



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



SÉRIE « MOISSURES INTÉRIEURES »

Coordonnée par D. Charpin et D. Caillaud

Méthodes d'identification et de quantification des moisissures de l'habitat : méthodes classiques, méthodes moléculaires



Classical and molecular methods for identification and quantification of domestic moulds

E. Fréalle^{a,b,*}, V. Bex^c, G. Reboux^d,
S. Roussel^d, S. Bretagne^{e,f}

^a Université Lille, CNRS, Inserm, CHU de Lille, institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France

^b CHU Lille, Laboratoire de parasitologie-mycologie, 59000 Lille, France

^c Service parisien de santé environnementale, 75013 Paris, France

^d Chrono-environnement UMR 6249 CNRS, de parasitologie-mycologie, université de Bourgogne Franche-Comté, CHU de Besançon, 25000 Besançon, France

^e Laboratoire de parasitologie-mycologie, hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) & Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité Université, 75010 Paris, France

^f CNRS URA3012, unité de mycologie moléculaire, centre national de référence des mycoses invasives et des antifongiques, institut Pasteur, 75015 Paris, France

Reçu le 8 octobre 2016 ; accepté le 9 janvier 2017

Disponible sur Internet le 15 novembre 2017

MOTS CLÉS

Moissure ;
PCR quantitative ;
Contamination
intradomiciliaire ;
Exposition aérienne ;
Collecteur de
poussières

Résumé

Introduction. — Pour appréhender les répercussions de l'inhalation constante et inévitable de spores de moisissures il est nécessaire de les prélever, les identifier et les quantifier.

État des lieux. — Les prélèvements sont de trois types : (i) surfaces, de réalisation facile mais non quantifiables, (ii) air, faciles à calibrer mais limités dans le temps, et (iii) poussières, plus représentatifs dans le temps d'une exposition aux moisissures. La stratégie d'échantillonnage dépend des objectifs (exposition des personnes, objectiver la contamination, efficacité de la remédiation). L'identification des colonies obtenues en culture est réalisée par microscopie, Maldi-TOF, et/ou par séquençage ADN.

* Auteur correspondant. Centre d'infection et d'immunité de Lille, institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr-Calmette, BP245, 59019 Lille, France

Adresses e-mail : emilie.frealle-2@univ-lille2.fr, emilie.frealle@chru-lille.fr (E. Fréalle).

Perspectives. — Les capteurs à poussières, faciles à mettre en œuvre et peu coûteux, représentent une alternative pour la caractérisation qualitative et quantitative de la flore fongique lors des enquêtes à domicile. Le comptage des colonies devrait être progressivement associé aux méthodes de PCR quantitative en temps réel dans l'attente de standardisation des méthodes de séquençage à haut débit.

Conclusion. — La diversité des moisissures, du nombre de spores inhalées, et l'association à d'autres allergènes rendent l'évaluation des liens entre moisissures et impact sur la santé difficile, d'où l'importance du développement d'outils quantitatifs faciles à mettre en œuvre. © 2017 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Mould;
Quantitative PCR;
Household
contamination;
Environmental air
exposure;
Dust collector

Summary

Introduction. — To study the impact of the constant and inevitable inhalation of moulds, it is necessary to sample, identify and count the spores.

Background. — Environmental sampling methods can be separated into three categories: surface sampling is easy to perform but non quantitative, air sampling is easy to calibrate but provides time limited information, and dust sampling which is more representative of long term exposure to moulds. The sampling strategy depends on the objectives (evaluation of the risk of exposure for individuals; quantification of the household contamination; evaluation of the efficacy of remediation). The mould colonies obtained in culture are identified using microscopy, Maldi-TOF, and/or DNA sequencing.

Viewpoints. — Electrostatic dust collectors are an alternative to older methods for identifying and quantifying household mould spores. They are easy to use and relatively cheap. Colony counting should be progressively replaced by quantitative real-time PCR, which is already validated, while waiting for more standardised high throughput sequencing methods for assessment of mould contamination without technical bias.

Conclusion. — Despite some technical recommendations for obtaining reliable and comparable results, the huge diversity of environmental moulds, the variable quantity of spores inhaled and the association with other allergens (mites, plants) make the evaluation of their impact on human health difficult. Hence there is a need for reliable and generally applicable quantitative methods.

© 2017 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Qu'est-ce qu'une moisissure et pourquoi l'identifier et la quantifier ?

Les moisissures sont des champignons filamenteux dont le biotope est le milieu extérieur. Ces champignons se développent sur de nombreux supports, principalement les végétaux en décomposition, et produisent des spores (souvent plusieurs millions/cm²), qui sont des formes de dissémination par l'air ou par l'eau. Ces spores de quelques micromètres de diamètre sont indispensables pour contaminer de nouveaux milieux quand le premier est épuisé. Le contact avec ces spores et leur inhalation sont donc inévitables et quotidiens [1].

Les conséquences médicales pour l'homme sont de deux ordres. Le risque infectieux est majeur en terme pronostic lorsque le patient développe une infection fongique invasive mais ces infections restent rares. En effet, le fait de réguler sa température à 37°C permet à l'homme d'être résistant à l'immense majorité des champignons dont l'optimum thermique est la température ambiante [2]. Ainsi, de très rares moisissures parmi les millions d'espèces connues ou à décrire, sont responsables d'infections chez

des patients profondément immunodéprimés (hémapathies malignes essentiellement) ou avec des pathologies préexistantes (caverne tuberculeuse, mucoviscidose par exemple) [3]. Il n'en est pas de même pour les pathologies allergiques qui sont extrêmement fréquentes et dans la physiopathologie desquelles les moisissures retiennent de plus en plus l'attention [4]. Nous ne parlerons pas ici des risques toxicologiques, bien que majeurs avec certaines espèces (aflatoxines et *Aspergillus flavus* par exemple). Ces risques toxicologiques sont bien connus par voie alimentaire, beaucoup moins bien par voie respiratoire [5]. De même, nous n'aborderons pas les mesures indirectes des constituants fongiques exposées par ailleurs dans le cadre de cette série.

Les problématiques de mesure et d'identification vont donc être différentes selon que la question concerne le risque infectieux ou le risque allergique. Pour le risque infectieux, très peu d'espèces sont à surveiller (*Aspergillus fumigatus* principalement) et la quantification apporte peu car on ne connaît pas le seuil minimal pour développer une infection. Pour l'allergie au sens large, le spectre des espèces est très vaste et la quantification constitue un argument possible pour impliquer une espèce donnée.

L'étude de l'habitat ou du lieu de travail peut aussi avoir un intérêt plus général pour caractériser un habitat avec un taux élevé de moisissures, défini par une quantité supérieure à la normale. L'intérêt de la quantification est alors majeur mais le dénombrement de toutes les espèces peut être secondaire et seules les plus fréquentes ou les plus faciles à mesurer peuvent suffire pour l'état des lieux et le suivi de la remédiation. Ces espèces fréquentes et facilement mesurables peuvent être alors utilisées comme marqueurs de la contamination environnementale sans tirer de lien de causalité avec l'espèce mesurée et les symptômes observés. Les parts liées à l'humidité et aux moisissures sont alors difficiles à séparer, les moisissures se développant dans des milieux humides. Cependant, les spores peuvent persister sur les murs bien après la disparition d'une humidité accidentelle (inondations par exemple).

Ces différents objectifs influent à l'évidence sur les stratégies d'échantillonnage, de collecte des prélèvements, d'identification et de quantification, qui sont extrêmement variables et peu standardisées, rendant les résultats obtenus même pour une méthode donnée difficilement comparables entre les études. De plus, quand ces études mycologiques sont réalisées pour suivre des cohortes, il est souvent difficile d'être homogène entre le début et la fin de la surveillance en raison des développements technologiques successifs.

- Les moisissures sont des champignons filamenteux qui se développent sur de nombreux supports extérieurs et se disséminent sous forme de spores par l'air ou par l'eau.
- Les conséquences médicales pour l'homme sont de plusieurs ordres : allergiques, très fréquentes, toxiques, plus rares, connues surtout par voie alimentaire (aflatoxine par exemple), et infectieuses, rares et survenant chez des patients profondément immunodéprimés ou présentant des pathologies préexistantes (caverne tuberculeuse, mucoviscidose...).
- Les stratégies de mesure et d'identification diffèrent, selon que le risque est infectieux (faible nombre d'espèces, surtout *Aspergillus*, avec faible intérêt de la quantification) ou allergique (grand éventail d'espèces et quantification dans l'habitat ou le lieu de travail pouvant permettre de mettre en évidence l'implication d'une espèce donnée).
- Ces différents objectifs expliquent la grande variété et la faible standardisation des stratégies d'échantillonnage, de collecte des prélèvements, d'identification, et de quantification, rendant difficiles les comparaisons entre les études ou le suivi de cohortes.

Prélèvements

Les prélèvements sont réalisés sous la responsabilité de personnes formées, qui connaissent les limites des méthodes

utilisées. Il peut s'agir de conseillers en environnement intérieur (CEI), conseillers habitat, techniciens des Agences régionales de santé (ARS) ou personnels de services communaux d'hygiène, de laboratoires de mycologie ou d'associations.

Les prélèvements sont possibles au niveau :

- des surfaces ou matériaux, décrits dans la norme NF ISO 16000-21 « Détection et dénombrement des moisissures—Échantillonnage à partir de matériaux » (2014) ;
- de l'air, par impaction ou filtration (décrits dans les normes NF ISO 16000-18 « Détection et dénombrement des moisissures — Échantillonnage par impaction » (2011), et NF ISO 16000-16 « Détection et dénombrement des moisissures — Échantillonnage par filtration » (2009), ou par des méthodes dites par « cyclone », développées plus récemment ;
- des poussières.

Prélèvements de surfaces ou matériaux

Les prélèvements de surfaces et/ou de matériaux (papier peint, moquette, bois, plâtre, débris de mur ...) sont les plus fréquemment réalisés. Ils permettent l'identification des espèces présentes en cas de moisissures visibles. Ce type de prélèvements, qui permet une appréciation qualitative (espèces présentes) et éventuellement semi-quantitative (densité) de la contamination fongique, présente l'avantage d'être de réalisation facile (possible par les occupants, sous réserve d'être guidés par des professionnels formés) et peu coûteux. Le nombre de prélèvements est adapté au nombre de surfaces ou matériaux concernés, de leur localisation et de l'aspect des moisissures qui s'y développent (couleur, texture). Les résultats peuvent cependant ne pas être représentatifs ni des espèces présentes sur la totalité des surfaces ou matériaux ni de celles présentes dans l'air.

Prélèvements d'air

Pour la mesure quantitative du niveau de contamination fongique, des prélèvements d'air peuvent être réalisés. Ces prélèvements sont les plus représentatifs de l'exposition individuelle car ils correspondent à la fraction potentiellement inhalée par les occupants. Par ailleurs, ils peuvent permettre la détection de moisissures « non visibles » se développant derrière des meubles, à l'intérieur des matériaux de construction ou dans d'autres réservoirs (par exemple dans la terre de plantes en pot ou au niveau de sources d'humidité intérieure telles que des aquariums ou des fontaines). Ils présentent cependant l'inconvénient d'être réalisés généralement sur des durées courtes (quelques minutes). Il s'agit donc d'une mesure à un instant donné qui, au vu des variations importantes des concentrations aériennes de moisissures rencontrées en fonction de l'hygrométrie, de la température ou des flux d'air dans un environnement non contrôlé (contrairement par exemple à un service hospitalier), n'est que partiellement représentative de l'exposition chronique des occupants. Par ailleurs, ils nécessitent l'achat d'appareils dédiés ainsi que le déplacement de professionnels formés au domicile.

L'impaction sur milieu gélosé solide est la méthode la plus souvent rapportée dans les études. Les points prélevés,

volumes, milieux, température et durée d'incubation sont cependant très variables [6]. Afin de standardiser ces méthodes, des recommandations ont été proposées par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) en 2006 (http://www.social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Contaminations_fongiques_en_milieux_interieurs.pdf), puis actualisées en 2011 par la norme NF ISO 16000-18, qui propose un volume minimum de 50L et le prélèvement de plusieurs volumes différents (par exemple 50L et 100L), sur milieu DG18 et milieu au malt ou dextrose/pomme de terre, pour chaque point d'échantillonnage.

Pour les prélèvements par filtration, la norme recommande l'utilisation de membranes en gélatine et en polycarbonate. Ces méthodes présentent l'avantage de permettre la réalisation de prélèvements de longue durée (plusieurs heures, voire plusieurs jours) et la mise en œuvre de méthodes variées (microscopie, culture ou méthode moléculaire), complémentaires. La possibilité d'une dilution avant analyse permet leur utilisation en environnement professionnel où des concentrations très élevées, liées à la manipulation de substrats contaminés, sont attendues. Portés à la ceinture, ces dispositifs peuvent également être utilisés pour la mesure d'une exposition individuelle.

Des biocollecteurs dits « cycloniques », qui permettent le transfert direct de particules aériennes en milieu liquide, sont les méthodes les plus récemment développées. Des appareils portatifs mais également des capteurs individuels, initialement développés pour des mesures d'exposition en milieu professionnel, sont disponibles. Le liquide de collecte, qui est généralement de l'eau ou une solution physiologique à laquelle sont ajoutés des tensioactifs pour permettre la mise en suspension des spores, peut être analysé par microscopie, culture ou biologie moléculaire. En fonction des appareils, la durée de prélèvement varie de quelques minutes à plusieurs heures. Les quelques études disponibles à ce jour confirment l'intérêt de ces appareils pour la mesure des concentrations aériennes fongiques [7,8]. Par ailleurs, une étude a comparé un biocollecteur cyclonique à un appareil utilisant la filtration et retrouve des résultats similaires [9].

Prélèvements de poussières

Le recueil des spores sédimentées dans les poussières présente l'avantage d'être représentatif à la fois du réservoir aérien et d'une exposition plus longue que les prélèvements d'air. Les poussières sont le plus souvent collectées par aspiration à l'aide d'un aspirateur muni d'un sac neuf ou d'une chaussette de nylon placée dans le tube de l'aspirateur. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle est très difficilement standardisable car les quantités collectées sont dépendantes du support et de l'entretien quotidien de l'environnement, et les résultats seront dépendants des modalités d'analyse. La possibilité de réalisation du prélèvement par l'occupant lui-même permet de faciliter le recueil (le déplacement à domicile n'est pas indispensable), mais c'est également une source de variabilité supplémentaire, notamment pour la quantification de la contamination fongique.

Le développement récent des capteurs électrostatiques ou pièges à poussières (carré de tissu stérile aux propriétés électrostatiques exposé pendant plusieurs semaines au

domicile du patient) ouvre la perspective d'une meilleure standardisation. Après exposition, le capteur sera rincé à l'aide d'une solution stérile dans un malaxeur automatisé. Les principaux avantages de cette méthode sont sa facilité de réalisation (le déplacement au domicile n'est pas indispensable) et son coût peu élevé. L'étape critique est le rinçage, qu'il est nécessaire d'optimiser. Comme pour les autres méthodes permettant le recueil d'un liquide, celui-ci peut être analysé par microscopie, culture ou biologie moléculaire. Ces dispositifs ont été principalement évalués pour la détection d'endotoxines ou d'allergènes [10,11]. Dans les quelques études disponibles sur la caractérisation de la flore fongique dans des logements au Danemark ou en France (jeunes mamans, utilisateurs de composteurs), des archives, ou des bâtiments publics [12–17], la durée d'exposition varie de 2 semaines à 12 mois (Tableau 1).

Ils sont ensuite analysés par culture ou PCR en temps réel. Les modalités de stockage dépendent des méthodologies d'analyse appliquées : généralement conservation à température ambiante et analyse rapide en cas de culture, congélation à -20°C pour les méthodes moléculaires. Normand et al. ont évalué l'effet d'une congélation pendant 1 ou 3 mois du capteur sur la viabilité et retrouvent une bonne reproductibilité en termes de diversité et nombre total d'UFC. Certains micromycètes comme *Aspergillus fumigatus* ou *Penicillium* spp. résistent cependant mieux à la congélation [14]. L'importance des modalités de conservation a été soulignée par d'autres auteurs qui ont comparé des échantillons de poussières prélevés par aspiration, conservés à température ambiante et analysés par biologie moléculaire, soit initialement soit progressivement, et ont mis en évidence des différences significatives entre les résultats pour chaque mois écoulé [18]. Par ailleurs, dans cette étude, les auteurs qui ont utilisé des modalités de conservation différentes en fonction des groupes (température ambiante et analyse juste après le prélèvement pour les logements de patients avec asthme et/ou rhinite vs congélation à -20°C pour les logements témoins) concluent à un biais probable de ces conditions sur les différences très importantes observées entre les deux groupes pour de nombreuses espèces (appartenant par exemple aux genres *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Scopulariopsis*, ou *Stachybotrys*).

- Les prélèvements se font à plusieurs niveaux : surfaces ou matériaux, air, par impaction ou filtration, et poussières.
- Les prélèvements de surfaces et/ou de matériaux sont simples et le plus fréquemment réalisés, sur des moisissures visibles. Ils permettent une appréciation qualitative (espèces présentes) et éventuellement semi-quantitative (densité) de la contamination fongique, mais leurs résultats peuvent ne pas être représentatifs ni des espèces présentes sur la totalité des surfaces ou matériaux, ni de celles présentes dans l'air.

Tableau 1 Méthodologie et principaux résultats des études ayant utilisé des capteurs électrostatiques pour la caractérisation de la flore fongique en environnement intérieur.

Lieux	Caractéristiques du capteur et localisation	Durée d'exposition (stockage)	Rinçage du capteur	Méthode d'analyse	Résultats		Référence
					Flore totale	Par espèce : fréquence de positivité et quantité mesurée en culture ou qPCR	
Logements danois ($n = 5$, 30 capteurs analysés)	Dossier en polypropylène avec 4 lingettes 19×11 cm	1 mois (analyse dans les 24 h)	20 mL Tween 20 0,05 % Agitation orbitale 300 rpm 60 min	Culture DG18 7 jours à 25°C	422 à 17644 UFC/m ² /jour (médiane 2500)	ND	[12]
Archives françaises ($n = 10$, 47 capteurs au total)	Lingettes « SuperU » 22×30 cm	4 semaines (non précisé)	5 à 20 mL Tween 80 0,1 % Stomacher 10 min	Culture DG18 30°C, Malt chloramphénicol 20°C, Malt 10 % NaCl 15°C, cellulose agar 0,5 % 20°C qPCR Sc, Af, Cs, Aa	Médianes 0 à 8 UFC/cm ² (culture)	Af : 2 % en culture (0,5 UFC/cm ²) vs. 0 en qPCR Alternaria sp. : 6 % en culture (5-15 UFC/cm ²), vs. 2 % en qPCR (110 UFC/cm ²) Sc : 0 % en culture vs. 1,5 % par qPCR (moy 1,37 UFC/cm ²) Cs : 26 % en culture vs. 47 % en qPCR	[16]
Logements avec bébé < 6 mois, Picardie, Bourgogne et Territoire de Belfort ($n = 53$)	Lingettes Apta top budget, Dia, Casino, Casino-First, Wiffer, SuperU 1,60–1,80 m dans la chambre de l'enfant	10 semaines (–20°C)		qPCR Pc, Sc, Av, Af, Cs, Aa	0 à 24 625 UFC/cm ²	Aa : 55 % (moy 33,9 UFC/cm ²) Av : 47 % (moy 884 UFC/cm ²) Pc : 38 % (moy 0,3 UFC/cm ²) Cs : 25 % (moy 9,4 UFC/cm ²) Af : 7 % (moy 3 UFC/cm ²) Sc : 9 % (moy 2 UFC/cm ²)	[17]
Logements avec bébé < 6 mois, 320 maternités en France ($n = 3193$)	Chambre de l'enfant	2 mois (non précisé)		qPCR Pc, Sc, Av, Af, Cs, Aa	ND	27 % (Sc) à 88 % (Aa) 0 à 1000 fg/μL	[15]

Lieux	Caractéristiques du capteur et localisation	Durée d'exposition (stockage)	Rinçage du capteur	Méthode d'analyse	Résultats		Référence
					Flore totale	Par espèce : fréquence de positivité et quantité mesurée en culture ou qPCR	
Logements de patients atteints de mucoviscidose (<i>n</i> = 16)	Chambre du patient	10 semaines (non précisé)		Culture sur DG18 et Malt chloramphénicol qPCR <i>Af</i>	Culture : 0,8 à 17,3 UFC/cm ²	Culture <i>Af</i> : 31 % (0,2–0,4 UFC/cm ²) <i>A. flavus</i> : 25 % (0,2–2,1 UFC/cm ²) <i>A. nidulans</i> : 12 % (0,2–6,4 UFC/cm ²) qPCR <i>Af</i> : 37 % (0–6,44 fg/μL)	[35]
Logements avec composteur (<i>n</i> = 38) et moins (<i>n</i> = 10)	21 cm × 5 cm À 0,5 m et 3 m du composteur	2, 4, 7 et 12 mois (non précisé)		qPCR <i>Pc</i> , <i>Av</i> , <i>Af</i> , <i>Cs</i> , <i>Aa</i> , <i>Ws</i>	ND	ND	[13]
Logements publics à Marseille (<i>n</i> = 3)	10 cm × 20 cm 1,30–2,00 m À distance des fenêtres	14–15 jours (–20°C ; analyse après 1 jour à 1 mois)	30 mL Tween 80 0,1 % – Stomacher 10 min Centrifugation 10 min 3500 rpm	Culture sur Sabouraud Chloramphénicol 7 jours à 30°C	Jusqu'à 13 000 UFC/m ² /jour	ND	[14]

Sc : *P. chrysogenum* ; Sc : *S. chartarum* ; Av : *A. versicolor* ; Af : *A. fumigatus* ; Cs : *C. sphaerospermum* ; Aa : *A. alternata*.

- Les prélèvements d'air, plus complexes à réaliser car nécessitant un appareillage spécifique, permettent une mesure quantitative du niveau de contamination ; ils sont les plus représentatifs de l'exposition individuelle car ils correspondent à la fraction potentiellement inhalée par les occupants et peuvent permettre la détection de moisissures « non visibles ». Mais leur inconvénient est qu'ils ne sont en général réalisés que sur des périodes brèves, donnant une mesure à un instant donné qui ne reflète que partiellement l'exposition chronique des occupants.
- Les prélèvements d'air utilisent plusieurs méthodes : l'impaction sur milieu gélosé solide, la plus utilisée, la filtration sur membranes en gélatine et en polycarbonate, permettant des prélèvements de longue durée et les biocollecteurs dits « cycloniques », plus récents, qui permettent le transfert direct de particules aériennes en milieu liquide.
- Les prélèvements de poussières par aspiration par un aspirateur domestique, qui recueille des spores sédimentées dans les poussières, présentent l'avantage d'être représentatifs à la fois du réservoir aérien et d'une exposition plus longue que les prélèvements d'air, mais cette méthode est très difficilement standardisable.
- Les capteurs électrostatiques ou pièges à poussières (carré de tissu stérile aux propriétés électrostatiques, exposé pendant plusieurs semaines au domicile du patient), plus récents, permettent une meilleure standardisation. Le prélèvement est simple et peu onéreux. Le rinçage du capteur avec une solution stérile permet l'obtention d'un liquide. Comme pour toutes les méthodes utilisant le recueil d'un liquide, ce dernier pourra être analysé par culture, biologie moléculaire (PCR en temps réel), ou éventuellement microscopie.

Stratégie d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage est mise en œuvre de préférence secondairement à l'inspection visuelle sur le terrain, qui permet de détecter la présence de moisissures et mesurer l'étendue des surfaces moisies cumulées au niveau des pièces d'habitation. Elle prend en compte les objectifs de la visite :

- évaluation de la contamination fongique de l'habitat, pour laquelle il est préférable de combiner des prélèvements d'air et/ou de poussières à des prélèvements de surface, même si ces derniers, associés à une mesure des surfaces moisies, peuvent s'avérer suffisants en cas de présence de moisissures visibles ;
- évaluation de l'exposition des personnes, pour laquelle des prélèvements d'air et/ou de poussières, permettant des mesures qualitatives et quantitatives, représentatives d'une exposition, sont nécessaires ;
- identification de sources de contamination, pour laquelle des prélèvements seront réalisés au niveau de réservoirs potentiels tels que terre, végétaux ou dérivés (plantes,

épices, thé, tabac), matelas, source d'eau (aquarium, fontaine), ou animaux ;

- vérification de l'efficacité de mesures de remédiation pour laquelle, en plus des vérifications visuelles, des prélèvements d'air et/ou de poussières quantitatifs seront effectués à l'aide de méthodes identiques à celles utilisées avant remédiation.

Le nombre de points prélevés, leur localisation, ainsi que les conditions de réalisation des prélèvements seront également déterminés en fonction de ces objectifs.

En pratique, dans les études sur la caractérisation de l'habitat ou dans les études épidémiologiques sur les effets des moisissures sur la santé, ce sont des prélèvements d'air ou, plus rarement, de poussières qui sont réalisés et analysés avec des méthodologies très variables [19]. Ceci n'est cependant pas le reflet des pratiques sur le terrain aussi bien en France, où c'est le plus souvent des prélèvements de surface qui sont réalisés en cas de présence de moisissures visibles, qu'au niveau international, où de nombreux organismes au Canada (Institut national de santé publique du Québec [INSPQ]), aux États-Unis (*Center for Disease Control* [CDC], *Environmental Protection Agency* [EPA]), en Suède (*Swedish Chapter of International Society of Indoor Air Quality and Climate* [SWESIAQ]) ou aux Pays-Bas (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu* [RIVM]), auditionnés lors de la consultation internationale mise en œuvre par l'ANSES et restituée dans le rapport publié en 2016, préconisent la prévention et la remédiation des problèmes de développement des moisissures plutôt que la réalisation de mesures. Ces pratiques ne prennent pas en compte la possibilité du développement de moisissures non visibles lié à des facteurs favorisants tels que humidité, odeur de moisi, dégât des eaux, ou anomalies structurelles de l'habitat, dont la détection nécessite la réalisation de prélèvements d'air et/ou de poussières. Un prélèvement témoin est conseillé dans une pièce de référence. Le type de prélèvements est aussi guidé par les caractéristiques physiologiques, cliniques et socio-économiques des occupants (âge, immunodépression, pathologies respiratoires chroniques, symptômes cliniques pouvant être liés à une exposition aux moisissures, précarité énergétique ou sur-occupation, qui favorise l'exposition) (http://www.social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Contaminations_fongiques_en_milieux_interieurs.pdf, <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>, NF EN ISO 16000-19 « Stratégie d'échantillonnage des moisissures », publiée en 2014).

Les prélèvements d'air intradomiciliaires peuvent être biaisés par des spores de l'air extérieur à limiter en fermant les portes et fenêtres au moins 8 h avant l'échantillonnage, et en évitant la réalisation de prélèvements en été. Pour évaluer ces biais, un prélèvement de l'air extérieur est également préconisé de façon systématique par la norme NF EN ISO 16000-19 pour la comparaison entre les concentrations et espèces fongiques intérieures et extérieures, mais la nécessité de ce prélèvement reste controversée (http://www.social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Contaminations_fongiques_en_milieux_interieurs.pdf). Enfin, la réalisation de prélèvements répétés est préconisée par certains auteurs afin de limiter les biais liés à la variation des concentrations fongiques aériennes [20].

- La stratégie d'échantillonnage est décidée suite à l'inspection visuelle sur le terrain, qui permet de détecter la présence de moisissures visibles ou de facteurs favorisant le développement de moisissures, et de mesurer l'étendue des surfaces moisies cumulées ; ses objectifs sont les suivants :
- évaluation de la contamination fongique de l'habitat (prélèvements d'air et/ou de poussières avec prélèvements de surface) ;
- évaluation de l'exposition des personnes (nécessitant des prélèvements d'air et/ou de poussières, permettant des mesures qualitatives et quantitatives) ;
- identification de sources de contamination (prélèvements au niveau de réservoirs potentiels) ;
- vérification de l'efficacité de mesures de remédiation (vérifications visuelles, prélèvements d'air et/ou de poussières quantitatifs effectués par les mêmes méthodes que celles utilisées avant remédiation).
- Dans les études sur la caractérisation sur les effets des moisissures de l'habitat sur la santé ou dans les études épidémiologiques, les prélèvements d'air ou de poussières sont les plus fréquents. Mais en pratique, lors des visites à domicile de conseillers en environnement intérieur, conseillers habitat, techniciens ARS, personnels de services communaux d'hygiène, de laboratoires de mycologie ou d'associations, ce sont le plus souvent des prélèvements de surface qui sont réalisés en cas de présence de moisissures visibles.
- Ces pratiques diffèrent selon les pays, et de nombreux organismes internationaux préconisent la prévention et la remédiation des problèmes de développement des moisissures plutôt que la réalisation de mesures. Mais on ne tient alors pas compte de la possibilité du développement de moisissures non-visibles qui nécessitent des prélèvements d'air et/ou de poussières.
- Le type de prélèvements dépend aussi des caractéristiques physiologiques, cliniques et socio-économiques des occupants (âge, immunodépression, pathologies respiratoires chroniques, symptômes évocateurs d'une exposition aux moisissures, précarité énergétique ou sur-occupation, qui favorisent l'exposition).
- Les prélèvements d'air intradomiciliaires peuvent être biaisés par des spores de l'air extérieur à limiter en fermant les portes et fenêtres au moins 8 h avant l'échantillonnage, et en évitant la réalisation de prélèvements en été ; pour évaluer ces biais, un prélèvement de l'air extérieur peut être envisagé, tout comme la réalisation de prélèvements répétés.

Méthodes d'identification

Observation microscopique directe

Les spores peuvent être identifiées directement à partir de prélèvements de surfaces par ruban adhésif ou de prélève-

ments d'air par filtration. Les prélèvements par scotch-test sont de réalisation facile ne demandant pas de grande technicité. Cependant, l'identification secondaire des spores au microscope demande une grande expertise. Cette expertise ne peut aller plus loin que l'identification du genre, certaines espèces présentant des spores morphologiquement très proches.

Identification des colonies après culture

La culture à partir de prélèvements d'air, de surfaces, de poussières ou de n'importe quel matériau est de loin la plus utilisée et de nombreuses données historiques sont disponibles (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>). La norme NF ISO 16000-17 « Détection et dénombrement des moisissures—Méthode par culture » publiée en 2009 propose une méthodologie pour les prélèvements d'air par impaction ou par filtration, également applicable à la culture des moisissures à partir de matières en suspension ou de culture directe sur boîte de Pétri. Les milieux préconisés sont la gélose DG18 et la gélose à l'extract de malt ou à la pomme de terre, incubées 7 jours à $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Pour la détection d'espèces avec un risque infectieux (*Aspergillus* spp. et mucorales), des températures d'incubation plus élevées peuvent être utilisées (37°C voire 40°C). La culture nécessite une expertise pour l'analyse macro- et microscopique des colonies. L'emploi de plus en plus généralisé de l'analyse par spectrométrie de masse (Maldi-TOF) laisse penser que l'identification des colonies sera de plus en plus facile en demandant de moins en moins d'expertise [21].

Si la microscopie et le Maldi-TOF ne donnent pas d'identification correcte, l'identification peut se faire après extraction de l'ADN, amplification par des amorces consensuelles (ciblant souvent l'ADN ribosomal et quelques gènes spécifiques conservés chez les champignons) suivie d'un séquençage et de la comparaison avec des banques de données. La qualité des banques de données est une limitation majeure (GenBank, contient environ 30–40 % d'erreurs d'identification pour les champignons filamenteux). Seules des banques fiables (CBS : <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home> ; Pasteur : <http://www.fungibank.pasteur.fr>) doivent être utilisées par les microbiologistes.

La principale limite des cultures est que seules les espèces que l'on sait cultiver sur les milieux habituels (Sabouraud, Malt, DG18) sont analysables. Cela n'a que peu d'impact si la question est d'évaluer la contamination globale et que la diversité ou la recherche d'une espèce particulière ne sont pas des objectifs prioritaires. Inversement, ce n'est pas parce qu'une espèce est revivifiable qu'elle est responsable des symptômes observés.

Identification par biologie moléculaire sans culture préalable

Rechercher de l'ADN spécifique dans un prélèvement est différent de l'identification de colonies car l'ADN recherché se trouve alors mélangé à de l'ADN non cible (plantes, acariens notamment). Si une seule espèce est ciblée par les amorces choisies, il est nécessaire de dessiner un autre jeu d'amorces pour une autre espèce, et ainsi de suite pour

chaque espèce. Pour gagner du temps, certains proposent de multiplexer (i.e. réaliser toutes les réactions dans le même tube réactionnel) les PCR spécifiques pour chaque espèce. Il est cependant difficile d'assurer que, dans un prélèvement, chaque espèce présente est amplifiée avec la même efficacité, ce qui peut entraîner des biais de représentation des espèces recherchées [22].

Une autre façon de dénombrer sans culture est d'amplifier les extraits d'ADN des échantillons avec des amorces génériques ciblant l'ADN ribosomal (18S, 28S ou *Internal Transcribed Spacer* [ITS], complètement différent de l'ADN ribosomal des bactéries, les moisissures étant des eucaryotes) et le dénombrement soit par hybridation dans des microplaques ou microarrays, soit de plus en plus souvent, par séquençage à haut débit (ou NGS pour *Next Generation Sequencing*). Tous les produits de PCR sont alors analysés et le traitement informatique aboutit à l'identification d'*operational taxonomic unit* (OTU) qui reflètent la diversité des espèces dans le prélèvement. Cependant, le choix d'amorces non spécifiques dites « pan-fongiques » aboutit à des biais d'amplification majeurs et les espèces les plus représentées ne sont pas forcément les plus fréquentes, mais les plus facilement amplifiables [23]. Il est en effet illusoire d'identifier des amorces qui amplifient avec la même efficacité toutes les espèces fongiques potentielles [24]. De plus, des amorces « panfongiques » comportent le risque d'amplifier des séquences d'autres eucaryotes en raison des similarités dans les séquences des amorces, en particulier celles de plantes dans des prélèvements environnementaux [25]. Ces amplifications parasites se font alors au détriment de celles des moisissures qui peuvent alors ne pas être détectées.

Pour limiter les biais inhérents à l'usage d'amorces prédéfinies, une autre méthode, décrite sous le terme de metagenomics, est proposée. Elle consiste à amplifier tous les ADN présents dans l'échantillon (*Whole Genome Sequencing*) sans a priori avec des amorces aléatoires, et de traiter ensuite informatiquement l'ensemble des données. Cette stratégie est plus longue, demande une expertise informatique majeure, et ne fournit que difficilement des données quantitatives. Ces stratégies sont de plus en plus souvent comparées à la culturomics, consistant à multiplier les milieux et les conditions de cultures [26]. Les résultats ne montrent pas toujours de concordances entre culturomics et metagenomics [27]. Ces méthodes, objets de nombreuses publications, doivent donc être regardées avec prudence tant que standardisation et reproductibilité ne seront pas assurées.

- L'identification des germes est effectuée par plusieurs méthodes :
- examen microscopique direct (à partir de prélèvements de surfaces par ruban adhésif ou de prélèvements d'air par filtration) ;

- après culture (à partir de prélèvements d'air, de surfaces, de poussières ou de n'importe quel matériau), la plus utilisée, par analyse macro- et microscopique des colonies et de plus en plus par spectrométrie de masse (Maldi-TOF) ou biologie moléculaire par séquençage ;
- biologie moléculaire sans culture préalable, par recherche directe d'ADN.
- L'identification par séquençage (après extraction de l'ADN et amplification par des amorces consensuelles) se fait par comparaison avec des banques de données qui doivent impérativement être fiables.
- La principale limite des cultures est que seules les espèces que l'on sait cultiver sur les milieux habituels (Sabouraud, Malt, DG18) sont analysables.
- Rechercher de l'ADN spécifique nécessite l'emploi d'amorces spécifiques à une seule espèce, d'un autre jeu d'amorces pour une autre espèce, et ainsi de suite pour chaque espèce.
- Une autre méthode utilise l'amplification d'extraits d'ADN des échantillons avec des amorces génériques ciblant l'ADN ribosomal fongique. Les amplifiats sont ensuite analysés par hybridation dans des microplaques ou *microarrays* ou par séquençage haut débit.
- Enfin, une autre méthode, appelée « *Whole Genome Sequencing* », permet de limiter les biais inhérents à l'usage d'amorces prédéfinies, par séquençage de tous les ADN présents dans l'échantillon ; cette méthode peut être comparée avec la culturomics, qui multiplie les milieux et les conditions de cultures. Les résultats entre ces méthodes ne sont pas toujours concordants, et elles doivent être regardées avec prudence tant que standardisation et reproductibilité ne seront pas assurées.

Méthodes de quantification

Le deuxième objectif après l'identification est la quantification dans l'espoir de définir des seuils opérationnels, soit pour diminuer un risque allergique, soit pour définir des environnements anormaux qui justifieraient une remédiation. Actuellement, le seul critère quantitatif validé est l'étendue de la surface moisie dans les pièces de vie. En fonction de la surface mesurée (par exemple $<0,2 \text{ m}^2$, $0,2\text{--}3 \text{ m}^2$, ou $>3 \text{ m}^2$), des préconisations pour la mise en œuvre d'une remédiation peuvent être appliquées (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>). C'est donc un critère qui peut être opérationnel, mais qui renseigne peu sur les relations entre spores fongiques et pathologie.

Le dénombrement des spores par microscopie est possible à partir de prélèvements de surface ou d'air par filtration, selon la méthode décrite dans la norme NF ISO 16000-20 « Détection et dénombrement des moisissures—Détermination du nombre total de spores », publiée en 2015. Cependant, le dénombrement des colonies obtenues en cultures a été jusqu'à maintenant la méthode de référence. Elle a permis de définir des

seuils quantitatifs qui définissent des environnements hors normes au-delà de 1000 colonies/m³ (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>) même si différents organismes gouvernementaux ou institutionnels ont opté pour des seuils plus bas entre 100 à 1000 UFC/m³ [28]. Certaines approches proposent des seuils par espèces en fonction de leur caractère pathogène connu, comme le décret portugais de 2013 (<http://www.oern.pt/documentos/legislacao/portarias/P353.2013.pdf>) qui différencie des espèces « communes » (ex : *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ; conforme si ≤ 500 UFC/m³), « rares » (ex : *Acremonium*, *Tricothecium*, *Curvularia* ; conforme si chaque espèce < 50 UFC/m³ et mélange < 150 UFC/m³), « pathogènes » (ex : *Cryptococcus neoformans* ; conforme si absence) et « toxiques » (ex : *Stachybotrys chartarum*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *Fusarium moniliforme* ; conforme si chaque espèce < 12 UFC/m³). Ces seuils sont discutables mais ont le mérite d'initier une réflexion en fonction des espèces de moisissures présentes. Pour les prélèvements de poussières, quelle que soit la méthode (aspiration ou capteur électrostatique), il n'existe pas de valeurs guides, et l'interprétation s'appuie généralement sur les propres bases de données du laboratoire, qui serviront de référence.

Cependant, la culture est fastidieuse, mais pas toujours aisée en cas de contamination massive de l'habitat, peu reproductible en cas de contamination faible, ou biaisée si certaines espèces croissent mieux et envahissent les milieux. La PCR quantitative en temps réel (qPCR) présente donc une alternative aux cultures, ou du moins un complément intéressant en détectant l'ensemble des spores y compris les non revivifiables et en fournissant un système de quantification robuste. Le principal avantage de la qPCR est d'être réalisée en système clos, ce qui limite grandement le risque de faux positifs inhérents à toute PCR [22]. Comme pour toute qPCR à visée diagnostique, le test qPCR pour l'environnement doit être validé avec des critères stricts dits MIQE pour « *minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments* » [29]. Ces critères concernent en particulier la nécessité d'établir une limite de détection et le monitoring du rendement de la réaction d'amplification dans chaque échantillon par des contrôles internes [22]. La stratégie pour obtenir un test qPCR fiable et reproductible est de cibler une espèce et de valider toutes les étapes, de l'extraction, cruciale pour assurer la destruction des parois fongiques et libérer l'ADN jusqu'à la quantification finale. La limite évidente est que seule l'espèce ciblée est détectée. Pour y pallier, une possibilité est de multiplier des qPCR spécifiques, chacune ciblant une espèce donnée.

La démarche de multiplier des tests unitaires ciblant chacun un germe donné est actuellement promue dans le cadre du *Mold Specific Quantitative Polymerase Chain Reaction* (MSQPCR). Les promoteurs américains proposent d'amplifier en parallèle 36 espèces différentes et ensuite, non pas de rendre le résultat pour chaque espèce, mais de les synthétiser en un index dit ERMI (*Environmental Relative Moldiness Index*). La première étape a été d'établir un groupe de moisissures (Groupe 1) dit associé aux dégâts des eaux (26 espèces) et un groupe commun à tous les environnements (Groupe 2), censé représenter la flore extérieure [1,30]. Les concentrations ne sont pas établies par rapport

au volume prélevé, mais par rapport à un ADN témoin (*Geotrichum candidum*), systématiquement ajouté et amplifié dans chaque échantillon. L'index se calcule ensuite en faisant la somme des logarithmes des concentrations des moisissures du Groupe 1 (S1) moins la somme des logarithmes des concentrations des moisissures du Groupe 2. Sur le plan analytique cette méthode est très sujette à des variations minimales du rendement des deux PCR, celle pour le germe ciblé, et celle pour le germe de référence (*G. candidum*), et toute variation minimale de l'un aboutit à des quantifications extrêmement variables. Par ailleurs, les a priori sur les caractéristiques des germes pour leur classement dans le Groupe 1 ou 2 sont très discutables. De récentes publications recalculent les ERMI en éliminant certains germes et en se concentrant sur les germes pertinents pour les pays considérés [2,31]. En effet, la flore du milieu extérieur est très dépendante du lieu où est réalisé le prélèvement et penser définir un groupe contrôle valable pour tous les lieux géographiques est illusoire [1,3].

- Après l'identification, la quantification vise à définir des seuils opérationnels, soit pour diminuer un risque allergique, soit pour définir des environnements anormaux qui justifieraient une remédiation.
- Actuellement, ces seuils opérationnels sont validés uniquement pour la détermination de la surface moisie dans les pièces de vie, ce qui offre peu de renseignements sur les relations entre spores fongiques et pathologie.
- Le dénombrement des spores par microscopie est possible à partir de prélèvements de surface ou d'air par filtration, mais la méthode de référence a été jusqu'à maintenant le dénombrement des colonies obtenues en cultures, en se référant à des seuils quantitatifs qui varient selon les différents organismes gouvernementaux ou institutionnels, ou à des seuils par espèce, selon leur caractère pathogène connu.
- Pour les prélèvements de poussières, quelle que soit la méthode (aspiration ou capteur électrostatique), il n'existe pas de valeurs guides, et l'interprétation s'appuie généralement sur les propres bases de données du laboratoire, qui serviront de référence.
- Pour pallier plusieurs inconvénients de la culture (fastidieuse, difficile en cas de contamination massive, peu reproductible en cas de contamination faible ou biaisée par les différences de caractéristiques culturelles selon les espèces), on a proposé une quantification par PCR quantitative en temps réel (qPCR), dont le principal avantage est de permettre la détection de l'ensemble des organismes fongiques, indépendamment de leurs caractéristiques culturelles, tout en étant réalisée en système clos, ce qui limite le risque de faux positifs inhérent à toute PCR.
- Pour obtenir une qPCR fiable et reproductible, on cible une espèce et on valide toutes les étapes, de l'extraction, cruciale pour assurer la destruction des parois fongiques et libérer l'ADN, jusqu'à la quantification finale.

- Sa limite est qu'elle ne détecte que l'espèce ciblée et, pour y pallier, on peut multiplier des qPCR spécifiques, chacune ciblant une espèce donnée.

Conclusion/perspectives

La caractérisation de la flore fongique de l'habitat lors des enquêtes au domicile reste rarement pratiquée à ce jour en France et concerne principalement les visites réalisées par des CEI, dans un contexte médical ou dans le cas d'un mauvais usage ou défaut d'entretien du logement. Elle est, le plus souvent, mise en œuvre par la réalisation de prélèvements de surface, l'exposition aérienne étant mesurée moins fréquemment car dépendante de la disponibilité des appareils et milieux de culture, de l'accessibilité à un laboratoire capable de prendre en charge les analyses et d'interpréter les résultats. Ces prélèvements sont pourtant indispensables pour permettre la détection de moisissures non-visibles qui exposent, comme les moisissures visibles, les occupants au risque d'effets sur la santé. La publication récente de normes, notamment pour la stratégie d'échantillonnage et la réalisation de prélèvements d'air par impaction, de référentiels et valeurs guides d'interprétation, devrait permettre de favoriser leur standardisation et leur réalisation, à la fois pour les enquêtes CEI et pour les enquêtes sur l'habitat insalubre sollicitées auprès des ARS, au cours desquelles la contamination par les moisissures est actuellement évaluée par des indicateurs subjectifs opérateur-dépendant, le plus souvent inspection visuelle et odeur de moisi (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>). Pour les prélèvements de poussières, l'émergence de dispositifs par sédimentation (capteurs à poussières), faciles à mettre en œuvre et peu coûteux, ouvre de nouvelles perspectives et représente une alternative pour la caractérisation à la fois qualitative et quantitative de la flore fongique lors des enquêtes à domicile.

Pour les identifications des espèces fongiques retrouvées dans l'environnement, celles-ci sont de plus en plus faciles et le nombre d'espèces décrites est de plus en plus important, que cela se fasse par culture ou par identification moléculaire. Sauf à penser que toutes les moisissures produisent les mêmes molécules avec les mêmes propriétés allergisantes, cela complique l'attribution de la responsabilité d'une espèce donnée pour des symptômes particuliers. En dehors de pathologies professionnelles avec une exposition massive à un germe, il semble difficile d'être uniciste, surtout que les allergènes fongiques se mélangent avec les autres allergènes d'acariens, de plantes, bactéries ou autres. Cependant, ne pas chercher à identifier les germes ne permet pas par définition d'avancer sur le décryptage des germes potentiellement responsables de pathologies allergisantes. Or certains germes, dont une liste a été proposée par le CSHPF en 2006, puis actualisée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en 2016, sont déjà identifiés comme responsables de pathologies infectieuses ou allergisantes (Tableau 2).

Il peut aussi être pertinent de non seulement caractériser les espèces mais aussi de quantifier la contamination

dans un environnement domiciliaire ou professionnel. Ceci peut être fait par culture, à partir de prélèvements d'air, avec l'avantage de pouvoir interpréter les résultats de données historiques. La compilation des données de la littérature expertisée par l'ANSES en 2016 identifie le seuil de 1000 UFC/m³, dépassé dans 5 % des logements et établissements recevant du public investigués, pour caractériser un logement dont le niveau de contamination est en dehors des valeurs habituellement mesurées dans les environnements intérieurs. Cependant, en l'absence de données quantitatives entre survenue d'effets sur la santé et exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs, il est possible que des niveaux de contamination plus faibles soient responsables d'effets sur la santé (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>).

En alternative ou en complément à la culture comme moyen d'analyse de l'habitat, la qPCR s'impose progressivement, sachant que celle-ci nécessite un choix a priori des espèces ciblées et qu'elle doit répondre à des critères de validation stricts et être réalisée pour chaque prélèvement avec les contrôles obligatoires. Le plus fiable car le plus reproductible est de développer un test ciblant une espèce, ou un groupe d'espèce proches, avec des amorces spécifiques et d'exprimer le résultat par unité de volume ou quantité de poussière prélevée. De tels tests pour des espèces d'intérêt clinique sont maintenant disponibles [4,17,32,33]. Enfin, la métagénomique par séquençage haut débit, qui permet la détection sans a priori de l'ensemble des espèces présentes, ouvre des perspectives à plus long terme pour évaluer la biodiversité fongique dont la diminution serait associée au développement de l'asthme chez l'enfant [5,34].

Remerciements

Nous tenons à remercier l'ensemble du groupe de travail ANSES « moisissures dans le bâti » dont le rapport est disponible (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>) : composition du groupe de travail ; ANSES : Marion Keirsbluck, Thomas Bayeux, Guillaume Boulanger, et Clémence Fourneau. Experts par ordre alphabétique : Christina Aschan-Leygonie, Valérie Bex, Stéphane Bretagne, Denis Caillaud, Anne-Claire Colleville, Emilie Fréalle, Stéphane Ginestet, Laurence Le Coq, Bénédicte Leynard, Rachel Nadif, Isabelle Oswald, Gabriel Reboux, Sandrine Roussel.

Déclaration de liens d'intérêts

Au cours des cinq dernières années, EF et SR ont participé à un groupe d'expert de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'environnement, de l'alimentation et du travail (ANSES) (2014–2016). EF a perçu des financements pour des travaux de recherche de la part des Laboratoires Gilead, MSD et Pfizer. SR a perçu des financements pour des travaux de recherche sur l'impact sanitaire des composteurs domestiques de la part de l'ANSES (2011–2014). BV, RG et SB déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Tableau 2 Effets sur la santé des principales moisissures rencontrées en environnement domestique, établi d'après le rapport « Contaminations fongiques en milieu intérieur » du CSHPF (2006), et complété par le rapport « Moisissures dans le bâti » de l'ANSES 2016 (noms en gras et *) (<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2014SA0016Ra.pdf>).

Nom	Effets identifiés dans le rapport du CSHPF (2006)				Effets identifiés dans le rapport de l'ANSES (2016)			
	Effet infectieux	Effet allergisant	Alvéolite	Effet toxique	Sifflement	Asthme : évolution de la maladie	Développement de rhinite	Sensibilisation atopique
<i>Acremonium</i> spp.		X				X		
<i>Alternaria alternata</i>		X						
<i>Alternaria</i> spp.*					X	X	X	X
<i>Aspergillus flavus</i>	X	X		X				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	X	X	X	X				
<i>Aspergillus niger</i>	X							
<i>Aspergillus versicolor</i>		X	X	X			X	
<i>Aspergillus</i> spp.*						X	X	X
<i>Aureobasidium</i> spp.		X				X	X	
<i>Chaetomium</i> spp.		X						
<i>Cladosporium</i>		X						
<i>sphaerospermum</i>								
<i>Cladosporium</i> spp.*					X	X	X	
<i>Epicoccum</i> spp.		X				X		
<i>Fusarium</i> spp.	X	X	X					
Mucorales	X	X	X	X				
<i>Mucor</i> spp., <i>Absidia</i> (= <i>Lichtheimia</i>) spp., <i>Rhizopus</i> spp.								
<i>Penicillium</i> spp.		X	X		X	X	X	X
<i>Stachybotrys chartarum</i>		X		X				
<i>Scopulariopsis</i> spp.*						X		
<i>Trichoderma</i> spp.		X		X		X		
<i>Trichothecium</i> spp.		X						
<i>Ulocladium</i> spp.*						X		
<i>Wallemia</i> spp.*						X		

Points essentiels

- L'évaluation des relations entre exposition aux moisissures et impact sur la santé est difficile à établir du fait de la diversité des espèces de moisissures et des composés produits et de l'association à d'autres allergènes.
- Pour évaluer les répercussions de l'inhalation constante et inévitable de spores de moisissures, il faut les prélever, les identifier et les quantifier.
- Les prélèvements peuvent se faire sur trois types de sites : surfaces, air, et poussières.
- La stratégie d'échantillonnage dépend des objectifs (exposition des personnes, objectivation de la contamination, efficacité de la remédiation).
- La caractérisation qualitative et quantitative de la flore fongique lors des enquêtes à domicile est rarement effectuée et repose souvent sur des critères subjectifs, les capteurs à poussières pouvant ici être d'un grand apport.
- Les prélèvements sont le plus souvent analysés par culture.
- Les méthodes d'identification des espèces fongiques de l'environnement sont de plus en plus performantes et permettent la description d'un nombre croissant d'espèces. Mais la diversité des espèces complique l'attribution de la responsabilité d'une espèce donnée pour des symptômes particuliers. Le rôle de plusieurs moisissures dans le développement de pathologies infectieuses ou allergisantes est cependant d'ores et déjà bien identifié.
- Outre la caractérisation des espèces, il est aussi pertinent de quantifier la contamination, par culture, à partir de prélèvements d'air. Le seuil de 1000 UFC/m³ permet de caractériser un logement dont le niveau de contamination est en dehors des valeurs habituellement mesurées dans les environnements intérieurs.
- Les méthodes de PCR quantitative en temps réel sont des alternatives possibles au comptage des colonies, tout comme les méthodes de séquençage à haut débit, qui nécessitent cependant d'être standardisées.

Références

- [1] Barberán A, Dunn RR, Reich BJ, et al. The ecology of microscopic life in household dust. *Proc Biol Sci* 2015;282.
- [2] Bergman A, Casadevall A. Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. *MBio* 2010;1.
- [3] Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1882–9.
- [4] Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011;364:701–9.
- [5] Cabaret O, Puel O, Botterel F, et al. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 2010;23:1673–81.
- [6] Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, et al. Moulds in dwellings: health risks and involved species. *Rev Mal Respir* 2010;27:169–79.
- [7] Viegas C, Faria T, Santos dos M, et al. Fungal burden in waste industry: an occupational risk to be solved. *Environ Monit Assess* 2015;187:199.
- [8] Méheust D, Le Cann P, Gangneux J-P. Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry. *J Hosp Infect* 2013;83:122–6.
- [9] Nieguitsila A, Arné P, Durand B, et al. Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environ Res* 2011;111:248–53.
- [10] Noss I, Wouters IM, Visser M, et al. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:5621–7.
- [11] Kilburg-Basnyat B, Metwali N, Thorne PS. Effect of deployment time on endotoxin and allergen exposure assessment using electrostatic dust collectors. *Ann Occup Hyg* 2015;59:104–15.
- [12] Frankel M, Timm M, Hansen EW, et al. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor Air* 2012;22:405–14.
- [13] Naegelé A, Reboux G, Vacheyrou M, et al. Microbiological consequences of indoor composting. *Indoor Air* 2016;26:605–13.
- [14] Normand A-C, Ranque S, Cassagne C, et al. Comparison of air impaction and electrostatic dust collector sampling methods to assess airborne fungal contamination in public buildings. *Ann Occup Hyg* 2016;60:161–75.
- [15] Rocchi S, Reboux G, Frossard V, et al. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. *Sci Total Environ* 2015;505:1026–35.
- [16] Roussel S, Reboux G, Millon L, et al. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air* 2012;22:514–22.
- [17] Scherer E, Rocchi S, Reboux G, et al. qPCR standard operating procedure for measuring microorganisms in dust from dwellings in large cohort studies. *Sci Total Environ* 2014;466–467:716–24.
- [18] Blanc PD, Quinlan PJ, Katz PP, et al. Higher environmental relative moldiness index values measured in homes of adults with asthma, rhinitis, or both conditions. *Environ Res* 2013;122:98–101.
- [19] Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, et al. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:110–22.
- [20] Hyvärinen A, Reponen T, Husmann T, et al. Comparison of the indoor air quality in mould damaged and reference buildings in a subarctic climate. *Cent Eur J Public Health* 2001;9:133–9.
- [21] Alanio A, Bretagne S. Nouvelles stratégies pour le diagnostic des mycoses viscérales. *Rev Prat* 2015;65:1325–9.
- [22] Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect* 2014;20:36–41.
- [23] Bokulich NA, Mills DA. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:2519–26.
- [24] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 2010;10:189.
- [25] Martin KJ, Rygielwicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 2005;5:28.
- [26] Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, et al. Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. *Ilar J* 2015;56:228–40.

- [27] Lagier J-C, Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:1185–93.
- [28] Rao CY, Burge HA, Chang JC. Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. *J Air Waste Manag Assoc* 1996;46:899–908.
- [29] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- [30] Vesper S. Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:15–24.
- [31] Täubel M, Karvonen AM, Reponen T, et al. Application of the Environmental Relative Moldiness Index in Finland. *Appl Environ Microbiol* 2016;82:578–84.
- [32] Bellanger AP, Reboux G, Roussel S, et al. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:260–7.
- [33] Zeng Q-Y, Westermark S-O, Rasmuson-Lestander A, et al. Detection and quantification of cladosporium in aerosols by real-time PCR. *J Environ Monit* 2006;8:153–60.
- [34] Dannemiller KC, Mendell MJ, Macher JM, et al. sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 2014;24: 236–47.
- [35] Rocchi S, Richaud-Thiriez B, Barrera C, et al. Evaluation of mold exposure in cystic fibrosis patients' dwellings and allergic bronchopulmonary risk. *J Cyst Fibros* 2015;14:242–7.