

Mesure des aérosols fongiques dans l'air : utilisation de l'ergostérol

Measurement of fungal airborne in indoor environment: use of ergosterol

E. Robine, I. Lacaze, S. Moularat *, M. Boissier, S. Ritoux

*Laboratoire de microbiologie des environnements intérieurs,
centre scientifique et technique du Bâtiment, 84, avenue Jean-Jaurès, 77447 Champs-sur-Marne, France*

Reçu le 16 janvier 2006 ; accepté le 19 janvier 2006

Disponible sur internet le 13 mars 2006

Ergosterol as a measure of airborne fungal exposure in an indoor environment

Résumé

Dans le but de mieux appréhender le niveau d'aérocontamination fongique des environnements intérieurs, nous avons adapté et testé une méthode d'évaluation de la biomasse fongique. Le dosage en chromatographie en phase liquide (HPLC) d'un constituant de la membrane cellulaire des champignons microscopiques : l'ergostérol, a été employé. Cette méthode permet de détecter et d'identifier la molécule d'ergostérol à une concentration de 40 ng/ml ($n = 33$, $\sigma = 5$). En utilisant conjointement ce dosage et un appareil de collecte à coupelle rotative, la mesure de la flore fongique globale est rendue possible avec une limite de quantification de 0,4 ng/m³ soit une valeur théorique de 150 spores/m³. Les mesures de l'ergostérol réalisées sur différents sites ont montré que cette méthode permettait d'appréhender les différentes situations d'expositions des occupants à une flore fongique aéroportée.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The aim of this study was to develop a method to evaluate the level of airborne indoor fungal exposure. To this end, we have adapted and applied a biomass assay method. Using liquid phase chromatography (HPLC), a specific component of the fungal cell membranes (ergosterol) was measured. This method allowed us to identify this substance and to detect it to a limit of 40 ng/ml ($n = 33$, $\sigma = 5$). When used in association with a rotating foam air sampler, it was possible to measure the airborne fungal contamination with a detection limit of 0.4 ng/m³, corresponding to a theoretical value of 150 spores/m³. Measurement of ergosterol carried out at different indoor sites showed that this method can be used to evaluate different types of exposure of individuals to airborne fungal contamination.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Aérosol fongique ; *Aspergillus niger* ; Bioaérosol ; Ergostérol ; Moisissure ; Qualité de l'air intérieur

Keywords: Moulds; Indoor air; Ergosterol; *Aspergillus niger*

1. Introduction

Il n'existe, au plan national, aucun chiffre de prévalence de contamination fongique en milieu intérieur, cependant une étude bibliographique récente de l'Institut national de santé public du Québec [1] rapporte l'ampleur du risque lié à la présence des moisissures dans ces environnements.

Le développement de moisissures à l'intérieur des logements est un phénomène qui apparaît, à la fois, dans les bâti-

ments anciens, mais aussi dans les constructions récentes. Ces locaux peuvent constituer des « niches écologiques » pour le développement de ces micro-organismes, sous l'influence de différents facteurs qui englobent la conception et la construction, les formes et la configuration, les matériaux et les structures, le type d'utilisation et les conditions de maintenance [2].

La contamination des bâtiments pose un problème, à la fois, de dégradation des matériaux et des ouvrages, mais également, un risque sanitaire non négligeable puisque ces biocontaminants peuvent entraîner, dans certaines circonstances d'exposition, l'apparition de maladies : allergies, infections, toxi-infections [3].

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : LMEI@cstb.fr (S. Moularat).

En effet, l'inhalation de spores, de fragments de mycélium, de particules de matériaux ou de 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 [4,5].

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 reconnaissance 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... [6–9]. Plus récemment, cette molécule a été mesurée dans les poussières, les produits de construction et l'air de maisons [10–12].

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

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Choix des souches

Les essais ont été réalisés avec une souche de collection de l'institut d'hygiène et d'épidémiologie de mycologie de Bruxelles IHEM : *Aspergillus niger* 05077. La souche est conservée dans de l'eau distillée. Une subculture favorisant la sporu-

lation est réalisée sur gélose Sabouraud avant chaque utilisation. La culture finale est obtenue après sept jours à 25 °C sur gélose avoine.

2.1.2. Dénombrement des moisissures

La concentration de la suspension fongique 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 FTU (*formazine turbidity unit*). Une corrélation entre la concentration de spores et la turbidité de la suspension (Fig. 1a) 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 cinq carrés représentant un volume de $1/250 \text{ mm}^3$ (Fig. 1b).

2.2. Méthode de dosage de l'ergostérol

Le principe de la mesure s'appuie sur l'absorbance de l'ergostérol dans l'UV à 282 nm. Les esters d'ergostérol contenus dans la membrane cellulaire fongique sont libérés et transformés en alcool par saponification. Le composé isolé est ensuite analysé par chromatographie en phase liquide. Le protocole d'extraction consiste à placer les supports contaminés dans 2 ml de méthanol, puis à les soumettre aux ultrasons (Branson 2510, Branson). L'extrait est récupéré puis centrifugé à 6000 tours/min pendant 15 minutes (EBA 8 S, Hettich). Le surnageant est filtré (inorganic membrane filter Anotop, 0,2 µm Whatman, VWR International) puis dosé en chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le système est étalonné à l'aide d'un extrait commercial d'ergostérol pur à 99,4 % (Fluka).

Le système Waters utilisé est muni d'une colonne Lichrospher RP18 de 100 Å (Merck). La détection est assurée par un détecteur UV (Waters 996 Photodiode Array Detector). L'ensemble de l'appareillage est piloté par le logiciel Millennium 32.

Nous utilisons une phase mobile composée exclusivement de méthanol (méthanol rectapur, Fisher) en mode isocratique. Le débit de cette phase lors de l'utilisation est égal à 1,5 l/min avec une pression résultante de 1400–1500 PSI. Hors utilisation, la colonne est conservée dans un mélange méthanol-eau

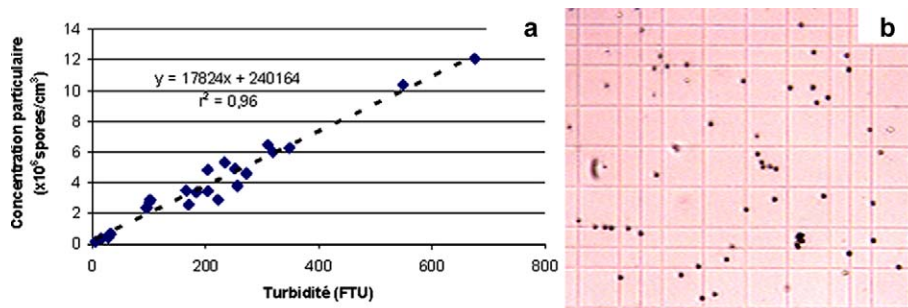


Fig. 1. a : relation entre turbidimétrie et concentration d'une suspension de spores ; b : observation, au microscope objectif ($\times 10$), de la cellule Thoma et des conidies à dénombrer.

(40–60). L'eau évite l'assèchement et le méthanol la prolifération des microorganismes dans la colonne.

2.3. Collecte des aérosols fongiques

2.3.1. Utilisation de la coupelle rotative

Une coupelle garnie d'une mousse en polyuréthane montée sur l'axe d'un moteur électrique, est mise en rotation à grande vitesse à l'intérieur d'une cavité cylindrique (CIP 10, Arelco).

L'aérosol ambiant est aspiré au travers d'un sélecteur. Ce dernier sélectionne la fraction inhalable des particules. L'air est ensuite rejeté par un orifice de refoulement tangentiel à la paroi de l'appareil (Fig. 2).

La coupelle contenant les particules collectées est ensuite traitée de manière à mesurer la quantité d'ergostérol prélevée, et par conséquent la concentration de l'aérosol ambiant. La mesure est exprimée en nanogramme d'ergostérol par mètre cube d'air.

Cet appareillage répond aux exigences de la norme française NF X 43-262: « Détermination gravimétrique du dépôt alvéolaire de la pollution particulaire — méthode de la coupelle rotative » [14].

2.3.2. Échantillonnage par impaction

Un impacteur (Andersen Instruments Incorporated) a 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 deux minutes, (diamètre des trous 0,71 mm ; $d_{50} = 3,3 \mu\text{m}$). Les particules sont collectées sur un milieu de culture Sabouraud. Les colonies sont dénombrées après sept jours d'incubation à l'obscurité (25 °C).

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation et validation de la technique

3.1.1. 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 coef-

ficient 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 ($n = 33$; $\sigma = 0,005$). Le coefficient de variation calculé pour cette limite est égal à 12,5 %.

3.1.2. 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 deux mois sans être altérée.

Néanmoins, nous avons contrôlé la stabilité des prélèvements pendant la période de stockage. Ainsi, 14 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 1).

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 sept 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 1). L'étape de collecte ne semble ainsi pas dégrader la molécule d'ergostérol.

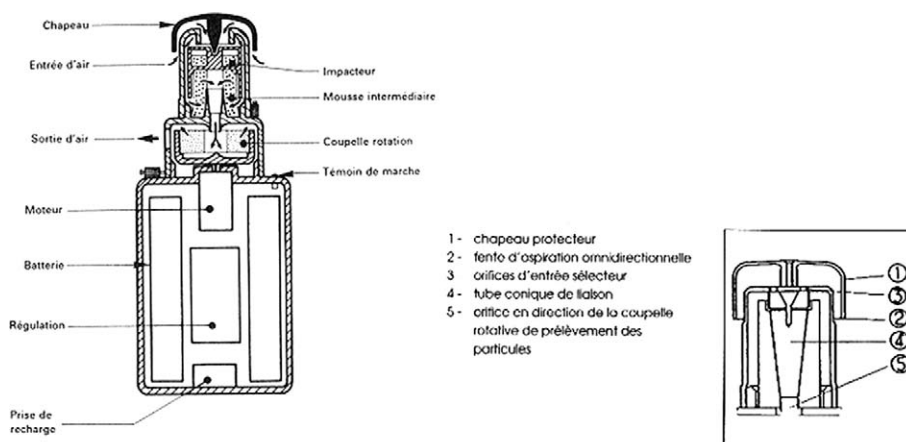


Fig. 2. Schéma de l'appareil à coupelle rotative et du sélecteur de la fraction inhalable (d'après la norme NF X 43-262 [13]).

Tableau 1
Stabilité de l'ergostérol contenu dans les spores d'*Aspergillus niger* après 19 et 27 jours de stockage et sept jours de collecte

	Conservation de l'échantillon			Effet de la collecte	
	T0	T19 jours	T27 jours	T0	Sept jours de fonctionnement
Moyenne en mg/l	0,359	0,294	0,375	0,279	0,237
Écart-type	0,042	0,064	0,019	0,006	0,087
Nombre Échantillon	8	3	3	3	3

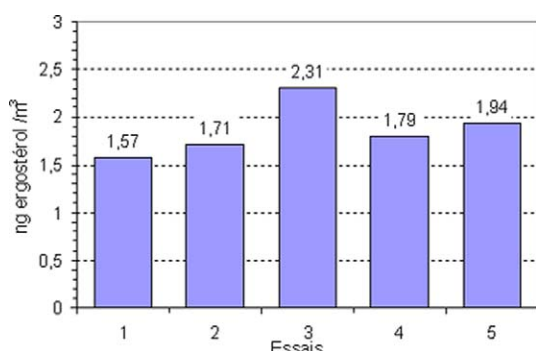


Fig. 3. Mesures simultanées de l'ergostérol aéroporté extérieur.

3.1.3. Dispersion de la mesure

De manière à évaluer la dispersion de la mesure entre différents appareillages, nous avons disposé sur un même site extérieur cinq 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 ($m = 1,87$, $n = 5$, $\sigma = 0,28$) (Fig. 3).

3.2. 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 sept jours de prélèvement et pendant cette même période quatre prélèvements ponctuels ont été effectués à l'aide de l'impacteur. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

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 [11] 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 ($n = 6$, $\sigma = 1,54$). 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 (Fig. 4). Les valeurs d'aérobiocontamination obtenues par culture permettent essentiellement d'apprécier un instantané du niveau de contamination. L'échantillonnage excède rarement les deux minutes de collecte, et selon les appareillages employés représente un maximum de 0,2 m³ d'air prélevé. À l'opposé, la mesure de l'ergostérol intègre une semaine de prélèvement, soit près de 100 m³ d'air.

3.3. 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 six logements et deux écoles.

Les concentrations d'ergostérol mesurées lors de cette campagne ont atteint un maximum de 6,47 ng/m³ (Fig. 5). Plusieurs situations d'aérobiocontamination ont été observées : pour cinq sites (habitats 4, 5 ; écoles 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 envi-

Tableau 2
Comparaison entre la concentration d'ergostérol aéroporté et des mesures ponctuelles de la flore fongique cultivable

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	Espèces majoritaires 95 % : <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i>
31/07/01	320		
02/08/01	1190		Espèces minoritaires 5 % : <i>Ulocladium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> et mycélium stérile
03/08/01	440		

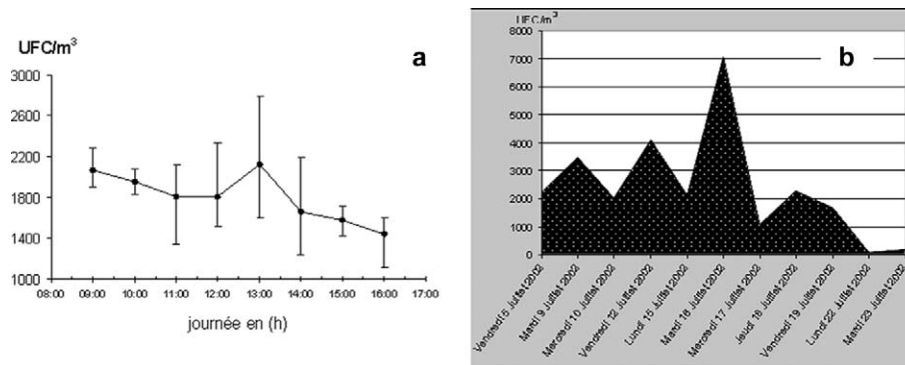


Fig. 4. a : mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur une journée ; b : mesure de la flore fongique cultivable aéroportée sur plus d'une semaine.

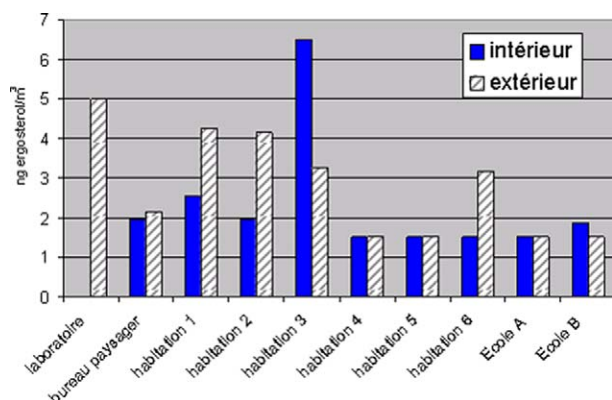


Fig. 5. Mesure de l'ergostérol aéroporté présent à l'intérieur et à l'extérieur de différents locaux. Le prélèvement à l'intérieur du local est réalisé à un mètre du sol. Un autre, en référence, est systématiquement effectué à l'extérieur dans les mêmes conditions.

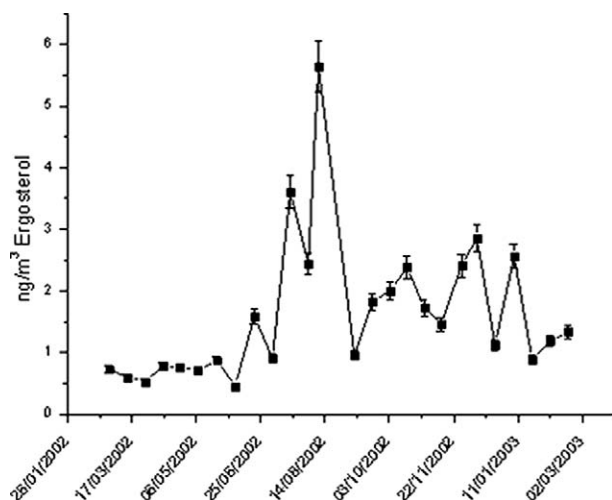


Fig. 6. Mesure extérieure de la biomasse fongique aéroportée, année 2002–2003 sur le site de Champs-sur-Marne (France).

ronnements est alors essentiellement le résultat de variations saisonnières (Fig. 6), les concentrations fongiques extérieures les plus importantes étant relevées en été.

Nous avons observé sur quatre 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 extérieure. 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.

4. Conclusion

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

Par ailleurs, 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 et/ou toxigènes.

Références

- [1] Institut national de santé public du Québec 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Document déposé à Santécom (<http://www.santecom.qc.ca>), p 163.
- [2] Hyvärinen A, Meklin T, Vepsäläinen A, Nevalainen A. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity. *Int Biodeterior Biodegradation* 2002;49:27–37.
- [3] Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(1):144–72.
- [4] Flannigan B. Air sampling for fungi in indoor environments. *J Aerosol Sci* 1997;28(3):381–92.
- [5] Madelin TM. Fungal aerosols: a review. *J Aerosol Sci* 1994;25(8):1405–12.
- [6] Seitz LM, Sauer DB, Burroughs R, Mohr HE, Hubbard JD. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 1979;69:1202–3.
- [7] Grant WD, West AW. Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. *J Microbiol Methods* 1986;6:47–53.
- [8] Zill G, Engelhardt G, Wallnöfer PR. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 1988;187(3):246–9.
- [9] Gessner MO, Schmitt AL. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(2):415–9.
- [10] Axelsson BO, Saraf A, Larsson L. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1995;666(1):77–84 (Biomedical Sciences and Application).
- [11] Miller JD, Young JC. The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air. *Am Ind Hyg Assoc J* 1997;58:39–43.
- [12] Pasanen AL, Kasanen JP, Rautiala S, Ikäheimo M, Rantamäki J, Kääriäinen H, et al. Fungal growth and survival in building materials under fluctuating moisture and temperature conditions. *Int Biodeterior Biodegradation* 2000;46:117–27.
- [13] AFNOR. Qualité de l'air, air des lieux de travail. NF X 43-262 1991; tome 3, 170.
- [14] Courbon P, Wrobel R, Fabries JF. A new individual respirable dust sampler: the CIP 10. *Ann Occup Hyg* 1988;32(1):129–43.