

**les
rencontres
scientifiques
de l'Anses**

anses
alimentation, environnement, travail



Exposition aux contaminants de l'environnement

Cité internationale Paris 14^e



Lundi 6 décembre 2010



EMMI

Mesure de l'Exposition aux Moisissures en Milieu Intérieur

approche qualitative et quantitative
à partir d'un prélèvement d'air de longue durée

Valérie Bex

Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris



Equipe 1 Responsabilité scientifique

Laboratoire d'Hygiène de la Ville Paris

Valérie Bex, Sophie Barral, Corinne Lebrun, Christina Vernant, Vincent Doucet, Sylvie Dubrou, Dr Fabien Squinazi

Equipe 2

Unité Mixte de Recherche BIPAR « Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques » ANSES-ENVA-UPEC

Jacques Guillot, Manjula Deville, Adélaïde Nieguitsila
Benoit Durand : Epidémiologie, ANSES

Equipe 3

Centre Scientifique et Technique du Bâtiment

Stéphane Moularat

Collaboration

Efficacité biologique des capteurs individuels

Ecole Normale Supérieure de Lyon

Vance Bergeron

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3520, faculté de Médecine Xavier Bichat, université Denis Diderot, Paris

Firas Choukri, F. Derouin

Objectif - Originalité

Proposer un outil pour la mesure de l'exposition aux moisissures dans l'air intérieur

- Mettre au point les différentes approches analytiques
- Tester 3 dispositifs portables permettant des **prélèvements d'air de longue durée : 24 heures**
- Mettre en oeuvre la méthodologie dans 30 environnements intérieurs moisiss pour obtenir **une description exhaustive de l'aérosol fongique**

analyse
quantitative

biomasse
fongique



- dénombrement des spores fongiques revivifiables
- ergostérol
- (1→3)-b-D-glucanes

analyse
qualitative

biomasse
fongique



- identification fongique
- par culture
- par **PCR-D-HPLC**

COVm



indice de contamination fongique

mycotoxines



Stérigmatocystine, Ochratoxine,
Trichothécènes

une description de l'aérosol fongique par l'analyse...

.. de différents constituants de la spore

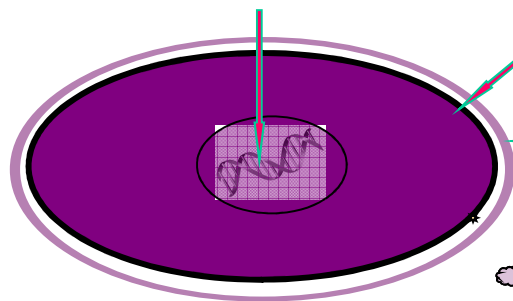
Identification de l'**ADN**
fongiques **ENVA**

Dosage de l'**ergostérol** membranaire
LHVP/CSTB

Dosage des **(1→3)-b-D-glucanes** de la paroi
LHVP

Présence de **COVm cibles**
Mycotoxines
CSTB

Dénombrement et
identification **des spores**
fongiques
LHVP



.. des spores

.. de certains métabolites

Intérêt du sujet et résultats attendus

- ➡ Rechercher des **corrélations** entre les différents indicateurs fongiques mesurés
- ➡ Associer différentes approches analytiques
- ➡ Proposer **un outil de mesure de l'exposition aux moisissures** pour les études épidémiologiques permettant d'obtenir à la fois une information
 - quantitative sur la biomasse fongique
 - qualitative sur les moisissures présentes (effets sur la santé / espèces fongiques)

Etape I

Mise au point des techniques analytiques

Méthodes analytiques

Méthodes quantitatives

Cible	Méthode analytique	Limite de quantification	Laboratoire
Spores revivifiables	culture Milieu MEA	10 UFC/mL soit 6,25 UFC/m³ pour un volume d'air de 14,4 m ³	LHVP
(1,3)-beta-D-glucanes	Kit Glucatell® : dosage LAL (facteur G)	3,125 pg/mL soit 5,43 pg/m³ pour un volume d'air de 2,88 m ³	LHVP (mise au point pour EMMI)
Ergostérol 24h	Extraction liquide-liquide + dosage par HPLC	50 µg/L soit 1,7 ng/m³ pour un volume d'air de 14,4 m ³ Validation d'une LQ à 30 µg/L (soit 1,0 ng/m ³) en cours	LHVP + ENVA (mise au point pour EMMI)
Ergostérol 7j	Extraction liquide-liquide + dosage par HPLC	50 µg/L Soit 0,50 ng/m³ pour un volume d'air de 100,8 m ³	CSTB

Méthodes analytiques

les
rencontres
scientifiques
de l'Anses

Méthodes qualitatives

Cible	Méthode analytique	Identification	Laboratoire
Spores revivifiables	Culture milieu MEA	Identification des colonies selon des critères morphologiques/microscopiques	LHVP
Génomomes fongiques	PCR-D-HPLC + séquençage	Par comparaison des séquences d'ADN obtenues à des séquences publiées dans des banques de données	ENVA
COVm	Brevet d'invention déposé	COVm cibles : spécifiques des moisissures, de leur métabolisme, de leur activité de biodégradation Construction d'un indice : incrémentation en fonction de la présence ou de l'absence des COVm cibles	CSTB
Mycotoxines	HPLC	Stérigmatocystine : cytotoxique par inhalation Ochratoxine A : immunotoxique par inhalation Déoxynivalénol : famille des trichothécènes	CSTB

Etape II

Choix des capteurs portables

génération d'un aérosol fongique en pièce expérimentale

Les capteurs individuels

CIP10



10 L/min
mousse en polyuréthane
en rotation à 7000 tr/min

IOM



2 L/min
filtre en polycarbonate
0,4 μ m

C37



1 L/min
filtre en polycarbonate
0,4 μ m

- portables
- autonomes sur 24 heures
- recueil de la fraction inhalable (efficacité physique connue Kenny *et al.*, 1997)

➡ **bio-collecteur de référence**, Andersen 6 étages
analyse granulométrique

La pièce expérimentale

volume 75 m³

- important réservoir fongique
- comparaison simultanée de plusieurs appareils

hermétique

- conditions d'ambiance fixes
20°C, 25%, 800 Pa
- absence de flux d'air

décontamination

- ventilation,
- plasma froid,
- filtration

= ambiance maîtrisée

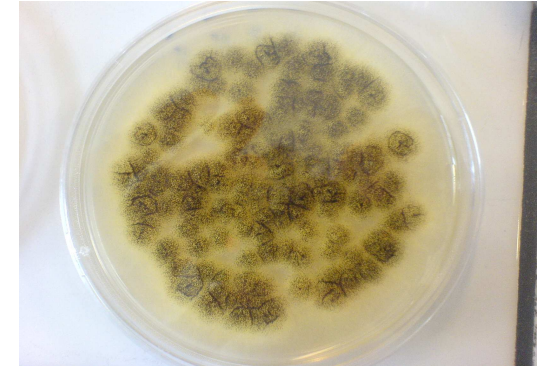


essais en condition de répétabilité

Conditions expérimentales

Choix de la souche, *Aspergillus niger* ATCC 16 404

- agent biologique du groupe 1
- identifiée dans l'habitat «moisi»
- conidies rugueuses : 3 à 4,5(5) μm , faciles à aérosoliser



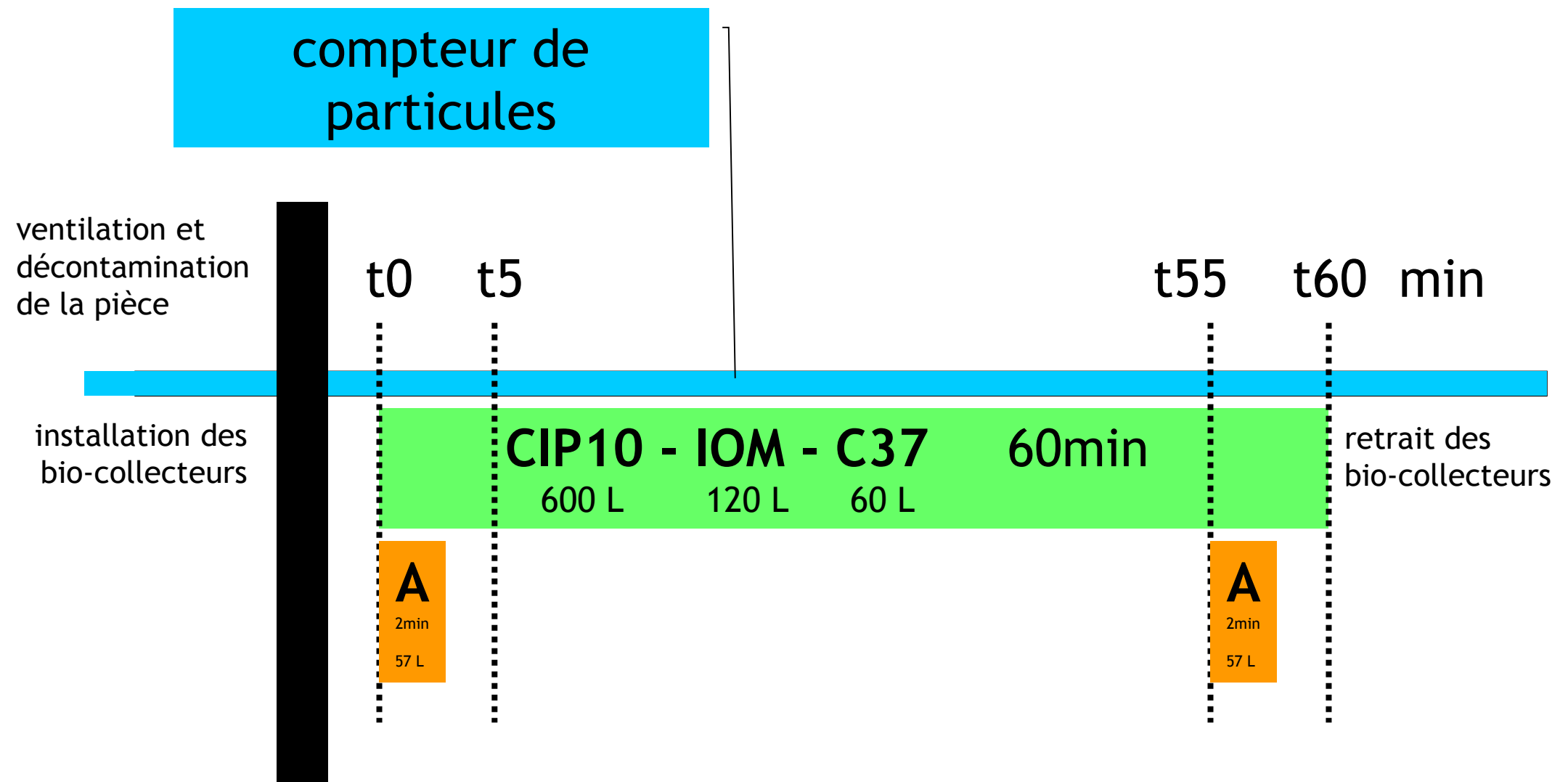
Nébulisation Collisson®

- 2 bars, eau ppi - tween 80 à 0,002%
- quantitatif, reproductible
- capacité importante de dispersion
- largement utilisé





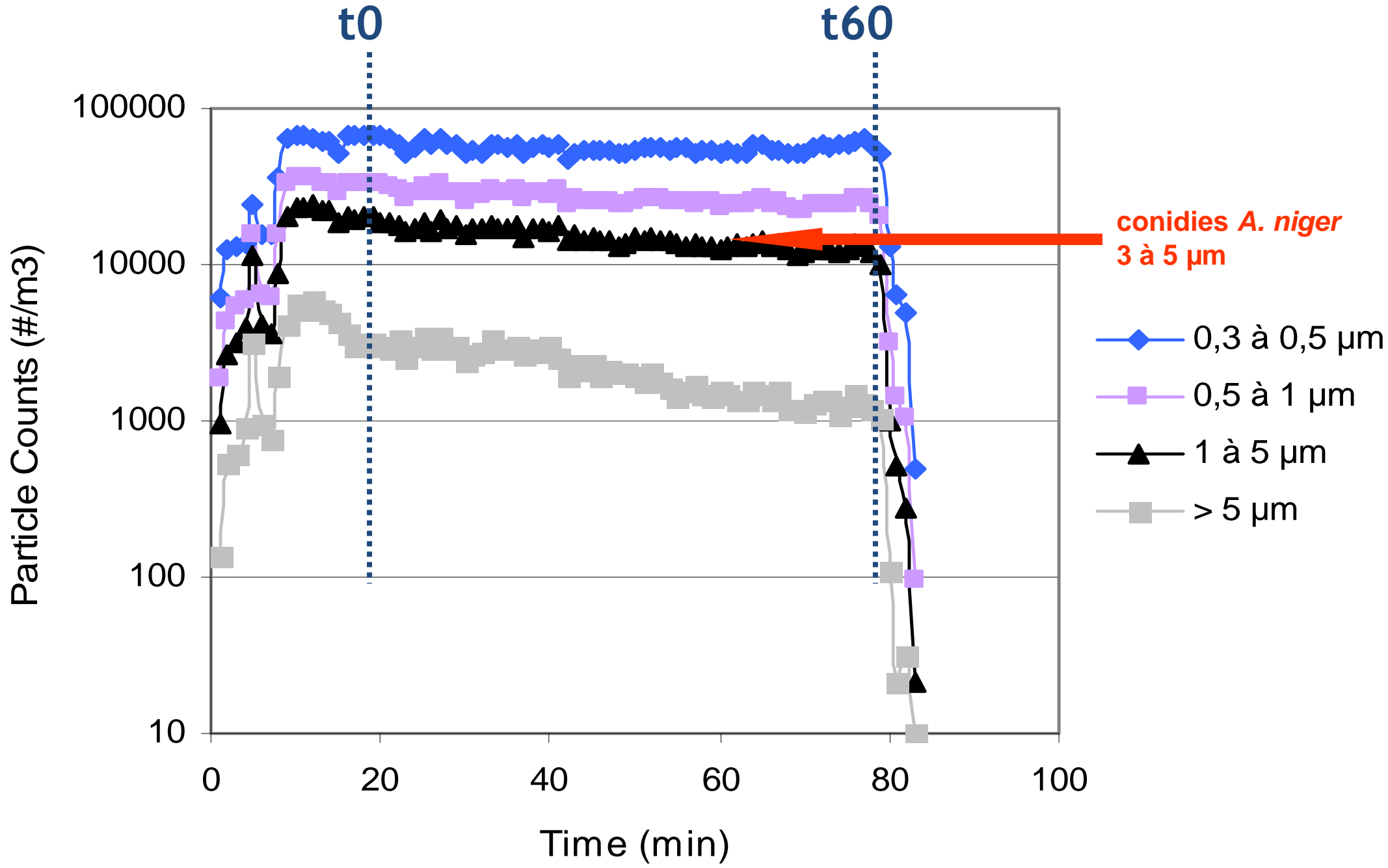
Déroulement d'un essai



aérosol
A. Niger
5 min

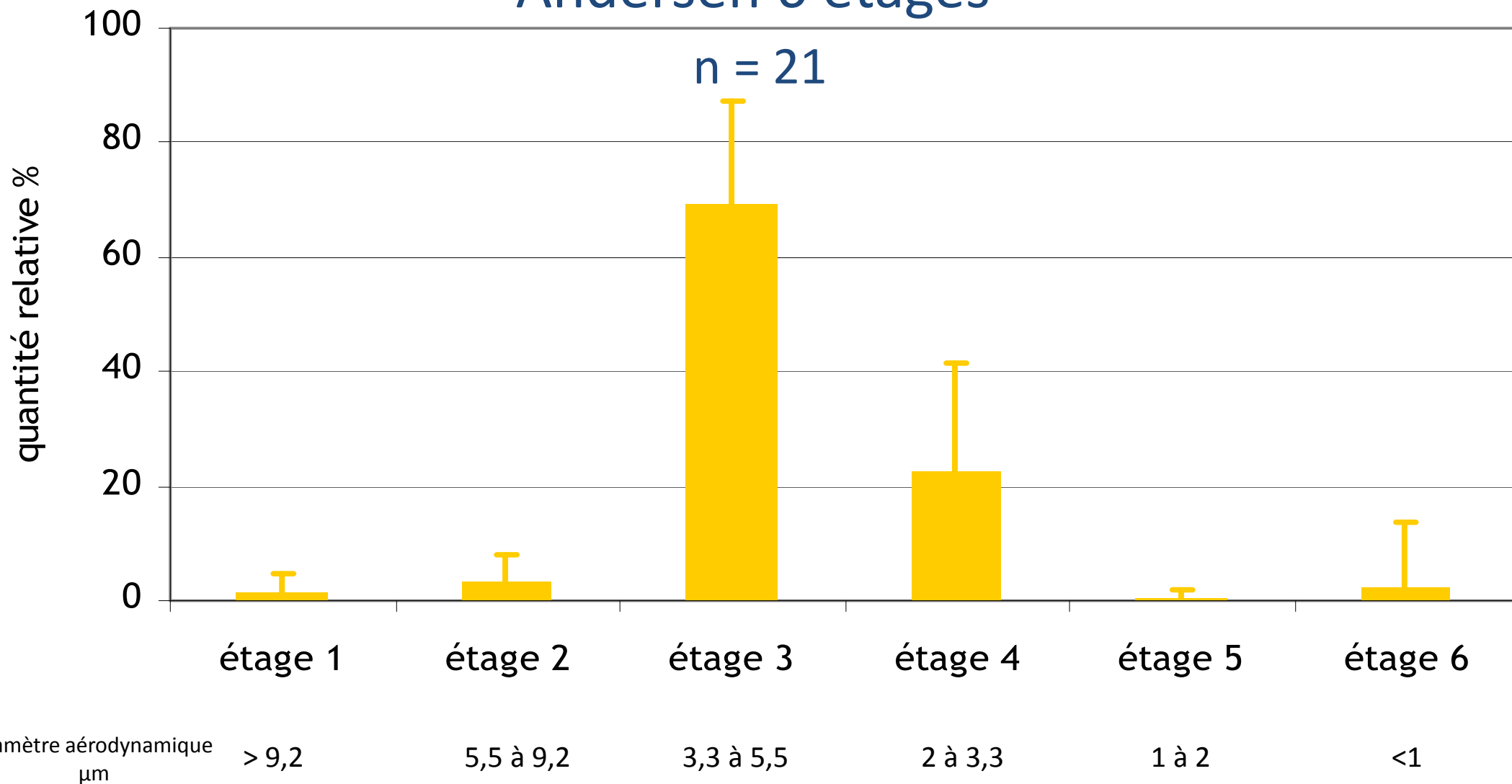
A = andersen 1 ou 6 étages

Comptage des particules



Répartition des particules aérosolisées selon leur taille

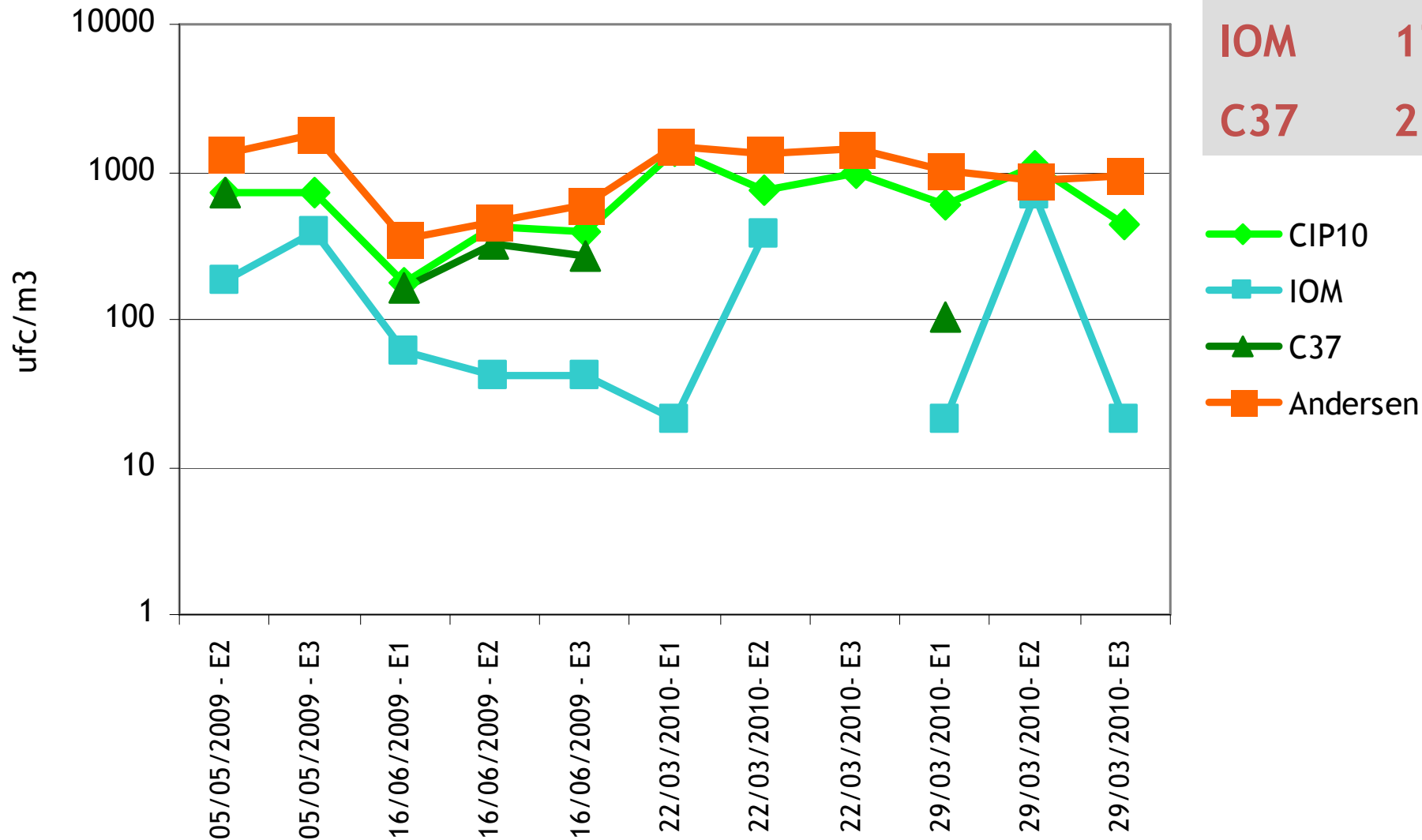
Andersen 6 étages



Efficacité des capteurs portables / Andersen

n = 11 essais

$E = C_T / C_R \times 100$	
CIP10	68% ± 25
IOM	17% ± 23
C37	21% ± 27



Choix des capteurs

compatibilité/méthodes d'analyse

	CIP10	C37	IOM
efficacité biologique	+++	+	+
fiable	+++	-	+
silencieux	+++	+	+
équipé d'un compteur	-	+	+
facilité d'élution	-	+	+
glucanes	-	+/-	+
ergostérol	+	+	+
culture	+	+	+
PCR-D-HPLC	+	+	+

Etape III

Etude sur sites

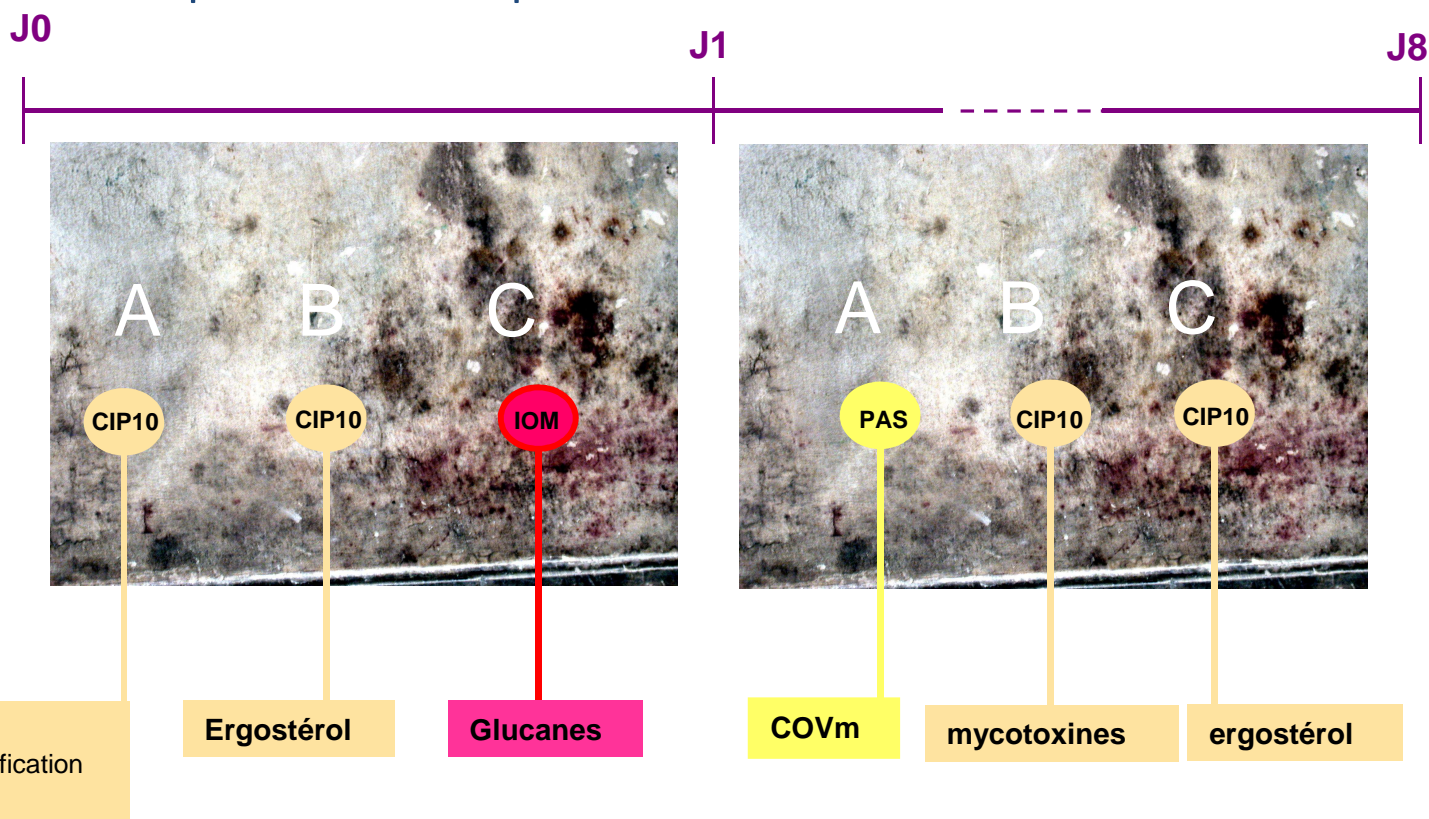
Campagne sur site dans 30 logements

Nombre de logements échantillonnés : 16

+ 3 prévus ou en cours

Protocole d'échantillonnage

tirage aléatoire de la position des capteurs



EMMI 12



EMMI 13



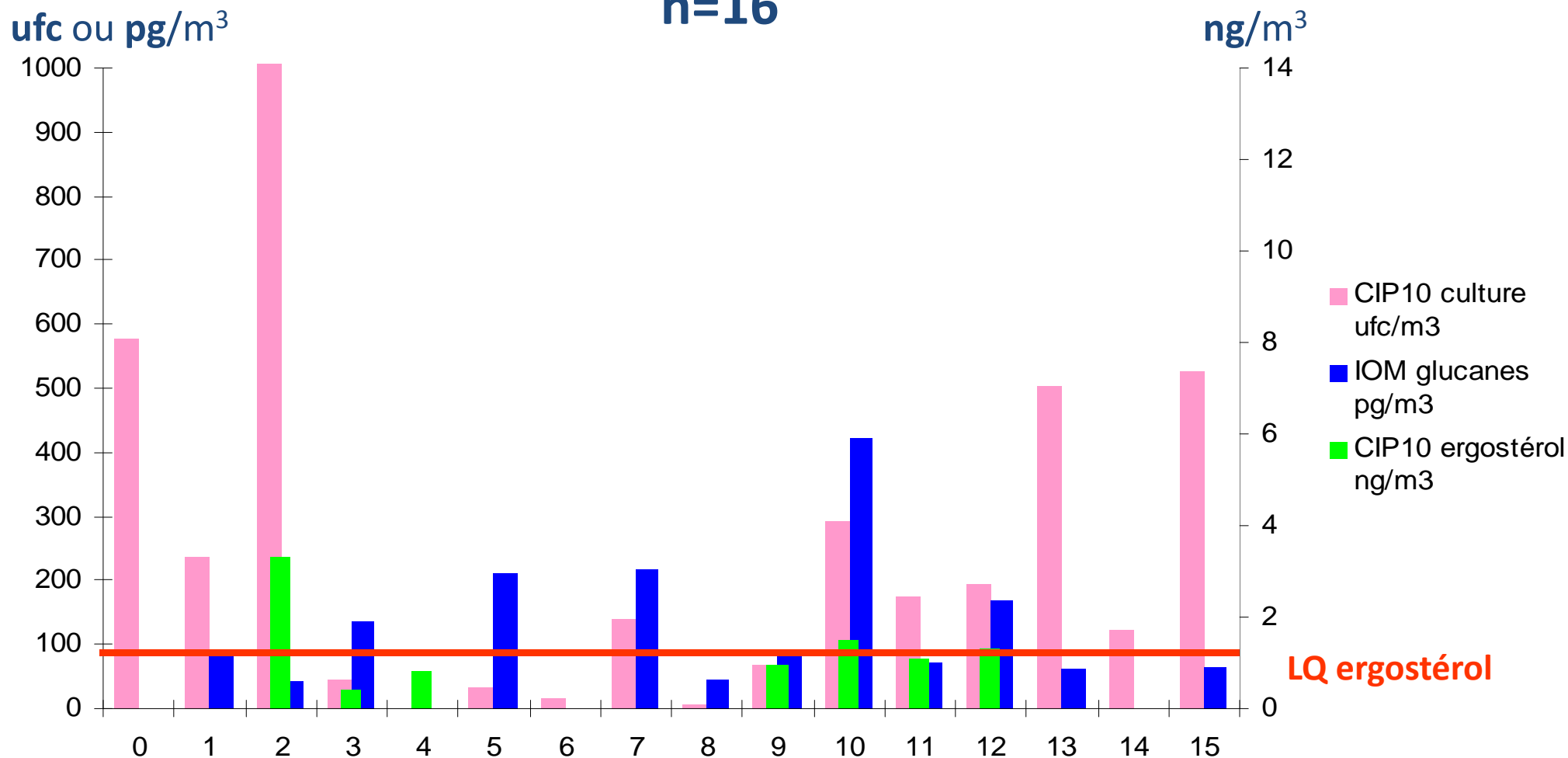
EMMI 16



analyse quantitative sur 24 h

culture / glucanes / ergostérol

n=16



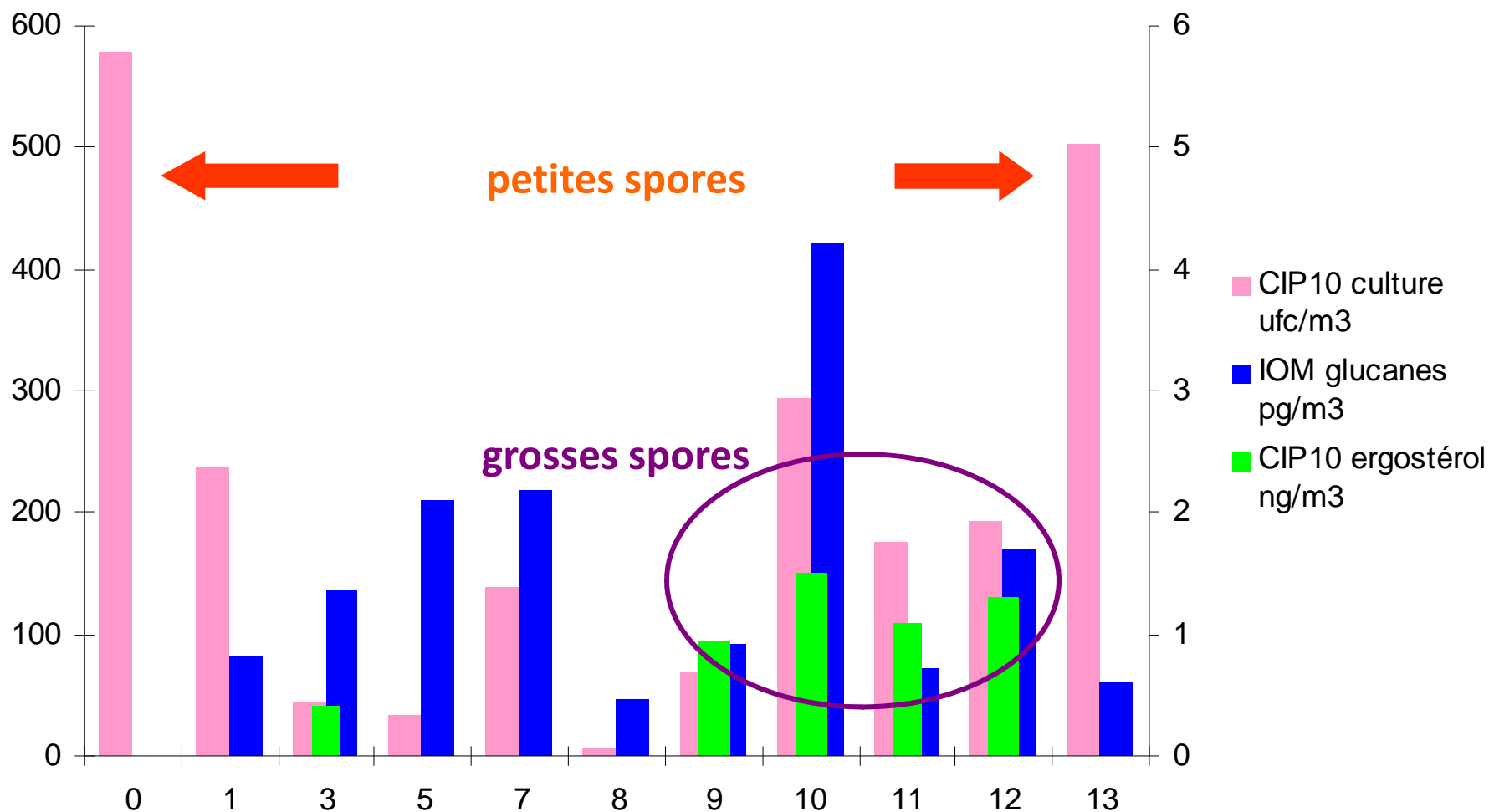
analyse quantitative sur 24 h

culture / glucanes / ergostérol

n=11

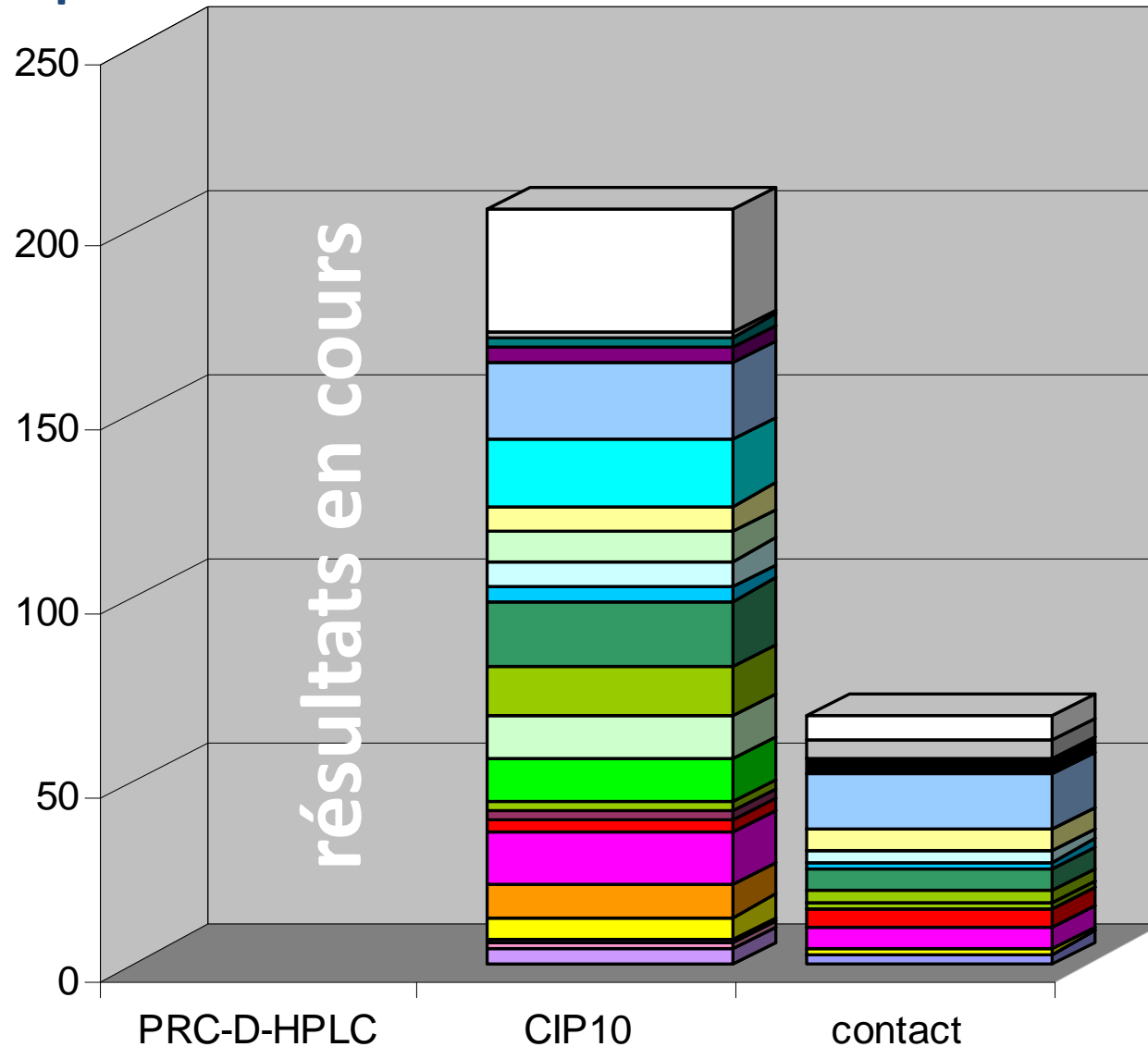
ufc ou pg/m³

ng/m³



analyse qualitative n=16

fréquence



- Autres
- Ulocladium
- Trichoderma
- Stachybotris
- Rhizopus stolonifer
- Penicillium
- Penicillium chrysogenum
- Mucor
- Geotrichum
- Fusarium
- Eurotium
- Cladosporium
- Cladosporium sphaerospermum
- Cladosporium cladosporioides
- Cladosporium herbarum
- Chaetomium
- Botrytis
- Aureobasidium pullulans
- Aspergillus
- Aspergillus terreus
- Aspergillus versicolor
- Aspergillus ochraceus
- Aspergillus niger
- Aspergillus flavus
- Aspergillus fumigatus
- Alternaria
- Acremonium

Indice COVm

détection d'une
croissance fongique
active

concordance indice / humidité

discordance indice / humidité

N° EMMI	Indice COVm	Humidité visible dans le logement
2	+	oui
3	-	non
4	+	oui
7	+	oui
8	+	oui
9	+	oui
11	-	non
12	-	oui

Mycotoxines

N° EMMI	Stérigmatocystine	Ochratoxine A	Déoxynivalénol
2	non détectée	non détectée	non détectée
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Conclusions

Définition d'un protocole de prélèvement et d'analyse pour les différentes cibles fongiques choisies

Difficulté de recrutement

- logements insalubres, petits, sur-occupés, enfants en bas âge...

L'analyse des données (n=30)

- quantitative : recherche de corrélations entre les résultats de dénombrements par culture, de concentrations d'ergostérol et de glucanes,
- qualitative à l'aide de test de concordance kappa et X² de Mac Nemar pour les espèces fongiques communes (identification par culture, PCR-D-HPLC)

Valorisation

Congrès

- **Microbaéro 2009**

ETUDE DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTS BIOCOLLECTEURS APRÈS NÉBULISATION D'*ASPERGILLUS NIGER* DANS UNE SALLE À AMBIANCE CONTRÔLÉE

- **Indoor Air 2011**

Measurement Of Indoor Mould Exposure: Development Of A Global Approach Associating Quantitative And Qualitative Tools From A Long Duration Air Sampling

2 publications prévues

- Applied and Environmental Microbiology
- Indoor Air

1 publication sous presse

Nieguitisla A, Goldenberg O, Deville M, Arné P, Benoît-Valiergue H, Chermette R, Latouche-Cottenot S, Pissard S, Guillot J. 2010. Molecular monitoring of fungal communities in air samples by denaturing high performance liquid chromatography (D-HPLC). *Journal of Applied Microbiology*