9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California.

SCHLEIBINGER, H and RÜDEN, H, (1999).

Air filter from HVAC systems as possible source of Volatile Organic Compounds (VOC) - Laboratory and field assays.
Atmospheric Environment, **33** pp.4571-4577.

SCHMIDT and ETKIN, D, (1994).

In Biocontaminants in indoor environments. Arlington Cutter information corp.

SCOTT, PM, (1989).

Mycotoxins.
Journal of the Association Official Analytical Chemists, **72**, (1), pp. 75-80.

SCOTT, WJ, (1957).

Water relations of food spoilage microorganisms.
Advances in Food Research, **7** pp.83-127.

SEITZ, LM ; SAEUR, BB ; BURROUGHS, R ; MOHR, HE and HUBBARD, JD, (1979).

Ergosterol as a measure of fungal growth.
Physiology and Biochemistry, **69**, (11), pp.1202-1203.

Service d'Hygiène de la ville de New-York (2000).

Lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur.

SINGH, J (1994).

Management of decay and health in buildings.

In Building mycology E and FN SPON. **6** pp. 298-309.

SMITH, JE ; ANDERSON, JG ; LEWIS, CW and MURAD, Y, (1992).

Cytotoxic fungal spores in the indoor atmosphere of damp domestic environment.

FEMS Microbiology Letters, **100** pp.337-344.

SMORAGIEWICZ, W ; COSSETTE, B ; BOUTARD, A and KRZYSTYNIAK, K, (1993).

Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings.

International Archives of Occupational Environmental Health, **65** pp.113-117.

SORENSEN, W, (1999).

Fungal spores : hazardous and health.

Environmental Health Perspectives, **107**, (3), pp.469-472.

SORENSEN, WG ; FRAZER, DG ; JARVIS, BB ; SIMPSON, J and ROBINSON, VA, (1987).

Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*.

Applied and Environmental Microbiology, **53**, (6), pp.1370-1375.

STEYN, PS, (1998).

The biosynthesis of mycotoxins.

Revue médicale vétérinaire, **149**, (6), pp.469-478.

STRÖM, G ; WEST, J ; WESSEN, B and PALGREN, U (1994).

Quantitative analysis of microbial volatiles in damp swedish houses.

In Health implication of fungi in indoor environments. RA SAMSON, B FLANNIGAN, ME FLANNIGAN *et al.* Amsterdam. **2** pp. 291-305.

SUNESSON, A-L ; NILSSON, C-A ; ANDERSSON, B and BLOMQUIST, G, (1996).

Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials.

Annals of Occupational Hygiene, **40**, (4), pp.397-410.

THORNE, PS and HEEDERIK, D (1999).

Indoor Bioaerosols-Sources and Characteristics.

In Organic Indoor Air Polluants. T SALTHAMMER WILEY-VCH pp. 275-288.

TRUCKSESS, MW and POLHAND, AE, (2001).

In Mycotoxin Protocols Methods in Molecular Biology.

TULIS, JJ and THOMANN, WR, (1998).

Fungal contamination : is your HVAC system at risk ?

Managing Risk, **2**, (3), pp.1-4.

TUOMI, T ; REIJULA, K ; JOHNSON, T ; HEMMINKI, K ; HINTIKKA, E-L ; LINDROOS, O ; KALSO, S ; KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P ; MUSSALO-RAUHAMAA, H and HAAHTELA, T, (2000).

Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings.

Applied and Environmental Microbiology, **66**, (5), pp.1899-1904.

VESPER, S ; DEARBORN, DG ; YIKE, I ; ALLAN, T ; SOBOLEWSKI, J ; HINKLEY, SF ; JARVIS, BB and HAUGLAND, RA, (2000).

Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary hemorrhage : quantitative assessment before, during, and after remediation.

Journal of urban health : bulletin of the New York academy of medicine, **77**, (1), pp.68-85.

VINCENT, D and PRADALIER, A, (1997).

Impact sanitaire de la climatisation : qu'en est-il du syndrome des "bâtiments malsains" ?

Revue Médicale Interne, **18** pp.460-469.

WADY, L ; BUNTE, A ; PEHRSON, C and LARSSON, L, (2002).

Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building materials.

Journal of microbiological methods, **1717** pp.1-8.

WALINDER, R ; WIESLANDER, G ; NORBACK, D ; B, W and VENGE, P, (2001).

Nasal lavage biomarkers : effects of water damage and microbial growth in an office building.

Archives of Environmental Health, **56** pp.30-36.

WAN, G and LI, C, (1998).

Indoor endotoxin and glucan in association with sick building syndrome.

Journal Aerosol Science, **29**, (1), pp.S1309-S1310.

WEIDENBÖRNER, M, (2001).

In Encyclopedia of food mycotoxins. Gieben, 294 p.

WESSEN, B ; STRÖM, G and SCHOEPS, K-O (1995).

MVOC-profiles-a tool for indoor-air quality assessment.

In An Integrated Approach. L Morawska. Amsterdam Indoor Air Quality pp. 67-70.

WHEAT, TE ; LILLEY, KA and BANKS, JF, (1997).

Capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry detection for low-molecular-mass compounds.

Journal of Chromatography A, **781** pp.99-105.

WHO Regional Office for Europe, (2004).

Moulds and moisture.

World Health Organization, **42** pp.29.

WILKINS, K (2002).

Microbial VOC (MVOC) in buildings, their properties and potential use.

9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California. Indoor Air 2002.

WILKINS, K and LARSEN, K, (1995).

Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp buildings.
Chemosphere, **31**, (5), pp.3225-3236.

WILKINS, K ; LARSEN, K and SMIKUS, M, (2000).

Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media.
Chemosphere, **41** pp.437-446.

**WILLEKE, K ; LEE, S ; MAINELIS, G ; ADHIKARI, A ; REPONEN, T ;
GRINSHPIN, S ; CHO, S ; WANG, H and TRUNOV, M (2002).**

Airborne microorganism collection by a new electrostatic precipitator.
9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California. Indoor Air 2002.

**WOUTERS, IM ; DOUWES, J ; DOEKES, G ; THORNE, PS ; BRUNEKREEF, B and
HEEDERIK, DJJ, (2000).**

Increased levels of markers of microbial exposure in homes with indoor storage of organic household waste.
Applied and Environmental Microbiology, **66**, (2), pp.627-631.

WU, P ; SU, H and HO, H, (2000).

A comparison of sampling media for environmental viable fungi collected in a hospital environment.
Environmental Research, Section A **82** pp.253-257.

YANG, CS and JOHANNING, E, (1997).

Airborne fungi and mycotoxins.
Manuel of Environmental Microbiology, pp.651-660.

YIKE, I ; ALLAN, T ; SORENSON, WG and DEARBORN, DG, (1999).

Highly sensitive protein translation assay for Trichothecene toxicity in airborne particulates: comparison with cytotoxicity assays.
Applied and Environmental Microbiology, **65**, (1), pp.88-94.

ZILL, G ; ENGELHARDT, G and WALLNÖFER, PR, (1988).

Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC.
Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und Forschung, **187** ,(3), pp.246-249.

ANNEXE I**COMPOSITION DE LA SOLUTION NUTRITIVE**

K_2HPO_4 : 1 g

KCl : 0,5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g

Glucose : 31,5 g

NaNO_3 : $3,5 \cdot 10^{-2}$ g/L

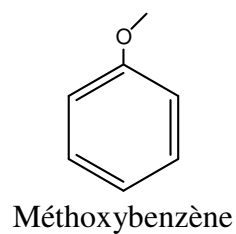
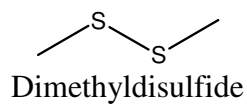
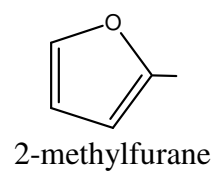
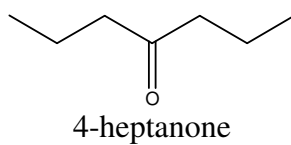
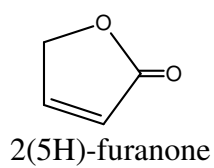
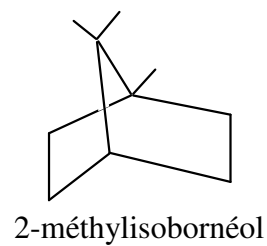
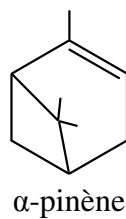
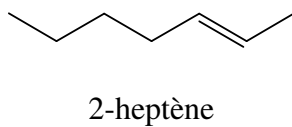
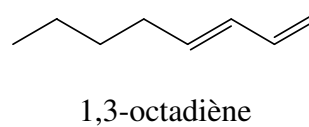
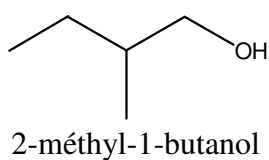
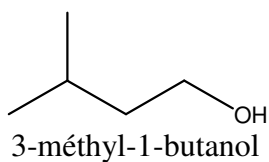
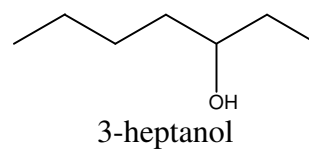
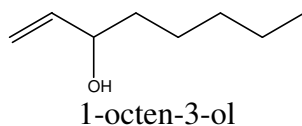
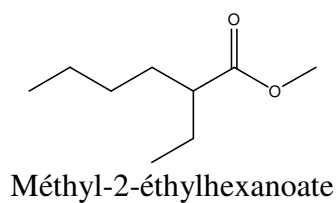
1 litre de solution tamponnée en pH

PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON pH =7,4

250 ml de KH_2PO_4 à 0,1 M

+ 145,5 ml de NaOH à 0,1 M

Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée

ANNEXE II**FORMULES DEVELOPPEES DES TRACEURS CHIMIQUES RETENUS**

Résumé

L'apparition de maladies chez les occupants d'environnements « moisis » a été très largement décrite dans la littérature. Les effets sur la santé des moisissures et métabolites associés sont nombreux : infections, allergies, toxi-infections, irritations. La prévalence et la sévérité des maladies déclarées chez l'enfant et l'adulte semblent corrélées avec une augmentation des surfaces contaminées dans l'habitat. Cependant, la caractérisation de l'exposition des personnes reste méconnue.

L'objet du travail de thèse a essentiellement porté sur le développement de méthodes d'analyse de la qualité microbiologique des milieux, la définition et la validation d'indicateurs de surveillance de cette qualité.

Ainsi, cette recherche a porté à la fois sur le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement mais également sur la mise au point et l'adaptation de méthodes de dosage et de reconnaissance indirecte, basées en particulier sur la recherche des produits du métabolisme (COV spécifiques) ou de constituants cellulaires spécifiques (Ergostérol, mycotoxines).

L'étude des COV d'origine fongique a permis de définir une liste de 18 traceurs chimiques pertinents associés à un développement fongique.

A partir de l'étude de ces composés, nous avons établi un indice de contamination fongique des locaux. Des prélèvements *in situ* réalisés dans 12 habitations ont permis la validation de cet indice.

Par ailleurs, une méthodologie originale de quantification de l'exposition aux moisissures par l'évaluation de la biomasse et des mycotoxines aéroportées a été proposée.

Le taux de transfert matériau-air d'une mycotoxine (la stérigmatocystine) a également été étudié.

Mots clés : *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, COV, déoxynivalénol, développement fongique, ergostérol, moisissures, mycotoxines, ochratoxine, *Penicillium brevicompactum*, qualité de l'air intérieur, *Stachybotrys chartarum*, stérigmatocystine.

Abstract

Disease occurrence in mouldy environments is very widely described in the literature. Health effects of moulds and associated metabolites are numerous: infection, allergy, toxi-infection, irritations. Prevalence and severity of declared diseases in the children and adults seem correlated with an increase of indoor contaminated surfaces. However, the characterization of occupant exposure remains underestimated.

The object of this work is essentially focused on the development of analytical methods to determine microbiological indoor quality, the definition and validation of survey indicators.

This research is thus both aimed at the development and improvement of sampling techniques and also on the conception and adaptation of direct and indirect measurements methods of metabolism products (Specific VOC) or of specific cellular components (Ergosterol, mycotoxins).

The study of VOC of fungus origin enabled the definition of relevant chemical tracers associated with fungus development. From these compounds, we established an index of fungus contamination in the indoor environments. Samplings realized in 12 houses allowed the validation of this index.

Besides, an original methodology of quantification of mould exposure was proposed taking into account the evaluation of biomass and airborne mycotoxins.

The transfer rate of material-air of a mycotoxin (the sterigmatocystin) was also studied.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, VOC, deoxynivalenol, moulds, ergosterol, mycotoxins, ochratoxin, *Penicillium brevicompactum*, indoor air, *Stachybotrys chartarum*, sterigmatocystin.