



Mesure des mycotoxines aéroportées

Mesurement of airborne mycotoxins

S. Moularat *, E. Robine

*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 20 janvier 2006

Résumé

Le but de ce travail est de proposer une nouvelle approche méthodologique pour estimer l'exposition des individus aux aérosols de moisissures. Nous avons développé une méthodologie permettant de mesurer trois mycotoxines majeures des environnements intérieurs (la stérigmatocystine, la déoxynivalénol et l'ochratoxine A) dans l'air. La méthode de dosage développée permet d'identifier et de quantifier les trois mycotoxines à des concentrations respectives de 30 µg/L ($n = 30$, $\sigma/m = 3,9\%$), 20 µg/L ($n = 10$, $\sigma/m = 5,5\%$) et 20 µg/L ($n = 10$, $\sigma/m = 7,6\%$). En utilisant cette technique d'analyse et un appareil de collecte à coupelle rotative validés par ailleurs, la mesure des concentrations des trois mycotoxines aéroportées est rendue possible avec une limite de quantification théorique de 60 pg/m³ d'air.

L'étude du transfert des mycotoxines du substrat vers l'air a montré que la quantité aérosolisée n'était pas proportionnelle à celle présente sur les matériaux moisissés. Aussi, la mesure dans l'air des mycotoxines nous semble un moyen plus pertinent pour approcher l'exposition des populations.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The aim of this study was to apply a new methodological approach to estimate the exposure of individuals to airborne moulds. We have developed a method that allows us to measure three mycotoxins (sterigmatocystin, deoxynivalenol and ochratoxin A) present in the indoor environment. The method we developed allows us to identify and to quantify these toxins at concentrations of 30 µg/L ($N = 30$, $\sigma/m = 3,9\%$), 20 µg/L ($N = 10$, $\sigma/m = 5,5\%$) et 20 µg/L ($N = 10$, $\sigma/m = 7,6\%$, respectively). Using this analytical method and a rotating foam air sampler, previously validated, it was possible to measure the concentrations of the three airborne mycotoxins with a detection limit of 60 pg/m³. The results of this study of the transfer of mycotoxins from their substrate into the air showed that the quantity that was aerosolized was not proportional to that present on contaminated materials. In addition, measurement of airborne mycotoxins appears to be a more relevant means to evaluate the level of exposure in populations.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : *Aspergillus versicolor* ; Déoxynivalénol ; Développement fongique ; Moisissure ; Mycotoxine ; Ochratoxine A ; Qualité de l'air intérieur ; Stérigmatocystine

Keywords: Mycotoxin; Sterigmatocystin; Deoxynivalenol; Ochratoxin A; Mould; *Aspergillus versicolor*; Indoor air

1. Introduction

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 [1,2]. À 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

* Auteur correspondant.

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

cette étude une méthodologie pour accéder à la mesure de trois mycotoxines aéroportées.

Pratiquement, nous avons mis 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 [3,4]. 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 [5] ;
- l'ochratoxine A est à l'origine d'effets immunotoxiques par inhalation démontrés chez le rat [6]. 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 a d'abord été élaborée à partir d'un standard de stérigmatocystine, puis appliquée aux deux autres mycotoxines.

Afin de caractériser la production des mycotoxines, nous avons étudié également l'impact du support de croissance. Pour cela, nous avons choisi des matériaux de construction vulnérables : fibre de verre, papier peint traditionnel et papier peint vinyle.

Nous avons ensuite étudié le transfert des mycotoxines entre ces matériaux et l'air. Pour ce faire, nous avons produit des aérosols fongiques directement à partir de matériaux contaminés et caractérisé ces aérosols en termes de taille et de concentration en mycotoxine.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Une moisissure (IHEM : *Aspergillus versicolor* 18 884) cultivée à 25 °C sur S10 (Bouillon de Sabouraud glucosé à 2 % dilué, Merck) et PDA (agar glucosé à la pomme de terre, Merck) a été utilisée.

La production de mycotoxine a été obtenue à partir de trois supports de croissance : fibre de verre compressée (filtre en fibre de verre GF/B, Whatman), et deux types de papier peint du commerce : papier peint traditionnel et papier peint vinyle (Leroy Merlin).

2.2. Méthode d'analyse des mycotoxines

Trois standards : stérigmatocystine pur à 99,0 % (S3255, Sigma), déoxynivalénol pur à 99,0 % (D0156, Sigma) et ochratoxine A pur à 99,5 % (O1877, Sigma) ont été utilisés.

Les mycotoxines sont analysées par chromatographie en phase liquide. La chaîne analytique employée est une HPLC

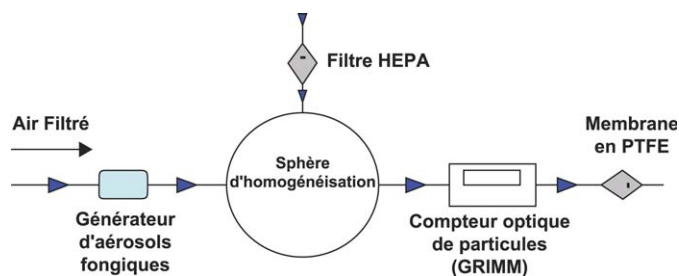


Fig. 1. Schéma du montage d'aérosolisation.

Waters munie d'une colonne Lichrospher RP18 de 100 Å (Merck). La détection est assurée par un détecteur UV (Waters 996 Photodiode Array Detector).

La phase mobile est composée d'un mélange méthanol : eau (85 : 15, v/v) (méthanol rectapur, Fisher) en mode isocratique.

2.3. Production d'aérosols de mycotoxines

En relation avec de précédents travaux sur les aérosols fongiques [7], un montage d'aérosolisation a été utilisé, dans le but de générer expérimentalement un aérosol de mycotoxines à partir de matériaux contaminés. Ce dispositif est composé d'une chaîne de production de l'aérosol comportant un générateur d'aérosols fongiques et un dispositif de mesure de l'aérosol disposé en aval de la chaîne de production (Fig. 1). Ce banc fonctionne en dynamique avec des débits équilibrés. Il est placé sous un poste de sécurité microbiologique.

3. Résultats

3.1. Limites analytiques

Nous avons vérifié la linéarité de la réponse de l'HPLC pour différentes concentrations de stérigmatocystine (ST) (0–500 µg/L ; $r^2 = 0,99$). Par ailleurs, nous avons évalué la limite de détection à 8,5 µg/L et la limite de quantification (LQ) est de 30 ± 3 µg/L ($n = 30$, coefficient de variation de 4 %).

Cette même méthode a été appliquée à des standards de déoxynivalénol (DON) et d'ochratoxine A (OA). 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 µg/L et les coefficients de variation correspondant sont respectivement de 5,5 et 7,6 %.

3.2. Impact des matériaux sur la production des mycotoxines

De manière à caractériser la production de stérigmatocystine, nous avons suivi sa formation sur trois produits de construction vulnérables aux moisissures : fibre de verre, papier peint traditionnel et papier peint vinyl. Nous avons utilisé comme souche toxigène l'*A. versicolor*. La production de cette toxine est mesurée après dix jours d'incubation (une fois la phase stationnaire de croissance atteinte) et exprimée en nanogramme de ST/cm² de matériau. Les essais sont réalisés en triplicata et présentés sur la Fig. 2.

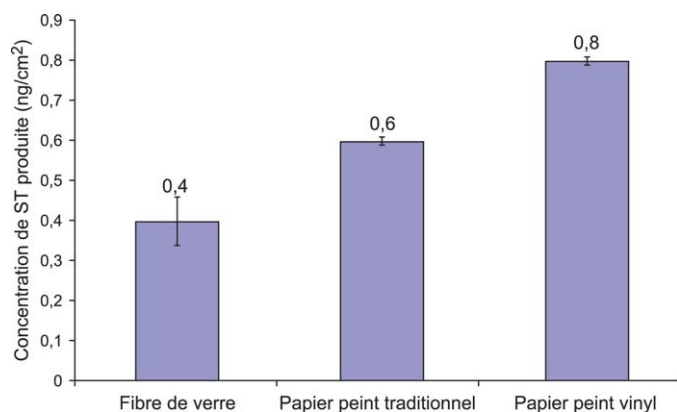


Fig. 2. Concentration de stérigmatocystine mesurée sur des matériaux contaminés en fonction du support de croissance (culture d'*Aspergillus versicolor* ; mesures réalisées après dix jours d'incubation ; $n = 3$).

Dans nos conditions expérimentales, le papier peint vinyle est le plus propice à la production de ST par *A. versicolor* avec $0,8 \text{ ng/cm}^2$.

3.3. Approche du transfert des mycotoxines substrat–air

Nous avons par ailleurs estimé l'influence du support de croissance sur la production d'aérosols de mycotoxines (Fig. 3).

La concentration maximale de ST aéroportée a été observée sur le papier peint traditionnel (215 ng/m^3). Les deux autres matériaux produisent respectivement $51,7$ et $73,3 \text{ ng/m}^3$. Ainsi, si on compare les quantités de ST sur le substrat à celles aéroportées, le papier peint traditionnel aérosolise près de 4 % de la ST produite tandis que les deux autres matériaux de construction se limitent à l'aérosolisation de 1 %.

Par ailleurs, nous avons caractérisé physiquement ces toxines en mesurant la taille des aérosols produits (Fig. 4).

Quel que soit le profil granulométrique considéré, nous observons un principal mode à $2,5 \mu\text{m}$. La granulométrie obtenue avec le papier peint traditionnel se distingue par un profil bimodal avec un deuxième mode à $0,9 \mu\text{m}$.

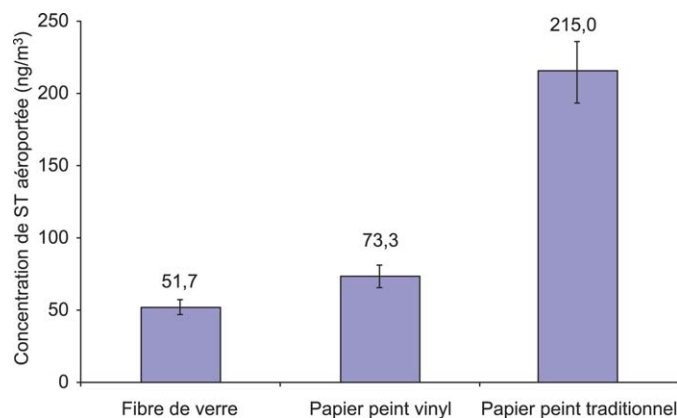


Fig. 3. Concentration de stérigmatocystine mesurée dans les aérosols fongiques en fonction du support de croissance (culture d'*Aspergillus versicolor* ; mesures réalisées après dix jours d'incubation ; $n = 3$).

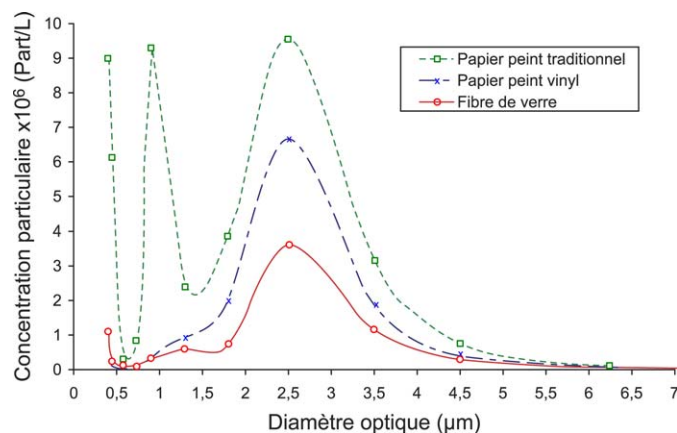


Fig. 4. Profils granulométriques des aérosols produit à partir de différents support (fibre de verre, papier peint vinyle et papier peint) et contaminés par *Aspergillus versicolor* (dix jours d'incubation à 25°C).

La taille de l'aérosol observé à $2,5 \mu\text{m}$ correspond très certainement aux spores d'*A. versicolor*, ce résultat est cohérent avec les travaux de Gorny [8] où le diamètre aérodynamique de spores aéroportées d'*A. versicolor* avait été mesuré entre $2,4$ et $2,7 \mu\text{m}$.

Concernant le profil de l'émission du papier peint traditionnel (d_{opt} compris entre $0,3$ et $1 \mu\text{m}$) il s'agit vraisemblablement de fragments de matériaux issus de la dégradation fongique.

En outre, les concentrations de particules plus importantes pour le papier peint traditionnel, puis le papier peint vinyle et la fibre de verre, sont en adéquation avec les mesures de toxines aéroportées.

4. Discussion

Il existe peu d'études ayant développé des méthodes de dosage et d'analyse des mycotoxines à partir de prélèvements atmosphériques dans l'habitat [2,9]. Depuis que l'association entre la croissance de *Stachybotrys chartarum* dans les bâtiments et l'apparition de cas d'hémophilose pulmonaire primitive idiopathique (IPH) chez des nourrissons a été publiée [10,11], ces recherches se focalisent sur la famille de mycotoxines majoritaires 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 [2,12].

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 [13], nous avons développé une méthode permettant de doser d'autres mycotoxines et notamment la stérigmatocystine et l'ochratoxine A, qui ont pour point commun d'être des molécules polaires. Cette technique permet également le dosage de la déoxynivalénol appartenant à la famille des trichothécènes.

En fait, notre dosage fondé 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 montage d'aérosolisation utilisé [7] nous a permis de générer des aérosols de stérigmatocystine à partir de la croissance d'une espèce de moisissure sur trois matériaux (fibre de verre, papier peint traditionnel et papier peint vinyle). Nous avons utilisé pour cela une souche d'*A. versicolor*, cette espèce fréquemment isolée dans les habitats pouvant être toxigène en produisant notamment une mycotoxine cytotoxique : la stérigmatocystine.

5. Conclusion

Le dosage de la ST à partir des aérosols fongiques générés avec le 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 1 et 4 % 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.

À ce jour, la majorité des études référencant 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 [1,13–17]. Or, dans le cas de maladies respiratoires induites par ce type d'agents, le mode d'exposition des personnes est l'inhalation de particules [18,19]. 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.

Références

- [1] Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO, Nielsen PA, Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *Int Biodeterior Biodegr* 1998;42:9–16.
- [2] Johanning E, Gareis M, Nielsen K, Dietrich R, Martlbauer E. Airborne mycotoxin sampling and screening analysis. 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate 2002, Monterey, California.
- [3] Krishnamachari KAV, Nagarajan V, Tilak TBG. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in western India. *Lancet* 1975;1:1061–3.
- [4] NIELSEN FK. Mould growth on building materials [thèse]. Denmark : University of Denmark; 2001.
- [5] Sorenson WG, Frazer DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA. Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 1987;53(6):1370–5.
- [6] Alvarez L, Gil AG, Ezpeleta O, Garcia-Jalon JA, Lopez de Certain A. Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. *Food Chem Toxicol* 2004;42(5):825–34.
- [7] Boissier M. Étude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques : application à l'hygiène des environnements intérieurs [thèse]. Créteil : université Paris XII ; 2003.
- [8] Gorny R, Reponen T, Grinshpun S, Willeke K. Source strength of fungal spore aerosolization from moldy building material. *Atmos Environ* 2001;35:4853–62.
- [9] Yike I, Allan T, Sorenson WG, Dearborn DG. Highly sensitive protein translation assay for trichothecene toxicity in airborne particulates: comparison with cytotoxicity assays. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(1):88–94.
- [10] Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, et al. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(10):3620–5.
- [11] Montana E, Etzel R, Allan T, Horgan T, Dearborn D. Environmental risk factors associated with pediatric idiopathic pulmonary hemorrhage and hemosiderosis in a cleveland community. *Am Acad Pediatr* 1997;99(1):1–8.
- [12] Croft WA, Jarvis BB, Yastawara CS. Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmos Environ* 1986;20(3):549–52.
- [13] Samson R, Hoekstra E. Common fungi occurring in indoor environments. In: Health implications of fungi in indoor environments. Amsterdam. 1994. p. 541–6 (2).
- [14] Johanning E, Gareis M, Yang Chin S, Hintikka E-L, Nikulin M, Jarvis B, et al. Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Res* 1998;14:60–73.
- [15] Richard JL, Plattner RD, May J, Liska SL. The occurrence of ochratoxine A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* 1999;146:99–103.
- [16] Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka E-L, Lindroos O, et al. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5):1899–904.
- [17] Engelhart S, Looock A, Skutlarek D, Sagunski H, Lommel A, Färber H, et al. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(8):3886–90.
- [18] Charmley LL, Trenholm HL. Les mycotoxines. Agence canadienne d'inspection des aliments; 2000 (6).
- [19] Fung F, Hughson WG. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. 9th international conference on indoor air quality and climate, Monterey, California 2002.