

UNIVERSITE PARIS XII VAL DE MARNE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XII

École doctorale Sciences de la vie et de la Santé

Spécialité : Parasitologie-Mycologie

**EVALUATION DE L'AEROCONTAMINATION FONGIQUE
DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS**

Par

Adélaïde NIEGUITSILO

Directeurs de thèse :

Docteur Sophie Latouche-Cottenot et Professeur Jacques Guillot

Docteur Nicole Nolard, Institut de santé publique, Bruxelles	Rapporteur
Professeur Dominique Chabasse, CHU Angers	Rapporteur
Docteur Pascal Arné, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur
Docteur Françoise Botterel, CHU Henri Mondor	Examineur
Professeur Stéphane Bretagne, Université Paris 12	Examineur
Professeur René Chermette, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur

Soutenue le 26 juin 2008

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Dr Nicole Nolard

Pour l'intérêt qu'elle a porté à ce projet et pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'être un de mes rapporteurs

Pr Dominique Chabasse

Pour avoir eu l'amabilité d'accepter d'être l'un des rapporteurs de cette thèse et pour ses remarques constructives

Dr Pascal Arné

Pour sa patience, sa générosité, sa disponibilité, sa bonne humeur et pour avoir servi de médiateur pour l'enquête dans l'élevage

Dr françoie Botterel

Pour la sympathie manifestée lors de nos quelques rencontres et pour avoir accepté de faire partie de ce jury

Pr Stéphane Bretagne

Pour avoir accepté de se joindre à ce jury

Pr René Chermette

Pour le grand intérêt qu'il a porté à mon travail, pour le temps qu'il a consacré à répondre à mes questions de novice

Dr Sophie Latouche-Cottenot

Pour avoir dirigé ce travail avec sérieux et sympathie

Pr Jacques Guillot

Pour m'avoir guidée dans ce travail, pour la patience, la gentillesse, la disponibilité, la confiance, la rigueur et le dynamisme avec lesquels il m'accompagnée depuis mon premier jour à l'UMR BIPAR.

Je remercie l'ANRT pour le soutien financier dans le cadre de la bourse CIFRE avec la société Thalès.

Aux membres de mon comité de pilotage (**Nicole Nolard, Murielle Désseaux, Valérie Capelle-Bex, Pascal Arné**), pour avoir accepté d'en faire partie et pour les différentes remarques qui ont eu leur importance dans ce travail.

A toutes les collaborations qui m'ont permis de mener à bien mon travail avec parfois des rencontres géniales :

- Le Laboratoire d'Hygiène de la ville de Paris (**Valérie Capelle-Bex, Murielle Dusséaux et Laurence Cheutin**),
- Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'ENVA (**Annette, Céline et Thierry**),
- Le centre d'application de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (**La formidable et sympathique équipe dirigée par Hélène**),
- Le Laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri Mondor (**Dr Serge Pissard et Laurent Skopinski**),
- **Monsieur et Madame Massuard** à Grandchamp en Bourgogne,
- La société Alreco (**M. Champion**),
- Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint-Antoine (**Olivia Raulin**),
- La société Transgenomic (**Stéphane Jaffresic, Oliver Goldenberg, Louisa Shepherd et Phil Eastlake**),
- **Dr Benoît Durand** de l'UMR d'épidémiologie de l'AFSSA,
- L'équipe « **bactéries transmises par les arthropodes** » de l'UMR BIPAR,
- L'équipe « **champignons transmis par voie aérienne** » de l'UMR BIPAR (**M. Chermette, Manju, Madeleine et Pascal**).

À la mémoire de **papa, tonton Augustin, Kake Dine, Kaka Joseph, Ka Raymond, Ka Dibadi et Dina.**

Je suis née au Gabon (Port-Gentil), au sein d'une grande famille matriarcale hors-pair :

- mes **mamans** (Marie et Florence) ;
- mes **tontons** (Léon et André) ;
- mes **frères** (Tcheya, Annicet, Tatok, Guy-Serge et Toundou)
- mes **sœurs** (Mboumboumbe, Yéyéye, Edwige, Olga, Annick et Béné)

A **papa Albert** qui a toujours cru en moi, sans la présence physique.

A tous mes **neveux et nièces.**

Aux autres **membres de ma famille** et à **mes belles-sœurs** pour leurs encouragements.

J'ai fait des rencontres extraordinaires au collège et au lycée (**Désirée, Ahmed, Virginie, Annie et les autres**) qui m'ont toujours beaucoup encouragée.

Mes premières années d'université (Masuku au Gabon) m'ont appris la débrouille avec toujours un bon soutien et surtout une confiance formidable (**Adonis, Moncoco, Nash, Arnaud, Stéphane, Alida, Fabienne, Désirée, Aymar, Loïc et les autres**).

Novembre 1999 (merci à mon frère aîné : **Tcheya**), j'arrive à Brest (cité universitaire de Kergoat) en licence (Université de Bretagne Occidentale). Lors de cette année, j'ai fait la connaissance des personnes que j'aime et admire et qui croient beaucoup en moi (**Magloir-Désiré, Slesvigie-George, Franck, Paoline, Belhasen, Luther, Réjane, Isabelle, Ange, Laetitia, Marie-Sylvie, Nadège**).

J'ai passé 4 ans à Brest où j'ai été bien entourée : **famille Abaziou, famille Bescond, Kathy, Thierry, Luc.**

Ma dernière année est celle de mon diplôme universitaire avec un stage dans le laboratoire des Sciences de l'Environnement marin. (**Philippe Soudant, Christophe Lambert, Christine, Marine**)

J'ai été acceptée en Master II de Biologie moléculaire et intégrative à l'université de Versailles Saint-Quentin. Lors de ce master II, j'ai effectué mon stage à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (UMR BIPAR) sous la direction de mon brillant et sympathique chef (**Jacques Guillot**). Mon chef a su me mettre en confiance et m'a permis de combler beaucoup de lacunes (Merci infiniment chef !!).

Cette année de Master m'a aussi permis de rencontrer des personnes extraordinaires qui m'ont acceptée et aidée (**M. Boireau, M. Chermette, Henri-Jean Boulouis, Bruno Polack, Geneviève Marignac et Muriel Vayssier-Taussat**).

Toujours lors de cette même année de master, je me suis fait des amis(es) vraiment « magiques » : **Manju, Sophie, Murielle G., Christelle, Corinne, Maria, Lénaïg, Christine D., Ambre, Isabelle, Sébastien, Taoufik.**

Aux adorables vétérinaires : **Renaud Maillard, Yves Milleman, Marie-Hélène Chiarisoli, Jean-françois Quinton, Laerte Ferreiro, Caroline Fournier, Aurélie Pasquier, Niksa Lemo et Odile Crosaz.**

La confiance de mon chef m'a permis de faire une belle rencontre (**Sophie Latouche-Cottenot**) par le biais d'une bourse de thèse en collaboration admirable avec l'entreprise Thalès (**Christophe Pannettier, Catherine Villeneuve, Agnès Prieur, Céline Agaesse, Estelle Langlois et Jérôme Louat**).

Mon installation en région parisienne m'a permis de développer des relations géniales (**Sylvain, Myt, Pat, Marthe, Serge, Jackie, Doris, Esther, Nina, Patricia, Jacques et Cécile**)

Lors de ma thèse j'ai fait des rencontres magnifiques au sein de l'UMR BIPAR (**Anna, Violaine, Mélanie, Pauline, Danielle, Martine, Evelyne, Dominique, Audrey, Ayman, Aurélie, Nicolas, Aleksandar, Sandrine, Myriam, Karine, Bernard, Sylvie, Alain, Eléonor, Guillaume, Rim, Saousen, Françoise, Elisabeth, Stéphane, Moez, Madeleine C., Madeliene B., Sarah, Juliana, Elodie, Eve, Nada, Caroline, Mohamed, et Deng**), merci pour tous ces beaux moments de bonne humeur permanente lorsque vous entendiez ma « belle voix ».

Aux autres **membres de l'UMR BIPAR** que j'ai moins cotoyé.

Tous les stagiaires de Jacques qui sont si sympathiques : **Emeline, Mauro Borba, Mériadeg, Guillaume et Aurélie, Eléonor, Anaïs, Dongying, Simon, Suzana, Andréa et Mauro Machado**.

J'ai fait une rencontre exceptionnelle qui m'a beaucoup apportée : **Pascal Arné** qui a joué au chauffeur pas mal de fois lors de mes séjours à Champignelles (merci à **Hélène** d'avoir accepté de me recevoir au centre).

A **Violaine, Eléonor et Anna** de leur amitié qui m'a permis de passer des soirées agréables. Merci à **Dom** et à **Fabien** pour leur sympathie.

A toutes les soirées chez **Deville family** !!!

Mes années de thèse m'ont permis de faire des rencontres formidables lors des colloques et séminaires scientifiques et d'insertion professionnelle (**Anne, Gwenaël, Michelle, Clara et Barbara Filler**)

Mon passage à l'UMR BIPAR m'a donné l'opportunité d'être en contact avec des familles (**famille Deville, famille Bertrand, famille DePooter-Nguema, famille Guillot, famille Demanche-Barthelemy, famille Bouillin-Cheval**)

Un merci exceptionnel à mon groupe du « café » (**Murielle, Sophie, Corinne, Christelle et Manju**) pour le soutien exceptionnel et sans faille. Vraiment merci les filles pour votre présence, écoute, disponibilité et confiance.

Aux sourires charmeurs de **tous les bébés** que j'ai eu l'occasion de cotoyer.

A **tous ceux que je n'ai pas cités mais qui m'ont été utiles pendant mes années d'études**.

Avec un merci tout particulier à **mon papa (Moatékouba Flaubert)** qui m'a beaucoup apporté et qui est absent en ce moment de fin de thèse.

En espérant vous avoir rendu une partie de tant de bonheur que vous m'avez apporté, je vous dis encore Merci !

RESUME

Le contrôle de l'aérocontamination fongique est devenu un objectif majeur pour préserver la santé humaine et animale. L'évaluation de l'aérocontamination fongique fait classiquement appel aux techniques de mise en culture ou de dosage de composants fongiques présents dans l'air. Ces techniques présentent des inconvénients. C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes fixés comme objectif de mettre au point des méthodes d'analyse alternatives utilisant des outils de biologie moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons comparé plusieurs techniques de prélèvements d'air dans des environnements intérieurs présentant une contamination plus ou moins élevée. Nous avons, par la suite, optimisé les conditions d'extraction de l'ADN fongique à partir de prélèvements d'air. L'ADN extrait a été amplifié par PCR « semi-nichée » avec des amorces universelles permettant d'amplifier une partie de l'ARNr 18S de champignons. Par la suite, nous avons utilisé la TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) et la D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) pour séparer les amplificats. Chaque produit de PCR a été identifié par séquençage direct après purification.

La comparaison des espèces identifiées par ces techniques avec celles qui sont obtenues par la méthode classique (culture) apporte de meilleurs renseignements sur la qualité fongique d'un même prélèvement d'air. L'application de ces techniques dans des environnements à différents niveaux de contamination a permis de déduire que l'étude de l'évaluation de l'aérocontamination fongique se fait par l'association de la culture et des méthodes moléculaires.

ABSTRACT

Fungal spores represent a significant part of the biological contaminants that could be detected in air. Exposure to fungi has been associated with several types of human or animal health problems (mycosis, allergy, mycotoxicosis). To evaluate the relationship between airborne fungi potential and adverse health effect, the fungal types and their relative frequencies in air need to be investigated. Traditional methods for fungal identification (culture and microscopy analysis) are laborious, time-consuming and require expertise. To replace cultivation, several techniques have been proposed. This study showed that molecular techniques (PCR-TTGE or *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis* and PCR-D-HPLC or *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) allowed the separation of amplicons corresponding to distinct fungal species that may be encountered in air. Both methods were proved to be appropriate for analysis of complex fungal communities. The detection and the molecular identification techniques were adapted for the evaluation of indoor airborne fungal contamination. The cultivation method and culture-independent techniques were further compared for the analysis of fungal aerosols from different sites.

TABLE DES MATIERES

Introduction et objectifs	13
Étude bibliographique	16
I. Les champignons de l'environnement	17
1. Définition et généralités	17
2. Place des champignons dans le monde du vivant	18
3. Origine des champignons	20
4. Aspects structuraux des champignons	24
5. Biologie des champignons	26
II. L'aérocontamination fongique dans les environnements intérieurs	30
1. Principaux champignons responsables de l'aérocontamination	32
2. Facteurs favorisant l'aérocontamination fongique	33
3. Conséquences de l'aérocontamination fongique sur la santé humaine et animale	35
4. Gestion de l'aérocontamination fongique	40
1) Détection des champignons dans l'air	40
2) Caractérisation de l'aérocontamination fongique	42
a. Culture	42
b. Autres méthodes	43
3) Moyens de lutte contre l'aérocontamination fongique	47
Étude expérimentale	49
1^{ère} Partie : Techniques de prélèvement et d'identification des champignons dans l'air	50
1. Mise au point de techniques de prélèvements des champignons dans l'air	53
Introduction	53
Article 1 : Comparative performance of two impactor air samplers and mycological media for quantification of fungal aerocontamination in a poultry facility	59
Discussion	78
2. Mise au point de techniques d'identification moléculaire des champignons dans l'air	81
Introduction	81
Article 2 : Characterization of fungal diversity in air samples using broad range PCR-temporal temperature gradient electrophoresis	87
Article 3 : Molecular monitoring of fungal aerosols contamination in a henhouse	98
Résultats complémentaires	121
Discussion	124
2^{ème} Partie : Application des différentes techniques dans des environnements clos et semi-clos	128
1. Analyse de la qualité de l'air dans les lieux publics et privés	130
a. Lieux publics	135
b. Lieux privés	140
Discussion	148
2. Analyse de la qualité de l'air dans des bâtiments d'élevage	150
a. Suivi de l'étable	151
b. Suivi de l'élevage de poulets	152
Résultats	154
Discussion	165
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
ANNEXES	189

ABREVIATIONS ET SIGLES

AAA :	Acide ϵ - aminoadipique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ACGIH :	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	ARN ribosomique
BIPAR :	Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques
CAP :	Capteur atmosphérique de poussière
CEN :	Comité Européen de Normalisation
UFC :	Unité formant colonie
CIP 10 :	Capteur individuel de poussière à 10 L/min
CHMT :	Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail
CIP 10-M :	Capteur individuel de poussière microbiologique à 10 L/min
CSHP :	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique
CSHPF :	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DAP :	Acide diaminopimélique
DG18 :	Dichloran 18% glycerol
DGGE :	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC :	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DRBC :	Dichloran rose bengal chloramphenicol agar
ELISA :	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ENVA :	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
GC :	Guanine-Cytosine
HIA :	Holegen immunoassay
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
LCB :	Laboratoire de Chimie et Biologie
LO :	Littman oxgall agar
MEA :	Malt extract agar
NYC :	New York department of Health
OGYA :	Oxytetracycline glucose yeast extract agar
pb :	paire de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

RBS :	Rose bengal streptomycin agar
SBS :	Syndrome des Bâtiments Malsains
SSCP :	Single Strain Conformation Polymorphism
TAE :	Tampon de migration Tris-acide acétique-EDTA (Acide éthylène diamine tétra acétique)
Taq :	ADN polymérase <i>Thermus aquaticus</i>
TEAA :	Triéthylammonium
TGGE :	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TTGE :	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
UMR :	Unité mixte de recherche
WHO :	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Tableau I :	Caractères communs et distinctifs des principales classes de champignons et eucaryotes unicellulaires assimilés	23
Tableau II :	Moisissures et levures fréquemment rencontrées dans un environnement intérieur	32
Tableau III :	Principales mycotoxines	38
Tableau IV :	Principaux appareils de prélèvement d'air disponibles en France	41
Tableau V :	Milieux de culture utilisés pour la caractérisation des champignons à partir des prélèvements d'air	42
Tableau VI :	Techniques de caractérisation des champignons aéroportés	44
Tableau VII :	Descriptif des habitations étudiées	132
Tableau VIII :	Descriptif des bureaux étudiés	133
Tableau IX :	Tableau récapitulatif du devenir des prélèvements d'air effectués dans les habitats et les bureaux	134
Tableau X :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des bureaux prélevés du bâtiment de la Direction Générale de la Mairie de Paris (DGMP). Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	137
Tableau XI :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des bureaux prélevés du bâtiment Goret de l'ENVA. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	139
Tableau XII :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 1. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	141
Tableau XIII :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 2. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	142
Tableau XIV :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 3. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	143
Tableau XV :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 4. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	145
Tableau XVI :	Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des trois points de prélèvement de l'habitat 5. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification	147
Tableau XVII :	Conditions de prélèvements d'air dans le poulailler et liste des analyses	153
Tableau XVIII :	Liste des espèces fongiques isolées dans l'air et à partir de poumons des animaux (bovins) autopsiés provenant d'une l'étable de l'ENVA. Les espèces retrouvées à la fois dans l'air et à partir du tissu pulmonaire sont indiquées en bleu	155
Tableau XIX :	Liste des différentes espèces fongiques identifiées pendant les 15 semaines d'enquête par culture, TTGE et D-HPLC dans les prélèvements d'air effectués avec l'AirPort MD8. Les espèces détectées par au moins deux techniques sont indiquées en bleu	163

Figure 1 :	Arbre phylogénétique du vivant à 3 branches d'après Woese (1977)	20
Figure 2 :	Descriptif de l'Air Test Oméga ou Air Strategie Bio-Impactor	54
Figure 3 :	Descriptif du Capteur individuel de poussières microbiologiques (CIP 10-M)	55
Figure 4 :	Descriptif de l'AirPort MD8	56
Figure 5 :	Ensemble du système D-HPLC et son principe	86
Figure 6 :	Vérification de la taille des produits PCR avec les amorces Fungcont 1-3 par D-HPLC (\approx 350 pb)	121
Figure 7 :	Mise au point de la température adaptée pour les amplificats issus des prélèvements d'air : les différentes températures ont été testées sur un produit PCR issu d'un même prélèvement d'air	122
Figure 8 :	Exemple de profil après une collecte de pics. Les différentes fractions récupérées sont représentées en rouge	123
Figure 9 :	Boîtes de culture sur les milieux DG18 et malt du liquide de collecte d'aérosols (pur et dilué) par CIP 10-M à la semaine 4, après incubation à 25°C	157
Figure 10 :	Boîtes de culture sur le milieu malt des liquides de collecte d'aérosols (pur et dilués) par les appareils CIP 10-M et AirPort MD8 à la semaine 4, après incubation à 37°C	157
Figure 11 :	Concentrations moyennes des champignons aéroportés collectés par le CIP 10-M dans le poulailler durant les 15 semaines en fonction des conditions de culture	158
Figure 12 :	Concentrations moyennes des champignons aéroportés collectés par AirPort MD8 dans le poulailler durant les 15 semaines en fonction des conditions de culture	158
Figure 13 :	Concentrations moyennes d'espèces et groupes de champignons identifiés après la collecte par CIP 10-M dans le poulailler durant les 15 semaines	159
Figure 14 :	Concentrations moyennes d'espèces et groupes de champignons identifiés après la collecte par AirPort MD8 dans le poulailler durant les 15 semaines	159
Figure 15 :	Profils TTGE à partir des prélèvements d'air avec le CIP 10-M et l'AirPort MD8 (MD8) les 5 premières semaines pendant le suivi hebdomadaire de 15 semaines de l'élevage de poulets	160
Figure 16 :	Profils TTGE à partir des prélèvements d'air effectués par l'AirPort MD8 pendant 15 semaines d'enquête dans le bâtiment d'élevage de poulets. S0 : semaine avant l'arrivée des poulets. S1 à S13 : semaines en présence des animaux et S14 : semaine après le départ des poulets	161
Figure 17 :	Profils D-HPLC des prélèvements d'air réalisés avec l'appareil AirPort MD8 pendant les 15 semaines du suivi hebdomadaire de l'élevage de poulets. S0 : semaine avant l'arrivée des poulets. S1 à S13 : semaines en présence des animaux et S14 : semaine après le départ des poulets	163

Introduction et objectifs

Tous les lieux de vie clos ou semi-clos sont concernés par le problème de la pollution intérieure, correspondant à l'accumulation d'un ensemble de polluants d'origine biologique, chimique ou minérale.

Il a été constaté qu'un Européen passe 80 à 90 % de son temps, c'est-à-dire environ 22 heures par jour dans des lieux fermés (appartements, bureaux, voitures,...). Les effets potentiels de la contamination de l'air intérieur sur la santé ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. C'est surtout le cas pour le Canada et les pays d'Europe du Nord où l'on vit la plupart du temps à l'intérieur. L'air intérieur peut être contaminé par plusieurs polluants libérés par les matériaux de construction (peintures, moquettes...), les produits d'entretien, le chauffage, ainsi que les contaminants biologiques comme les acariens, les allergènes d'origine animale voire végétale et les agents fongiques.

Des épisodes de forte pollution en matières particulaires pourraient avoir des effets nocifs (allergies, irritations des muqueuses, troubles respiratoires...) et des conséquences sur l'environnement plus importants que des épisodes à plus faible concentrations. Cette hypothèse a été sérieusement mise en doute à partir des années 90 par des études faites aux Etats-Unis, au Canada, en Grande-Bretagne ou dans d'autres pays européens. Ces études ont démontré l'apparition d'effets nocifs des matières particulaires sur l'appareil cardiorespiratoire (asthme, toux...), avec une augmentation des hospitalisations et de la mortalité prématurée, avec des niveaux de polluants souvent inférieurs aux seuils généralement admis.

Une mauvaise qualité de l'air intérieur peut provoquer des maux de tête, des irritations des muqueuses, une gêne respiratoire, des sifflements, des difficultés à se concentrer avec une mémoire diminuée ; on parle alors de Syndrome du Bâtiment Malsain ou SBM (Pertrix *et al.* 2005). Mais les séquelles peuvent être plus graves si les bâtiments sont contaminés par l'amiante ou par des bactéries du genre *Legionella*, par exemple.

Les agents fongiques se propagent généralement par l'intermédiaire de spores microscopiques ou de fragments de filaments en suspension dans l'air. Ils représentent un des danger potentiel dont le lien avec la santé humaine et animale a fait l'objet de très nombreuses études (Croft *et al.*, 1986 ; CSHPF, 2006 ; Harrison *et al.*, 1992). Certains champignons peuvent se développer dans l'appareil respiratoire des mammifères et des oiseaux et être à l'origine de mycoses mortelles, en particulier chez les individus immunodéprimés ou les animaux dans les élevages. L'inhalation de spores peut provoquer des réactions d'hypersensibilité (Bush et Portnoy, 2001 ; Leclère et Drouet, 2005 ; Ren *et al.*, 2001) et certaines espèces fongiques produisent des mycotoxines dont les effets délétères sur l'appareil respiratoire ont été

démontrés (Etzet *et al.*, 1998 ; Hodgson *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 1996 ; Roussel *et al.*, 2005).

Plusieurs études rapportent la présence d'aflatoxines dans l'air ambiant de moulins d'arachide, d'atelier de préparation de nourriture pour animaux ou de traitement du blé ou du riz (Autrup *et al.*, 1991 ; Burg *et al.*, 1981 ; Desai et Ghosh, 2003). Des troubles d'insuffisance rénale aiguë due à l'ochratoxine, ont été rapportés en 1993 par Di Paolo *et al.* sur une patiente ayant séjourné dans un grenier présentant une forte contamination par des spores d'*Aspergillus ochraceus*. La plupart des études actuelles portent sur l'impact des trichothécènes produits par le champignon *Stachybotrys atra* (synonyme de *Stachybotrys chartarum*). Les résidents des immeubles contaminés par cette espèce fongique souffrent d'irritation des yeux, de la peau des muqueuses et se plaignent de maux de tête (Johanning *et al.*, 1996). Ces symptômes ont pu être reproduits chez des souris exposées par voie nasale à des spores de *Stachybotrys atra* (Nikulin *et al.*, 1997).

Il ne semble pas exister à l'heure actuelle de normes permettant de définir à partir de quel seuil la contamination fongique (par des spores et/ou des mycotoxines) d'un environnement intérieur donné peut être considérée comme " anormale " ou présentant un risque pour l'homme ou l'animal.

Le contrôle de la qualité de l'environnement intérieur permet de se mettre en conformité avec les exigences réglementaires, mais aussi de prévenir les risques de contamination, tout en contribuant au bien-être des occupants (Gangneux *et al.*, 2006 ; Grimaldi et Pareil, 2006).

Il semble important de fournir des outils d'analyse de l'aérocontamination sous toutes ses formes (spores vivantes ou mortes, mycotoxines) et de définir des normes de contamination dans les principaux environnements intérieurs (CSHPF, 2006).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la mise au point de méthodes globales d'identification des agents fongiques dans l'air, avec un effort préalable pour le développement et l'amélioration des techniques de prélèvement d'air.

L'objectif de ce travail a été de développer des outils permettant une meilleure connaissance de l'aérocontamination fongique dans les milieux intérieurs. Pour cela nous avons :

- mis au point des outils de détection et d'identification moléculaire des agents fongiques en suspension dans l'air ;
- adapté ces techniques pour l'identification d'agents fongiques dans des environnements clos et semi-clos variés.

Etude bibliographique

I. Les champignons de l'environnement

1. Définition et généralités

Les champignons, sont des organismes eucaryotes. Ils peuvent être unicellulaires (levures) ou pluricellulaires avec une structure constituée d'hyphes formant un mycélium (agglomérat de filaments). Ils se distinguent des végétaux par l'absence de chlorophylle et de cellulose dans la paroi ; ce sont des organismes hétérotrophes. Dans la nature, les champignons colonisent avant tout les organismes morts ou en décomposition (surtout les végétaux), sur lesquels ils trouvent les nutriments (carbone, azote, sels minéraux, etc) essentiels à leur croissance et leur multiplication.

Le rapport surface/volume de l'ensemble des filaments mycéliens (structure de base d'un champignon filamenteux) est le plus élevé du monde vivant. Leur paroi riche en chitine leur assure une certaine résistance aux contraintes du milieu extérieur. Les champignons se multiplient par l'intermédiaire de spores microscopiques, produites le plus souvent en très grand nombre. Ces spores assurent aux champignons un pouvoir de dispersion considérable. A partir de substrats très contaminés, le nombre de spores fongiques en suspension dans l'air extérieur, oscille entre 200 à 20 000 spores par m³. Les concentrations varient en fonction des régions (les zones tropicales humides et chaudes sont les plus propices à la sporulation) ou des saisons (le pic de concentration maximale étant souvent situé durant les mois d'été). Cette dispersion de spores permet aux champignons de coloniser toute la surface de la terre dont le milieu marin. Cette efficacité à coloniser des milieux et des substrats les plus variés n'a pas d'égal parmi les autres êtres vivants.

La multiplication se fait selon le mode asexué, mais aussi sexué (reproduction) dans certaines conditions et pour certaines espèces fongiques.

Le réservoir naturel des champignons (moisissures ou levures) se situe à l'extérieur, sur les végétaux, la matière organique en décomposition, à la surface d'eau stagnante ainsi que dans le sol ou à la surface de ce dernier (Malloch, 1997).

Les champignons sont avant tout des organismes souterrains, invisibles le plus souvent, qui ont colonisé l'ensemble de la biosphère. Cependant quelques uns (macromycètes) présentent un carpophore (support de la reproduction) visible en surface. Ils présentent une grande diversité et des modes de multiplication qui servent de support à la taxinomie.

Par ailleurs, ces organismes établissent avec les espèces animales ou végétales des interactions qui vont de la saprobiose au parasitisme, en passant parfois par le commensalisme ou la constitution d'une symbiose.

Le pouvoir pathogène des champignons n'est pas seulement dû à leur parasitisme éventuel. Ils peuvent produire des toxines. Ces dernières peuvent être directement à l'origine d'intoxication alimentaire, ou leur accumulation dans les végétaux ou les produits d'origine animale (lait, viande) consommés peut provoquer des mycotoxicoses chez l'homme ou l'animal.

Environ 100 000 espèces de champignons sont actuellement recensées. Ce chiffre est largement sous-estimé car pour chaque espèce de plante vascularisée européenne, il existe environ 6 espèces de champignons associées. Comme environ 300 000 espèces de plantes sont connues, le nombre d'espèces fongiques devrait être au moins de 1,5 million, avec quelques 1 700 nouvelles espèces décrites chaque année (Chabasse *et al*, 1999). Parmi les 100 000 espèces fongiques décrites, une centaine sont reconnues comme étant régulièrement impliquées dans le développement des mycoses chez l'homme et chez l'animal (de Hoog *et al*, 2000).

Dans notre étude, nous avons utilisé la classification classique par commodité. Récemment des modifications ont cependant été suggérées (Hibbett *et al.*, 2007). Les principaux changements concernent : (i) : la disparition des *Zygomycètes*, qui se retrouvent répartis en plusieurs groupes, avec les mucorales qui appartiennent désormais au sous embranchement des *Mucoromycotina* ; (ii) : les embranchements *Ascomycota* et *Basidiomycota* sont assemblés dans un sous règne dénommé *Dikarya*.

2. Place des champignons dans le monde du vivant

Au XVIII^e siècle, on répartissait les êtres vivants en 2 règnes, l'animal d'une part et le végétal d'autre part et l'on considérait que les champignons appartenaient au règne végétal. En 1866, le naturaliste et philosophe allemand Haeckel proposa la création d'un troisième règne rassemblant les protistes. Celui-ci fut transformé par Copeland en Protoctistes pour regrouper la plupart des êtres unicellulaires. Il faut attendre le début du XX^e siècle, quand les méthodes d'observation s'affinèrent, pour voir une évolution de la taxinomie. Les champignons furent d'abord séparés des végétaux pour être inclus dans le règne des Protistes, avec les protistes

inférieurs (procaryotes ou bactéries) et les protistes supérieurs (eucaryotes : rotozoaires, algues unicellulaires et champignons).

En 1969, l'américain Wittaker proposa une vision globale du monde vivant séparé en 5 règnes :

- les monères ou bactéries,
- les protistes,
- les champignons ou fungi,
- les végétaux,
- les animaux.

Cette classification, complétée par Margulis distingue les deux types fondamentaux de cellules : à la base, les procaryotes qui sont individualisés dans un seul règne, et les eucaryotes unicellulaires ou protistes qui vont donner naissance aux 3 règnes des multicellulaires (les plantes, les champignons et les animaux). Cette classification s'appuie sur la conception évolutionniste dans le sens d'une complexité croissante. Elle tient compte aussi de la diversité nutritionnelle et adaptative du vivant : la photosynthèse (plantes), l'absorption (champignons) et l'ingestion (animaux). Enfin, elle montre le rôle charnière des protistes eucaryotes parmi lesquels vont apparaître les premiers Métaphytes (plantes), Métazoaires (animaux) et les vrais champignons (Eumycètes).

A partir de 1976, les techniques de séquençage sont utilisées dans les études phylogénétiques. La comparaison des séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARNr 16S ou 18S de la petite sous unité des ribosomes) a permis de construire un nouvel arbre du vivant. Les informations obtenues par les séquences de gènes codant des protéines ubiquistes (de la machinerie de la traduction par exemple) ont confirmé ou, parfois affiné la structure de l'arbre.

En 1977, Woese crée la surprise en proposant un arbre simplifié à 3 branches : Archaeobactéries, Eucaryotes et Eubactéries (figure1). D'autres arbres du vivant confirmèrent par la suite cette représentation. Dans une proposition récente de la classification des eucaryotes et des protistes, Adl *et al.* (2005) proposent 6 grands groupes d'eucaryotes parmi lesquels les Opisthokonta rassemblent champignons, animaux, massomescetozoa et choanoflagellés. Ce groupe se retrouve par ailleurs fort distinct de celui des Archaeplastida comprenant diverses algues et les plantes.

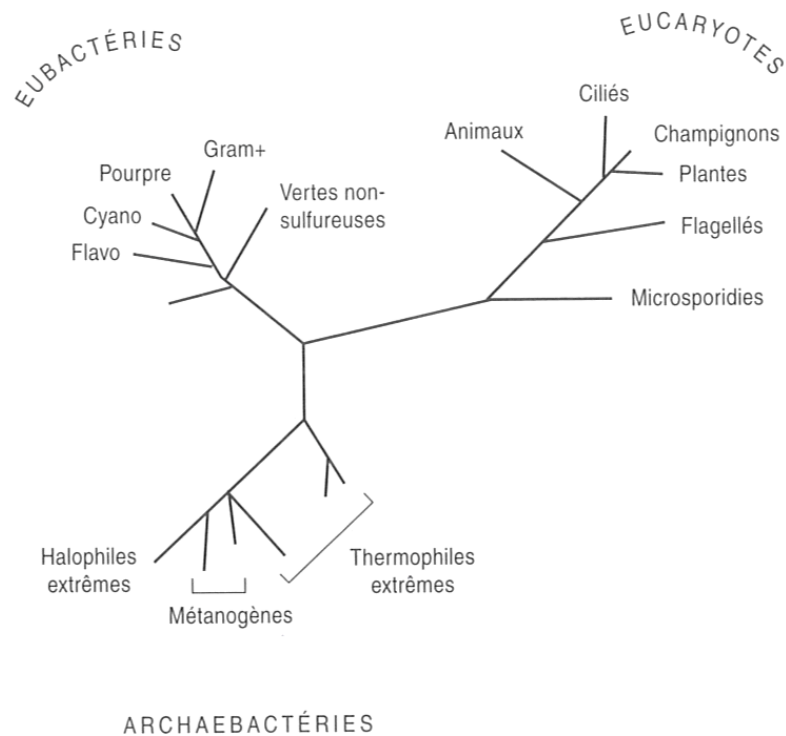


Figure 1 : Arbre phylogénétique du vivant à 3 branches d'après Woese (1977)
 (source : Chabasse *et al.*, 1999)

Malgré leurs ressemblances morphologiques, les procaryotes ne représenteraient donc pas un groupe homogène. Les distances évolutives entre les archaeobactéries et les eubactéries mesurées par l'indicateur ARNr 16S sont très importantes. Par contre, malgré leur grande disparité morphologique, les distances entre les animaux, les plantes et les champignons sont bien plus faibles. Les eucaryotes multicellulaires sont d'apparition récente (600 à 800 millions d'années).

Les données actuelles de la biologie moléculaire ont permis d'établir des relations phylogéniques entre les eucaryotes.

3. Origine des champignons

Malgré certaines similitudes entre les Myxomycètes et Acrasiomycètes, les ancêtres des Eumycètes (vrais champignons) ne sont pas à rechercher parmi les protistes fongiformes. Ces similitudes sont le fait de convergences évolutives et non pas d'une véritable parenté.

Actuellement les discussions des taxinomistes portent sur certains groupes d'eucaryotes unicellulaires proches ou assimilés (tableau I) :

- les Oomycètes sont considérés comme les ancêtres probables des champignons du fait de leurs filaments coenocytiques, leur multiplication asexuée (oospores), le caractère de leur parasitisme (agents de mildious, de la rouille blanche et de maladies chez de nombreux poissons). Redoutables parasites des végétaux ou d'animaux, il est d'usage courant de les étudier avec les champignons. Cependant, les phylogénies moléculaires ne confirment pas cette hypothèse. Ils constitueraient un groupe proche qui a évolué en parallèle et qui est resté bien adapté au milieu aquatique.
- les algues rouges (Rhodophytes) présentent des similitudes avec les champignons en raison de l'absence de spores flagellées, d'une multiplication sexuée similaire et d'un métabolisme assez proche. Elles stockent le tréhalose comme les Ascomycètes et les Basidiomycètes ce qui suggère un lien de parenté. Mais les phylogénies moléculaires placent les Rhodophytes, à proximité des algues vertes, plus près des végétaux. Ces ressemblances sont attribuées à un phénomène de convergence et non à une réelle parenté avec les champignons véritables.
- Cavalier-Smith fut le premier à suggérer que les champignons ont évolué comme les Métazoaires à partir d'un protiste flagellé, vraisemblablement l'ancêtre d'un choanoflagellé actuel. Cette hypothèse sera confirmée par les phylogénies moléculaires. Ainsi le groupe le plus proche de l'ensemble choanoflagellé/animaux serait celui des champignons, nommé Opisthokonta par Adl et al (2005). Ces derniers partageraient de nombreux points communs avec celui des animaux. La divergence entre le règne animal et celui des champignons remonterait au Précambrien (600 à 800 millions d'années).
- Les Chytridiomycètes qui sont d'origine aquatique, sont considérés comme les premiers Eumycètes apparus dès le Précambrien. Leur assimilation au phylum des champignons est fondée d'après Kwon-Chung sur des critères distinctifs entre vrais champignons et protistes fongoïdes. Les Chytridiomycètes ressemblent aux moisissures visqueuses (myxomycètes) et aux Oomycètes par le mode de division du noyau. Cette division entraîne la disparition de l'enveloppe nucléaire, il y a formation du fuseau à l'extérieur du noyau à l'aide des centrioles tandis que chez les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Zygomycètes la membrane nucléaire reste intacte et le fuseau s'organise en plaque polaire. Sur le plan biochimique, tandis que les Oomycètes, les Myxomycètes, les algues, les procaryotes et les végétaux utilisent

la voie de l'acide diaminopimélique (DAP) pour la synthèse de la lysine, les Chytridiomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Zygomycètes utilisent une autre voie de synthèse pour cet acide aminé, celle de l'acide ϵ - aminoadipique (AAA). Les phylogénies moléculaires à partir de l'analyse des séquences de l'ARNr 18S placent le rameau des Chytridiomycètes à la base de la branche des vrais champignons mais après la bifurcation avec les Métazoaires.

D'après la phylogénie et la calibration de l'échelle du temps des fossiles, les champignons terrestres auraient divergé des Chytridiomycètes aquatiques, il y a environ 550 millions d'années, c'est-à-dire peu de temps avant l'apparition des plantes vasculaires (Trachéophytes) au Silurien (il y a 420 millions d'années). Les Zygomycètes apparus ensuite auraient donné naissance aux Ascomycètes et aux Basidiomycètes un peu plus tard, au Carbonifère ou au Permien.

L'origine des Deutéromycètes ou champignons imparfaits (pas de reproduction connue) reste controversée. Leurs caractères morphologiques semblent indiquer qu'ils ont subi une évolution régressive avec perte de la reproduction sexuée. La question qui se pose est de savoir si cette disparition est la conséquence ou la cause du parasitisme. Ce groupe semble artificiel et très hétérogène. On constate que les critères morphologiques ne constituent pas des éléments probants pour la recherche d'un ancêtre commun. Les récents travaux de phylogénie moléculaire tentent de retrouver l'origine des Deutéromycètes. Ils seraient rattachés pour beaucoup d'entre eux à des Ascomycètes, voire des Basidiomycètes ou Zygomycètes ayant perdu toute possibilité de reproduction sexuée.

En taxinomie, on classe les champignons dans un règne distinct dans la classification actuelle (Kendrick, 1999 ; Malloch, 1997). A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, ordres, familles, puis en genres et espèces.

Tableau I : Caractères communs et distinctifs des principales classes de champignons et eucaryotes unicellulaires assimilés (Chabasse *et al.*, 1999)

Classes	Aspects du mycélium	Spores asexuées	Spores sexuées	Polysaccharides pariétaux principaux	Nutrition	Habitats, nutrition
Oomycètes	Non cloisonné Cœnocytique	Zoospores biflagellées mobiles	Oospores	Cellulose	Phagocytose	Aquatiques et terrestres, saprobes ou parasites de poissons et de végétaux (agents de mildiou). Rares parasites des mammifères et de l'homme
Chytridiomycètes	Non cloisonné Cœnocytique	Zoospores uniflagellées mobiles	présence	Chitine	Absorption	saprobes du sol et des eaux, parasites d'insectes. Certains vivent en symbiose. Rares parasites des végétaux et de l'homme
Zygomycètes	Peu cloisonné Cœnocytique	Sporangiospores	Zygospores	Chitine	Absorption	saprobes du sol et des eaux, parfois parasites des animaux et de l'homme. Comportement opportunistes marqué
Ascomycètes	Cloisonné à bords parallèles	Conidies, Chlamydo­spores	Ascospores formées dans un asque	Chitine	Absorption	saprobes du sol et des eaux. La plupart des espèces parasites des animaux et de l'animal appartiennent aux Ascomycètes
Basidiomycètes	Cloisonné à bords parallèles	Conidies, Chlamydo­spores	Basiospores formées et émises par une baside	Chitine	Absorption	saprobes du sol, parasites des végétaux, rares parasites de l'homme ou de l'animal
Deutéromycètes ou champignons imparfaits	Cloisonné à bords parallèles	Conidies, Chlamydo­spores	Inconnues	Chitine	Absorption	saprobes du sol. De nombreuses espèces parasites de l'homme et/ou de l'animal (champignons opportunistes)

4. Aspects structuraux des champignons

Le mycélium est un ensemble de filaments (ou hyphes) plus ou moins développés et ramifiés par lequel les champignons filamenteux se développent.

Les levures ont une structure unicellulaire. On utilise le terme de pseudomycélium pour montrer la différence structurale qui existe entre les filamenteux et les levures qui s'allongent puis bourgeonnent en restant attachées les unes aux autres.

Forme végétative

Habituellement, elle se développe après qu'une spore se soit fixée sur un substrat nutritif. La spore fixée, se gonfle, se modifie et émet un filament appelé tube germinatif. C'est le début de la croissance ; le tube germinatif devient alors filamenteux. Parfois, il peut rester unicellulaire (bourgeon) comme chez les levures.

Multiplication

Les champignons peuvent se multiplier de deux manières :

- le premier mécanisme et le plus simple est le bouturage. La forme végétative se fragmente et les articles libérés, contenant les noyaux, font office de spores. Ils se dispersent et peuvent à nouveau se fixer sur un substrat favorable. Ce mécanisme reste limité dans la nature, peut-être en raison de la fragilité des articles libérés.
- le deuxième mécanisme conduit à la formation de spores de multiplication. Elles constituent les éléments naturels les plus efficaces permettant la dispersion du champignon dans la nature. Elles assurent aussi la conservation du champignon, ce qui contribue à la survie de l'espèce dans le milieu extérieur.

La paroi du mycélium est particulièrement résistante, riche en résidus peptidopolyosidiques. Selon les groupes, elle contient une proportion de chitine (constante chez les champignons), de sucres (mannanes, glucanes), de protéines et de phospholipides. Elle est doublée par une membrane riche en lipides, dont des stérols (l'ergostérol est caractéristique des champignons). La paroi assure au champignon la protection indispensable et efficace vis-à-vis du milieu extérieur. Il devra aussi déjouer les systèmes de défense de son hôte en cas de parasitisme.

Dans l'environnement, le mycélium se développe de façon harmonieuse et centrifuge lorsqu'il trouve le substrat nutritif favorable. Sur certains substrats (végétaux en décomposition, fruits pourris), le champignon peut être visible en surface, comme sur un milieu de culture synthétique, d'où l'aspect de moisissure que l'on observe dans les caves, les lieux humides et

renfermés. De plus grâce, à l'étendue du réseau mycélien, la surface d'absorption est considérable et toujours renouvelée, ce qui assure au champignon un apport nutritif constant. Les champignons produisent un très grand nombre de spores dont la taille, la forme et la couleur varient d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constantes ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxinomique (ACGIH, 1999). Le diamètre des structures fongiques de multiplication varie entre 2 et 200 μm , bien qu'il se situe, pour une forte proportion des spores, entre 2 et 20 μm (WHO, 2000). Certaines spores se retrouvent à l'intérieur de structures fongiques spécialisées qui peuvent mesurer jusqu'à 250 μm de diamètre.

En conditions momentanément défavorables de croissance, le développement du mycélium s'arrête, la paroi s'épaissit et le champignon se protège en fabriquant des chlamydo-spores ou spores de résistance. Elles sont issues de la condensation du cytoplasme et de l'épaississement de la paroi du champignon.

Le développement des champignons débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance (des températures variant entre +2°C et +40°C voire plus, une source d'alimentation : livres, tapis, vêtements, bois, plâtre, etc et une source d'humidité)

Chez les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes, les filaments sont tubulaires à bords parallèles, de diamètre régulier et septés (cloisons internes ou septa). Dans les filaments cloisonnés, délimitant des articles, on peut trouver un, deux ou plusieurs noyaux, ainsi que les mitochondries et du réticulum endoplasmique, en particulier à l'extrémité apicale du filament, où règne une intensive activité enzymatique. Chez les Zygomycètes, les filaments sont irréguliers, dilatés, de diamètre plus large et rarement septés.

Dans un tissu vivant avec les contraintes du parasitisme (hyperthermie, hyperosmophilie, xérophilie, hypertonie), les filaments mycéliens sont le plus souvent déformés et dilatés. De même lorsqu'il s'agit d'espèces particulièrement adaptées au parasitisme d'un être vivant, le champignon sera structurellement totalement différent. Ces champignons qui changent de forme selon leur état (saprobiose ou parasitisme), sont dits polymorphes, ou dimorphiques lorsque les formes levures sont parasites et se transforment en filaments dans les conditions de saprobiose (environnement ou milieux de culture).

5. Biologie des champignons

Les champignons sont hétérotrophes se nourrissant par absorption des principes nutritifs dissous dans le milieu qui les entoure. Ils vivent en saprobiose (du radical *bios* ou vie, les champignons n'étant plus reconnus comme végétaux, on évite le radical *-phyte*) c'est-à-dire aux dépens de matières organiques mortes. Mais ils peuvent aussi être des parasites en tirant de l'organisme hôte (plante ou animal) l'énergie et les nutriments nécessaires à leur croissance et à leur reproduction. Quand les deux organismes (champignons et hôte) tirent chacun un bénéfice de cette interaction, on parle d'interaction positive ou symbiose (cas des lichens). Si le champignon tire seul avantage de cette interaction, sans que cela nuise à l'hôte, l'interaction est appelée commensalisme.

Mis à part le cas des chytridiomycètes, les champignons vrais ne produisent pas d'éléments mobiles. Leur croissance se fait par l'apex des filaments avec production d'embranchements, d'où une extension centrifuge des colonies. La multiplication des champignons est assurée par des spores qui peuvent soit provenir directement du mycélium ou des levures (multiplication asexuée ou stade anamorphe), soit résulter du développement de stades sexués et d'une fécondation (stade téléomorphe).

Multiplication asexuée

De nombreuses espèces de champignons ne sont connues que par leurs anamorphes, c'est-à-dire les stades non sexués.

Pour le stade anamorphe, la cellule fongique se divise par simple mitose. La conservation intégrale du génotype assure la propagation de lignées stables.

Les spores sont produites par des structures différenciées. Ces structures varient selon les groupes de champignons.

- Les spores internes ou endospores se forment à l'intérieur de vésicules ou sporocystes, situées à l'extrémité de filaments sporocystophores. Ces filaments ne sont pas cloisonnés, mais une paroi les sépare du sporocyste. Parfois cette paroi constitue un renflement ou columelle. Quand les spores sont matures, le sporocyste se déchire et libère les spores qu'il contient. Ce mécanisme est habituel chez les mucorales (zygomycètes).
- Les spores externes ou conidies se forment à partir d'un élément (ou cellule) appelé conidiogène. Cet élément conidiogène peut être morphologiquement différencié ou

non et parfois porté par un conidiophore où se produisent la division du ou des noyaux et modification de la paroi préparant l'extrusion puis la déhiscence des spores.

Les conidies peuvent soit résulter directement de la transformation de la cellule conidiogène dans sa totalité (ce sont les conidies thaliques), soit être constituées par une expansion sortant de la cellule conidiogène, et se développant avant tout cloisonnement (ce sont les conidies blastiques). Lorsque dans une même espèce de champignon, on observe deux types de conidies de dimensions sensiblement différentes, on qualifie les conidies de macro- et microconidies.

Il existe chez de nombreuses espèces fongiques des structures protégeant le stade asexué. Ces formations peuvent être visibles à l'œil nu. Elles sont constituées d'une simple association de mycélium aggloméré, souvent à paroi épaisse. Il ne s'agit pas de vrais tissus. Ainsi les pycnides sont constituées d'une masse de mycélium à l'aspect de nodule creux dont la paroi délimite une cavité qui renferme l'appareil sporifère. Les sporodochium et les acervules sont aussi des formations protectrices constituées d'une enveloppe mycélienne demeurant sur la plante hôte ou un milieu artificiel. Ailleurs, les filaments peuvent s'agglomérer entre eux, formant des gerbes d'appareils sporifères se terminant par un bouquet de spores (graphium, corémie ou synnéma).

Multiplication sexuée

Les spores sont obtenues à l'issue d'une fécondation qui peut se réaliser directement par union de gamètes ou plus fréquemment par union d'organes de fécondation appelés gamétocystes. Les éléments de sexe opposé impliqués peuvent être soit présents sur un même mycélium (homothallisme), soit obligatoirement situés sur des mycéliums différents (hétérothallisme).

Chez de nombreuses espèces parasites, la reproduction sexuée a totalement disparu (groupe des Deutéromycètes ou « *Fungi imperfecti* »), bien qu'on puisse parfois la faire apparaître dans les conditions particulières de culture. Cette disparition conduit à distinguer pour une même espèce des téléomorphes (formes sexuées) avec une reproduction et des anamorphes (formes asexuées) avec une multiplication asexuée, et qui souvent ont des appellations différentes.

Il résulte de grosses difficultés relatives à la systématique des champignons. La découverte de téléomorphes oblige parfois à placer dans des groupes très différents des espèces semblables en vie parasitaire par leurs anamorphes et qui jusqu'alors étaient regroupées chez les *Fungi imperfecti*. Il y a de très grandes analogies entre certaines espèces connues seulement par leur

anamorphe et d'autres par le téléomorphe, d'où, parfois, des divergences entre les systèmes de dénomination. C'est le cas de l'ensemble des *Aspergillus* spp., qui regroupe à la fois des espèces connues uniquement par leur anamorphe, non sexué (*A. fumigatus*), mais aussi des espèces connues par leur téléomorphe, sexué tel *Emericella nidulans* (anamorphe : *A. nidulans*)

Les types de reproduction et de spores sexuées sont des éléments servant à la classification des champignons et organismes assimilés

- Chez les Oomycètes, organismes différents des champignons mais qui leur sont souvent assimilés. Il y a formations des oospores pour la reproduction
- Les Chytridiomycètes se reproduisent aussi par des gamètes
- Les zygospores proviennent de la fusion de deux filaments (homothallisme ou hétérothallisme). Chez d'autres champignons Zygomycètes, lors du contact des deux filaments, une cellule terminale s'isole par cloisonnement à l'extrémité de chacun des filaments. Les deux cellules, identiques, fusionnent (isogamie).
- Les ascospores caractéristiques des Ascomycètes, sont produites à l'intérieur de cellules appelées asques. Ces asques sont soit libres, soit enfermés dans une enveloppe plus ou moins complexe. La formation des asques est précédée du développement de filaments spéciaux compatibles transformés en gamètes mâles (anthéridies) ou femelles (ascogones).
- Les basidiospores, caractéristiques des Basidiomycètes, se forment lorsque deux filaments différents fusionnent pour donner un filament compartimenté contenant les deux noyaux. Ces filaments dicaryotiques se différencient des autres par la présence de crochets de conjugaison près des septa. Pendant cette phase dicaryotique, les hyphes restés stériles continuent à se développer et ils finissent par former une masse solide, compacte et visible à l'œil nu chez les macromycètes. C'est tardivement, quand la structure aérienne est en place, que l'extrémité des hyphes diploïdes se transforme en baside. La caryogamie et la méiose s'y produisent. Les basides peuvent être cloisonnés ou divisés en plusieurs parties (Hétérobasidiomycètes) ou rester sans division donnant naissance à 4 basidiospores (Holobasidiomycètes), ces basidiospores étant émises à l'extérieur des basides.

Culture des champignons

La plupart de champignons sont cultivables *in vitro*.

Certains milieux de culture sont non sélectifs tels le milieu Sabouraud (gélose peptonée sucrée) ou le milieu au Malt (Annexes 1). D'autres milieux sont utiles pour obtenir certaines identifications.

En général, le développement de bactéries est inhibé grâce à l'addition d'antibiotiques (chloramphénicol, à 0,5 g/L, gentamicine ou pénicilline). Un autre antibiotique aux propriétés antifongiques est souvent ajouté (la cycloheximide) afin d'inhiber ou du moins de limiter le développement intempestif de champignons contaminant les prélèvements cliniques. La cycloheximide inhibe cependant aussi la croissance de certaines espèces pathogènes fongiques (comme *Cryptococcus neoformans*).

L'incubation se fait entre +25 et +30°C en général. Pour les espèces pathogènes des organes profonds, elle se fait à +37°C ; cette température facilite l'obtention de la forme levure des champignons dimorphiques (phénomène de réversion). En outre il existe des espèces dites thermophiles pour lesquelles les températures les plus élevées sont plus favorables (supérieures à +40°C pour *Aspergillus fumigatus*).

Le développement des champignons est lent, il se fait entre 2 et 4 jours pour les levures, 2 jours à 3 semaines pour les autres.

II. L'aérocontamination fongique dans les environnements intérieurs

La contamination par des aérosols représente un risque pour de multiples secteurs d'activité. En milieu hospitalier, cette contamination peut être à l'origine d'infections nosocomiales. En élevage, elle peut être à l'origine d'infections aiguës ou chroniques et, à terme, les pertes économiques peuvent être importantes. Dans l'industrie, les problèmes liés à l'aérocontamination sont bien caractérisés dans les domaines comme la microélectronique, l'industrie pharmaceutique et l'agroalimentaire.

L'air constitue le véhicule de très nombreux éléments qui restent en suspension pendant plus ou moins longtemps : particules minérales, molécules variées (hydrocarbures, molécules organiques diverses dont certaines toxines...), mais aussi micro-organismes (pollen, bactéries, virus et champignons). Il y a, cependant, peu d'étude portant sur les modifications de la diversité microbienne de l'air en fonction des périodes de l'année ou des zones échantillonnées.

Les micro-organismes de l'air sont véhiculés par des supports de taille variable : poussières (10 à 100 μm), gouttelettes et micro-gouttelettes émises par les voies respiratoires ou par aérosolisation (10 à 1000 μm) et noyaux de condensation issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5 μm). Les plus petites particules (de l'ordre du micron) persistent dans l'atmosphère de manière prolongée car leur vitesse de sédimentation est lente (environ 1 mètre en 8 heures) ; elles peuvent être maintenues en suspension et diffuser à distance de leur point d'émission ; elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires.

Les principales sources de contamination sont les occupants eux-mêmes et leurs activités, les matériaux de construction (revêtements des murs et des sols, peintures, matériaux d'isolation...), les équipements du bâtiment (appareils de combustion pour chauffage, systèmes de ventilation et d'air conditionnée...), ainsi que différents allergènes (provenant d'acariens ou d'animaux domestiques,...).

Dans le cas particulier des zones rurales, la répartition des agents varie en fonction de la diversité des productions des régions ou des pays concernés. Les contaminants sont alors potentiellement très nombreux. L'humidité, la chaleur, la proximité des étables, des granges, du fumier favorisent le développement de champignons retrouvés à la fois dans les locaux d'exploitation et les locaux d'habitation.

Les concentrations de certains polluants comme les composés organiques volatils peuvent être bien plus fortes à l'intérieur des bâtiments qu'à l'extérieur.

Un taux élevé d'humidité relative, une ventilation réduite, l'étanchéité plus grande des bâtiments, des problèmes de chauffage, d'infiltration d'eau constituent des facteurs contribuant à la dégradation de la qualité de l'air intérieur.

Les spores de champignons sont presque toujours présentes dans l'air mais leur nombre et leurs types varient avec la période du jour, le climat, la localisation géographique et la présence de sources locales de spores. Les conidies des genres *Cladosporium* et *Alternaria* prédominent durant les jours secs dans la plupart des endroits du monde, en particulier l'été. En revanche, les ascospores et les basidiospores prédominent la nuit après la pluie. Les concentrations habituelles sont de l'ordre de $10-10^3$ spores/m³.

Il existe plusieurs méthodes de prélèvement et d'identification des champignons microscopiques mais les résultats sont difficilement comparables entre les études de par la variabilité des échantillonneurs, temps de pose des appareils et milieux de culture. La concentration d'*Aspergillus fumigatus* dans l'air extérieur varie de 0 à 700 CFU/m³ en milieu urbain.

La présence de spores de champignons dans le milieu intérieur est une préoccupation majeure de santé publique et a d'importantes implications sanitaires, sociales et économiques.

La prise de conscience de l'importance de la qualité de l'air intérieur est relativement récente. Les sujets qui ont contribué à la sensibilisation du public aux risques microbiologiques liés à l'air sont essentiellement la légionellose, les infections nosocomiales, les pneumopathies et le bioterrorisme. Des études sont actuellement menées afin de mieux connaître cette pollution biologique et de mieux appréhender les expositions instantannées et cumulées de l'homme ou des animaux aux différentes sources de pollution.

Les spores fongiques sont actuellement reconnues comme des contaminants majeurs des milieux intérieurs. En cas de détérioration de bâtiments, de dégâts ou infiltration d'eau, la contamination fongique se développe facilement.

1. Les principaux champignons responsables de l'aérocontamination des milieux intérieurs

Plusieurs champignons sont adaptés aux conditions de l'environnement intérieur (multitude de situations distinctes). Une trentaine de genres sont observés de façon régulière en milieu intérieur contaminé, les plus fréquents étant les *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* (Garret *et al.*, 1998 ; Hamilton et Eggleston, 1997 ; Husman, 1996 ; Strachan *et al.*, 1990) (tableau II et annexe 5).

Tableau II : Moisissures et levures fréquemment rencontrées dans un environnement intérieur. Sources : Goyer *et al.*, 2001 ; Kendrick, 1999 ; Malloch, 1997.

Groupes	Moisissures	Levures
Zygomycètes	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Absidia</i> spp. - <i>Mucor plumbeus</i> - <i>Rhizopus</i> spp. 	
Ascomycètes ou assimilés	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Acremonium</i> spp. - <i>Alternaria alternata</i> - <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Aspergillus glaucus</i> - <i>Aspergillus niger</i> - <i>Aspergillus penicillioides</i> - <i>Aspergillus versicolor</i> - <i>Aureobasidium</i> spp. - <i>Chaetomium</i> spp. - <i>Chrysosporium</i> spp. - <i>Cladosporium cladosporoides</i> - <i>Curvularia</i> spp. - <i>Epicoccum</i> spp. - <i>Eurotium</i> spp. - <i>Fusarium</i> spp. - <i>Paecilomyces</i> spp. - <i>Penicillium brevicompactum</i> - <i>Penicillium chrysogenum</i> - <i>Phoma</i> spp. - <i>Pithomyces</i> spp. - <i>Stachybotrys chartarum</i> - <i>Stemphylium</i> spp. - <i>Trichoderma</i> spp. - <i>Tritirachium</i> spp. - <i>Ulocladium consortiale</i> - <i>Verticillium</i> spp. - <i>Wallemia sebi</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Candida</i> spp. - <i>Saccharomyces</i> spp.
Basidiomycètes		<ul style="list-style-type: none"> - <i>Rhodotorula</i> spp.

2. Facteurs favorisant l'aérocontamination fongique

L'air que nous respirons contient en permanence des spores de champignons, plus ou moins nombreuses selon les saisons et les conditions météorologiques. Le mode de dispersion et de transfert n'est pas le même pour toutes les espèces.

Les spores de certains champignons (*Acremonium* sp., *Exophiala* sp.), appelées gloeiospores ont une paroi épaisse de consistance humide et restent collées entre elles par un mucus ; de ce fait, elles forment des amas plus lourds difficilement transportables par l'air. Les spores seront véhiculées par contact, par les insectes, par l'eau mais rarement par l'air (Heineman *et al.*, 1994). D'autres espèces, ont des spores à parois sèches (xérospores), facilement dissociables et légères. Elles pourront être en suspension dans l'air et facilement dispersées par les courants d'air. C'est le cas des spores des genres *Penicillium* et *Cladosporium* que l'on trouve en grand nombre dans l'environnement. Xérospores et gloeiospores ont des caractéristiques physiques et physiologiques qui peuvent expliquer leurs différences de comportements (Gregory, 1961 ; Madelin, 1966 ; Wakefield et Bisby , 1941).

Lorsque cessent les mouvements d'air, les spores de l'atmosphère sédimentent à une vitesse qui dépend de leur forme, de leur ornementation, de leur taille (Al-Doory et Domson, 1984) mais aussi du degré d'hygrométrie relative. En atmosphère calme, la décantation est très rapide (Flannigan et Miller, 1994). Dans ces conditions, les spores ont tendance à descendre verticalement et à se déposer sur les surfaces qu'elles rencontrent. Elles y constituent un *inoculum* important que ne détectent pas toujours les analyses de prélèvements d'air mais qui est susceptible de se développer si les facteurs environnementaux le permettent.

Les travaux de démolition ou de construction sont souvent à l'origine de la mise en suspension ou la resuspension des éléments fongiques dans l'air (Sautour *et al.*, 2008).

Dans les milieux intérieurs, les champignons peuvent se retrouver sur :

- des aliments destinés à la consommation humaine ou animale (fruits, céréales, viande, œufs, produits laitiers, épices...) ;
- les sols ;
- les murs ;
- les plantes ;
- des objets à base de matériaux celluloseux ou d'origine animale (textiles, papiers, liège, cuir, bois...) ;
- des produits de toute nature (caoutchouc, peintures, huiles, verre, métaux...) ;

Les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre car chaque champignon est plus ou moins adapté à un environnement donné. Certains champignons requièrent un taux d'humidité relative très élevé (plus de 50%) pour croître tandis que d'autres préfèrent une certaine siccité. Certains peuvent croître sur des feuilles en décomposition, substances humides et facilement colonisables, tandis que d'autres s'attaqueront à des matières plus ligneuses, comme le bois ou même à des matières animales chitineuses tels les cheveux et les ongles. De plus la compétition inter-espèces procurera un avantage aux moisissures les mieux adaptées, faisant référence ainsi à la notion de niches écologiques particulières pour la croissance optimale de chaque type de moisissure (Grant *et al.*, 1988 ; Malloch, 1997 ; Robbins *et al.*, 2000).

En plus de la vitesse de croissance et de la quantité de spores produites, le succès de propagation d'une moisissure dépendra surtout de l'efficacité de la dispersion de ses spores. Ainsi, sauf pour quelques espèces qui peuvent projeter leurs spores sur une distance considérable, ce succès dépendra principalement de l'efficacité de la dispersion des spores aéroportées (Kendrick, 1999).

Les principaux facteurs de développement impliqués dans la germination des spores sont :

- les éléments nutritifs ;
- l'eau ;
- la température ;
- l'oxygène ;
- le pH.

Il est très important de prendre en compte la diversité et les particularités des espèces.

3. Conséquences de l'aérocontamination fongique sur la santé humaine et animale

Ces dernières années, de plus en plus d'études en Amérique du Nord et en Europe ont fait ressortir un lien possible entre la présence de champignons en milieu intérieur et diverses atteintes à la santé (Harrison *et al.*, 1992 ; Croft *et al.*, 1986).

Les agents fongiques peuvent se développer dans l'appareil respiratoire et être à l'origine de mycoses mortelles, en particulier chez des patients immunodéprimés mais aussi chez les mammifères et les oiseaux (voire d'autres animaux). L'inhalation de spores peut provoquer des réactions d'hypersensibilité (Bush et Portnoy, 2001 ; Ren *et al.*, 2001) et certaines espèces comme *Stachybotrys chartarum*, *Fusarium* spp. ou *Aspergillus versicolor* produisent des toxines aux effets délétères sur l'appareil respiratoire (Etzel *et al.*, 1998 ; Hodgson *et al.*, 1998 ; Johanning *et al.*, 1996 ;). Certaines espèces (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) contaminent les plantes et les récoltes et les mycotoxines qu'elles produisent peuvent se retrouver dans l'alimentation animale ou humaine (ochratoxine, trichothécènes, fumonisines...).

De nombreux documents, articles ou revues ont été publiés au cours des dernières années concernant les effets nocifs consécutifs à une exposition aux moisissures et à leurs métabolites en milieu intérieur (ACGIH, 1999 ; Boutin-Forgano *et al.*, 2006 ; Burge, 1990 ; Husman, 2000 ; Institut national de santé publique du Québec, 2002 ; NYC, 2000 ; Tobin *et al.*, 1987 ; Verhoeff et Burge, 1997). Selon la nature, la concentration dans l'environnement des agents en cause et selon la susceptibilité des individus exposés, les moisissures ont été associées à des effets de type irritatif, immunologique, toxique et plus rarement à des infections opportunistes chez des individus sévèrement immunodéprimés ainsi qu'à des effets cancérigènes et immunosuppresseurs, dans des contextes d'exposition importante.

Par ailleurs, le milieu intérieur est susceptible de contenir une multitude de contaminants ou facteurs d'insalubrité potentiellement nocifs pour la santé des occupants (fèces d'acariens, poils d'animaux domestiques, substances chimiques...). Il importe de considérer l'implication possible de ces contaminants même dans les cas où des symptômes compatibles avec la présence de moisissures sont observés.

Divers éléments fongiques sont susceptibles d'entraîner des effets nocifs chez un individu exposé. Il s'agit de substances élaborées par les moisissures (mycotoxines, composés organiques volatiles) ou d'éléments constituant la paroi des spores et du mycélium ($\beta(1,3)$

glucane). Les structures fongiques non viables peuvent être tout aussi nocives (allergéniques, irritantes ou toxiques) que les éléments viables (ACGIH, 1999).

Il existe peu de données concernant la prévalence de l'exposition aux moisissures en milieu intérieur, notamment en raison des difficultés inhérentes à la standardisation de l'échantillonnage dans l'environnement intérieur (ACGIH, 1999).

Les moisissures peuvent à forte dose pour des personnes bien portantes ou même à faible concentration pour des personnes immunodéprimées, soit entraîner des infections, soit des réactions allergiques et/ou inflammatoires relevant, le plus souvent de pathologies respiratoires aiguës. Ces dernières mettent en jeu des mécanismes d'action complexes qui peuvent être isolés ou associés. Une des caractéristiques liée aux risques biologiques est la possibilité de synergie entre différents agents produisant des réactions allergiques et inflammatoires.

L'exposition aux particules et aux métabolites fongiques se fait principalement par inhalation ou par ingestion mais aussi plus rarement par contact cutané. Cette exposition présente un risque potentiel pour la santé (Croft *et al.*, 1986 ; Harrison *et al.*, 1992 ; Ren *et al.*, 2001). Quelques études basées sur un questionnaire ou une inspection proposée aux occupants ont néanmoins été réalisées en Amérique et en Europe du Nord. Les résultats obtenus montrent une proportion très variable des effets des champignons sur la santé dans les logements contaminés. Il existe des études mettant en évidence une relation entre l'habitat humide et l'existence d'asthme et de symptômes respiratoires chez les enfants (Garett *et al.*, 1998; Kilpelainen *et al.*, 2001 ; Peat *et al.*, 1998) ou même l'adulte (Thorn *et al.*, 2001).

Lorsqu'elles sont inhalées, les particules se déposent à différents niveaux de l'arbre respiratoire en fonction de leur diamètre. Celles dont le diamètre est de 2 à 4 μm auront tendance à se loger au niveau des alvéoles pulmonaires tandis que les particules de 10 à 60 μm de diamètre demeureront davantage au niveau des voies respiratoires supérieures (Hendry et Cole, 1993).

Le nombre d'infections fongiques a augmenté de façon importante dans les hôpitaux. *Aspergillus fumigatus* et *Candida* sp. restent les agents fongiques les plus fréquemment responsables d'infections chez les patients immunodéprimés.

Les mycotoxines aéroportées (tableau III) issues du métabolisme secondaire des moisissures (dans certaines conditions de température, d'humidité ou de substrat) sont solubles dans le liquide alvéolaire pulmonaire et passent dans la circulation. Leur action directement

cytotoxique s'accompagne de troubles généraux plus ou moins spécifiques en fonction des organes affectés.

L'exposition aux champignons potentiellement toxigènes ne doit pas sous-entendre nécessairement une exposition aux mycotoxines. En effet, dans l'environnement, la production de toxine par ces espèces n'est pas systématique, plusieurs facteurs (la souche fongique, le substrat, les conditions ambiantes de température et d'hygrométrie) peuvent influencer la production des mycotoxines (Johaning *et al.*, 2002 ; Nielsen *et al.*, 1998).

Tableau III : Principales mycotoxines

Genre	Espèce	Principales mycotoxines	Toxicité	Risque lié à l'inhalation
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>	Altérotaxine I, alternariol, altenuisol, acide tenuazoïque	Mutagène, tératogène, hématotoxicité et immunosuppresseur	Participe au SBM*
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Aflatoxine B1 et B2, citrinine	Carcinogène, mutagène, tératogène, hématotoxicité et immunosuppresseur	Participe au SBM*
	<i>A. fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgène, gliotoxine, verruculogène	Immunosuppresseur	Aspergilloses, participe au SBM*
	<i>A. niger</i>	Acide oxalique	Lésions tissulaires et hypocalcémie	Participe au SBM*
	<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxine A	Hématotoxicité	
	<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxines G1 et G2	Carcinogène, mutagène, tératogène, hématotoxicité et immunosuppresseur	
	<i>A. versicolor</i>	Aspercolorine, sterigmatocystine, versicolorine	Carcinogène, mutagène et tératogène	Participe au SBM*
<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium</i> spp.	Chaetomine	?	Participe au SBM*
	<i>C. globosum</i>	Chasetoglobosine	?	
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	Cladosporine, émodine, acide épycladosporique	?	Participe au SBM*
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Trichothécènes (type B) , fumonisines, zéaralénone	Carcinogène, mutagène, néphrotoxicité, hépatotoxicité et œstrogénique	
<i>Penicillium</i>	<i>P.brevicompectum</i>	Brevianamide A, acide mycophénolique	Tératogène et mutagène	Participe au SBM*
	<i>P. expansum</i>	Citrinine, patuline	Carcinogène et mutagène	
	<i>P. viridiatum</i>	Acide pénicillique, ochratoxines, brevianamide A, acide mycophénolique	Néphrotoxicité, cancérigène, immunosuppresseur, génotoxicité, mutagène	
<i>Stachybotrys</i>	<i>S. chartarum</i>	Trichothécènes (satratoxines F, G et H) lacone, roridine, trichoverrine, sporidesmine G, verrucarine J	Immunosuppresseur et hématotoxicité	Alvéolites, fièvre d'inhalation (hémosidérose) et participe au SBM*
<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>	Trichodermine, trichoverrine, satratoxine, gliotoxine, fumitremorgène, isocyanide, toxine T-2	Carcinogène, tératogène et immunosuppresseur	

* SBM : Syndrome du Bâtiment Malsain

En conclusion, les mécanismes d'action mis en jeu lors de l'exposition par inhalation à des agents d'origine biologiques aéroportés sont de trois ordres :

□ Infectieux

Un agent infectieux est un agent qui est capable de se multiplier dans l'organisme hôte. Une infection peut se traduire ou non par une maladie. Si le microorganisme se développe chez l'hôte sans provoquer d'effets délétères, on parle alors d'une infection asymptomatique

□ Immuno-allergique

Ce terme regroupe des phénomènes de stimulation des défenses (réponse spécifique ou non), la dépression immunitaire et ceux générant l'hypersensibilité. L'hypersensibilité immédiate aux moisissures représente la forme la plus fréquente des allergies aux moisissures et peut provoquer des troubles cliniques variés, non spécifiques, parfois sévères et probablement sous-estimés (Leclère et Drouet, 2005). Les manifestations cliniques liées à une hypersensibilité s'expriment sous forme de rhinite, sinusite, asthme, conjonctivite, eczéma, urticaire, œdème, anaphylaxie (Drouet et Bouillaud, 1996). Les conséquences d'une hypersensibilité immédiate à IgE dépendent de l'individu et de sa réaction vis-à-vis de l'allergène fongique (Horner *et al*, 1995 ; Recco *et al*, 1996)

□ Inflammatoire et toxique

La réaction inflammatoire est une réaction de défense très générale contre un agresseur. Elle inclut l'afflux de cellules sanguines, un phénomène de vasodilatation des capillaires et de l'apport des facteurs humoraux. L'inflammation des tissus exposés aux microorganismes aéroportés peut être due aux formes solubles des (1,3)- β -D-glucanes et aux mycotoxines.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données fiables permettant d'établir un seuil au-dessus duquel il n'y a pas d'effet sur la santé, que ce soit pour l'irritation, l'hypersensibilité ou la réponse toxique (ACGIH, 1999 ; NYC, 2000), pas plus qu'il n'existe de liste de référence permettant d'évaluer le niveau de risque pour la santé pour une espèce fongique donnée.

4. Gestion de l'aérocontamination fongique

1) Détection des champignons dans l'air

Pour appréhender le risque représenté par la contamination fongique des environnements intérieurs, la détection, l'identification et la quantification des spores présentes dans l'air sont indispensables.

Les échantillons d'air doivent être prélevés au niveau ou au-dessus du niveau du sol, à hauteur d'homme ou des animaux, pour l'évaluation des risques sur la santé.

Les techniques de prélèvement ont pour but de séparer les particules du flux d'air pour les recueillir sur un ou plusieurs milieux sélectionnés. Pour les prélèvements d'air, les méthodes utilisées sont la sédimentation, l'impaction sur support adhésif ou sur milieu de culture solide en boîte de Petri, l'impaction en milieu liquide et la filtration (Salvaggio, 1994).

Des études récentes (Bellin et Schillinger, 2001 ; Ljungqvist et Reinmüller, 2000) tendent à montrer que l'impacteur Andersen est l'appareil le plus performant, tant sur le plan de l'efficacité de la collecte que sur celui de la reproductibilité. C'est l'appareil qui a été utilisé dans les études menées à grande échelle aux Etats-Unis (Womble *et al*, 1999). Toutefois ce type de dispositif présente de nombreux inconvénients : un débit considéré par de nombreux utilisateurs comme insuffisant (28,3 L/min), une absence d'autonomie électrique et une ergonomie déficiente ; cela a conduit à la production de nouveaux appareils corrigeant ces défauts tout en maintenant les principes de base : Air-Test Oméga (LCB), Mas 100 (Merk), M Air T (Millipor), Bio-impactor (Iroise). Ces nouveaux appareils ont des débits de l'ordre de 100 L/min, sont maniables et autonomes.

La plupart des biocollecteurs sont équipés pour loger des boîtes de gélose (Bex *et al.*, 2003 ; Gangneux *et al*, 2006 ; Leenders *et al.* 1999). D'autres utilisent des filtres ou des membranes. Pour certains appareils, les prélèvements se font directement dans un liquide (Desai et Ghosh, 2003) (tableau IV).

Pour l'impaction sur support adhésif ou sur milieu de culture solide en boîte de Petri, l'air est aspiré à travers un impacteur qui est constitué d'un ensemble d'orifices de tailles variables. Les particules sont collectées en fonction du diamètre des orifices. Dans la méthode par impaction en milieu liquide, la collecte se fait par impaction des bioaérosols dans un liquide. Enfin, pour la méthode par filtration, les bioaérosols sont collectés sur des membranes microporeuses (en gélatine ou en cellulose)

Tableau IV : Principaux appareils de prélèvement d'air disponibles en France

Principe	Nom	Fabricant	Débit (L/min)	Support de collection des particules	Références
Impaction	Air Test Omega	Laboratoire de Chimie et Biologie, Lasalle	100	Boite de Pétri	Nesa <i>et al.</i> , 2001
	AGI 30	Ace Glass	12,5	Liquide	Reponen <i>et al.</i> , 1999
	Andersen	Andersen Instruments Inc.	28,3	Boite de Pétri	Andersen, 1958 ; Womble <i>et al.</i> , 1999
	Cascade impactor	Sierra Instruments, Inc.	2	Boite de Pétri	Blomquist <i>et al.</i> , 1984
	Casella Slit sampler ou (Casella à fente)	Casella Ltd	30-700	Boite de Pétri	Morris <i>et al.</i> , 2000
	CIP 10-M	Arelco	10	Liquide	Gorner <i>et al.</i> , 2006
	Greenberg-Smith		28,3	Liquide	Macher <i>et al.</i> , 1995
	Mas 100	Merck	100	Boite de Pétri	Meier et Zingre, 2000
	RCS	Biotest Folex	40	Boite de Pétri	Casewell <i>et al.</i> , 1986 ; Clak <i>et al.</i> , 1981
	RCS Plus	Biotest Folex	100	Boite de Pétri	Mehta <i>et al.</i> , 1996
	SAS (surface Air System)	Bioscience International	90-180	Boite de Pétri	Le Bars J et Le Bars P, 1988
	Slit sampler ou Casella Bacterial Sampler Mk 2	Casella & Co Ltd	30	Boite de Pétri	Blomquist <i>et al.</i> , 1984
Combinaison d'impaction et centrifugation	Biosampler	SKC Inc.	1, 5 et 15	Liquide	Willeke <i>et al.</i> , 1998
Filtration	Gilian air	Lab Safety Supply Inc.	1-5	Membrane ou filtre de verre	Eduard et Heederick, 1998 ; Flannigan <i>et al.</i> , 1999
	M D8 sampler	Sartorius	50	Membrane gélatine	Parks <i>et al.</i> , 1996
	Nuclepore filter method	Nuclepore Corp.	1	Filtre Nuclepore	Blomquist <i>et al.</i> , 1984
Cyclonique	Coriolis	Bertin Technologie	300	Liquide	Non publié

Toutes les études sur la détection des souches fongiques dans l'air sont classiquement basées sur la mise en culture. En conséquence, les échantillons des prélèvements obtenus renseignent sur les espèces cultivables ou « viables » dans l'air. Il est important de savoir que pour différentes raisons, les techniques d'échantillonnage de l'air existant sous-évaluent les espèces fongiques aéroportées. Les colonies sont dénombrées et identifiées par microscopie optique. Pour les impacteurs à cribles, il existe un facteur de correction (table de correction). Ce facteur est basé sur le fait que plusieurs particules peuvent passer par le même orifice et s'impacter au même endroit en ne donnant naissance qu'à une seule colonie visible. Il existe des courbes d'efficacité en fonction du diamètre des particules pour les autres appareils.

2) Caractérisation de l'aérocontamination fongique

a. Culture

Actuellement, les études effectuées sur la détermination de la contamination fongique des environnements sont basées sur la mise en culture des prélèvements d'air. Il existe des milieux de culture non spécifiques et d'autres plus spécifiques (tableau V).

Tableau V : Milieux de culture utilisés pour la caractérisation des champignons à partir des prélèvements d'air.

Nom du milieu	Caractéristiques	Références
Extrait de Malt (MEA)	- Facilite la croissance des souches à croissance rapide (mucorales) - Permet la croissance de tous les champignons hydrophiles	Galloway et Burgess, 1952
Dichloran 18% glycérol (DG18)	- Inhibe partielle des espèces à croissance rapide - Permet la croissance des champignons mésophiles et xérophiles	Hocking et Pitt, 1980
Oxytétracycline glucose yeast extract agar (OGYA)	Permet la croissance des moisissures et levures dans tout type de matériel (alimentaire, clinique...)	Mossel <i>et al</i> , 1970
Sabouraud	Permet la croissance des moisissures et levures à partir des prélèvements cliniques	
Dichloran Rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)	Permet la croissance des moisissures et levures dans les aliments, sauf les mucorales	King <i>et al</i> , 1979 ; Hocking, 1981
Littman Oxgall Agar (LO)	Permet la croissance des moisissures et des levures	Littman, 1947 ; 1948
Rose Bengal-Streptomycin agar (RBS)	- Permet la croissance des moisissures et levures, sauf les mucorales - Se décompose à la lumière et peut devenir toxique pour certaines espèces	Rogerson, 1958

Des antibiotiques (chloramphénicol, gentamycine, pénicilline) sont ajoutés au milieu de culture pour inhiber la croissance des bactéries présentes dans le prélèvement d'air.

Les températures d'incubation les plus appropriées sont comprises entre +25 et +30°C pour la flore fongique globale et +35 à +42°C pour les espèces thermotolérantes (CEN, 2000 ; Jensen et Schaefer, 1998)

La durée d'incubation est comprise entre 7 et 14 jours avec une lecture à 3 jours puis une surveillance journalière pour afin de pouvoir dénombrer les ufc (unité formant colonie) avant l'envahissement des boîtes par les espèces à croissance rapide.

Le dénombrement et l'identification des champignons collectés se font par un examen macroscopique et microscopique des colonies.

L'étape de mise en culture pose différents problèmes : certains champignons ne se développent pas (ou difficilement) sur les milieux de cultures usuels. Des phénomènes de compétition dans les cultures, provenant d'environnements aussi complexes que l'air, font qu'il est parfois très difficile d'isoler certaines espèces même si leurs spores étaient majoritairement présentes dans le prélèvement. La mise en culture se traduit par la production d'une grande quantité de matériel fongique qui peut représenter un danger pour l'expérimentateur lui-même et impose le recours à des laboratoires disposant d'un niveau de confinement adéquat. L'identification est parfois difficile à cause de la grande diversité. Les diverses espèces fongiques n'ont pas les mêmes exigences nutritives ou la même température optimale de croissance. Il existe une grande diversité au niveau phénotypique au sein d'une même espèce ou a contrario une grande ressemblance entre certaines espèces distinctes. Par exemple les différentes espèces du genre *Penicillium* sont difficilement identifiables et nécessitent une batterie de milieux et une grande expertise.

b. Autres méthodes

Il existe des méthodes montrant la présence de champignons par la mesure de leurs composants (tableau VI). Ces derniers proviennent des cellules fongiques et présentent une grande stabilité. L'avantage de ces méthodes est que la détection des agents fongiques ne dépend pas de leur viabilité. Cependant, ces techniques ne fournissent qu'une information très globale.

Tableau VI : Techniques de caractérisation des champignons aéroportés

Éléments détectés	Origine	Méthode	Spécificité/ Sensibilité	Disponibilité de la méthode	Références
Glucanes ou (1-3)-β-D-glucanes	Paroi des champignons	Limulus Amoebocyte Lysate modifié (LAL) ou Test immunochimique (EIA)	LAL :Sensible mais peu spécifique EIA : Reproductible, spécifique d'espèce mais pas sensible	LAL : commercialisée	Chew <i>et al.</i> , 2001 ; Douwes <i>et al.</i> , 1999 ; CEN, 2000 ; Pasanen, 2001
Chitine	Paroi des champignons	Dosage colorimétrique ou chromatographique	Manque de spécificité	Pas disponible sur le marché	Matcham <i>et al.</i> , 1985
Antigènes- Allergènes	En fonction des conditions de croissance (<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Stachybotrys chartarum</i>)	Sérologie et immunochimie	Faible sensibilité mais spécifique d'espèce	Détection de <i>Stachybotrys chartarum</i> et <i>Aspergillus niger</i> en cours de commercialisation	Aden <i>et al.</i> , 1999 ; Eduard and Heederick, 1998 ; Pasanen, 2001
Polysaccharides extracellulaires (EPS)	Excrétés par la plupart des champignons	Immunochimie (ELISA)	Spécifique de genre	Pas disponible sur le marché	Chew <i>et al.</i> , 2001 ; Eduard and Heederick, 1998
Composés organiques volatils d'origine microbiologique (COVm)	Paroi de tous les champignons	Tubes absorbants (Tenax ou charbon activé) associés à la chromatographie gazeuse + spectrométrie de masse ou ionisation de flamme	Manque de spécificité	Pas disponible sur le marché	Elke <i>et al.</i> , 1999 ; Pasanen, 2001 ; Portnoy <i>et al.</i> , 2004 ; Rose <i>et al.</i> , 2000 ; Wessen <i>et al.</i> , 1999
Ergostérol (Stérol)	Membranes des champignons	Chromatographie en phase liquide (HPLC) ou chromatographie gazeuse + spectrométrie de masse	Manque de spécificité	Pas disponible sur le marché	Dales <i>et al.</i> , 1997 ; Pasanen, 2001 ; Robine <i>et al.</i> , 2005 Rose <i>et al.</i> , 2000 ; West <i>et al.</i> , 1987 ;
Mycotoxines (toxines pouvant diffuser en dehors du champignon mais non volatils)	Paroi de nombreuses espèces de champignons (<i>Alternaria</i> sp ; <i>Aspergillus</i> spp ; <i>chaetomium</i> spp ; <i>Cladosporium</i> spp ; <i>Fusarium</i> spp ; <i>Penicillium</i> spp ; <i>stachybotrys</i> sp ; <i>Trichoderma</i> sp)	HPLC ou chromatographie gazeuse + spectrométrie de masse	Pas spécifique d'espèce	Méthodes complexes, Pas disponible sur le marché	Pasanen, 2001 ; Tuomi <i>et al.</i> , 2000 ; Yike <i>et al.</i> , 1999

Les dosages des composants des champignons à l'exception des mycotoxines ne donnent pas d'information sur l'espèce présente dans l'environnement testé.

Il existe une nouvelle technique d'immunodétection (Halogen Immunoassay ou HIA) pour l'identification des champignons aéroportés responsables de réactions allergiques (Green *et al.*, 2003 ; Tovey et Green, 2005). La collecte des champignons, pour l'application de cette technique, se fait à l'aide de petits filtres qui se mettent dans les narines chez l'homme (intra-nasal air sampler) (Graham *et al.*, 2000). Les filtres contenant les champignons aéroportés sont déposés sur une membrane protéique. Celle-ci est ensuite recouverte par une autre membrane pour extraire les antigènes. Leur détection se fait d'abord à l'aide d'anticorps monoclonaux primaires ou du sérum humain, puis un immunomarquage est effectué avec des anticorps secondaires conjugués. La visualisation de l'immunomarquage se fait par microscopie optique ou confocale (Green *et al.*, 2006).

La difficulté d'identification des espèces par les techniques de dosage de leurs composants, rend indispensable les études de communautés de microorganismes présents dans un biotope donné par les outils d'analyse moléculaire.

Certaines techniques moléculaires sont fastidieuses et nécessitent de disposer d'une grande quantité d'ADN.

Il existe des techniques rapides et plus sensibles, fondées sur l'amplification par PCR de gènes dont une partie de la séquence est conservée au sein des microorganismes (Sparagano *et al.*, 1999). Les gènes les plus fréquemment utilisés dans ces études sont les gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr) (18S et 26S chez les champignons).

Le produit de PCR est un mélange dont il faut séparer chaque constituant pour l'analyse. Celle-ci peut se faire par une étape de clonage suivie d'une analyse par échantillonnage de l'ensemble des clones. Toutefois l'étude d'un grand nombre d'échantillons ou l'analyse d'un biotope polycontaminé contenant beaucoup d'espèces différentes, peuvent rapidement devenir très longues et coûteuses.

La méthode la plus récemment mise en œuvre est la PCR en temps réel. Elle est reproductible et sensible. Elle permet également une standardisation et une automatisation des analyses. Elle se développe actuellement pour la détection d'*Aspergillus fumigatus* (Bretagne, 2003), de *Stachybotrys atra* (Haugland *et al.*, 1999 ; Haugland et Heckman, 1998 ; Land et Must, 1999), des espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et de *Paecilomyces* (Haugland *et al.*, 2004 ; Morrison *et al.*, 2004). Toutefois, cette méthode nécessite l'utilisation d'amorces spécifiques qui doivent être conçues pour chaque espèce ou genre, ce qui impose le développement de

plusieurs tests pour une analyse globale. La difficulté réside dans le choix des séquences pour la conception des amorces car le séquençage des espèces fongiques n'est pas encore généralisé et pour certaines espèces environnementales aucune séquence n'est actuellement disponible dans les banques génomiques.

Une autre approche est la séparation des différents fragments contenus dans les produits PCR par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous gradient de température (TTGE : *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) ou dans des conditions dénaturantes (DGGE : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1993). Ces techniques plus rapides que le clonage permettent la comparaison de nombreux échantillons. Elles ont été développées, à l'origine, pour détecter des mutations ponctuelles sur l'ADN (Muyzer *et al.*, 1993). Elles sont aujourd'hui utilisées pour étudier la biodiversité de biotopes très variés.

Il existe d'autres approches automatisées comme la SSCP (*Single Strain Conformation Polymorphism*) et la D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography* ou Chromatographie Liquide Haute Pression en condition dénaturante).

3) Moyens de lutte contre l'aérocontamination fongique

Les études descriptives présentant le nombre d'espèces et de spores viables dans l'air intérieur rapportent des valeurs se situant entre 0 et 1×10^5 UFC/m³, bien que de plus fortes concentrations puissent être retrouvées en milieu agricole ou industriel (Goyer *et al.*, 2001). Cependant, les décomptes les plus fréquents en milieu résidentiel ou en milieu de travail non industriel se situent entre 50 et 1.500 UFC /m³ (Fung *et al.*, 2000 ; Garrett *et al.*, 1998 ; Jarvis et Morey, 2001 ; Miller *et al.*, 1988 ; Seuri *et al.*, 2000), ce qui est généralement inférieur aux concentrations retrouvées à l'extérieur (Strachan *et al.*, 1990).

Dans un milieu intérieur où il n'y a pas d'amplification ni d'accumulation de particules fongiques dans les systèmes de ventilation, la concentration des particules fongiques est similaire voire souvent inférieure à la concentration retrouvée à l'extérieur au même moment (ACGIH, 1999 ; AIHA, 2001). Il n'existe pas de seuil quantitatif valable définissant la superficie de la moisissure visible nécessaire pour statuer qu'il y a « contamination ».

Il faut noter que les petites taches de moisissures apparaissant aux endroits régulièrement humides (au pourtour du bain ou de certaines fenêtres) ne sont pas considérées comme une « contamination ». En effet, ce type de croissance est facilement contrôlé lors de l'entretien ménager régulier. La contamination d'un milieu intérieur correspond à la prolifération non contrôlée de moisissures (poussières, murs, tuiles de plafond, meubles etc.)

De nombreuses études canadiennes, américaines et européennes ont été effectuées dans des édifices publics et des écoles soupçonnés d'être contaminés par les moisissures. Comme elles ont été réalisées dans des situations où des problèmes de santé ont été rapportés par des occupants, ces évaluations ponctuelles ne permettent pas d'estimer la proportion des édifices aux prises avec une contamination fongique.

Il est essentiel de renouveler l'air des locaux fréquentés par l'homme ou l'animal. Les bâtiments sont de plus en plus hermétiques par soucis d'économie d'énergie mais cela empêche le passage de l'air. Naturellement, il y a émission de gaz carbonique et divers autres gaz par l'organisme. Les activités effectuées dans le milieu testé et les matériaux qui constituent les locaux participent à l'émission de gaz.

Dans les hôpitaux, le contrôle de l'aérocontamination est primordial dans les secteurs hébergeant des patients qui présentent un haut risque infectieux (hématologie, soins intensifs, bloc opératoire...). Ce contrôle se fait par des systèmes de traitement d'air (filtration ; renouvellement d'air, diffusion, surpression, ozonisation, irradiation UV et procédés plasmas)

(Poirot *et al.*, 2007 ; Sixt *et al.*, 2007). Il est combiné au contrôle de l'aérocontamination (prélèvements microbiologiques et comptage particulaire) (Gangneux et al, 2002, 2006).

Les études concernant l'aérocontamination des bâtiments doivent être multidisciplinaires, regrouper des experts de la médecine environnementale, professionnels du bâtiment, de la santé publique, de l'hygiène, des épidémiologistes, des microbiologistes et des pneumologues-allergologues. Un groupe de travail de ce type a pour but d'harmoniser la méthodologie utilisée dans les laboratoires de mycologie (prélèvements, transport, conditions de primocultures et autres techniques d'analyse) de façon à pouvoir comparer les résultats inter-laboratoires et mieux identifier les agents responsables.

Comme le mentionnent la plupart des documents sur la contamination fongique dans les bâtiments, la prévention est essentielle (conférence de consensus sur la prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés, 2000). Porter une attention immédiate à la condensation, aux infiltrations d'eau et aux matériaux humides (associés à un problème de plomberie ou à une autre cause, comme une inondation ou des dommages découlant des intempéries) permet d'éliminer toute croissance fongique et de prévenir la prolifération d'autres contaminants. Ces mesures de prévention s'avèrent relativement peu coûteuses par rapport aux frais liés à l'assainissement d'un immeuble touché par une contamination fongique. Les mérites de la prévention sont encore plus évidents lorsqu'on considère les problèmes de santé qu'elle permet d'éviter.

En élevage, seule une prévention sanitaire est envisageable. Cette prévention repose sur le respect des mesures d'hygiène pour limiter la présence et la prolifération des champignons dans l'environnement immédiat des animaux. Le respect des mesures d'hygiène peut permettre aux animaux de mieux lutter contre la présence des champignons qui seront en moindre concentration. Une étude sur l'aspergillose aviaire a montré qu'au cours des infections expérimentales simulant la maladie naturelle de dindes, l'immunité protectrice qui suit la vaccination apparaît satisfaisante (Tell, 2005).

Etude expérimentale

1^{ère} Partie

Techniques de prélèvements et d'identification moléculaire des champignons dans l'air

INTRODUCTION

Les difficultés liées à l'évaluation de l'exposition aux particules à l'intérieur des locaux sont nombreuses, en particulier pour les moisissures ou leurs constituants (Pasanen, 2001). Dans l'air intérieur, une proportion non négligeable de l'exposition fongique résulte des particules sédimentées qui sont remises en suspension par les activités exercées dans le local et par la ventilation.

Actuellement, il n'existe pas d'harmonisation des techniques de prélèvement des éléments fongiques dans l'air (Boutin-Forzano *et al*, 2006). Les prélèvements d'air permettent de récupérer les particules en les séparant du flux d'air. Il existe trois méthodes de prélèvement d'air :

- la filtration,
- l'impaction sur milieu solide,
- l'impaction en milieu liquide.

La mise en culture semble une étape incontournable pour les études visant à déterminer la contamination des environnements par les agents fongiques. Cependant, la mise en culture présente plusieurs inconvénients qui justifient le développement de techniques alternatives.

En parallèle à la mise en culture, nous proposons d'identifier les espèces fongiques présentes dans les prélèvements par PCR-TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) et par PCR-D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*).

La technique PCR-TTGE permet l'étude de communautés complexes de microorganismes présentes dans un biotope. Elle est fondée sur l'amplification par PCR de gènes dont une partie de la séquence est conservée au sein des micro-organismes (Sparagano *et al*. 1999). Le recours à une unique paire d'amorces conduit à la formation d'un mélange de produits de PCR. La séparation des différents fragments est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous gradient de température. Après migration, les fragments d'intérêt sont extraits, ré-amplifiés par PCR puis séquencés.

Cette technique originale d'étude d'une communauté de microorganismes a été appliquée pour l'analyse d'écosystèmes microbiens complexes tels que la flore bactérienne du tube digestif chez l'homme (Suau *et al.*, 1999), la flore bactérienne hébergée par des arthropodes (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2003). Au sein de notre laboratoire, l'équipe 890 (Bactéries transmises par les arthropodes) a adapté cette technique à l'étude des bactéries hémotropes

véhiculées par différents ectoparasites hématophages (Halos *et al.*, 2006). Seules deux études rapportent l'utilisation de la technique PCR-TTGE pour l'analyse de communautés fongiques : la première a permis de décrire précisément la flore fongique du sol (Smit *et al.*, 1999), la seconde a porté sur l'identification de levures intervenant lors de la vinification (Hernan-Gomez *et al.*, 2000).

La D-HPLC est une chaîne de chromatographie qui repose sur la séparation en conditions dénaturantes des produits PCR. Cette méthode permet la détection de substitutions de bases, de petites délétions ou d'insertion au niveau de l'ADN. Grâce à sa rapidité et sa résolution élevées, cette méthode est particulièrement utile pour la recherche de polymorphismes de séquences nucléotidiques.

1. Mise au point de techniques de prélèvements des champignons dans l'air

Introduction

L'absence de standardisation des méthodes de prélèvement d'air nous a amené à évaluer et comparer les trois types de méthodes existantes : impaction en milieux liquide et solide et la filtration.

L'impaction sur milieu solide, méthode la plus utilisée, a été sélectionnée comme méthode de référence afin d'évaluer les deux autres techniques (filtration et impaction sur milieu liquide).

Pour cela nous avons utilisé :

- l'Air Test Omega ou Air Strategie Bio-impactor, méthode de référence (Nesa *et al.*, 2001) ;
- le CIP 10-M (capteur individuel de poussières microbiologiques) (Görner *et al.*, 2006) ;
- l'AirPort MD8 (Parks *et al.*, 1996).

Matériels et méthodes

1) Appareils de prélèvement d'air

L'UMR BIPAR possède plusieurs impacteurs permettant la détection et la quantification d'espèces fongiques cultivables comme les *Aspergillus* (Air Strategie Bio-impactor ou Air Test Omega) ou non cultivables comme *Pneumocystis* spp. (CAP ; CIP 10 et CIP 10-M).

L'air Strategie Bio-impactor ou Air Test Omega (figure 2) a été spécialement conçu pour une utilisation rapide et facile. Commercialisé par le Laboratoire de Chimie et Biologie, Lasalle en France, il est employé couramment pour le contrôle de l'aéro-contamination fongique en milieu hospitalier (Nesa *et al.*, 2001). Cet appareil permet uniquement la mise en culture des prélèvements d'air par une impaction directe sur gélose avec un débit de 100 L/min et un volume de prélèvement qui peut aller de 5 à 1000 litres. Il possède une batterie d'une autonomie maximale de 4 heures et pèse 1,2 kg. Après prélèvement, la boîte est directement mise à incubation à la température désirée.

Air Test Omega ou Air Strategie Bio-impactor	
Fabricant	Laboratoire de Chimie et Biologie, France
Principe	Impaction directement sur gélose
Caractéristiques techniques	Débit : 100 L/min ; batterie rechargeable ; programmable ; autonomie : 4 heures ; utilisation de cribles de prélèvement vissables
Dimensions et poids	208x146x128 mm ; 1,2 kg



Figure 2 : Descriptif de l'Air Test Oméga ou Air Strategie Bio-Impactor

L'équipe 892 (Champignons transmis par voie aérienne) a réalisé un travail expérimental ayant pour objectif la validation de l'impacteur CAP (Société Arelco) pour la mise en évidence et la caractérisation des champignons du genre *Pneumocystis* (Guillot *et al.*, 1999). Le CIP 10 (Courbon *et al.*, 1988) est la version « non microbiologique » couramment employée en France et dans différents pays pour la mesure de l'exposition professionnelle aux aérosols en milieu industriel. Le CIP 10 a été utilisé avec succès pour la détection des *Pneumocystis* en milieu hospitalier ou dans l'environnement d'animaux en captivité (Demanche *et al.*, 2001, 2003). L'avantage du système portatif CIP est qu'il rend possible le suivi de l'exposition d'un individu aux agents fongiques dans ses différents cadres de vie au cours d'une journée.

L'échantillonneur individuel de bioaérosols CIP 10-M (Görner *et al.*, 2006) est une émanation dans son principe général de l'échantillonneur CIP 10. L'appareil fonctionne sur batterie avec une autonomie de 2 jours. Le cœur du dispositif CIP 10-M est la coupelle rotative (figure 3). Dans ce nouvel échantillonneur, les bioaérosols sont aspirés à un débit de 10 L/min et collectés dans une couche de liquide plaquée sur la paroi interne de la coupelle du fait de sa rotation (environ 7000 tr/min). Une fois aspirés, les microorganismes suivent un mouvement hélicoïdal pour finalement toucher la surface du liquide de manière tangentielle. Dès la mise

en route, le CIP 10-M peut-être utilisé dans n'importe quelle position, le liquide étant maintenu dans la coupelle rotative par l'effet centrifuge.

L'aspiration de l'air est assurée par la présence de rainures disposées de façon radiale sur la paroi supérieure de la coupelle. Le volume du liquide de collecte est compris entre 1 et 2,5 mL. Après prélèvement, ce dernier est transféré dans un flacon stérile et conditionné pour le transport au laboratoire pour analyse microbiologique. Du fait de l'évaporation du liquide de collecte, le temps du prélèvement peut varier entre quelques minutes et plusieurs heures en fonction de la température, de l'humidité relative de l'air et de la nature du liquide de collecte utilisé.

CIP 10-M	
Fabricant	Arelco, France
Principe	Impaction sur liquide
Caractéristiques techniques	Débit : 10 L/min ; batterie rechargeable ; non programmable ; autonomie : 40 heures ; utilisation d'une coupelle rotative métallique
Dimensions et poids	175x70x45 mm ; 0,3 kg



Coupelle rotative

Figure 3 : Descriptif du capteur individuel de poussières microbiologiques (CIP 10-M)

L’AirPort MD8 (figure 4) qui opère par filtration sur membrane de gélatine est commercialisé par Sartorius. Il en existe plusieurs modèles. L’Air Scan MD8 est constitué d’une pompe avec un affichage du temps et du volume prélevé. Il a été utilisé pour la collecte des bactéries dans l’air (Parks *et al.*, 1996). Après collecte, la gélatine est soit placée directement sur un milieu de culture, soit dissoute dans un liquide (Petras, 1966 ; Rotter et Koller, 1973).

L’AirPort MD8 est un nouvel appareil de prélèvement d’air sans pompe fonctionnant avec le même principe que le MD8 avec pompe. Il est utilisé dans de nombreux domaines (industrie pharmaceutique, biotechnologie, industrie alimentaire, hôpitaux et pour des mesures de surveillance environnementale). Cet appareil a été fourni par Thalès Security Systems. Il a un débit de 50 L/min, une autonomie de 4,5 heures et son débit de prélèvement peut être ajusté (30 ; 40 et 50 L/min). L’AirPort MD8 indique le temps et le volume prélevé.

Tout comme le CIP 10-M, il est facilement transportable donc peut être utilisé dans divers environnements. Les prélèvements sont effectués sur une membrane en gélatine. Après le prélèvement, la membrane peut être ensemencée directement ou elle peut être diluée à l’aide d’un liquide (eau associée ou non à un surfactant).

AirPort MD8	
Fabricant	Sartorius, Allemagne
Principe	Filtration avec utilisation de membranes de gélatine
Caractéristiques techniques	Débit : 30, 40 et 50 L/min ; batterie rechargeable ; programmable ; autonomie : 4,5 heures
Dimensions et poids	300x135x165 mm ; 2,5 kg



Membrane de gélatine

Figure 4 : Descriptif de l’AirPort MD8

2) Procédures de prélèvement d'air

L'évaluation des performances pour la collecte des champignons des appareils CIP 10-M et AirPort MD8 a été obtenue par comparaison avec l'appareil Air Test Oméga.

Pour cela, les trois appareils ont été simultanément utilisés dans trois sites de prélèvements

- un site supposé « faiblement contaminé » : milieu hospitalier (Hôpital Saint-Antoine), des bureaux (Direction Générale de la Mairie de Paris et Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) ;
- un site supposé « moyennement contaminé » : salle de stockage de culture de champignons et des habitations avec des problèmes d'humidité (odeurs de moisissures ; tâches de moisissures sur les murs...) ;
- un site supposé « fortement contaminé » : étable, écurie et poulailler où sont hébergés des animaux. Le sol de ces bâtiments est recouvert de paille de céréales.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des séries de prélèvements avec l'Air Test Oméga et le CIP 10-M. Chaque série incluait un prélèvement avec le CIP 10-M et deux prélèvements avec l'Air Test Oméga de même volume (100 L).

Ensuite dans les sites supposés faiblement et moyennement contaminés, nous avons opté pour un volume commun de prélèvement de 200 L par appareil. Cela correspond à des durées de 2 min avec l'Air Test Oméga ; 20 min avec le CIP 10-M et 5 min avec l'AirPort MD8. Les trois appareils ont été positionnés à environ 3 m de distance et à une hauteur de 1 m.

Dans le site supposé fortement contaminé, nous n'avons utilisé que le CIP 10-M et l'AirPort MD8. Les deux appareils ont été mis en marche simultanément à hauteur des animaux et distants d'environ 3 m. Le volume commun prélevé était de 500 L d'air c'est-à-dire pendant 50 min avec le CIP 10-M et 10 min avec l'AirPort MD8.

Les prélèvements d'air avec l'Air Test Oméga se font directement sur le milieu de culture. La collecte avec le CIP 10-M s'est faite en milieu liquide dans un mélange eau et Tween 20 (0,001%). Les prélèvements avec l'AirPort MD8 se sont faits sur une membrane de gélatine qui a été ensuite diluée dans l'eau stérile à +37°C

3) Conditions de culture

Nous avons utilisé trois milieux de culture différents :

- le milieu de Sabouraud (Annexe 1) est utilisé pour l'ensemencement des prélèvements biologiques, il permet le développement de la plupart des champignons.
- le milieu malt extract Agar (Annexe 2) permet la croissance de la plupart de champignons aéroportés
- le milieu Dichloran glycérol-18 ou DG18 (Annexe 3) utilisé pour la croissance des champignons xérophiles. Il inhibe ou ralentit le développement des champignons à croissance rapide (comme les Mucorales).

Les boîtes de Petri (Sabouraud, Malt et DG18) utilisées pour l'Air Test Oméga ont été incubées dans une étuve à +25°C pendant 7 jours.

Le liquide de collecte provenant de la coupelle CIP 10-M et la membrane de gélatine diluée ont été ensemencés pur et dilués (1/10 ; 1/100 et 1/1000) sur les deux milieux (Malt et DG18). Les boîtes de Petri contenant le DG18 ont été incubées à +25°C pendant 7 jours. Les boîtes contenant le milieu malt ont été incubées à +25°C et à +37°C pendant 7 jours.

Après incubation, les colonies ont été dénombrées à l'œil nu. L'identification des espèces a été réalisée au microscope optique (coloration au bleu lactique) selon des critères morphologiques (de Hoog *et al.*, 2000).

4) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par Benoît Durand de l'Unité d'Epidémiologie de l'AFSSA, Maisons-Alfort. Cette étude a porté sur le suivi de l'aérocontamination fongique d'un élevage de poulets pendant 15 semaines. Des prélèvements d'air hebdomadaires ont été effectués avec le CIP 10-M et l'airPort MD8. La concentration fongique moyenne en ufc/m³ a été calculée à partir du nombre de colonies isolées par les trois conditions de culture (DG18 à +25°C ; malt à +25°C et malt à +37°C).

Les programmations et l'analyse statistique ont été réalisées sous le logiciel R Development Core Team, Austria, 2006, (<http://www.R-projet.org>.) La valeur de p = 0,05 a été utilisée comme limite significative.

Article 1 : Comparative performance of two air samplers and mycological media for quantification of fungal aerocontamination in a poultry facility

Nieguitsila Adélaïde, Arné Pascal, Durand Benoît, Haddad Nadia, Deville Manjula, Benoit-Valiergue Hélène, Chermette René, Latouche-Cottenot Sophie,
Guillot Jacques

Soumis « Science of the Total Environment »

Comparative performance of two air samplers and mycological media for quantification of fungal aerocontamination in a poultry facility

Nieguitsila Adélaïde^{1,2}, Arné Pascal¹, Durand Benoît³, Haddad Nadia¹, Deville Manjula¹, Benoit-Valiergue Hélène⁴, Chermette René¹, Cottenot-Latouche Sophie², Guillot Jacques¹

1 INRA, AFSSA, ENVA, UPVM, UMR 956, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

2 Thales Security Systems, Vélizy-le-Bois, France

3 UMR Epidémiologie AFSSA, Maisons-alfort, France

4 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Champagnelle, France

Abstract

Fungal elements represent a significant part of the biological contaminants that could be detected in the air of animal facilities especially densely populated and enclosed henhouses. The aim of this study was to assess the performance of two air samplers and to compare different culture conditions for quantitative evaluation of fungal exposure in a poultry facility in France. Air samples were made every week throughout a 15-week period. Two devices were simultaneously used: an impactor air sampler (CIP 10-M, Arelco, France) and an air sampler based on filtration (AirPort MD8, Sartorius, Germany). For culture of airborne viable fungi, malt extract agar (ME) and dichloran glycerol-18 (DG18) were used. After incubation at 25°C or 37°C and morphological identification, concentrations of airborne fungi were expressed as colony forming units per m³ (cfu/m³). CIP 10-M and AirPort MD8 were shown to have comparable performances but significant differences were observed between culture conditions for *Aspergillus* spp. ($P < 0.01$), *Scopulariopsis* spp. ($p = 0.02$) and unknown fungi ($P < 0.01$).

1. Introduction

Indoor air quality has become an area of major concern in recent years (Cooley *et al.*, 1998; Fung and Hughson, 2003; Johanning *et al.*, 1999; Kauffman *et al.*, 1995; Piecková & Jesenská, 1999; Samson *et al.*, 1994) and fungal elements represent a significant part of the biological contaminants that could be detected in air. Many investigations demonstrated that exposure to airborne fungal particles can cause a variety of adverse health effects in humans and domestic animals (Fung and Hughson, 2003). Airborne fungal particles may be associated with allergic reactions, respiratory infections and toxic effects (Chang *et al.*, 2001; Savilahti *et al.*, 2000). In animal units, environmental conditions are usually favorable for the development of a wide variety of molds. These conditions may cause adverse health effects in workers (Chang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006) and in animals, especially avian species (Lair-Fulleriger *et al.*, 2006; Tell, 2005). In order to increase poultry production, birds are usually fed in buildings that are mainly confined structures densely stocked with birds. Fungi resulting from litter, droppings and feed can easily accumulate and be aerosolized in such densely populated and enclosed buildings (Lair-Fulleriger *et al.*, 2006).

The objective of the present study was to determine the relative efficiencies of two air samplers and three culture conditions (Mat extract agar, incubation at 25 and 37°C and Dichloran glycerol-18, incubation at 25°C) for the assessment of airborne fungi in a henhouse in France. The effect of environmental parameters (temperature, relative humidity and animal density) on retrieval of airborne fungi was evaluated during a 15 weeks surveillance program. We used two devices with the same volume air sampling: CIP 10-M, which allows the collection of airborne particles in a liquid, and AirPort MD8, which allows the collection of airborne particles onto a gelatine membrane.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling devices

Air samples were obtained using the CIP 10-M and the AirPort MD8 (Table 1)

The CIP 10-M (Capteur Individuel de Poussières Microbiologiques, Arelco company, Fontenay-sous-Bois, France) is a bioimpactor (Courbon et al., 1988). It was originally validated for the detection of the non-culturable fungi of the genus *Pneumocystis* (Guillot et al., 1999). More recently, CIP 10-M has been used for the characterization of fungal aerocontamination by measurement of ergosterol in air (Robine et al., 2005) and by TTGE fingerprinting (Nieguitsila et al. 2007).

The Airport MD8 sampler (Sartorius, Goettingen, Germany) is a filtration-based bioaerosol (Engelhart et al. 2007). The sampling head inserts directly in the pump unit without an interjacent flexible hose, and the flow rate is restricted to 50 L/min. The filter head contains a gelatine membrane (Sartorius AG, biotechnology Division, Germany), which can be dissolved in distilled water at 37°C (after air sampling) (Parks et al., 1996).

2. 2. Sampling site and procedure

This study was realized in a 400 m² henhouse (45 m long by 9.5 m wide) during 15 weeks. The building sheltered about 4300 broiler chickens. The ventilation was static. After 5 weeks of breeding all the animals had access to an outdoor area (2 m²/bird). Indoor litter consisted of fresh chopped straw spread on the floor a few days before the arrival of the animals. Extra straw was added when necessary. The study was performed in spring 2007 in Burgundy, a French region with continental climate.

Bioaerosol samples were collected with the two devices. Air samplings were made weekly throughout the 13 weeks period of breeding, the week before the arrival of the animals and the week after their departure to the slaughterhouse.

We selected the same air sampling volume for the two devices (500L). Air samplers were placed at 0.5 m from the soil and used simultaneously (at 3 m distance from each other).

With CIP 10-M, airborne particles were collected in 2 mL of distilled water with 0.01% Tween 20 (Madelin, 1987). With AirPort MD8, airborne particles were filtered by a gelatine membrane which was further dissolved in 10 mL of distilled water at 37°C.

Indoor temperature, relative humidity (Testo sarl Forbach, France) and NH₃ concentration (Dreager, Germany) were recorded every week in the facility.

2.3. Culture Media

Malt extract agar-chloramphenicol (ME)

ME medium was composed of malt extract, 20 g/L (Fluka, Biochemika); agar, 15 g/L (Labosi); peptone, 1 g/L (Difco); glucose, 20 g/L; and chloramphenicol, 0.5 g/l.

Dichloran glycerol-18 agar-chloramphenicol (DG18)

DG18 was composed of glucose, 10 g/L; peptone, 5 g/L; NaH₂PO₄, 1 g/L; Mg₂SO₄, 0.5 g/L; dichloran, 0.002 g/L; agar, 15 g/L; glycerol, 220 g/L and chloramphenicol, 0.5 g/l. Glycerol is used as a suitable solution for the cultivation of many xerophilic fungi. Dichloran restricts the growth of fast-growing fungi (such as Mucorales) and limits the colony diameters of other species, and therefore facilitates the counting of the colonies.

Petri dishes containing 12 mL medium were used. The collection liquid and dissolved gelatine membrane were diluted with distilled water at 1/10, 1/100 and 1/1000.

The Petri dishes containing ME were incubated at 25°C and 37°C. The Petri dishes containing DG18 were incubated at 25°C. Petri dishes were incubated for 7 days and examined daily.

2.4. Fungal identification

Fungal species were identified by their macroscopic and microscopic appearance after lactophenol cotton blue staining (de Hoog et al., 2000). The Fungal concentrations were calculated as colony forming units per cubic meter (CFU/ m³).

2.5. Statistical analysis

An ANOVA was used to compare the mean number colonies isolated by the two devices and mean number colonies identified by the 3 different culture conditions. We used software R (R Development Core Team, Austria, 2006, <http://www.R-projet.org>). A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Considering the whole sampling period, the mean of total indoor fungal concentration with CIP 10-M and AirPort MD8 were 161.5 and 95.7 cfu/m³ on DG18 (at 25°C), 123.6 and 101 cfu/m³ on ME (at 25°C), 95.1 and 85.80 cfu/m³ on ME (at 37°C), respectively. Strong variations of cfu values occurred during the sampling period (FIG 1).

Fungi most frequently recovered from air samples were *Aspergillus* spp. (among which *Aspergillus fumigatus*), *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Scopulariopsis* spp., *Cladosporium* spp., Mucorales and yeasts (Table 3 and 4). Table 3 provides the results obtained with CIP 10-M sampler and table 4 those with AirPort sampler. *Aspergillus fumigatus*, the pathogenic species responsible for aspergillosis in breeding birds and in humans, was separated from other *Aspergillus* species.

Many fungi could not be identified with certainty either because they did not sporulate (on ME or DG18) or because they develop spores in a way that could not be associated with an already known group of fungi. In table 2, 3, 4 and 5, these organisms are designated as “unknown fungi”. Table 4 and 5 show that fungal groups that were most frequently isolated corresponded to *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp. and unknown fungi. Other fungi (yeasts, *Penicillium* spp. and Mucorales) were regularly isolated but less frequently. Among fungi isolated very sporadically during the 15-week sampling period were *Alternaria* spp., *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium* spp.

3.1. Efficiency of the two air samplers

There was no significant difference between the efficiency of the two air samplers except for unknown fungi ($p = 0.02$), which were more abundantly detected in air samples from CIP-10 than in those from Airport MD8 (FIG 2). Figure 1 shows the evolution of cfu counts during the 15-week sampling period. The values obtained from air samples made with the two devices were usually similar.

The mean concentrations of fungi between CIP 10-M sampler (table 3) and AirPort MD8 sampler (table 4) show that genera *Alternaria*, *Cladosporium* and yeasts were identified in air with CIP 10-M. However, the difference was not significant.

3.2. Comparison of culture conditions

For *Aspergillus* spp. higher cfu values were obtained with DG18 and ME at 25°C (30.28 and 23.06 cfu/m³) than with ME at 37°C (3.20 cfu/m³). For *Scopulariopsis* spp. higher cfu values were obtained with ME at 37°C (79.06 cfu/m³) than with DG18 (27.57 cfu/m³). For unknown fungi higher cfu values were obtained with DG18 at 25°C (79.71 cfu/m³) than with ME at 25°C (23.87 cfu/m³) or with ME at 37°C (8.00 cfu/m³).

Alternaria spp. yeasts and Mucorales were detected only on ME at 25°C during the 15-week sampling period.

There was no significant impact of NH₃, ambient temperature or relative hygrometry on either global mycoflora or specific fungal groups concentration during the survey (data not shown).

Figure 1 clearly shows that the evolution of cfu counts during the 15-week sampling period was dependent on culture conditions.

Table 2 provides mean cfu counts for *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp. and unknown fungi. For these types of fungi significant differences could be detected according to culture conditions.

3.3. Effect of outdoor access on concentrations of airborne fungi

To evaluate the relationship between outdoor access and the concentrations of three types of fungi (*Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp. and unknown fungi) an ANOVA study was performed (Table 5). Significant differences were detected between indoor access and outdoor access for *Scopulariopsis* spp. and unknown fungi.

4. Discussion

Most investigations about indoor air are conducted with culture-based methods, but insufficient attention is generally given to four important issues: sampler performance, temporal variability, culture media and accurate identification.

Many strategies have been reported to sample air and their choice has been determined by the hypotheses involved. Several air samplers are currently marketed and are based on different physical principles (mainly impaction, centrifugal acceleration or filtration). Impactors remain the most widely used type of sampler. Air samplers should offer advantages in term of performance and simplicity of use. In 1989, the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) outlined several sampling methodologies for indoor monitoring but did not report the comparability of data derived from these various methods.

Existing samplers for the collection of bioaerosols have been designed with the aim of maintaining biological stability of the collected material, and in general do not select particles in accordance with international conventions for aerosols sampling. In the present study, the choice of samplers was based on the following criteria: commercial availability; presence of a battery giving at least 1h of autonomy; weight; simplicity of use under difficult conditions (a large building with birds). According to these criteria we selected an impactor (CIP 10-M) and a device using air filtration principle (AirPort MD8).

Our study showed that the performance of the CIP 10-M and the AirPort MD8 regarding the collection of fungi was comparable. This result is surprising as the two devices do not collect air particles in the same way and that the flow rate of air sampling is very different (50 L/min for MD8 versus 10 L/min for CIP 10-M).

Regarding culture conditions, a comparison of cfu values for total fungi and individual fungal groups was performed. ME agar allowed the growth of many different fungal species. ME has been extensively used in aerobiological studies and is still recommended by the ACGIH for detection and enumeration of fungi in indoor environments (Burge *et al.*, 1987). DG18 is seldom used in aerobiological studies. It was first developed for the enumeration of moderately xerophilic molds and osmophilic yeasts in food (Hocking and Pitt, 1980). So far, only one field study adopted this medium for environmental airborne fungi sampling (Verhoeff *et al.*, 1994), and two methodological studies suggested that DG18 could be an alternative choice for easier colony counting and higher yield of cfu and types of fungi (Smid *et al.*, 1989; Verhoeff *et al.*, 1990). The study conducted by Wu in 2000 demonstrated that

DG18 is superior to ME for yeasts enumeration. Our observations were not in accordance with the latter study as yeasts were recovered more frequently on ME than on DG18.

Mucorales are fast-growing molds, making the colonies counting impossible after 5 days of incubation with ME. On the opposite, DG18 seemed to limit the growth of Mucorales (Hocking and Pitt, 1980).

Any assessment of environment fungi usually looks for media providing the growth of different fungi to make a better generalization of the study results. All fungi identified in this study had already been sampled in confined agricultural environment (Adhikiari *et al.*, 2004; Gemeinhardt and Wallenstein, 1985; Lugauskas *et al.*, 2004; Reboux *et al.*, 2006). During a previous investigation in a poultry facility in Lithuania, 31 species attributed to 13 fungal genera were isolated (Lugauskas *et al.*, 2004). *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans* prevailed and made up 15.1 and 9.7% of all the identified isolates, respectively. *Penicillium* genus fungi were represented by 12 species. Mucorales were also isolated. In the air from poultry facilities in Germany, Gemeinhardt and Wallenstein (1985) detected a large number of fungal species including many *Penicillium* spp. and *Scopulariopsis brevicaulis*.

Concentration for each individual fungal groups could be an indicator of selectivity for the culture condition used. As shown in Table 4, the isolation of *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp. and unknown fungi, depended significantly on culture conditions. Figure 2 showed that DG18 allowed the detection of *Aspergillus* spp. whereas ME was very efficient for the isolation of unknown fungi and *Scopulariopsis* spp. In a previous investigation conducted in human habitats (Verhoeff *et al.*, 1994), the use of DG18 yielded the highest fungal concentrations. Another study performed in a hospital (Wu *et al.*, 2000) showed that DG18 allowed the isolation of more fungal types than ME. Chao *et al.* (2002) found a better recovery for the genus *Aspergillus* on DG18 than on ME medium. Various environments would naturally consist of different fungal microflora and concentrations.

The concentration of *Scopulariopsis* was significantly lower in the first four weeks when chicken were in controlled indoor environment in comparison with last eight weeks of rearing when they had outdoor access. On the contrary, the number of unknown fungi was significantly higher in the first four weeks than in the last part of rearing. These results demonstrate that the outdoor access yielded significant variations in indoor airborne fungi concentrations.

To assess the level of exposure to airborne fungal organisms, many investigations have been made in different environments including hospitals (Wu *et al.*, 2000, Nesa *et al.*, 2001), buildings (Basilo *et al.*, 2007; Bomquist, 1984; Horner *et al.*, 2004; Jo and Seo, 2005; Lee and

Jo, 2006; Shelton *et al.*, 2002; Verhoeff *et al.*, 1990) and agricultural environments (Adhikari *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2001; Lair-Fullerger *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Lugauskas *et al.*, 2004). However, different procedures of air sampling and analysis have been used and the results obtained in these investigations are hardly comparable. The spore density threshold is difficult to establish, as the sampling conditions depend upon the type of sampler, sampling time and culture conditions (Mishra *et al.*, 1992). Adhikari *et al.* (2004) indicated that the contrasting observations of airborne fungal concentrations in agricultural environment of different countries could be attributed to the different structure of agricultural confinements, diverse local sources for fungal growth in different climates, environmental parameters, cleaning and animal handling activity and maintenance of environment.

5. Conclusion

The two methods of sampling used in this study showed the same efficiency for the collection of the following fungal groups: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Scopulariopsis* spp., Mucorales and yeasts. However significant differences were observed between culture conditions. As a consequence, the use of different mycological media may be recommended in order to improve the accuracy of the evaluation of fungal aerocontamination in a heavily contaminated place (like an animal facility). During the 15-week sampling period, many fungi could not be identified with certainty. This result highlighted the need to develop non-culture based techniques for specific identification.

Acknowledgements

This study could not have been accomplished without the agreement of Mr Massuard for air sampling in the henhouse.

This study was supported by a grant from the Association Nationale de la Recherche Technique (CIFRE convention 2005016 in collaboration with Thales Security Systems).

References

- Adhikari A, Reponen T, Lee SA, Grinshpun SA. Assessment of human exposure to airborne fungi in agricultural confinements: personal inhalable sampling versus stationary sampling. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2004; 11:269-77
- Adhikari A, Sen MM, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Internat.* 2004; 29:1071-8
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 1989. Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.
- Basilico MLZ, Chiericatti C, Aringoli EE, Althaus RL, Basilico JC. Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. *Science of Total Environment.* 2007; 376:143-50
- Blomquist G, Palmgren U, Ström G. Improved techniques for sampling airborne fungal particles in highly contaminated environments. *Scand. J. Work Environ. Health.* 1984;10:253-58
- Burge HA, Chatigny M, Feeley J, Kreiss K, Morey P, Otten J, Peterson K. Guidelines for assessment and sampling of saprophytic bioaerosols in the indoor environment. *Appl. Ind. Hyg.* 1987;2:R10-6
- Chang CW, Chung H, Huang CF, Su HJJ. Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:155-61
- Chao HJ, Schwartz J, Milton DK, Burge HA. Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ Health Perspect* 2002;101:777-82
- Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup. Environ. Med.* 1998; 55:579-84.
- Courbon P, Wrobel R, Fadriès JF. A new individual respirable dust sampler: The CIP 10. *Ann. Occup. Hyg.* 1988;3:129-43.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederick D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 2003; 47:187-200
- Dutkiewick J. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1997;4:11-6
- Engelhart S, Glasmacher A, Simon A, Exner M. Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the merck Mas-100 portable bioaerosol sampler. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* 2007; 210:733-739
- Fung F, Hughson WG. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2003;18:535-54.

Gemeinhardt H, Wallenstein G. Occurrence of molds in airborne dusts in poultry farms. *Zbl. Mikrobiol.* 1985;140:375-9

Guillot J, Berthelemy M, Polack B, Lainé V, Lacube P, Chermette R, Roux P. Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999;46:S94.

Hocking AD and Pitt JJ. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980;39:488-92

Horner WE, Worthan AG, Morey PR. Air and dustborne mycoflora in house free of water damage and fungal growth. 2004;70:6394-400

Jo WK, Seo YJ. Indoor and outdoor bioaerosols levels at recreation facilities, elementary schools, and homes. *Cemosphere.* 2005; 61:1570-9

Johanning E, landbergis P, Gareis M, Yang CS, Olmsted E. Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environ. Health Perspect.* 1999;107:489–94.

Kauffman HF, Tomee JFC, van der Werf TS, de Monchy JGR, Koeter GK. Review of fungus-induced asthmatic reaction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151:2109–16.

Kennedy MJ, Sigler L. *Aspergillus*, *Fusarium* and other opportunistic moniliaceous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken (Eds): *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., 765-90. ASM Press, Washington 1995.

Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and occupational lung disease. *J. Aerosol Sci.* 1994;25:1371-404

Lair-Fullerenger S, Segui D, Warin S, Bezille A, Desterke C, Arné P, Chermette R, Bretagne S, Guillot J. Evolution of the environment contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poultry Science.* 2006; 85:1875-80

Lee JH, Jo WK. Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols at Korean high-rise apartment buildings. *Environmental research* 2006; 101:11-7

Lee SA, Adhikari A, Grinshpun SA, McKay R, Shukla R, Reponen T. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J Occup Environ Hyg.* 2006; 3(3):118-30

Lugauskas A, Kriskstaponis A, Sveistyle L. Airborne fungi in industrial environments – Potential agents of respiratory diseases. *Annals Agriculture Environmental Medicine* 2004; 11:19–25

Mishra SK, Ajello L, Ahearn DG, Burge HA, Kurup VP, Pierson DL, Price DL, Samson RA, Sandhu RS, Shelton B, Simmons RB, Switzer KF. Environmental mycology and its importance to public health. *J. Med. Mycol.* 1992;30:287-305

- Nesa D, Lortholary J, Bouakline A, Bordes M, Chandeniers J, Derouin F, Gangneux JP. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J. Hosp. Infect.* 2001; 47:149-55
- Nieguitsila A, Deville M, Taoufik J, Halos L, Berthelemy M, Chermette R, Latouche S, Arné P, Guillot J. Evaluation of fungal aerosols using temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *J. Microbiol. Methods* 2007;70:86-95
- Parks SR, Bennett SE, Speight SE, Benbough JE. An assessment of sartorius MD8 microbiological air sampler. *Journal of Applied Bacteriology.* 1996; 80:529-34
- Piecková E, Jesenská Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1999;6:1–11.
- Reboux G, Roussel S, Grenouillet F. fungi in agricultural environment. *J. Med. Mycol.* 2006;16:248-62.
- Robine E, Lacaze I, Moularat S, Ritoux S, Boissier M. Characterisation of exposure to airborne fungi: measurement of ergosterol.. *J. Microbiol. Methods.* 2005;63:185–92.
- Samson RA, Flannigan B, Flannigan ME, Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES. *Health Implications of Fungi in Indoor Environments.* Elsevier, Amsterdam. 1994.
- Savilahti R, Uitti J, Laippala P, Husman T, Roto P. Respiratory morbidity among children following renovation of a water-damaged school. *Arch Environ Health.* 2000;55(6):405-10
- Shelton BG, Kirkland KH, Flanders WD, Morris GK. Profiles of airborne fungi in building and outdoor environments in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:1743-53
- Smid T, Schokkin E, Boleij JS, Heederik D. Enumeration of viable fungi in occupational environments: a comparison of samplers and media. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1989;50:235-9
- Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact in veterinary medicine. *Med. Mycol.* 2005;43:S71–3.
- Verhoeff AP, van Reenen-Hoeksstra ES, Samson RA, Brunzkreef B, van Wijnen JH. Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure. *Allergy.* 1994;49:533-9
- Verhoeff AP, van Wijnen JH, Boleij JSM, Brunekreef B, van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA. Enumeration and identification of airborne viable mould propagules in houses. *Allergy.* 1990; 45:275-84
- Wu PC, Su HJJ, Ho HM. A comparison of sampling media for environment viable fungi collected in a hospital environment. *Environ. Res. Sect.* 2000; 82:253-7

Table 1: Characteristics of the two air samplers tested in the present study

Name	Manufacturer	Principle	Programmable Time/volume	Flow rate (L/min)	Sample collection	Autonomy	Weight (kg)
CIP 10-M	Alreco, Fontenay-sous-Bois, France	Impaction	No	10	Water + Tween 20 (0.01%)	40h	0.3
AirPort MD8	Sartorius, Goettingen, Germany	Filtration	Yes	Adjustable: 30; 40 and 50	Gelatine membrane (water soluble at 37°C)	4.5h	2.5

Table 2: Mean concentration (cfu/m³) of individual group of fungi with a significant difference according to culture conditions

	Aspergillus		Scopulariopsis		Unknown	
	CIP 10-M	AirPort MD8	CIP 10-M	AirPort MD8	CIP 10-M	AirPort MD8
ME 25°C	23.06	15.40	31.46	60.13	23.87	6.67
ME 37°C	3.20	5.26	79.06	66.13	8.00	5.73
DG18 25°C	30.28	20.00	27.57	25.28	79.71	54.86
P-value related to culture conditions	P < 0.01		0.02		P < 0.01	

Table 3: Mean concentrations (cfu/m³) of fungi in air according to difference culture conditions during the 15 week-sampling period (CIP 10-M sampler).

		CIP 10-M									
		CFU/m ³									
Culture conditions *		<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.**	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	Mucorales	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	Yeast	Unknown fungi	Total
Week before	1.	0	0	2	0	0	0	0	16	22	40
	2.	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	3.										
Week 1	1.	0	60	0	0	0	6	0	10	82	158
	2.	0	20	0	0	0	0	0	0	4	24
	3.	4	0	0	0	0	60	0	18	54	136
Week 2	1.	0	0	0	0	0	4	0	10	44	58
	2.	0	0	0	0	0	2	0	20	20	42
	3.	0	20	0	0	0	16	0	0	304	340
Week 3	1.	0	2	0	0	2	0	0	0	124	128
	2.	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	3.	0	58	0	0	0	4	0	2	146	210
Week 4	1.	0	30	0	0	2	2	4	6	10	54
	2.	0	0	0	0	2	0	6	0	4	12
	3.	0	40	0	0	0	0	0	2	96	138
Week 5	1.	0	4	0	0	4	6	4	70	8	96
	2.	0	2	0	0	2	0	26	0	12	42
	3.	0	52	0	0	0	0	0	0	40	92
Week 6	1.	4	78	0	0	4	8	48	92	8	242
	2.	0	2	2	0	4	0	58	0	38	104
	3.	0	46	0	0	0	0	10	0	60	116
Week 7	1.	0	42	0	0	0	12	76	112	20	262
	2.	0	0	0	0	0	0	92	2	6	100
	3.	0	62	0	0	0	0	104	0	126	292
Week 8	1.	2	66	0	0	0	0	120	4	10	202
	2.	0	0	0	0	0	0	194	0	20	214
	3.	0	26	0	0	0	0	40	0	148	214
Week 9	1.	0	24	0	0	2	0	44	62	10	142
	2.	0	0	0	0	0	6	132	0	2	140
	3.	0	28	0	0	0	0	66	0	64	158
Week 10	1.	0	4	0	80	2	2	20	20	4	132
	2.	0	4	0	0	0	20	138	0	12	174
	3.	0	50	0	0	0	260	100	2	22	434
Week 11	1.	0	10	0	0	0	0	56	116	2	68
	2.	0	0	0	0	0	0	90	0	0	90
	3.	0	6	0	0	0	0	12	0	10	28
Week 12	1.	0	8	0	0	0	0	20	0	2	146
	2.	0	0	0	0	0	0	236	0	0	236
	3.	0	16	0	0	0	0	0	126	16	158
Week 13	1.	4	14	0	0	2	2	66	0	12	100
	2.	0	0	0	0	0	0	214	0	0	214
	3.	0	16	0	0	0	0	54	0	22	92
Week after	1.	0	4	0	0	8	0	14	0	0	26
	2.	0	20	8	0	0	2	0	0	0	30
	3.	0	4	0	0	0	0	0	2	8	14

* 1: malt extract at 25°C; 2. malt extract at 37°C and 3: dichloran glycerol at 25°C

** : other than *Aspergillus fumigatus*

Table 4: Mean concentrations (cfu/m³) of fungi in air according to difference culture conditions during the 15 week-sampling period (AirPort MD8 sampler).

		AirPort MD8									
		CFU/m ³									
Culture conditions	*	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.**	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	Mucorales	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	Yeasts	Unknown fungi	Total
Week before	1.	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6
	2.	0	2	0	0	0	0	0	100	6	108
	3.										
Week 1	1.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Week 2	1.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Week 3	1.	0	14	0	0	0	4	0	0	12	30
	2.	0	24	0	0	2	4	0	0	2	32
	3.	0	48	0	0	0	10	0	0	120	178
Week 4	1.	0	10	0	0	2	4	20	104	6	146
	2.	0	2	0	0	2	0	10	6	6	26
	3.	0	30	0	0	0	0	4	0	136	170
Week 5	1.	0	22	0	0	2	0	10	80	8	122
	2.	0	0	0	0	0	0	76	2	12	90
	3.	0	30	0	0	0	0	0	0	146	176
Week 6	1.	0	56	0	0	0	0	46	4	6	112
	2.	0	6	0	0	2	0	114	2	44	168
	3.	0	50	0	0	0	0	0	0	160	210
Week 7	1.	0	36	0	0	2	14	100	0	4	156
	2.	0	0	0	0	0	0	92	0	0	92
	3.	0	64	0	0	0	0	18	0	70	152
Week 8	1.	0	16	0	0	0	0	144	0	8	168
	2.	0	0	0	0	0	0	200	0	2	202
	3.	0	12	0	0	0	0	34	0	32	78
Week 9	1.	0	10	4	0	2	0	46	0	2	64
	2.	0	24	0	0	0	0	196	0	2	222
	3.	0	12	0	0	0	0	126	0	12	150
Week 10	1.	0	14	6	0	0	0	120	0	4	144
	2.	0	6	0	0	0	0	48	0	12	66
	3.	0	12	0	0	0	0	110	4	22	148
Week 11	1.	0	8	0	0	0	0	40	0	20	68
	2.	0	0	0	0	0	0	72	0	0	72
	3.	0	0	0	0	0	0	28	0	4	32
Week 12	1.	0	20	0	0	0	20	318	0	2	360
	2.	0	0	0	0	0	0	74	0	0	74
	3.	0	0	0	0	0	14	0	0	12	26
Week 13	1.	0	6	0	0	12	0	58	0	18	94
	2.	0	0	0	0	0	0	110	0	0	110
	3.	0	20	0	0	0	6	34	0	50	110
Week after	1.	6	19	6	0	4	6	0	0	4	45
	2.	0	15	8	0	0	2	0	0	0	25
	3.	0	2	0	0	0	0	0	0	4	6

* 1: malt extract at 25°C; 2. malt extract at 37°C and 3: dichloran glycerol at 25°C

** : other than *Aspergillus fumigatus*

Table 5: Mean concentrations (cfu/m³) of *Aspergillus*, *Scopulariopsis* and unknown fungi in air. Two periods were defined: from week 1 to 4, the birds had no outdoor access; from week 5 to 13, the animals had free outdoor access.

	Culture conditions *	Aspergillus		Scopulariopsis		Unknown fungi	
		CIP 10-M	AirPort MD8	CIP 10-M	AirPort MD8	CIP 10-M	AirPort MD8
No outdoor access (week 1 to 4)	ME 25°C	19.20	9.20	1.60	6.00	53.60	5.20
	ME 37°C	4.40	5.20	6.40	17.20	8.00	4.00
	DG18 25°C	34.00	21.60	0.00	0.80	128.00	80.40
Outdoor access (week 5 to 13)	ME 25°C	30.75	20.75	56.25	109.00	8.50	8.00
	ME 37°C	0.75	4.50	144.25	113.25	9.75	7.50
	DG18 25°C	31.25	21.25	48.25	43.75	58.50	45.25
		P > 0.05		P < 0.01		P < 0.01	

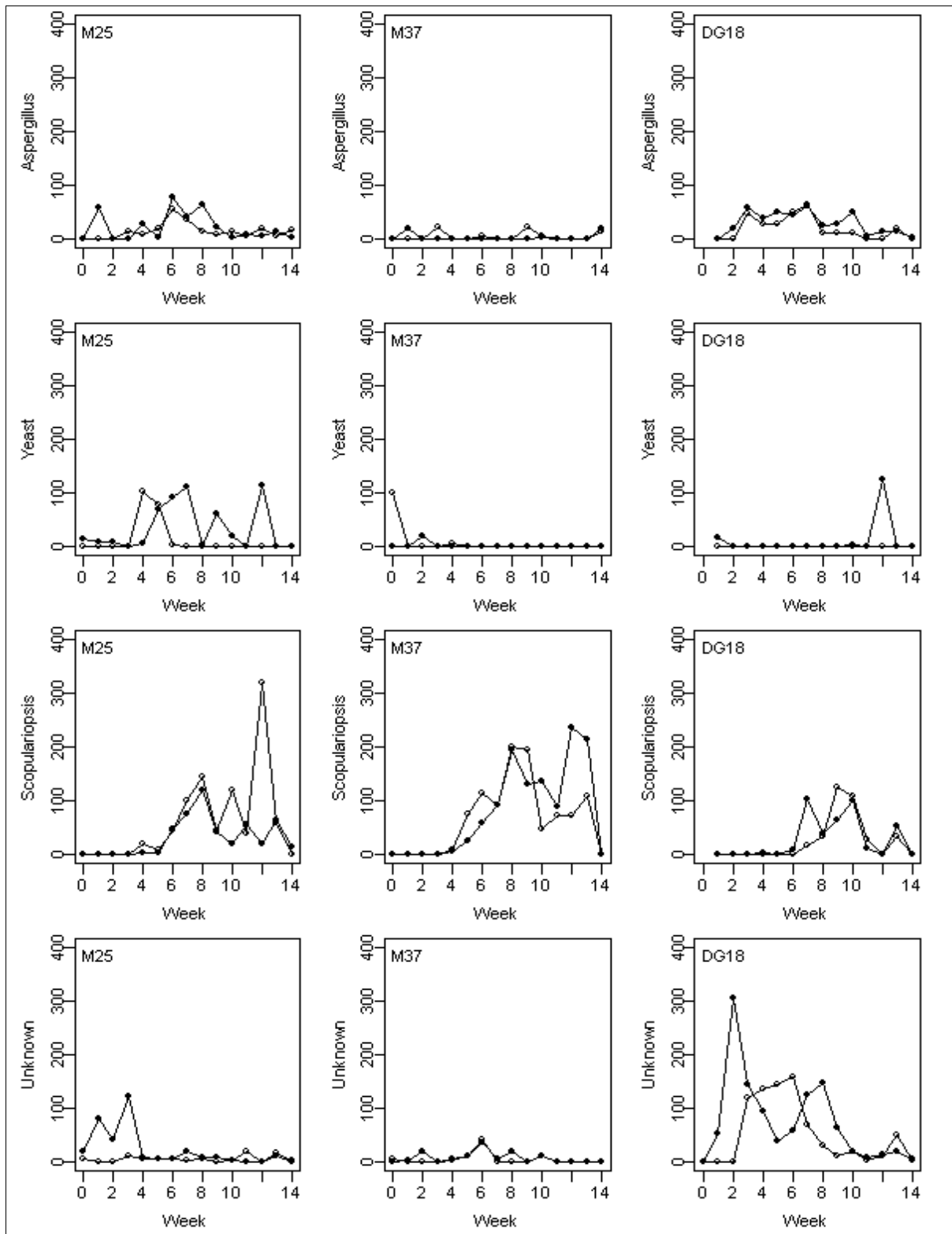


FIG 1: values of colony forming unit throughout the 15-week sampling period in the henhouse. Each column corresponds to a specific culture condition (M25 = Malt extract agar at 25°C; M37 = Malt extract agar at 37°C and DG18 = Dichloran glycerol-18 at 25°C). Each line corresponds to a fungal group. The curves with points represent the values obtained from air samples made with CIP 10-M and the curves with circles represent the values obtained from air samples made with AirPort MD8.

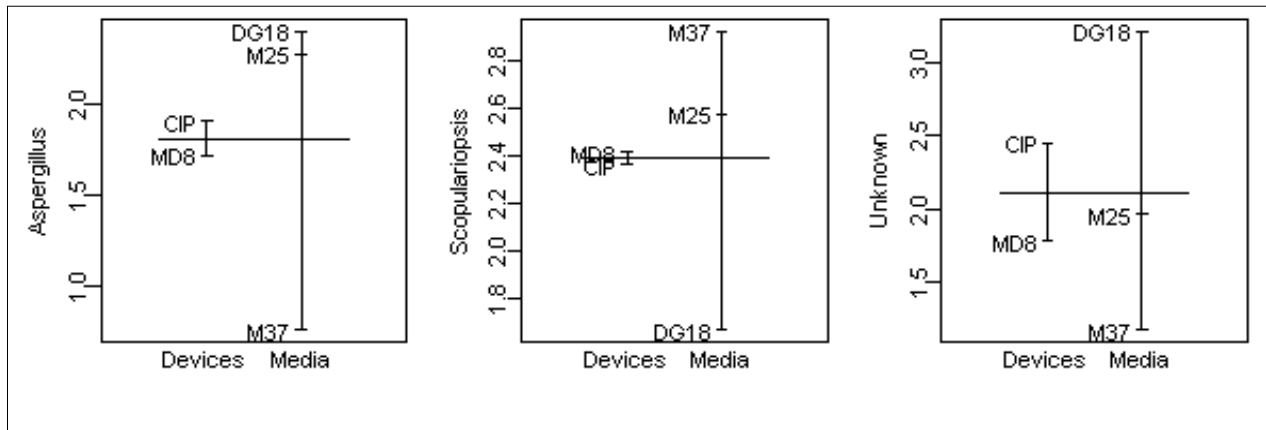


FIG 2: Comparison of mean concentration (cfu/m³) of fungi genera whose numerations differ significantly dependant on devices and cultivation conditions. CIP is CIP 10-M sampler; MD8 is AirPort MD8 sampler and culture conditions are represented by M25 = malt extract at 25°C; M37 = malt extract at 37°C and DG18 = DG18 at 25°C.

Discussion

Les biocollecteurs ont des caractéristiques qui peuvent limiter leur utilisation à la détection de certains bioaérosols. Le nombre ou le type de colonies est fonction de l'appareil utilisé (Godish D et Godish T, 2008), du lieu de prélèvement (Mehta *et al*, 2000) et des conditions environnementales. La méthode de prélèvement peut avoir des effets différents sur la survie des particules biologiques collectées (Reponen *et al*, 1998 ; Stewart *et al*, 1995). Dans l'idéal, les particules collectées sont représentatives de la concentration des microorganismes aéroportés (Cox, 1991).

Pour les prélèvements standards en milieu hospitalier, il est recommandé un prélèvement de moins de 10 minutes avec des appareils d'un débit de 100 L/min et d'une vitesse d'impact de 20 m/s (pour limiter le stress des particules ou la déshydratation des milieux de culture) (ISO 14698-1, 2003). Par contre, pour les environnements non hospitaliers il n'existe pas de norme établie pour les biocollecteurs et leur utilisation. Il existe un projet de norme (ISO/TC 146/SC 6/WG 10) mais aucun document officiel à ce jour.

Dans cette étude nous avons choisi deux modes de prélèvement d'air : l'impaction (impaction sur milieu solide : Air Test Oméga et impaction sur liquide : CIP 10-M) et la filtration avec l'AirPort MD8. Lors de l'évaluation des appareils, nous avons utilisé trois milieux de culture différents (Sabouraud, ME et DG18) et deux températures d'incubation (+25°C et +37°C). Le milieu de Sabouraud a été utilisé au début de notre étude puis nous avons opté pour le milieu ME qui a été recommandé par le comité ACGIH (*American Conference Governmental Industrial Hygienist*) pour la détection et l'énumération des champignons dans les environnements intérieurs (Burge *et al.*, 1987). Par ailleurs, ME semble plus favorable au développement de champignons avec une identification des espèces plus facile que le Sabouraud. Il semble également moins favorable à la croissance des bactéries (Gangneux *et al*, 2002). L'utilisation du DG 18 a permis l'identification des espèces xérophiles comme *Aspergillus versicolor* (Hocking and Pitt, 1980). Il a inhibé la croissance des espèces envahissantes (comme les mucorales).

La température d'incubation de +25°C est celle qui convient au développement des champignons mésophiles, hydrophiles et xérophiles. L'incubation à +37°C nous a permis de cibler certains champignons susceptibles de se développer chez l'homme ou l'animal.

Les conditions de mise en culture (milieux et température d'incubation) des prélèvements d'air dépendent des espèces fongiques recherchées. Pour l'évaluation de l'aérocontamination

fongique d'un environnement, il s'avère nécessaire de combiner plusieurs conditions de mise en culture.

Dans un premier temps, nous avons évalué le CIP 10-M (permettant la mise en culture et l'application d'autres techniques sur le prélèvement d'air) en le comparant avec l'Air Test Oméga (permettant uniquement la mise en culture). Nous avons constaté que l'Air Test Oméga était plus efficace pour la collecte des champignons dans les environnements faiblement contaminés. Ce manque de sensibilité du CIP 10-M peut s'expliquer par son faible débit qui présente un champ de prélèvement théorique 10 fois inférieur à celui de l'air Test Oméga. Les prélèvements effectués dans les environnements très contaminés (étable, écurie...), ont donné des résultats (quantitatifs et qualitatifs) similaires pour les deux appareils. Cette étude a montré que le CIP 10-M permet bien la collecte de champignons aéroportés dans un contexte de forte contamination. Cela nous a permis d'appliquer les techniques de biologie moléculaire sur les prélèvements d'air obtenus à partir du CIP 10-M.

Lors de cette étude nous avons comparé l'utilisation de l'eau stérile seule et du mélange eau stérile/Tween 20 pour les prélèvements avec le CIP 10-M. Nous n'avons pas noté de différence de collecte au niveau du nombre d'espèces identifiées. Notre choix d'utiliser le mélange eau stérile/Tween 20 a été déterminé par le fait que l'ajout du surfactant assure une meilleure collecte des espèces hydrophobes. Le surfactant permet également la séparation des amas de spores ce qui favorise le développement de colonies fongiques bien séparées sur la gélose. Et donc le dénombrement des espèces à croissance lente (Madelin, 1987).

Ensuite nous avons utilisé le CIP 10-M et l'AirPort MD8 pour un suivi de l'aérocontamination fongique sur toute la durée d'élevage d'une bande de poulets de chair. Les deux appareils ont montré une même efficacité bien qu'ils soient de mode de fonctionnement et de débit différents. Le choix d'un appareil de prélèvement d'air doit se baser sur sa facilité d'utilisation (poids, autonomie, programmation...) et surtout sur le traitement du prélèvement en fonction de ce que l'on cherche. Le coût d'achat et d'entretien doit aussi être pris en considération.

Pendant les 15 semaines de suivi de l'aérocontamination du poulailler, les animaux ont eu des périodes de contact avec l'extérieur. Les résultats montrent que toutes les espèces fongiques qui ont été identifiées dans notre étude ont été déjà identifiées dans les environnements agricoles (Adhikiari *et al.*, 2004, Lagastras *et al.*, 2004 ; Reboux *et al.*, 2006). Nous avons également noté que la sortie des animaux sur le parcours extérieur entraîne des variations dans les concentrations et la composition des espèces fongiques dans le bâtiment.

Notre étude est difficilement comparable à d'autres. D'une part, parce que la plupart des études n'utilisent pas les mêmes appareils de collecte et les conditions de culture différentes (milieux de culture et températures d'incubation). D'autre part, nous n'avons pas trouvé dans la littérature des études utilisant le CIP 10-M et/ou l'AirPort MD8.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les appareils CIP 10-M et AirPort MD8 peuvent être recommandés pour des prélèvements dans les environnements intérieurs.

Pour une meilleure représentation de l'aérocontamination fongique, il semble essentiel de combiner plusieurs conditions de mise en culture des prélèvements d'air.

2. Mise au point de techniques d'identification moléculaire des champignons dans l'air

Introduction

La culture est la technique de référence pour l'identification des espèces présentes dans les prélèvements d'air.

Cependant, pour étudier les communautés de champignons dans l'air, il est également possible d'utiliser les techniques de biologie moléculaire fondées sur l'amplification de gènes par PCR. Les amorces sélectionnées s'hybrident sur des zones conservées et permettent l'amplification de régions variables chez les champignons (Sparagano *et al.*, 1999). Les gènes les plus fréquemment utilisés sont les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) 18S et 26S.

Notre objectif était de mettre au point une méthode efficace et facile d'emploi pour séparer les différents fragments d'ADN fongique des produits PCR. Pour cela l'amplification de nos échantillons s'est faite en présence d'un fragment riche en GC appelé GC clamp. Ce GC clamp est placé à l'extrémité 5' d'une des amorces utilisées. Il a permis de développer deux techniques de détection et de séparation des différents fragments d'ADN fongique à partir des échantillons de prélèvements d'air. La première technique est la TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) ; la séparation se fait sur un gel de polyacrylamide. C'est une électrophorèse à gradient de température dénaturant.

La deuxième technique est la D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). La séparation se fait sur colonne de chromatographie à température dénaturante.

Matériels et méthodes

1) Extraction de l'ADN total des échantillons de prélèvements d'air

L'étape préalable, avant toute technique d'identification moléculaire, est l'extraction de l'ADN total de l'échantillon, qui s'avère extrêmement difficile sur les agents fongiques (Faggi *et al*, 2005 ; van Burik *et al*, 1998). Les difficultés rencontrées lors de l'extraction à partir de spores fongiques sont dues à la présence et à la composition de la paroi fongique qui rend la lyse difficile.

Nous avons pour but de mettre au point une méthode efficace, standardisée et facile d'emploi pour l'extraction de l'ADN total de nos prélèvements d'air. Pour cela, nous avons comparé quatre méthodes d'extraction d'ADN testées d'abord sur des spores issues de culture et ensuite sur les prélèvements d'air :

- la première technique est la congélation (-80°C) puis la décongélation des échantillons ;
- la seconde technique est l'utilisation de kits commerciaux (Qiamp ; tissue protocol, Qiagen ou NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel ou encore Fast DNA Spin® Kit for soil, Q-Biogene) ;
- la troisième technique associe la congélation-décongélation et l'utilisation de kits commerciaux ;
- la dernière technique est l'association du broyage fin des éléments fongiques à l'amalgameur à billes ou bead beater (mixer mill MM301, Qiagen) et de l'utilisation d'un kit commercial (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel).

2) Amplification par PCR avec des amorces universelles pour les champignons

L'amplification permet de produire un nombre élevé de séquences nucléotidiques identiques. Les amplifications ont été réalisées à l'aide du thermocycleur Gene Amp® 9700 (Applied Biosystem).

À partir de l'ADN total extrait nous avons appliqué la technique PCR avec des amorces non sélectives. Cette technique permet d'obtenir en quelques heures un très grand nombre de copies des fragments d'ADN de tous les champignons présents dans notre échantillon. Nous nous sommes intéressés à deux gènes codant les ARN ribosomiques 18S et 26S. L'analyse de

ces gènes, comportant des domaines conservés et variables apporte une grande quantité d'informations mises à profit dans le cadre d'étude taxonomiques et phylogénétiques.

Pour obtenir des amorces adéquates nous avons d'abord testé des amorces déjà décrites dans la littérature (annexe 4). Les couples d'amorces publiés ont été utilisés pour étudier des prélèvements réalisés dans les écosystèmes variés : vin ; rhizosphère ; peau. Dans notre étude, ces amorces se sont révélées inappropriées notamment parce que certaines ont permis l'amplification d'ADN d'autres éléments présents dans l'air comme des plantes ou encore des insectes (poux). D'autres ne permettaient pas l'amplification de certaines espèces fongiques (comme les mucorales). Enfin certains couples ont conduit à la formation de fragments de grande taille, ce qui rendait difficile l'extraction de l'ADN du gel de polyacrilamide.

Nous avons donc défini de nouvelles amorces spécifiques d'une portion de l'ADNr 18S des champignons (Fungcont 1, 2 et 3). L'obtention de ces amorces s'est faite à l'aide du Logiciel Oligo 4.0 à partir de plusieurs séquences d'espèces de champignons (Ascomycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes) susceptibles d'être collectés dans l'air .

La composition des trois amorces est la suivante :

- Fungcont 1 : 5'-CTC GCA TCG ATG AAG AAC-3'
- Fungcont 2 : 5'-GGG TAA TCC CAC CTG ATT-3'
- Fungcont 3 : 5'-CCG CTT ATT GAT ATG CTT-3'

La PCR « nichée » (Nested PCR) consiste à réaliser une seconde amplification interne sur un premier fragment déjà amplifié, la sensibilité de la technique est ainsi améliorée. Pour notre étude, nous avons opté pour une PCR semi-nichée qui consiste à utiliser une même amorce pour les amplifications. Afin d'éviter la contamination au maximum du milieu réactif nous avons mis les trois amorces dans le même mélange réactionnel et les deux séries d'amplifications se déroulent dans le même tube, limitant ainsi les manipulations.

L'utilisation des amorces non sélectives conduit à la formation d'un mélange de produit de PCR dont il faut séparer chaque constituant pour analyse.

3) Caractérisation de l'aérocontamination par électrophorèse à gradient de température dénaturant ou TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*)

La séparation des produits de PCR peut se faire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous gradient de température (TGGE, TTGE) ou dans des conditions dénaturantes (DGGE : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyers *et al.*, 1999). La TTGE a été développée à l'origine pour la détection des mutations ponctuelles sur l'ADN. Elle est utilisée maintenant pour l'analyse de la biodiversité des micro-organismes dans les écosystèmes très différents.

A ce jour, la caractérisation des espèces fongiques par PCR-TTGE n'a été réalisée que sur le vin (Hornàn-Gomez *et al.*, 2000) et sur la rhizosphère du blé (Smit *et al.*, 1999). Il y a eu un peu plus d'études utilisant le PCR-DGGE, sur la rhizosphère (Kowalchuk *et al.*, 1997), le maïs (Ben Omar et Ampe, 2000), le vin (Cocolin *et al.*, 2000), la vanille séchée (Rölling *et al.*, 2001), les peintures anciennes et fenêtres en verres (Möhlenholf *et al.*, 2001 ; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001), le bois et le sol (Pennanen *et al.*, 2001 ; Vainio et Hantula, 2000 ; van Elsas *et al.*, 2000), l'ensilage de grains (May *et al.*, 2001) et le compost (Marshall *et al.*, 2003).

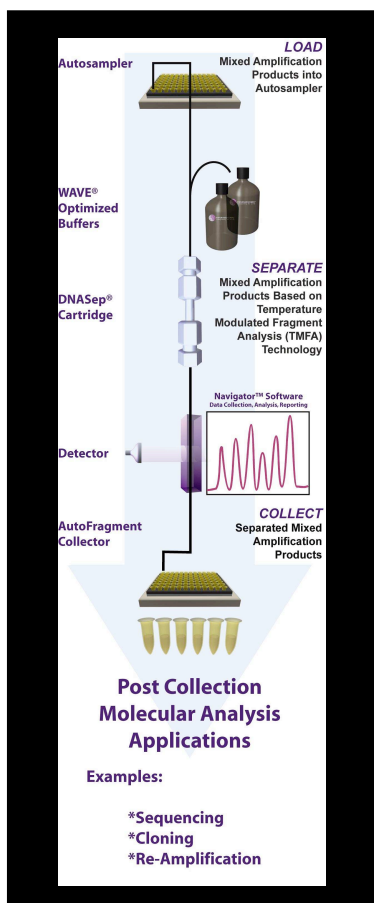
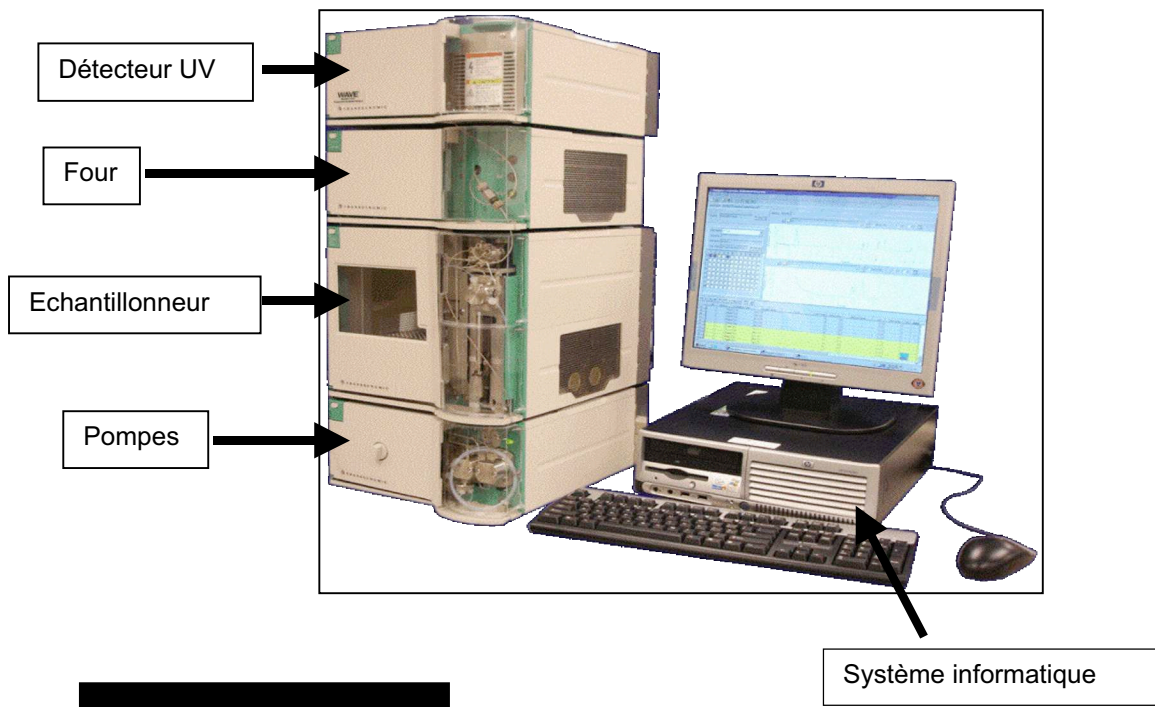
D'un point de vue pratique, une des amorces utilisées pour la PCR (précédant l'application de la TTGE) possède une région riche en GC surajoutée (région dite "clamp-GC"). Ce clamp-GC maintient les 2 brins du produit de PCR associés au cours de la migration. La composition en bases GC du fragment amplifié conditionne la température de dénaturation. Les produits de PCR obtenus avec ces amorces sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide (10 % polyacrylamide urée 8 M) soumis à un gradient de température. Dans ce gradient de température, la vitesse de migration des amplifiats est donc proportionnelle à leur composition en GC. Après migration, les fragments d'intérêt ainsi séparés sont extraits, ré-amplifiés par PCR avec les mêmes amorces (Fungcont 1-3) mais sans clamp-GC et directement séquencés.

4) Caractérisation de l'aérocontamination par chromatographie à température dénaturante ou D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)

Le système D-HPLC WAVE® (Transgenomic™) est un outil précis, automatisé et rapide qui permet de séparer des séquences nucléotidiques ne différant que d'une base. Ce système (figure 5) d'analyse est basé sur le principe de la chromatographie liquide de haute performance. Ce sont la lourdeur, le temps prolongé d'expérimentation et la complexité de l'analyse de la technique PCR-TTGE qui nous ont amenés à tester la PCR-D-HPLC.

Dans le système WAVE®, les fragments d'ADN sont transportés à travers le dispositif de pompage par un tampon (phase liquide ou mobile). Pour observer la séparation des fragments d'ADN amplifié, dans le système D-HPLC est intégrée une colonne greffée d'une phase stationnaire non poreuse composée de poly(styrène-divinylbenzène) alkylé. Cette phase stationnaire est électriquement neutre et hydrophobe (colonne DNASep®). L'ADN, chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates, ne peut donc s'adsorber (se fixer à la surface) de lui-même au niveau de la colonne. Afin de rendre l'adsorption possible, on utilise de l'acétate de triéthylammonium (TEAA), dont les ions ammonium, chargés positivement, interagissent avec l'ADN et les chaînes alkyl, avec la surface hydrophobe de la phase solide. Ce complexe ADN/TEAA sera décroché de la phase stationnaire par un gradient d'acétonitrile de 2 % toutes les minutes. Pour que le système puisse détecter la présence de variations de séquences, il faut réaliser une dénaturation partielle du double brin d'ADN. La température du four dans lequel est placée la colonne doit être déterminée au degré près selon le domaine de fusion étudié. Si celle-ci est trop élevée, l'ADN peut se retrouver en simple brin. La séparation partielle des différents fragments d'ADN est visualisée sous forme de chromatogramme à l'aide de rayons UV ou de la fluorescence.

Après séparation dans la colonne des différents fragments, les pics d'intérêt peuvent être ré-amplifiés par PCR avec les mêmes amorces (Fungcont 1-3) mais sans clamp-GC afin d'être purifiés et directement séquencés.



Echantillonneur

Pompes (mélange de tampons pour neutralisation et élution de l'ADN)

Four (dénaturation partielle de l'ADN)

Observation des pics à partir de Navigator™ Software

Auto-Collecteur de fragments (détecteur UV)

Figure 5: Ensemble du système D-HPLC et son principe.

Article 2 : Characterization of fungal diversity in air samples using broad range PCR-temporal temperature gradient electrophoresis

Adélaïde Nieguitsila, Manjula Deville, Taoufik Jamal, Lénaïg Halos, Madeleine Berthelemy, René Chermette, Sophie Latouche, Pascal Arné, Jacques Guillot

Journal of Microbiological Methods, 2007. 70 : 86-95

Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture

Adélaïde Nieguitsila^{a,b}, Manjula Deville^a, Taoufik Jamal^a, Lénaïg Halos^a,
Madeleine Berthelemy^a, René Chermette^a, Sophie Latouche^b,
Pascal Arné^a, Jacques Guillot^{a,*}

^a INRA, AFSSA, ENVA, UPVM, UMR 956, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

^b Thales Security Systems, Mesdon La Foret, France

Received 4 December 2006; received in revised form 23 March 2007; accepted 28 March 2007

Available online 12 April 2007

Abstract

Information obtained from fungal air samples can assist in the assessment of health hazards and can be useful in proactive indoor air quality monitoring. The objective of the present study was to evaluate the PCR–TTGE technique for the analysis of fungal diversity in the air. Eleven air samples were collected in five different sites using the bioimpactor CIP 10-M (Arelco). After a 2 hours sampling period, the collection liquid was recovered for subsequent cultivation and PCR–TTGE. A set of three fungi-specific primers (Fungcont 1, Fungcont 2+GC and Fungcont 3) was designed for the partial amplification of the 18S rRNA gene. The amplification was obtained in a single reaction tube by a semi-nested PCR. For identification, the TTGE bands were extracted and sequenced. PCR–TTGE allowed the clear separation of amplicons corresponding to distinct fungal species (both Ascomycota and Basidiomycota) that may be encountered in air. The number of fungal taxa detected after culture was systematically higher than the number of taxa found using PCR–TTGE. However, few fungal species were detected by PCR–TTGE and not by cultivation, suggesting that the combination of these approaches may provide a better analysis of fungal diversity in air samples than either method alone.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fungal aerosols; Indoor; Air samples; PCR–TTGE

1. Introduction

Fungal spores represent a significant part of the biological contaminants that could be detected in air. Among the large number of aerosolized fungal species, some are being proposed as a cause of adverse health effects (Cooley et al., 1998; Fung and Hughson, 2003; Johanning et al., 1999; Kauffman et al., 1995; Piecková and Jesenská, 1999; Samson et al., 1994). Exposure to fungal spores or hyphal fragments has been associated with several types of human or animal health problems including irritations, infections, allergies, and toxic

effects. Spores of *Aspergillus fumigatus* pose special risks to neutropenic humans. Spores of *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* generated in damp buildings can cause bouts of asthma and/or rhinitis among atopic occupants (Kauffman et al., 1995; Cramer et al., 2006). Furthermore, it has been suggested that toxigenic fungi are the cause of additional adverse health effects (Dewey et al., 1995; Hintikka, 1978; Johanning et al., 1993; Kuhn and Ghannoum, 2003; Piecková and Jesenská, 1999). *Stachybotrys chartarum*, *Fusarium* spp. or *Aspergillus versicolor* produce toxins, which may be baneful on respiratory system (Etzet et al., 1998; Hodgson et al., 1998; Johanning et al., 1996). In animal facilities, environmental conditions are usually favorable for the development of molds. These environmental conditions may cause adverse health effects in workers (Chang et al., 2001; Lee et al., 2006) and in animals, especially avian species (Tell, 2005; Lair-Fuller et al., 2006).

* Corresponding author. Service de Parasitologie-Mycologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France. Tel.: +33 1 43 96 71 57; fax: +33 1 43 96 71 90.
E-mail address: jguillot@vet-alfort.fr (J. Guillot).

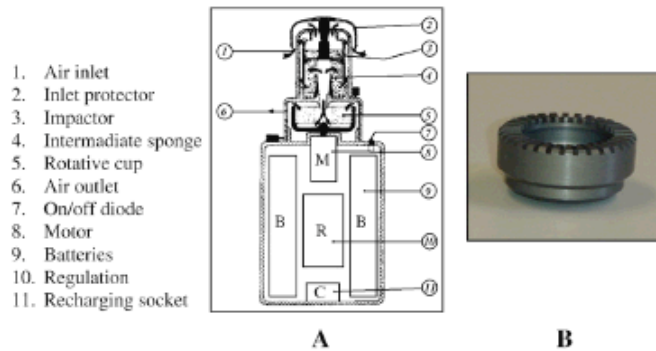


Fig. 1. Diagram of the rotating cup apparatus CIP 10-M (Areko Company) (A); closer view of the rotative cup (B).

To evaluate the relationship between fungal aerosols and potential for adverse health effects in humans and animals, the fungal species and their relative frequencies in air need to be known. Traditional methods of fungal identification include culture and microscopic analysis. However, these methods are laborious, time-consuming and require a competent mycological expertise. In addition, some fungal species are non-culturable or are unable to produce classical structures under

laboratory conditions that are necessary for identification. To circumvent the cultivation limits, several molecular techniques have been proposed: specific assays using single-step PCR, nested PCR and PCR followed by Southern blotting and probing (Williams et al., 2001), ribosomal DNA (rRNA gene) sequencing, rRNA gene restriction analysis (Wu et al., 2003). Techniques based on mass spectrometry (Szponar and Larson, 2001) and flow cytometry (Prigione et al., 2004) have also been

Table 1
List of primers sets evaluated in the present study

Primer name (and sequence 5' to 3')	Amplified region	Fragment size (bp)	PCR type	Reference or source
Yuniv1+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G AGC CTG AGA AAC GGC TAC CAC)	18S rDNA	244	Simple	Hernán-Gómez et al. (2000)
Yuniv3 (TTC AAC TAC GAG CTT TTT AA)				
NLI+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG)	28S rDNA	640	Simple	Marshall et al. (2003)
NL4 (GGT CCG TGT TTC AAG ACG G)				
EF4 (GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG)	18S rDNA	250	Semi-nested	Smit et al. (1999)
EF3 (TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG)				
FUNG5 (GTA AAA GTC CTG GTT CCC C)				
NS3+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC)				
NS1 (GTA GTC ATA TGC TTG TCT C)	18S rDNA	545	Nested	Theelen et al. (2001)
NS8 (TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA)				
NS2+10 (GAA TTA CCG CGG CTG CTG GC)				
NS1+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GTA GTC ATA TGC TTG TCT C)				
FF1+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GTT AAA AAG CTC GTA GTT GAA C)	18S rDNA	425	Semi-nested	Zhou et al. (2000)
FF2 (GGT TCT ATT TTG TTG GTT TCT A)				
FR1 (CTC TCA ATC TGT CAA TCC TTA TT)				
NLI+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG)	28S rDNA	244	Simple	Marshall et al. (2003)
NLI-A (CCC AAA CAA CTC GAC TC)				
Fungcont 1 (CTC GCA TCG ATG AAG AAC)	18S rDNA	350	Semi-nested in one single reaction tube	This work
Fungcont 2+GC (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G GGG TAA TCC CAC CTG ATT)				
Fungcont 3 (CCG CTT ATT GAT ATG CTT)				

Original primers Fungcont 1–3 were finally selected for the PCR–TTGE technique.

Table 2
List of fungal isolates used for the selection of PCR primer sets and the adjustment of DNA extraction conditions (see Fig. 2)

Isolate	TTGE fragments no.	Closest sequence relative (species)	Genbank accession no.	% Identity
A	1 and 2	<i>Aspergillus versicolor</i>	AY373882.1	94
B	3 and 4	<i>Penicillium thiersii</i>	DQ532125.1	100
C	5	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	AJ131681.1	98
D	6 and 7	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	AY625065.1	98
E	8	<i>Aspergillus flavus</i>	AY939785.1	99
F	9 and 10	<i>Fusarium culmorum</i>	AY147334.2	99
G	11	<i>Penicillium commune</i>	AY373905.1	99
H	12 and 13	<i>Absidia glauca</i>	AY944881.1	92
I	14 and 15	<i>Acremonium crocicinigenum</i>	AJ621773.1	94
J	16 and 17	<i>Fusarium culmorum</i>	AY147334.2	99
K	18	<i>A. flavus</i>	AY939785.1	99
L	19 and 20	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	AY625065.1	98
M	21 and 22	<i>Alternaria gaisen</i>	AY762944.1	99
N	23	<i>C. keratinophilum</i>	AJ131681.1	98
O	24 and 25	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AY373851.1	100
P	26	<i>Paecilomyces variotii</i>	AF033395.1	100
Q	27, 28 and 29	<i>Fusarium sp.</i>	AY633561.1	99
R	30 and 31	<i>Penicillium solitum</i>	AY373932.1	99

described. All these studies suggested that our current understanding of fungal diversity may be inadequate.

Molecular methods currently used to study microbial communities include broad-range PCR, using primers that target highly-conserved regions of genes allowing the simultaneous amplification of DNA from large groups of microorganisms present in one sample in a single-step. The different amplicons are then subsequently separated with sequence-specific separation tools such as SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), TTGE (Temporal Temperature Gradient

Gel Electrophoresis) and DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). DGGE and TGGE have already been applied to elucidate fungal populations structures in different environments: the soil (Heuer and Smalla, 1997; Pennanen et al., 2001), wine (Cocolin et al., 2000; Hemán-Gómez et al., 2000), wood (Van Elsas et al., 2000; Vaino and Hantula, 2000), rhizospheres of marram grass (Kowalchuk et al., 1997), vanilla curing and corn silage (Röling et al., 2001; May et al., 2001), maize and wheat (Ben Omar and Anpe, 2000; Smit et al., 1999). DGGE, TGGE and TTGE are based on same principle. These techniques allow the separation of PCR products on the basis of the decreased electrophoretic mobility of partially melted double-stranded DNA molecules in polyacrylamide gels. For DGGE, the polyacrylamide gel is composed of a linear gradient of DNA denaturants (a mixture of urea and formamide) in a bath at a constant temperature. For TGGE and TTGE, the polyacrylamide gel includes a constant of DNA denaturant but PCR products are separated along a linear temperature gradient. Temperature gradient denaturing gradient gel electrophoreses (TGGE and TTGE) were suggested to remove the disadvantages of DGGE by avoiding both the draw backs of laborious optimization procedure and the need for casting a chemical denaturing gradient (Borrensen-Dale et al., 1997; Shina et al., 2001). TGGE replaces the spatial chemical denaturing gradient by using a spatial temperature gradient and TTGE replaces it by using a temporal temperature denaturing gradient. These two last methods have very similar characteristics and the differences are only related to the apparatus providing spatial or temporal temperature gradient.

The objective of the present study was to evaluate the PCR–TTGE method for the characterization of fungal diversity in air. Samples were collected in five sites, which have been selected because they were supposed to be contaminated by different

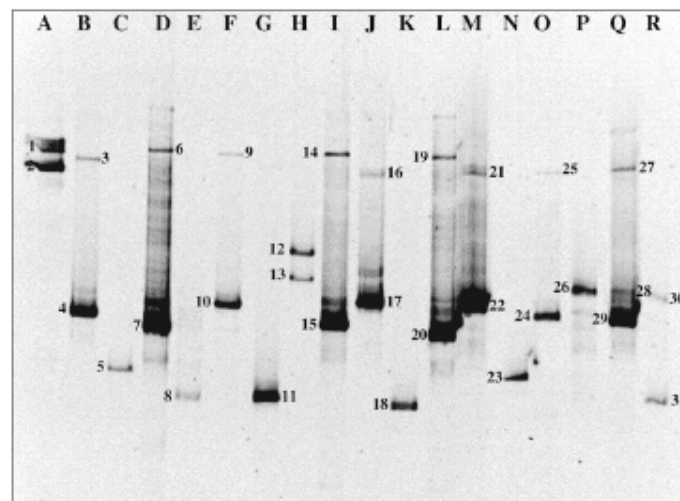


Fig. 2. TTGE of PCR amplicons of 18S rDNA fragments representing the fungal isolates. PCR Primers Fungcont 1–3 were used. The following species were tested: strain A *Aspergillus versicolor*; strain B *Penicillium thiersii*; strain C *Chrysosporium keratinophilum*; strain D *Scopulariopsis brevicaulis*; strain E *Aspergillus flavus*; strain F *Fusarium culmorum*; strain G *Penicillium commune*; strain H *Absidia glauca*; strain I *Acremonium crocicinigenum*; strain J *F. culmorum*; strain K *A. flavus*; strain L *S. brevicaulis*; strain M *Alternaria gaisen*; strain N *C. keratinophilum*; strain O *A. fumigatus*; strain P *Paecilomyces variotii*; strain Q *Fusarium sp.*; strain R *Penicillium solitum*.

types of aerosolized fungal organisms. At those sites, we used the air sampler CIP 10-M (*Capteur Individuel de Poussières Microbiologiques*). This device allows the collection of air particles in a liquid that could be used for subsequent cultivation and molecular analyses. For PCR–TTGE, broad-range primers for aerosolized fungal species were designed. The range of species that could be amplified by the primers was tested with a collection of different fungal isolates from all major groups (Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota). Primer sets were subsequently used to generate PCR products from air samples. TTGE results were complemented by sequencing of PCR products and compared to mycological culture results, which were used as control.

2. Materials and methods

2.1. Sampling site selection

Five sampling sites were selected because the air fungal diversity was expected to be high: a cowshed and a stable at the veterinary school of Alfort, a metropolitan station in Paris and two henhouses with static ventilation. In the cowshed and the stable, animals (sheep and horses, respectively) were housed and stocks of straw were maintained. Each henhouse held about 4300 chickens (4 week-old females or males, respectively).

2.2. Air sampling procedure

Air samples were obtained using the bioimpactor CIP 10-M (*Capteur Individuel de Poussières Microbiologiques*) (Courbon et al., 1988) (Arelco company, Fontenay-sous-Bois, France). This device, described in Fig. 1, was originally validated for the detection of the non-culturable fungi of the genus *Pneumocystis* (Guillot et al., 1999). CIP 10-M has been recently used for the characterization of exposure to fungi by measurement of ergosterol in air (Robine et al., 2005). The ambient air is aspirated at a sampling flow rate of 10 L/min via a selector. Particles are aspirated, then driven by centrifugal force toward a liquid collection layer, maintained inside the rotative cup. The air is then exhausted via a tangential outlet on the wall of the apparatus. The configuration of CIP 10-M causes minimal stress of mechanical impaction or pressure shock. The sampler exhibits a physical efficiency >50% for >1.8 µm in aerodynamic diameter, and >95% for particles >2.8 µm (Gorner et al., 2006). In the present study, the rotative cup was filled with 2 mL of sterile water. The CIP 10-M was placed at 1 m from the floor in a vertical position. The sampling duration was 120 min. After each sampling period, 1.5 mL of the collection liquid was recovered for subsequent cultivation and molecular analysis. For mycological culture, 0.5 mL of the liquid was immediately used. For molecular analysis, 1 mL was stored at –80 °C until use (a few days after the air sampling). After each sampling period, the rotative cup was first washed with alcohol and then with sterile water and dripped dry.

One air sampling (1200 L) was made in the cowshed and the metropolitan station. Three air samples were obtained at one

month intervals in the stable. Six air samplings were performed in the henhouses (the same day).

Each of the 11 air sample was analyzed by PCR–TTGE and cultivation.

2.3. DNA extraction

Several extraction methods and commercial kits were tested (Fast DNA Spin kit for soil; T1, NucleoSpin®Tissue, Hoerd, France). We finally selected a protocol, which included the use of a bead beater and the commercial kit NucleoSpin®Tissue. 1 mL of the collection liquid collected from the rotative cup was placed in a 2 mL sterile microtube containing 2 sterile microbeads (4 mm diameter) (Qiagen, Courtabeuf, France) and sand. Each tube was cooled at –80 °C for 1 h and crushed by shaking with a bead beater (mixer mill MM301, Qiagen, Courtabeuf, France) for 2 cycles of 15 min at a frequency of 20 Hz. DNA was further extracted using the NucleoSpin®Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

2.4. Polymerase chain reaction

To obtain fungi-specific amplicons suitable for TTGE, seven primer sets have been tested (Table 1). For the first six primer

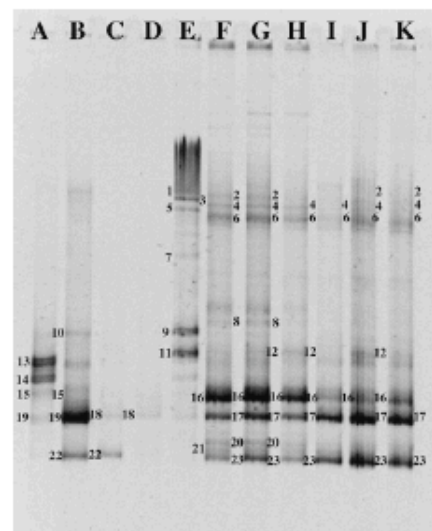


Fig. 3. TTGE of PCR amplicons of 18S rDNA fragments representing the fungal biodiversity in air samples. A, B, C: stable; D: cowshed; E: metropolitan station in Paris; F, G, H, I, J, K, I: henhouses. After purification and sequencing, the following species were identified: *Alternaria infectoria* (band 22), *Alternaria* sp. (band 23); *Alternaria tritici* (band 18); *Arthrinium* sp. (band 12); *Ascochyta* sp. (band 10); *Aspergillus caesiellus* (band 20); *Bulleromyces albus* (band 9); *Candida catenulata* (band 2); *Cladosporium cladosporioides* (band 15); *Cladosporium* sp. (bands 6 and 17); *Cochliobolus heterostrophus* (band 21); *Dioszegia hungarica* (band 7); *Eurotium rubrum* (bands 8 and 16); *Fusarium arthrosporioides* (band 13); *Paecilomyces variotii* (band 11); *Penicillium* sp. (band 4); *Physcia aiopolia* (band 19); *Sepedonium chakipori* (band 14); *Sporobolomyces jilinensis* (band 3); *Sporobolomyces roseus* (bands 1 and 5).

Table 3
List of fungal species identified by cultivation or PCR–TTGE from air samples

Sampling site	Fungal species identified from air samples ^a		
	by cultivation (CFU / m ³) ^b	by PCR–TTGE (fragment size, GenBank sequence identity)	
Stable (samples A, B & C)	<i>Acremonium strictum</i> (-; 17; -)		
	<i>Alternaria</i> sp. (-; 29; 43)	<i>Alternaria infectoria</i> (347 bp, Y17066 99%) <i>Alternaria triticina</i> (334 bp, AY278834 99%)	
	<i>Arthonia sardoa</i> (-; 6; -)	<i>Ascochyta</i> sp. (334 bp, AY305377 100%)	
	<i>Aspergillus fumigatus</i> (17; 6; 29)		
	<i>Aspergillus niger</i> (-; 6; -)		
	<i>Aspergillus</i> sp. (35; 17; -)		
	<i>Aspergillus versicolor</i> (-; 11; -)		
	<i>Bulleromyces albus</i> (-; 6; 14)		
	<i>Cladosporium herbarum</i> (-; 11; -)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (347 bp, AY361994 100%)	
	<i>Fusarium proliferatum</i> (26; 11; 29)	<i>Fusarium arthrosporioides</i> (334 bp, AF111065 97%)	
	<i>Glomerella cingulata</i> (-; 6; -)		
	<i>Mucor circinelloides</i> (-; 11; -)		
	<i>Mucor</i> sp. (17; -; -)		
	<i>Parmelia saxatilis</i> (-; 6; -)		
	<i>Paecilomyces variotii</i> (-; 11; -)		
	<i>Penicillium commune</i> (26; 11; 43)		
	<i>Penicillium griseofulvum</i> (-; 11; -)		
	<i>Protoblastenia calva</i> (-; 6; -)	<i>Physcia aipolia</i> (321 bp, AY3031 35 100%)	
	<i>Scutellinia</i> sp. (-; 6; -)	<i>Sepedonium chalcipori</i> (351 bp, AF054865 93%)	
	<i>Rhizopus</i> sp. (35; -; -)		
	<i>Trichoderma</i> sp. (17; 11; 14)		
	Cowshed (sample D)	<i>Alternaria alternata</i> (37)	<i>A. triticina</i> (334 bp, AY278834 99%)
		<i>Aspergillus</i> sp. (37)	
<i>F. proliferatum</i> (25)			
<i>P. griseofulvum</i> (25)			
<i>Penicillium</i> sp. (37)			
<i>Trichoderma</i> sp. (12)			
Metropolitan station (sample E)	<i>Aspergillus flavus</i> (25)		
	<i>Aspergillus nidulans</i> (37)		
	<i>Aspergillus</i> sp. (37)	<i>B. albus</i> (347 bp, AB093527 98%) <i>Dioszegia hungarica</i> (347 bp, AB049614 99%) <i>Paecilomyces variotii</i> (334 bp, AY373941 100%)	
	<i>Penicillium mangini</i> (25)		
	<i>Penicillium</i> sp. (50)	<i>Sporobolomyces jilinensis</i> (321 bp, AY364838 97%) <i>Sporobolomyces roseus</i> (351 bp, AB030351 100%)	

When results were in accordance (at the fungal genus level), species have been framed.

^a when several air samples were collected in the same site, cultivation and PCR–TTGE results were pooled (in the two corresponding columns).

^b >200: uncountable colonies. -: below the detection threshold of the sampling techniques.

sets, PCR conditions were in accordance with previous studies (Hemán-Gómez et al., 2000; Marshall et al., 2003; Smit et al., 1999; Theelen et al., 2001; Zhou et al., 2000). For the present study, we decided to design a new set of primers (Fungcont1–3). For that purpose the following primer design procedure was adopted: a small 18S rRNA sequences database was constituted from GenBank. The database included 40 different fungal species (Ascomycota, Basidiomycota or Zygomycota), which are commonly detected in air. The sequences were aligned using Clustal X software (version 1.63b, December 1997) (Thompson

et al., 1997) and the primers were selected in highly-conserved regions. The best combination of primers was determined using Oligo 4.0 software. The composition of the primers is the following: Fungcont 1 (5'-CTC GCA TCG ATG AAG AAC-3'); Fungcont 2 (5'-GGG TAA TCC CAC CTG ATT CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G-3'); Fungcont 3 (5'-CCG CTT ATT GAT ATG CTT-3'). These primers were used in a semi-nested PCR in a single reaction tube. They allowed the amplification of 350 bp amplicons from 18S rRNA fungal sequences. Primer Fungcont 2 contained a 5'-

Table 3 (continued)

Sampling site	Fungal species identified from air samples ^a	
	by cultivation (CFU / m ³) ^b	by PCR-TTGE (fragment size, GenBank sequence identity)
Henhouses (samples F, G, H, I, J & K)	<i>A. strictum</i> (-; -; >200; -; -; 7)	
	<i>Alternaria oregonensis</i> (-; -; -; 10; 9; -)	
	<i>Alternaria</i> sp. (-; 31; -; > 200; > 200; > 200)	<i>Alternaria</i> sp. (343 bp, AY305368 96%)
	<i>Arthrinium sacchari</i> (-; -; -; 9; 7)	<i>Arthrinium</i> sp. (346 bp, AY425967 95%)
	<i>A. flavus</i> (17; -; 12; -; -; -)	<i>Aspergillus caesiellus</i> (347 bp, AY373865 97%)
	<i>A. fumigatus</i> (14; 17; 21; 23; 24; 26)	
	<i>A. nidulans</i> (12; 15; 26; 32; >200)	
	<i>Aspergillus</i> sp. (-; >200; -; -; -; 14)	
	<i>A. versicolor</i> (-; 23; 24; -; -; 7)	
	<i>B. albus</i> (-; -; -; -; 7)	
	<i>Candida catenulata</i>	
	(>200 ; > 200; > 200; > 200; > 200)	<i>C. catenulata</i> (347 bp, AY493436 99%)
	<i>Chrysomya</i> sp. (-; -; -; 9; -)	
	<i>Cladosporium</i> sp. (-; -; -; 9; 7)	<i>Cladosporium</i> sp. (334 bp, AY305374 98%)
		<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (321 bp, BQ491489 90%)
	<i>Cordyceps bassiana</i> (-; -; -; 9; -)	
		<i>Eurotium rubrum</i> (351 bp, AY373891 98%)
	<i>Fusarium oxysporum</i> (-; -; -; -; 14)	
	<i>Lophodermium niteus</i> (-; -; -; 7; -)	
	<i>Mucor</i> sp. (17; -; -; -; -)	
<i>P. variotii</i> (17; 15; 24; 10; 9; -)		
<i>Penicillium roquefortii</i> (-; -; 12; -; -; -)		
<i>Penicillium</i> sp. (17; -; -; 21; 17; 21)	<i>Penicillium</i> sp. (332 bp, AF177739 100%)	
<i>Penicillium viridicatum</i> (-; -; 12; -; -; -)		
<i>Rhizopus oryzae</i> (17; 23; 18; -; -; -)		
<i>Scopulariopsis</i> sp. (-; -; -; 10; 9; -)		
<i>Sporobolomyces</i> sp. (-; -; -; -; 7; -)		

GC clamp for direct melting during TTGE. Each reaction was carried out in 50 μ L volume containing 2 pM of each primer, 2.5 mM of each dNTP, 0.9X PCR buffer, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Takara, Saint Germain en Laye, France) and 5 μ L of the DNA extract. To check for the presence of DNA inhibitors, DNA samples were used at the following dilutions: 1/1, 1/10, 1/100 and 1/1000. All PCR were performed in a Genamp thermocycler (Applied biosystem, Courtabeuf, France) with one cycle of denaturation (2 min, 95 °C), followed by 25 cycles of denaturation (30 s, 95 °C), annealing (30 s, 50 °C) and extension (1 min, 72 °C) and a final extension step (10 min, 72 °C). To avoid contamination, solutions were prepared with sterile and double distilled water and preparation of the mastermix, addition of template and gel electrophoresis of PCR products were carried out in separate rooms. DNA electrophoresis was carried out in 2% agarose gels containing ethidium bromide, and DNA fragments were visualized under ultraviolet light.

To adjust DNA extraction conditions and confirm the ability of Fungcont1-3 primers to amplify fungal DNA, we selected 18 isolates from the collection of the Mycology laboratory at the Veterinary College of Alfort (Table 2). These isolates represented some major fungal species that propagate via aerosolized conidia. Each isolate was maintained on Sabouraud dextrose agar (supplemented with 0.5 g of chloramphenicol) and subcultured at 27 °C for several days to two weeks, until sufficient hyphal growth and sporulation was observed.

DNA from these fungal isolates was extracted as described above.

2.5. Temporal Temperature Gradient Electrophoresis

For sequence-specific separation of PCR products, the TTGE DCode System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used. 8 μ L of each PCR-amplified fragments were added to 8 μ L of loading buffer (0.5 g L⁻¹ bromophenol blue, 0.5 g L⁻¹ xylene cyanol, 70% glycerol in dH₂O) and loaded onto the TTGE apparatus. Ten percent polyacrylamide gels (per 60 mL) were composed of 10% acrylamide–bisacrylamide (37.5:1), 1.25X Tris–acetate–EDTA buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8), 2.94 M urea, 55 μ L of *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 9.2% ammonium persulfate. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 80 V and with a temperature gradient of 55 °C to 63 °C and a temperature ramp rate of 1 °C/h were applied in 1.25X Tris–acetate–EDTA buffer. After electrophoresis, the gel was stained for 30 min in SYBR Gold nucleic acid gel stain (Amresco, Solon, USA). Gels were digitized using a gel Doc system (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France).

2.6. DNA sequencing and data analysis

TTGE bands were excised and the DNA was eluted with 50 μ L of elution buffer EB (Qiaquick PCR purification kit,

Qiagen, Courtabeuf, France) for 3 h at 58 °C before PCR amplification with the same primer set except that the primer Fungcont 2 was used without the GC clamp. The reaction conditions were similar to those described above. PCR products were purified and concentrated with a QIAquick spin PCR purification kit (Qiagen, Courtabeuf, France). PCR products were sequenced by Qiagen Genomic Services (Sequencing Services, Hilden, Germany).

18S rRNA sequences were compared with known sequences listed in the GenBank nucleotide sequence databases. The BLAST search option of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to search for close evolutionary relatives in the GenBank database (Altschul et al., 1990).

2.7. Culture and mycological identification

For fungal cultures, we used Petri dishes filled with malt extract agar (20 g of malt extract [Fluka, Biochemika]; 1 g of peptone [Difco]; 20 g of glucose; 15 g of agar-agar [Labosi] and 0.5 g of chloramphenicol). The collection liquid recovered from the CIP10-M cup was poured onto the surface of the medium and incubated at 27 °C for 10 days. Molds were subcultured and identified by their macroscopic and microscopic appearance after lactophenol cotton blue staining (de Hoog et al., 2000). Yeasts were subcultured and identified with the 32C API system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Specific identifications were systematically confirmed by partial sequencing of 18S fungal rRNA gene. For each isolate, DNA was extracted and the PCR amplification was performed with the same procedures as that developed for air samples (except that the PCR primers were used without a GC clamp).

3. Results

3.1. Primer set selection

Seven primer sets (Table 1) have been tested using DNA from air samples and DNA from representative fungal species (Table 2). The primer sets already described in the literature did not provide satisfactory results. Some primers did not allow the amplification of all fungal species (especially Mucorales). When other primers (Yuniv1-3, for example) were used for PCR-TTGE from air samples, they amplified DNA from non fungal eukaryotes. Original primers Fungcont 1/Fungcont 2+GC/Fungcont 3 allowed the amplification of 350 bp amplicons in 18S rRNA fungal sequences from all representative fungal species (Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota) (Table 1). When they were tested with air samples, they yielded fungal products.

3.2. TTGE fingerprints

Using a semi-nested PCR approach with Fungcont 1/Fungcont 2+GC/Fungcont 3 primers, we were able to perform a TTGE analysis of 18S rRNA fragments from single fungal

isolates (Fig. 2) and mixtures of fungal organisms from air samples (Fig. 3). Each fungal isolate was characterized by one to three bands in TTGE analysis. Sequencing confirmed that the band(s) obtained for each isolate corresponded to a unique sequence in accordance with the specific identification of the isolate (Table 1). Fingerprints from air samples collected in the stable, the cowshed, the metropolitan station or the henhouses were different. Each TTGE fingerprint (from a representative fungal isolate or from an air sample) was highly reproducible (data not shown). Fingerprints were similar when DNA samples were used at dilutions 1/1, 1/10, 1/100 and 1/1000, suggesting absence of PCR inhibitors in air. The identification results obtained by sequence analysis and subsequent nBLAST comparisons are reported in Tables 2 and 3. All TTGE sequenced bands corresponded to fungal DNA sequences. Bands from different lanes but with similar electrophoretic migration pattern corresponded to the same sequence (Fig. 3). The presence of several bands for the same 18S sequence was sometimes observed in TTGE fingerprints from air samples. A total number of 20 distinct fungal taxa were detected from air samples. These taxa represented 16 different fungal genera (13 Ascomycota and 3 Basidiomycota). No member of the Zygomycota was detected with TTGE analysis. *Alternaria* spp. (bands 18, 22 and 23) and *Cladosporium* spp. (bands 6, 15 and 17) were identified in fingerprints from different sampling sites. Other fungal taxa were detected only once. Henhouses were the sampling sites where the greatest diversity of fungal taxa could be detected (8 different taxa representing 8 distinct genera). On the opposite, the TTGE fingerprint from the cowshed was characterized by a single band (*Alternaria triticea*).

3.3. Cultivation results

Mycological cultures allowed the isolation of 21, 6, 5 and 24 fungal taxa from air samplings in the stable, the cowshed, the metropolitan station and the henhouses, respectively (Table 3). These isolates belonged to 23 different genera of the Ascomycota, one genera of the Basidiomycota and two genera of the Zygomycota. All these taxa represent common aerosolized organisms. Taxa of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated from all air samples.

4. Discussion

Indoor air quality has become an area of major concern in recent years (Cooley et al., 1998; Fung and Hughson, 2003; Johanning et al., 1999; Kauffman et al., 1995; Piecková and Jesenská, 1999; Samson et al., 1994). Increased understanding of fungal populations in air should enable better interpretation of fungal exposure found in air quality investigations in building or animal facilities. In the present study, fungal populations were assessed by two different techniques: mycological culture which is still considered as the gold standard technique and an original molecular method based on the separation of amplicons in a polyacrylamide gel under a denaturing temperature gradient (TTGE).

4.1. Air sampling procedure

A large number of sampling devices have been used for the detection of fungi in air. The CIP 10-M was selected for the present study because it allows both culture and molecular analysis from the same air samples. This sampler is light and offers full work shift autonomy. Furthermore, CIP 10-M limits the mechanical stress on aerosolized microorganisms (Gorner et al., 2006). Its sampling flow rate of 10 L/min is much lower than that of other air samplers but with a sampling duration as long as 120 min, the CIP 10-M allowed the recovery of a large number of different fungal taxa from the stable, the cowshed, the henhouses and the metropolitan station.

4.2. DNA extraction and PCR amplification

Conidia have strong cell walls, which are often resistant to traditional DNA extraction procedures (Van Burik et al., 1998; Cenis, 1992; Prosser, 2002). These difficulties have led to time-consuming (Blanchard and Nowotny, 1994) and expensive extraction methods involving ultracentrifugation (Specht et al., 1982) or column chromatography (Saunders et al., 1984). Many of these methods are not suited for routine analyses, where processing many samples simultaneously may be necessary. In the present study, we used the fine crushing with beads beater and DNA extraction with a commercial kit. The bead beater is considered as a convenient, rapid and very efficient device for disrupting fungal spores (Zhou et al., 2000; Kim et al., 1999; Haugland et al., 1999; Vaitilingom et al., 1998).

The other limitation in investigating fungal diversity in air samples is the suitability of available PCR primers. None of the already published primer sets were proved to be satisfactory for the present investigation. As a consequence, the challenge has been to design primers able to amplify as broad a taxonomic range of fungi as possible, but at the same time to prevent amplification of closely related eukaryotic DNA present in air samples. Primers Fungcont 1–3 allowed the amplification of 18S rRNA sequences from diverse fungal species, including members of the Ascomycota, Basidiomycota or Zygomycota. Using the three primers in a single reaction tube limited the risk of contamination.

4.3. TTGE fingerprints

DGGE, TGGE and TTGE have been the most widely adopted fingerprinting techniques in bacterial as well as fungal ecology in the last years (Anderson and Cairney, 2004). Most investigations concerned the analysis of soil microbial communities. The present study is the first one to use TTGE technique for the analysis of fungal diversity in the air. As already described, the technique benefits from the ability to analyze and compare several samples on a single gel and to investigate shifts or changes in community composition. The other advantage of TTGE technique is the ability to excise and sequence bands of interest. It has been shown that the intensity of bands in TTGE corresponded semiquantitatively with the abundance of species (Muyzer et al., 1993).

One of the main disadvantages of the TTGE technique is the formation of more than one band for a single rRNA sequence. We observed this phenomenon with reference isolates as well as some air samples. A similar situation has been reported in other investigations (Ferris and Ward, 1997; Fromin et al., 2002; Gadanho and Sampaio, 2004). This is probably caused by secondary structures formed in the DNA during electrophoresis (Anderson and Cairney, 2004; Doare-Lebrun et al., 2006).

4.4. Comparison of TTGE and cultivation results

The present investigation clearly demonstrated that the fungal diversity detected by TTGE was much lower than that revealed by culture. This result may be related to the inherent limitation of TTGE technique. First of all, preferential amplification of particular fungal groups from mixed community DNA samples could not be excluded. Although primer bias is an acknowledged problem (Smit et al., 1999) the potential bias associated with Fungcont 1–3 is difficult to estimate from our data set. Targeted investigations using defined template mixtures or synthetic fungal communities are still required. The second limitation associated with TTGE is the lack of sensitivity of conventional gel staining methods. It has been suggested that even the most sensitive staining methods may not be suitable to detect all the diversity present in a sample. Furthermore, single TTGE bands have been shown to comprise more than a single sequence (Anderson and Cairney, 2004).

The present investigation also demonstrated that fungal taxa detected by TTGE were different from pure cultures isolated on malt agar chloramphenicol in many instances. The same genera were detected by culture and TTGE in only 3 cases for air samples from the stable, in one case for the air sample from the cowshed and in six cases for air samples from the henhouses (Table 3). There was no similarity at all between TTGE and culture results for the air sample from the metropolitan station. This remains a surprising result even though the targets of the two detection methods are different. Cultivation allowed the detection of fungal taxa which were initially represented by viable conidia and which were able to grow on the selected mycological medium. We may imagine that DNA from non-viable conidia or fragments of hyphae could be amplified and identified by TTGE. This represents a major advantage for investigations about allergenic or toxigenic risks related to fungal aerocontamination. The fact that most of the cultured species (especially *Aspergillus*, *Penicillium* or Zygomycota) could not be detected by TTGE may be related to the different steps of the molecular technique. DNA extraction may not have the same efficiency according to the different types of conidia (size, shape, wall thickness, etc). The primer bias could not be excluded. Furthermore, the number of rRNA operon is known to vary according to the different fungal species (Hibbet, 1992). All these variations complicate the quantification of different fungal species in a mixed DNA pool. The presence of DNA inhibitors is unlikely as PCR–TTGE results were similar when DNA from air samples were diluted.

In conclusion, the present study demonstrated that there was no clear correlation between cultivation and PCR–TTGE results.

Cultivation was proved to give a much better overview of fungal diversity in air than did PCR–TTGE but the molecular detection may in some circumstances provide additional information by identifying non cultivable or non viable fungal elements. The combination of traditional methods and culture-independent techniques would certainly increase our understanding of fungal communities in air.

Acknowledgements

The authors are grateful to Christian Champion from Arelco Company for providing the CIP 10-M impactor. They also thank Valérie Bex from the Laboratoire d'Hygiène de Paris for giving the opportunity to examine one air sample from a metropolitan Station. This study was supported by a grant from the Association Nationale de la Recherche Technique (CIFRE convention 016/2005).

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769–779.
- Ben Omar, N., Ampe, F., 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3664–3673.
- Blanchard, M.M., Nowotny, V., 1994. High-throughput rapid yeast DNA extraction. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 11, 7–11.
- Borrensen-Dale, L.A., Lydstad, S., Langerød, A., 1997. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) compared with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and constant denaturing gel electrophoresis (CDGE) in mutation screening. *Bioradition* 99, 12–13.
- Cenis, J.L., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20, 2380.
- Chang, C.W., Chung, H., Huang, C.F., Su, H.J., 2001. Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 155–161.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 81–87.
- Cooley, J.D., Wong, W.C., Jumper, C.A., Straus, D.C., 1998. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup. Environ. Med.* 55, 579–584.
- Courbon, P., Wrobel, R., Fadriès, J.F., 1988. A new individual respirable dust sampler: The CIP 10. *Ann. Occup. Hyg.* 32, 129–143.
- Cramer, R., Weichel, M., Fluckiger, S., Glaser, A.G., Rhyner, C., 2006. Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chem. Immunol. Allergy* 91, 121–133.
- de Hoog, G.S., Gene, J., Figueras, M.J., 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands.
- Dewey, S., Sagnowski, H., Palgrem, U., Willeboer, B., 1995. Microbial volatile organic compounds: a new approach in assessing health risk by indoor mould? *Zbl. Hyg.* 197, 504–515.
- Doare-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pemelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis — potentialities and limits of the method. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1340–1350.
- Etzel, R.A., Montano, E., Sorenson, W.G., Kullman, G.J., Allan, T.A., Dearborn, D.G., 1998. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 152, 757–762.
- Ferris, M.J., Ward, D.M., 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1375–1381.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvellé, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of Denaturing Gel Electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4, 634–643.
- Fung, F., Hughson, W.G., 2003. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 18, 535–554.
- Gadinho, M., Sampaio, J.P., 2004. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus River, Portugal. *FEMS Yeast Res.* 5, 253–261.
- Gorner, P., Fabries, J.F., Daquenne, P., Witschger, O., Wrobel, R., 2006. Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. *J. Environ. Monit.* 8, 43–48.
- Guillot, J., Berthelemy, M., Polack, B., Lainé, V., Lacube, P., Chermette, R., Roux, P., 1999. Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, S94.
- Haugland, R.A., Heckman, J.L., Wymser, L.J., 1999. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J. Microbiol. Methods* 37, 167–176.
- Hernán-Gómez, S., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F., 2000. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 45–50.
- Heuer, H., Smalla, K., 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 353–373.
- Hühbet, D.S., 1992. Ribosomal RNA and fungal systematic. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 33, 533–556.
- Hintikka, E.L., 1978. Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem. In: Rodrick, J.V., Hesselstine, G.W., Mehlman, M.A. (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, pp. 277–284.
- Hodgson, M.J., Morey, P., Leung, W.Y., Morrow, L., Miller, D., Jarvis, B.B., Robbins, H., Halsey, J.F., Storey, E., 1998. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *J. Occup. Environ. Med.* 68, 207–218.
- Johanning, E., Morey, P.R., Jarvis, B.B., 1993. Clinical-epidemiological investigation of health effects caused by *Stachybotrys atra* building contamination. *Proc. Indoor Air* 1, 225–230.
- Johanning, E., Biagini, R., DeLem, H., Morey, P., Jarvis, B., Landsbergis, P., 1996. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68, 207–218.
- Johanning, E., Landsbergis, P., Gareis, M., Yang, C.S., Olmsted, E., 1999. Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environ. Health Perspect.* 107, 489–494.
- Kauffman, H.F., Tomasz, J.F.C., van der Werf, T.S., de Monchy, J.G.R., Koeter, G.K., 1995. Review of fungus-induced asthmatic reaction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 2109–2116.
- Kim, S.H., Uzunovic, A., Breuil, C., 1999. Rapid identification of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 287–290.
- Kowalkuk, G.A., Gerards, S., Woldendorp, J.W., 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Amomphila arenaria* (Marram Grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3858–3865.
- Kuhn, D.N., Ghannoun, M.A., 2003. Indoor mold toxigenic fungi and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 144–172.
- Lair-Fulleriger, S., Seguin, D., Warin, S., Desterque, C., Arné, P., Chermette, R., Bretagne, S., Guillot, J., 2006. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poult. Science* 85, 1875–1880.
- Lee, S.A., Adhikari, A., Grinslun, S.A., McKay, R., Shukla, R., Repmen, T., 2006. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 118–130.
- Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., VanderGheynst, J.S., 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *J. Appl. Microbiol.* 95, 934–948.

- May, L.A., Smiley, B., Schmidt, M.G., 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can. J. Microbiol.* 47, 829–841.
- Mayzer, G., deWaal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Penanen, T., Paavola, L., Hantula, J., 2001. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biol. Biochem.* 33, 697–699.
- Piecková, E., Jesenská, Z., 1999. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6, 1–11.
- Prigione, V., Lingua, G., Marchisio, V.F., 2004. Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1360–1365.
- Prosser, J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant Soil* 244, 9–17.
- Robine, E., Lacaze, I., Moularat, S., Ritoux, S., Boissier, M., 2005. Characterisation of exposure to airborne fungi: measurement of ergosterol. *J. Microbiol. Methods* 63, 185–192.
- Röling, W.F.M., Kerler, J., Braster, M., Apriyanto, A., Stam, H., van Veenveeld, H.W., 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1995–2003.
- Samsom, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G., Hoekstra, E.S., 1994. Health Implications of Fungi in Indoor Environments. Elsevier, Amsterdam.
- Saunders, G., Rogers, M.E., Adlard, M.W., Holt, G., 1984. Chromatographic resolution of nucleic acids extracted from *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* 194, 343–345.
- Shina, A., Mm, S.K., Dawson, S., Gaskell, R.M., Hart, C.A., Winstanley, C., 2001. Use of temporal temperature gradient gel electrophoresis to identify *flaA* and *flm3* sequence types in *Bordetella bronchiseptica*. *Let. Appl. Microbiol.* 32, 384–387.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D., Wernars, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2614–2621.
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, P.C., Ulrich, R.C., 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119, 158–163.
- Szponar, B., Larsen, L., 2001. Use of mass spectrometry for characterizing microbial communities in bioaerosols. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8, 111–117.
- Tell, L.A., 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact in veterinary medicine. *Med. Mycol.* 43, S71–S73.
- Theelen, B., Silvestri, M., Guého, E., van Belkum, A., Boekhout, T., 2001. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP™), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeasts Res.* 1, 79–86.
- Thompson, J.D., Gibson, T.S., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Vaino, E.J., Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104, 927–936.
- Vaitilingam, M., Gendre, F., Brignon, P., 1998. Direct detection of viable bacteria, mold and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1157–1160.
- Van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A., Myerson, D., 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med. Mycol.* 36, 299–303.
- Van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Keijzer-Wolters, A., Smit, E., 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 43, 133–151.
- Williams, R.H., Ward, E., McCartney, H.A., 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2453–2459.
- Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., Wang, X.R., 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5389–5397.
- Zhou, G., Whong, W.Z., Ong, T., Chen, B., 2000. Development of fungus-species PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell. Probes* 14, 339–348.

**Article 3 : Molecular monitoring of fungal aerosols contamination in
henhouse**

Nieguitisla Adélaïde, Goldenberg Oliver, Pissard Serge, Arné Pascal, Deville
Manjula, Benoît-Valiergue Hélène, Chermette René, Latouche-Cottenot Sophie,
Guillot Jacques

A soumettre dans la revue « Applied and Environmental Microbiology »

Molecular monitoring of fungal aerosols contamination in an animal facility

Nieguitisla Adélaïde ^{1, 2}, Goldenberg Oliver ³, Pissard Serge ⁴, Arné Pascal ¹, Deville Manjula¹, Benoît-Valiergue Hélène ⁵, Chermette René¹, Latouche-Cottenot Sophie ², Guillot Jacques ¹

1 INRA, AFSSA, ENVA, UPVM, UMR 956, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

2 Thales Security Systems, Vélizy-le-Bois, France

3 Transgenomic England

4 Laboratoire de Biochimie Génétique, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

5 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Champagnelles, France

This study compared two molecular techniques for the evaluation of fungal aerocontamination in an animal facility in France. The first one is a PCR-TTGE (Temperature Temporal Gradient Electrophoresis) which has already been used for the identification of fungal species in air samples (Nieguitsila et al., 2007). The second one is a PCR-D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), a new technique for the analysis of complex microbial populations. In the present study, optimal separation of amplified fungal 18S rRNA gene fragments was developed for D-HPLC analysis. Fungal communities yielded D-HPLC profiles with distinguishable peaks. Fraction collection and direct DNA sequencing from D-HPLC peaks enabled fungal identification.

The air samples in a henhouse during a 15 week-sampling period showed that PCR-D-HPLC could be used to monitor fungal aerocontamination. D-HPLC analysis allowed the detection of more fungal species than did the TTGE technique.

Failure to establish an objective connection between the respiratory health status of animals or humans in mould-affected environments and airborne microorganisms in these places may be the result of inadequate quantification of the air spora to which the animals or humans are exposed. Since most investigations only assess numbers of culturable organisms, they ignore numbers of non-viable or nonculturable spores that may be as allergenic or toxigenic as their culturable counterparts and have as significant effect on health. Furthermore identification of fungal species in air samples is difficult and time-consuming, even for experienced mycologists, since fungal strains must be grown in pure culture and need to be carefully examined by microscopy (Nesa *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1999). For all these reasons, the development of culture-independent techniques are required for the evaluation of fungal aerocontamination.

Techniques based on mass spectrometry (Szponar and Larson, 2001), flow cytometry (Prigione *et al.*, 2004) and Fourier-transform infrared spectroscopy (Fisher *et al.*, 2006) suggested that our current understanding of fungal diversity may be inadequate.

Molecular methods currently used to study microbial communities include broad-range PCR, with primers that target highly conserved regions of genes. This strategy allows the simultaneous amplification of DNA from all microorganisms present in one sample in a single-step. The different amplicons are then subsequently separated with sequence-specific separation tools such as SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), TTGE (*Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) and DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). DGGE, TGGE and TTGE techniques have already been applied to elucidate fungal populations structures in other environments than air: the soil (Heuer and Smalla, 1997; Pennanen *et al.*, 2001; Cornejo *et al.*, 2004), rhizospheres of marram grass (Kowalchuk *et al.*, 1997), maize and wheat (ben Omar and Ampe, 2000; Smit *et al.*, 1999) wine (Cocolin *et al.*, 2000; Hernàn-Gómez *et al.*, 2000), vanilla curing and corn silage (Röling *et al.*, 2001; May *et al.*, 2001) and wood (van Elsas *et al.*, 2000; Vanio and Hantula, 2000).

We were the first ones to use TTGE technique for the characterization of fungal aerocontamination (Nieguitsila *et al.*, 2007). This investigation demonstrated that the number of fungal taxa detected after culture was systematically higher than the number of taxa found using PCR-TTGE. However, few fungal species were detected by PCR-TTGE and not by cultivation, suggesting that the combination of these two approaches may provide a better analysis of fungal diversity in air samples. However, TTGE remains a laborious and time consuming technique.

The D-HPLC is a new approach for microbial communities analysis, monitoring and identification. This method has never been applied to profile and characterize airborne fungal communities. It is an automated technology that allows separation of PCR products using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography system. Originally, D-HPLC was developed for mutation analysis (Frueh and Noyer-Weidner, 2003; Xiao and Oefner, 2001). Moreover, it was successfully applied for analysis of marine bacterial populations (Barlaan *et al.*, 2005), of bacterial communities in human faecal samples (Goldenberg *et al.*, 2007). D-HPLC allowed the specific identification of *Candida* spp. from blood culture samples (Goldenberg *et al.*, 2005b).

The objective of the present study was to compare PCR-TTGE and PCR-D-HPLC methods for the characterization of fungal diversity in air. Samples were collected in a poultry facility in France, which has been selected because it was supposed to be contaminated by different types of aerosolized fungal organisms. We used the air sampler AirPort MD8, which collects air particles on a gelatine membrane. After air sampling, the membrane is diluted and the liquid is used for subsequent cultivation and molecular analysis. TTGE and D-HPLC results were compared to mycological culture results, which were used as control.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site. The sampling site was selected in the expectation of a high air fungal diversity. The henhouse selected for this investigation held about 4300 breeding chickens (2150 males and 2150 females). The ventilation was static. After 3 weeks of birds presence, six large windows were opened.

Sampling devices and procedure. The Airport MD8 sampler (Sartorius, Goettingen, Germany) is a filtration-based bioaerosol. It is a further development of the Sartorius MD8. The sampling head directly inserts at the pump unit without an interjacent flexible hose, and the flow rate is restricted to 50 L/min. The filter head contains a gelatine membrane, which is dissolved in distilled water at 37°C. The gelatine membrane used in MD8 collected monodispersed aerosols between 0.7 and 1.0 µm with an efficiency of 99.9995% (Parks *et al.*, 1996).

The air sampling volume was 500 L. Air samplings were made every week throughout the 13 weeks period of breeding, one week before the arrival of the birds and the week after their departure. Air sampler was placed at 0.5m from the soil.

Culture and mycological identification. For fungal culture, we used Petri dishes filled with Malt extract agar-chloramphenicol (MEA) [20 g/L of malt extract, (Fluka, Biochemika); 15 g/L of agar (Labosi); 1 g/L of peptone, (Difco); 20 g/L of glucose, and 0.5 g/L of chloramphenicol]

The Petri dishes containing MEA chloramphenicol were incubated at 25°C for 7 days.

Molds were subcultured and identified by their macroscopic and microscopic appearance after lactophenol cotton blue staining (de Hoog *et al.*, 2000). Fungal contamination was estimated by counting the number of colony-forming units per m³ for air.

DNA extraction and PCR amplification. A protocol including the bead beater and the commercial kit NucleoSpin®Tissue was used (Nieguitsila *et al.*, 2007). Total DNA extracts from air samples were used for PCR.

The primer set Fungcont 1 (5'-CTC GCA TCG ATG AAG AAC-3'); Fungcont 2 (5'-GGG TAA TCC CAC CTG ATT CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G-3'); Fungcont 3 (5'-CCG CTT ATT GAT ATG CTT-3') have been designed for PCR amplification. This primer set had previously been used for TTGE analysis of fungal diversity

in air (Nieguitsila *et al.*, 2007). They allowed the amplification of 350 pb from fungal 18S rRNA gene. GC-clamp was added on Fungcont 2 to facilitate amplicon separation (Wurzburger *et al.*, 2003).

Each reaction was carried out in 50 μ L volume containing 2 pM of each primer, 2.5 mM of each dNTP, 0.9X PCR buffer, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Takara, Saint Germain en Laye, France) and 5 μ L of the DNA extract. All PCR were performed in a Genamp thermocycler (Applied biosystem, Courtabeuf, France) with one cycle of denaturation (2 min, 95°C), followed by 25 cycles of denaturation (30 sec, 95°C), annealing (30 sec, 50°C) and extension (1 min, 72°C) and a final extension step (10 min, 72°C). DNA electrophoresis was carried out in 2% agarose gels containing ethidium bromide, and DNA fragments were visualized under ultraviolet light.

Temporal Temperature Gradient Electrophoresis. For sequence-specific separation of PCR products, the TTGE DCode System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used. 8 μ L of each PCR-amplified fragments were added to 8 μ L of loading buffer (0.5 g L⁻¹ bromophenol blue, 0.5 g L⁻¹ xylene cyanol, 70% glycerol in dH₂O) and loaded onto the TTGE apparatus. Ten percent polyacrylamide gels (per 60 mL) were composed of 10% acrylamide-bisacrylamide (37.5:1), 1.25X Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8), 2.94 M urea, 55 μ L of *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 9.2% ammonium persulfate. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 80 V and with a temperature gradient of 55°C to 63°C and a temperature ramp rate of 1°C/h were applied in 1.25X Tris-acetate-EDTA buffer. After electrophoresis, the gel was stained for 30 min in SYBR Gold nucleic acid gel stain (Amresco, Solon, USA). Gels were digitized using a gel Doc system (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France).

Denaturing High Performance Liquid Chromatography. DNA samples were analyzed by D-HPLC analysis on the WAVE® Microbial Analysis System (Transgenomic, Omaha, Nebraska) using DNASep® cartridge. Chromatogry was performed using an eluant buffer system. Loading, elution and washing of D-HPLC column was carried out with varying combinations of three buffers injected at a flow rate of 0.9 mL/min: buffer A contained 100 mM triethylamine acetate (TEAA), pH 7.0 and 0.025% acetonitrile; buffer B contained 25% acetonitrile, 100 MM TEAA, pH 7.0, and 0.1 mM EDTA, and buffer D contained 75% acetonitrile. Loading and elution buffers were combinations of buffers A and B, whose relative proportions formed a gradient over a specified time interval. Buffer D was used to

wash the column. The elution of DNA fragments in the system was influenced by essential factors such as column temperature, pump flow rate, gradient rate of buffer B and time of elution.

Optimal separation of PCR products was achieved by application of percent buffer B 48% at an oven temperature of 63°C and a flow rate of 0.9 mL/min. Separated PCR products were detected and visualized with HSX-3500 fluorescence detector using instrument-internal staining solution I. All buffers and solutions were obtained from Transgenomic (Omaha, NE) at analytical grade. The analysis was accomplished with Navigator™ software version 1.5.4 (Build 23) (Transgenomic, Omaha, NE).

18S rRNA gene amplicons separated by D-HPLC (as indicated by distinct peaks in the elution profiles) were collected with DNA fragment collector FCW 200 (Transgenomic, Omaha, NE). The volume of each fraction varied from 10 to 200 μ L depending on peak size height. Aliquots were used as templates for re-amplification.

DNA sequencing. TTGE bands were excised and the DNA was eluted with 50 μ l of elution buffer EB (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen, Courtabeuf, France) for 3h at 58°C before PCR amplification with the same primer set except that the primer Fungcont 2 was used without the GC clamp.

D-HPLC peaks collected were re-amplified with the primer set except the primer Fungcont 2 was used without the GC clamp. The reaction conditions were similar to those described above. PCR products were purified and concentrated with a QIAquick spin PCR purification kit (Qiagen, Courtabeuf, France). PCR products were sequenced using primer Fungcont 3 by Qiagen Genomic Services (Sequencing Services, Hilden, Germany).

For partial 18S rRNA sequences analysis, sequences were compared with known sequences listed in the GenBank nucleotide sequence databases. The BLAST search option of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to search for close evolutionary relatives in the GenBank database (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTS

Primer set selection and optimization of D-HPLC parameters for molecular analysis of airborne fungi. For the optimization of D-HPLC parameters, we tested a primer set, which has previously been used for the analysis of fungal communities in air (Nieguitsila *et al.*, 2007).

We tested the primer set (with and without GC clamp on primer Fungcont 2) on DNA from single fungal species and from artificial mixture of PCR products of a few fungal species. For single fungal species, results of PCR amplification and further D-HPLC analysis were similar with and without GC clamp on primer Fungcont 2 (data not shown). On the contrary for artificial mixture of fungal species DNA, the discrimination of D-HPLC peaks looked better when Fungcont 2 included a GC clamp (Fig 1).

We investigated the optimal column temperature because this parameter plays a very important role in partial denaturation of DNA molecules. We demonstrated that the temperature 63°C allowed the clear separation of artificial mixture of fungal species (Fig 1) and the analysis of fungal diversity from air samples (Fig 2). With this temperature we adjusted the gradient buffer (48% for buffer B) and the rate (0.9 mL/min). Figure 1 shows PCR products from individual species yielded different retention times.

Application of D-HPLC for monitoring of fungal aerosols contamination in an animal facility. After the optimization of D-HPLC parameters, we analyzed PCR products from air samples collected in a henhouse (Fig. 2). We collected all peaks manually for DNA sequencing directly after re-amplification. Fungal species identified with this protocol are in Table 2.

After sequencing, each peak corresponded to a unique sequence (Table 2). Most of the fungal species showed a single retention time. It was not the case for *Trichoderma atroviride*, *Gibberella moniliformis* and *Botryotinia fuckeliana* which exhibited two retention times. We noticed variations in the degree of intensity or absorbance in the different peaks.

We analyzed the same air sample using the PCR-TTGE (Fig. 2 and Table 3) to compare D-HPLC peaks and TTGE bands. The number of D-HPLC peaks (10) was higher than that of TTGE bands (5). Consequently, the number of fungal species identified by D-HPLC (7) was higher than that detected by TTGE (5) (tables 2 and 3).

Comparison of culture and molecular techniques for the detection of fungal species in air samples. The 15 air samples were analyzed by D-HPLC. In parallel, they have been analyzed by cultivation and PCR-TTGE. The fungal species identified by the 3 different techniques are listed in table 4.

After cultivation, some fungi could not be identified with certainty either because they did not sporulate or because they developed spores in a way that could not be associated with an already known group of fungi. In table 4, these organisms are designated as “unknown fungi”. We distinguished *Aspergillus fumigatus* from other *Aspergillus* because this species is the main responsible for aspergillosis in breeding birds and in humans.

During the 15 week-sampling period, most fungal species identified by culture were not detected by PCR-TTGE or PCR-D-HPLC. However, *Aspergillus* spp. (including *Aspergillus fumigatus*) were identified by both culture and D-HPLC and several types of yeasts were detected by the 3 techniques. The 3 species, *Trichoderma atroviride*, *Gibberella moniliformis* and *Candida albicans*, were identified by PCR-TTGE and by PCR-D-HPLC.

DISCUSSION

The concentration of airborne fungi can differ from place to place based on local environmental variables, fungal growth substrates, and animal or human activity (Adhikari *et al.*, 2004). A lot of aerosolized fungal species are being proposed as a cause of adverse health effects (Cooley *et al.*, 1998; Fung and Hughson, 2003; Johanning *et al.*, 1999; Kaufman *et al.*, 1995; Piecková and Jesenskà, 1999; Samson *et al.*, 1994). The environmental conditions of animal facilities are usually favourable for the development of a large variety of fungal species. These conditions may cause adverse health effects in workers (Chang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006) and animals, especially avian species (Tell, 2005; Lair-Fulleriger *et al.*, 2006).

Optimization of D-HPLC parameters. For optimal resolution and separation of fragments in D-HPLC, we tested the primer set (Fungcont 1, 2 and 3) that had already been developed for PCR-TTGE (Nieguitsila *et al.* 2007). Without the incorporation of the GC clamp on Fungcont 2, the discrimination of PCR products was difficult or inconclusive. At higher column temperature in D-HPLC, the helical content decreased and double strand DNA fragments partially dissociated to single-stranded DNA. The irreversible dissociation to single-stranded DNA occurred during the passage through the column, which led to the broadening of the chromatographic peaks as exhibited in DNA fragments of fungal species without GC clamp. Subjecting this DNA complex to lower temperature or shorter gradient time did not help in the separation of fragments. Addition of GC clamp to one of the ends of the fragments seemed to stabilize the double stranded DNA, leading to definitive peaks (Fig 1). In the present study, a temperature of 63°C, a gradient of 48% and a rate of 0.9 mL/min allowed the clear separation and discrimination of mixed fungal populations.

Application of D-HPLC for the analysis of air samples. The results of DHLPC analysis indicated composition and abundance of fungal species. This demonstrated the sensitivity of D-HPLC to detect 18S rDNA sequence variants as indicated by the number and intensities of the peaks observed in Fig 2. However, it must be emphasized that D-HPLC diversity profiles did not necessarily reflect the true diversity in the environment considered. The differences between culture and D-HPLC results could be attributed to different factors such as DNA extraction limitations, formation of chimera and heteroduplex and preferential bias during the PCR (Muyzer, 1999; Muyzer and Smalla, 1998; Wintzingerode *et al.*, 1997). The composition

of amplified fragments from the environmental DNA may include not only the predominantly targeted 350 bp fragment, but also other amplicon sizes.

D-HPLC allowed fraction collection of peaks for DNA isolation and sequencing, which led to fungal identification and characterization of fungal community composition. DNA fragments could be used directly for sequencing, for cloning or for constructing clone libraries (Colosimo *et al.*, 2003). We could refine the fraction collection of shorter or clamped peaks. Shorter peaks can be re-amplified or repeated fraction collection to collect sufficient amounts of DNA. Clustered peaks may be difficult to separate, but may be resolved by manipulations in buffer gradient, rate, elution time and column temperature.

The different intensities of peaks in D-HPLC profiles may reflect the relative abundance of populations (Fig 2 and Fig 3). This display shows the advantage of D-HPLC analysis in monitoring fungal population of interest that may be abundant or dominant, present or absent, in specific environments. The fungal species, which have showed two retention time could explained by the fact that those fungi contain sequence variations in multiple 18S rRNA genes per genome. Similar findings were reported for TTGE analysis of defined fungal species (Nieguitsila *et al.*, 2007).

Comparison of culture and molecular techniques for the detection of fungal species in air samples. The present study clearly showed that the fungal diversity revealed by culture was different from that detected by molecular techniques. However, D-HPLC profiles were reproducible from run to run and fungal could be easily identified at the species level by sequencing (Fig 3 and Table 4). In general the number species identified by D-HPLC was higher than those found by TTGE. This demonstrated that D-HPLC should be considered as the most sensitive molecular method. The advantage of D-HPLC compared to gel-based approaches is the automatisation and the fact that the preparation and loading of electrophoresis gels is not required. The results of TTGE analysis were obtained after laborious and time-consuming combined gel preparation, electrophoresis, band detection using carcinogenic agents (Syber Green) and re-amplification of bands for DNA sequencing. Although the D-HPLC equipment itself is expensive, the multiple application, and long-term uses of D-HPLC analysis will out weight the cost.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Association Nationale de la Recherche Technique (CIFRE convention 2005016 in collaboration with Thales Security Systems)

REFERENCES

1. **Adhikari A., M.M. Sen, S. Gupta-Bhattacharya, S. Chanda.** 2004. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Internat.* 29:1071-1078
2. **Barlaan, E. A, M. Sugimori, S. Furukawa, K. Takeuchi.** 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods* 61:399-412.
3. **ben Omar, N., and F.Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3664-3673.
4. **Chang C.W., H. Chung, C.F. Huang, and H.J. Su.** 2001. Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:155-161.
5. **Cocolin L., L.F. Bisson, and D.A. Mills.** 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189:81-87.
6. **Colosimo A., V. Guida, E. Flex, E. Conti and B. Dallapiccola.** 2003. Use of DHPLC for rapid screening of recombinant clones. *BioTechniques.* 34: 706–708.
7. **Cooley, J.D., W.C. Wong, C.A. Jumper, and D.C. Straus.** 1998. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup. Environ. Med.* 55:579-584.
8. **de Hoog, G.S., J. Gene, and M.J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
9. **Fischer, G., S.Braun, R.Thissen, and W. Dott.** 2006. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods* 64 :63-77.
10. **Frueh F.W, Noyer-Weidner M.** 2003. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med.* 41(4):452-461
11. **Fung, F., and W.G., Hughson.** 2003. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 18:535-554.
12. **Goldenberg, O. S. Herrmann, T. Adam, G. Maejoram, G. Hong, U. B. Göbel, and B. Graf.** 2005. Use of denaturing high performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 43:5912-5915.
13. **Goldenberg, O. S. Herrmann, G. Maejoram, M. Noyer-Weidner, G. Hong, S. Bereswill, and U. B. Göbel.** 2007. Molecular monitoring of intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Microbiol.methods* 68:94-105.
14. **Hernán-Gómez, S., J.C. Espinosa, and J.F. Ubeda.** 2000. Characterization of wine

yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Letters* 93:45-50.

15. **Heuer, H., and K. Smalla.** 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J. D., J. T. Trevors, E. M. H. Wellington, (Eds.). *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 353-373.
16. **Johanning, E., P. Landbergis, M. Gareis, C.S. Yang, and E. Olmsted.** 1999. Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environ. Health Perspect.* **107**:489-494.
17. **Kauffman, H.F, J.F.C. Tomee, T.S. van der Werf, J.G.R. de Monchy, and G.K. Koeter.** 1995. Review of fungus-induced asthmatic reaction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**:2109-2116.
18. **Kowalchuk, G.A., S. Gerards, and J.W. Woldendorp.** 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram Grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3858-3865.
19. **Lair-Fulleriger, S., D. Seguin, S. Warin, C. Desterque, P. Arné, R. Chermette, S. Bretagne, and J. Guillot.** 2006. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poult. Science* in press.
20. **Lee, S.A., A. Adhikari, S.A. Grinshpun, R. McKay, R. Shuklaand, and T. Reponen.** 2006. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J. Occup. Environ. Hyg.* **3**:118-130.
21. **May, L.A., B. Smiley, and M.G. Schmidt.** 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian J. Microbiol.* **47**:829-841.
22. **Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2** : 317–322
23. **Muyzer, G., E.C. deWaal, and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
24. **Muyzer G., and K. Smalla,** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127–141
25. **Nesa D., J. Lortholary, A. Bouakline, M. Bordes, J. Chandeniens, F. Derouin, J.P. Gangneux.** 2001. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J. Hosp. Infect.* **47**:149-155
26. **Nieguitsila A., M. Deville, J. Taoufik, L. Halos, M. Berthelemy, R. Chermette, S. Latouche, P. Arné, and J. Guillot.** 2007. Evaluation of fungal aerosols using temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *J. Microbiol. Methods* **70**:86-95.
27. **Pennanen, T., L. Paavolainen, and J. Hantula.** 2001. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biol. Biochem.* **33**:697-699.

28. **Piecková, E., and Z. Jesenská.** 1999. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.* **6**:1-11.
29. **Prigione, V., G. Lingu, and V.F. Marchisio.** 2004. Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1360-1365.
30. **Röling, W.F.M., J. Kerler, M. Braster, A. Apriyantono, H. Stam, and H.W. van Verseveld.** 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional indonesian vanilla curing. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1995-2003.
31. **Samson, R.A., B. Flannigan, M.E. Flannigan, A.P. Verhoeff, O.C.G. Adan, and E.S. Hoekstra.** 1994. Health implications of fungi in indoor environments. Elsevier, Amsterdam.
32. **Smit, E., P. Leeflang, B. Glandorf, J.D. van Elsas, and K. Wernars.** 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2614-2621.
33. **Szponar, B., and L. Larson.** 2001. Use of mass spectrometry for characterizing microbial communities in bioaerosols. *Ann. Agric. Environ. Med.* **8**:111-117.
34. **Tell, L.A.,** 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact in veterinary medicine. *Med. Mycol.* **43**:S71-S73.
35. **Vaino, E.J., and J. Hantula.** 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **104**:927-936.
36. **Van Elsas, J.D., G.F. Duarte, A. Keijzer-Wolters, and E. Smit.** 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **43**:133-151.
37. **Van Wintzingerode, F., U.B.Göbel, and E. Stackebrandt.** 1997 Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
38. **Wu, J., R.H. Istepanian and S. Chen.** 1999. Stability issues of nite precision controller structures for sampled data systems. *Int. J. Control,* **72** (15): 1331-1342
39. **Wurzburger, R.J., R. Gupta, A.P. Parnassa, S. Jain, J.A. Wexler, J.L. Chu, K.B. Elkon, R.D. Blank.** 2003. Use of GC clamps in DHPLC mutation scanning. *Clin Med Res.* **1**(2):111-118
40. **Xiao, W. and P..J. Oefner.** 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* **17**: 439–474.

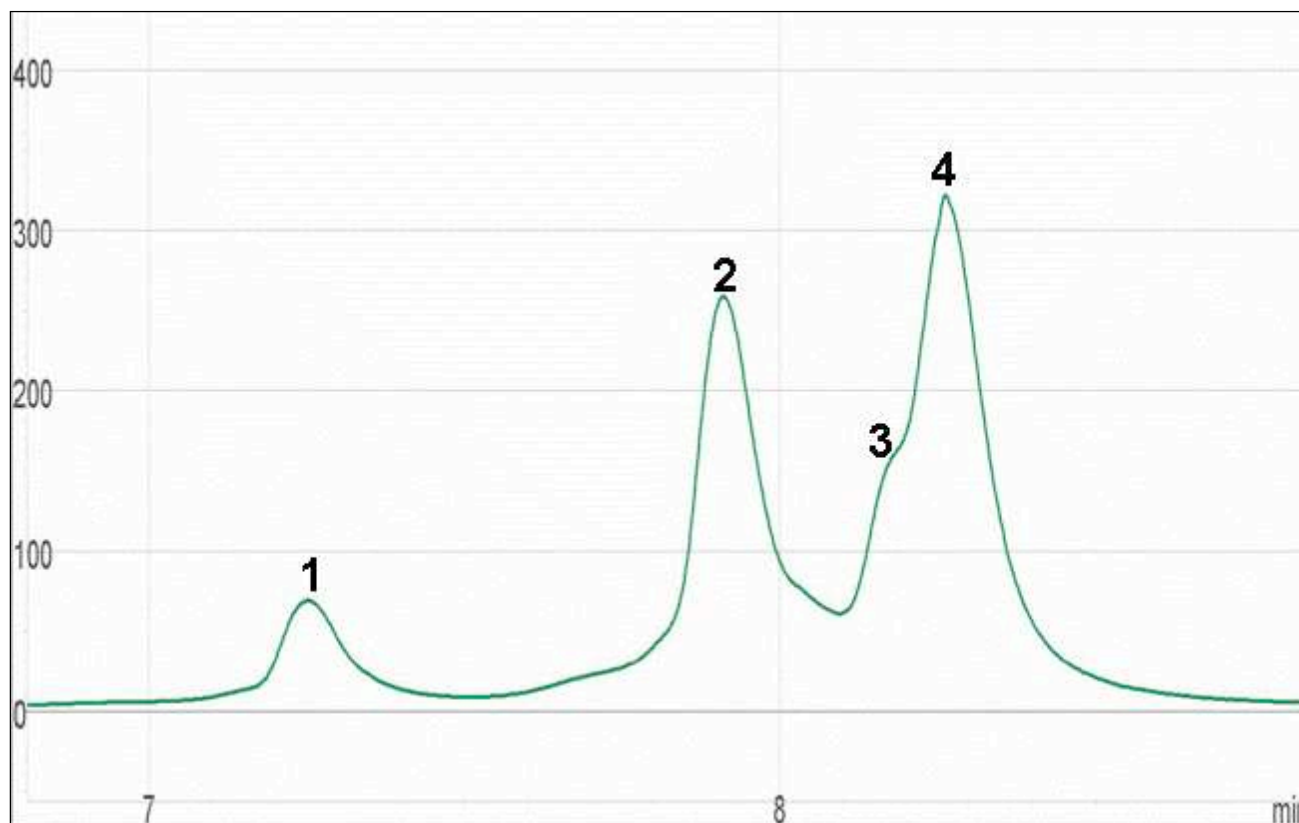


Fig 1: Chromatogram representing the analysis of four fungal species using the optimized D-HPLC conditions. Peak 1: *Trichoderma* sp.; 2: *Fusarium oxysporum*; 3: *Penicillium* sp. and 4: *Aspergillus fumigatus*.

Table 1. List of fungal isolates used for the adjustment of D-HPLC parameters (see fig 1).

Isolate	D-HPLC peak number	Retention time (min)	Closest relative accession number	Similarity (%)	Taxonomy description
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	8.21	ABDB01000088	88	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	7.85	AAXH01000557	82	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Penicillium</i> sp.	3	8.13	ABAR01000140	88	<i>Penicillium marneffe</i>
<i>Trichoderma</i> sp.	1	7.29	AAIL01001871	86	<i>Trichoderma reesei</i>

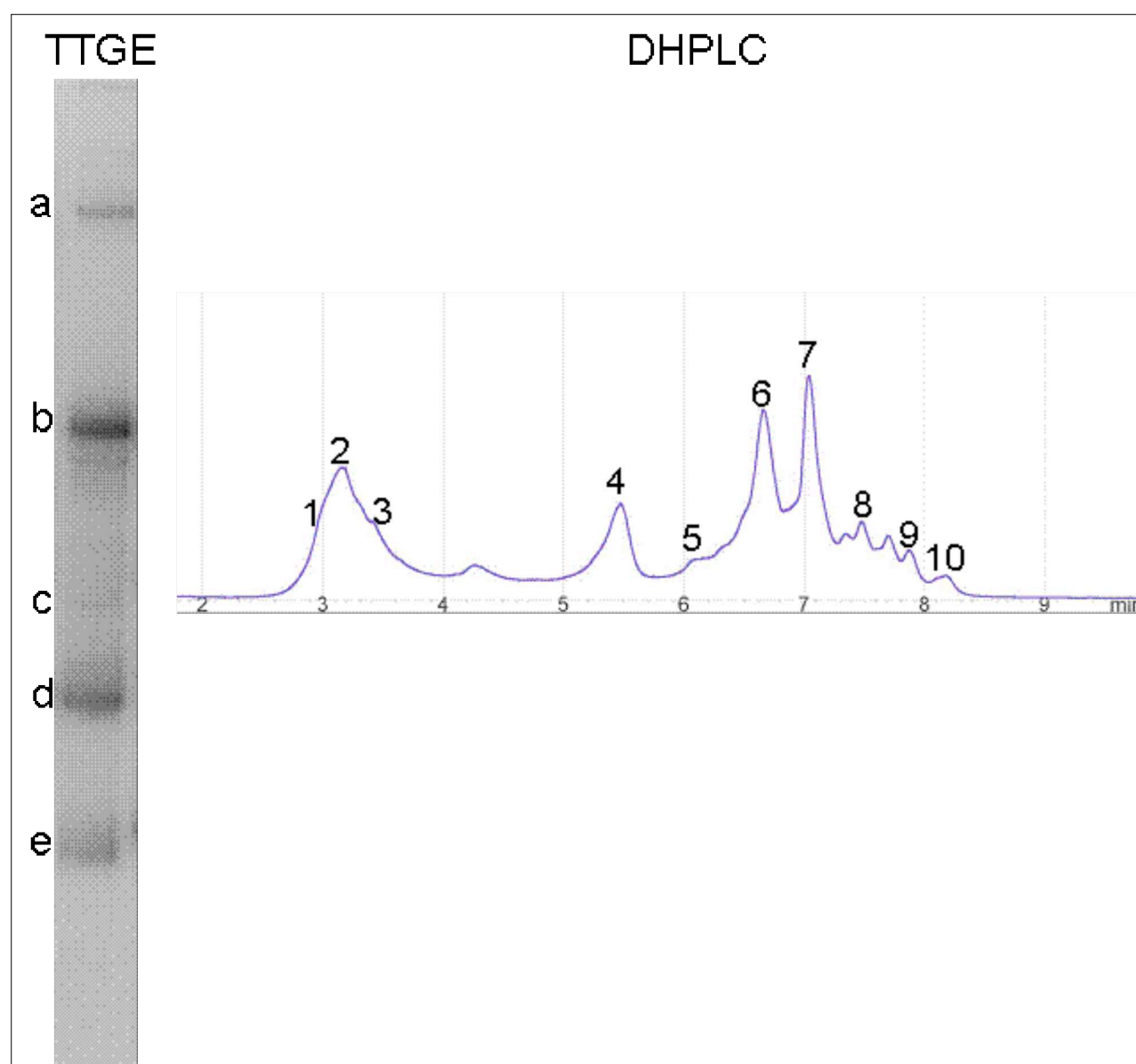


Fig 2: TTGE and D-HPLC profiles for the same air sampling (made at week 4 in the henhouse). Letters a to e represent the TTGE bands and numbers 1 to 10 are D-HPLC peaks. Resulting sequences are listed in tables 2 and 3.

Table 2. D-HPLC collected fractions (see fig. 2) and closest sequences from GenBank database.

D-HPLC fraction number	Retention time (min)	Closest relative accession number	Similarity (%)	Taxonomy description
1	2.93	ABDG01000287	98	<i>Trichoderma atroviride</i>
2	3.22	AAP 001000114	87	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
3	3.45	NZ-AAID01000266	95	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
4	5.51	AAF001000018	90	<i>Candida albicans</i>
5	6.06	AAIMO2000198	92	<i>Gibberella moniliformis</i>
6	6.66	ABDG01000287	98	<i>Trichoderma atroviride</i>
7	7.05	NZ-AAID01000266	96	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
8	7.40	AAIMO2000198	99	<i>Gibberella moniliformis</i>
9	7.86	NZ-AAGI01000077	88	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
10	8.16	AAIHO2000621	91	<i>Aspergillus flavus</i>

Table 3. TTGE collected bands (see fig. 2) and closest sequences from GenBank database.

TTGE bands name	Closest relative accession number	Similarity (%)	Taxonomy description
a	NZ-AAEY01000011	91	<i>Cryptococcus neoformans</i>
b	AAIM02000198	98	<i>Gibberella moniliformis</i>
c	AAF001000018	91	<i>Candida albicans</i>
d	AABX02000621	94	<i>Neurospora crassa</i>
e	ABDG01000287	94	<i>Trichoderma atroviride</i>

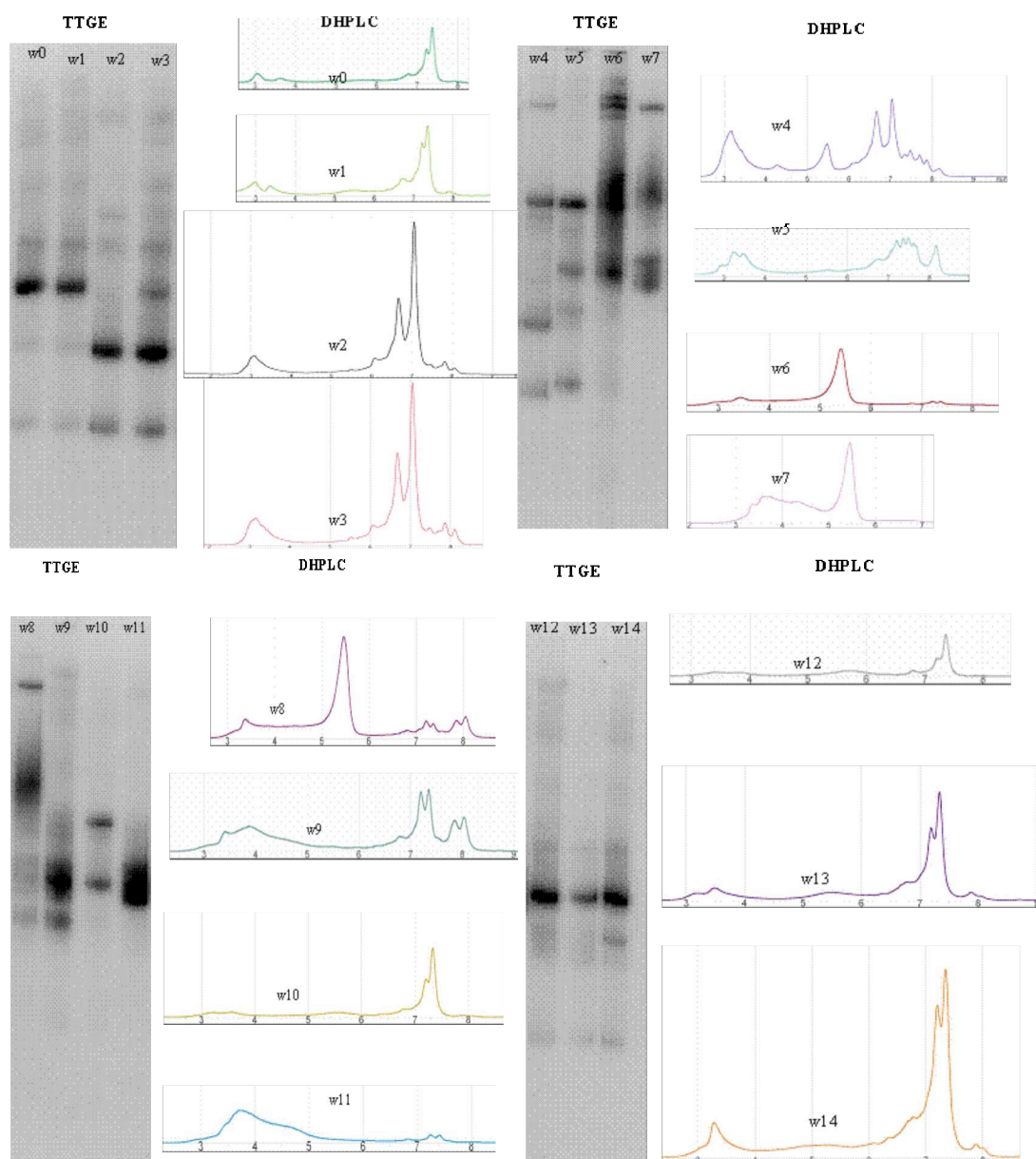


Fig 3. Monitoring of airborne fungal contamination by D-HPLC in a henhouse in France. Air samples were collected every week (week 0 to week 14). All the samples were analyzed by both D-HPLC and TTGE.

Table 4a. List of fungal species identified by cultivation, PCR-TTGE and PCR-D-HPLC from air samples in a henhouse during 15 weeks. TTGE and D-HPLC profiles are shown in fig 3.

Sampling time	Fungal species identified from air samples		
	By cultivation (CFU/m3)	By PCR-TTGE (Fragment size, Genbank sequence identity)	By PCR-D-HPLC (Peak retention time, Genbank sequence identity)
Week before the arrival of the birds	- Mucorale (4) - Unknown fungi (12)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%)
		- <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%) - <i>Gibberella morniliformis</i> (327; AAIM02000198; 98%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min ; AAIM02000198 ; 99%)
Week 1		- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 and 6.66 min; ABDG1000287; 98%)
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%) - <i>Gibberella morniliformis</i> (327; AAIM02000198; 98%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%) - <i>Lodderomyces elongisporus</i> (3.22 min; AAP001000114; 87%) - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min ; NZ-AAGI01000077 ; 88%)
Week 2		- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 and 6.66 min; ABDG1000287; 98%)
		- <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%) - <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%) - <i>Gibberella morniliformis</i> (327; AAIM02000198; 98%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (8.05 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Botryotinia fuckeliana</i> (7.05 min; NZ-AAD01000266; 96%) - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
		- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 and 6.66 min; ABDG1000287; 98%)

Table 4b. List of fungal species identified by cultivation, PCR-TTGE and PCR-D-HPLC from air samples in a henhouse during 15 weeks. TTGE and D-HPLC profiles are shown in fig 3.

Fungal species identified from air samples			
Sampling time	By cultivation (CFU/m ³)	By PCR-TTGE (Fragment size, Genbank sequence identity)	By PCR-D-HPLC (Peak retention time, Genbank sequence identity)
Week 3	- Other <i>Aspergillus</i> (28)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Aspergillus flavus</i> (8.16 min; AAIH02000621; 91%)
		- <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	- <i>Candida albicans</i> (5.51 min; AAF001000018; 90%)
		- <i>Gibberella moniliformis</i> (327; AAIM02000198; 98%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (6.06 and 7.40 min; AAIM02000198; 92 and 99%)
			- <i>Lodderomyces elongisporus</i> (3.22 min; AAP001000114; 87%)
	- Unknown fungi (26)		- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
	- <i>Penicillium</i> spp. (8)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 and 6.66 min; ABDG1000287; 98%)
Week 4	- Other <i>Aspergillus</i> (20)		- <i>Aspergillus flavus</i> (8.16 min; AAIH02000621; 91%)
			- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 and 7.05 min; NZ-AAD01000266; 95 and 96%)
			- <i>Candida albicans</i> (5.51 min; AAF001000018; 90%)
	- Yeast (208)	- <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	
		- <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (6.06 and 7.40 min; AAIM02000198; 92 and 99%)
	- Mucorale (4)		- <i>Lodderomyces elongisporus</i> (3.22 min; AAP001000114; 87%)
	- Unknown fungi (12)		- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
- <i>Penicillium</i> spp. (8)		- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 and 6.66 min; ABDG1000287; 98%)	
- <i>Scopulariopsis</i> spp. (40)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)		

Table 4c. List of fungal species identified by cultivation, PCR-TTGE and PCR-D-HPLC from air samples in a henhouse during 15 weeks. TTGE and D-HPLC profiles are shown in fig 3.

Fungal species identified from air samples			
Sampling time	By cultivation (CFU/m ³)	By PCR-TTGE (Fragment size, Genbank sequence identity)	By PCR-D-HPLC (Peak retention time, Genbank sequence identity)
Week 5	- Other <i>Aspergillus</i> (44)		- <i>Aspergillus flavus</i> (8.16 min; AAIH02000621; 91%) - <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%)
	- Yeast (160)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%) - <i>Lodderomyces elongisporus</i> (3.22 min; AAP001000114; 87%)
	- Mucorale (4)		- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
	- Unknown fungi (16)	- <i>Neurospora crassa</i> (340; AAB02000162; 94%) - <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (2.93 min; ABDG1000287; 98%)
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (20)		
Week 6	- Other <i>Aspergillus</i> (112)		- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%) - <i>Candida albicans</i> (5.51 min; AAF001000018; 90%) - <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Yeast (8)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	
	- Unknown fungi (12)		
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (92)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	
Week 7	- Other <i>Aspergillus</i> (72)		- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%) - <i>Candida albicans</i> (5.51 min; AAF001000018; 90%)
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	
	- Mucorale (4)		
	- Unknown fungi (4)		
	- <i>Penicillium</i> spp. (28) - <i>Scopulariopsis</i> spp. (200)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	

Table 4d. List of fungal species identified by cultivation, PCR-TTGE and PCR-D-HPLC from air samples in a henhouse during 15 weeks. TTGE and D-HPLC profiles are shown in fig 3.

Fungal species identified from air samples			
Sampling time	By cultivation (CFU/m ³)	By PCR-TTGE (Fragment size, Genbank sequence identity)	By PCR-D-HPLC (Peak retention time, Genbank sequence identity)
Week 8	- Other <i>Aspergillus</i> (32)		- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 and 8.05 min; ABDB01000088; 88%)
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%)
		- <i>Cryptococcus neoformans</i> (325; NZ-AAEY01000011; 92%)	- <i>Candida albicans</i> (5,51 min; AAF001000018; 90%)
		- <i>Neurospora crassa</i> (340; AAB02000162; 94%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Unknown fungi (16)		
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (288)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
Week 9	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (8)		- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 and 8.05 min; ABDB01000088; 88%)
	- Other <i>Aspergillus</i> (20)		- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%)
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Mucorale (4)	- <i>Neurospora crassa</i> (340; AAB02000162; 94%)	- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)
	- Unknown fungi (4)		
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (92)		
Week 10	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (12)		- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%)
	- Other <i>Aspergillus</i> (28)		
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	
		- <i>Gibberella moniliformis</i> (327; AAIM02000198; 98%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Unknown fungi (8)		
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (240)		
Week 11	- Other <i>Aspergillus</i> (16)		- <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%)
		- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 95%)
	- Unknown fungi (40)		
	- <i>Scopulariopsis</i> spp. (80)		

Table 4d. List of fungal species identified by cultivation, PCR-TTGE and PCR-D-HPLC from air samples in a henhouse during 15 weeks. TTGE and D-HPLC profiles are shown in fig 3.

Fungal species identified from air samples			
Sampling time	By cultivation (CFU/m ³)	By PCR-TTGE (Fragment size, Genbank sequence identity)	By PCR-D-HPLC (Peak retention time, Genbank sequence identity)
Week 12	- Other <i>Aspergillus</i> (40)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%) - <i>Neurospora crassa</i> (340; AAB02000162; 94%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Other fungi (4) - <i>Penicillium</i> spp. (40) - <i>Scopulariopsis</i> spp. (636)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	
Week 13	- Other <i>Aspergillus</i> (12)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%) - <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%) - <i>Lodderomyces elongisporus</i> (3.22 min; AAP001000114; 87%)
	- Mucorale (24) - Unknown fungi (36) - <i>Scopulariopsis</i> spp. (116)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%) - <i>Trichoderma atroviride</i> (6.66 min; ABDG1000287; 98%)
Week after	- <i>Alternaria</i> spp. (12) - <i>Aspergillus fumigatus</i> (12) - Other <i>Aspergillus</i> (38)	- <i>Candida albicans</i> (351; AAF001000018; 88%) - <i>Fusarium oxysporum</i> (345; AAXO10000560; 96%) - <i>Neurospora crassa</i> (340; AAB02000162; 94%)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> (7.21 min; ABDB01000088; 88%) - <i>Botryotinia fuckeliana</i> (3.45 min; NZ-AAD01000266; 95%) - <i>Gibberella moniliformis</i> (7.40 min; AAIM02000198; 99%)
	- Mucorale (8) - Unknown fungi (8) - <i>Penicillium</i> spp. (12)	- <i>Trichoderma atroviride</i> (337; ABDG1000287; 93%)	- <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (7.86 min; NZ-AAGI01000077; 88%)

Résultats complémentaires

Le système D-HPLC permet aussi de vérifier la pureté des amorces utilisées et la taille du fragment amplifié à l'aide d'un standard commercialisé (figure 6). Le témoin taille a permis de confirmer la taille de nos fragments d'ADN amplifiés (environ 350 pb).

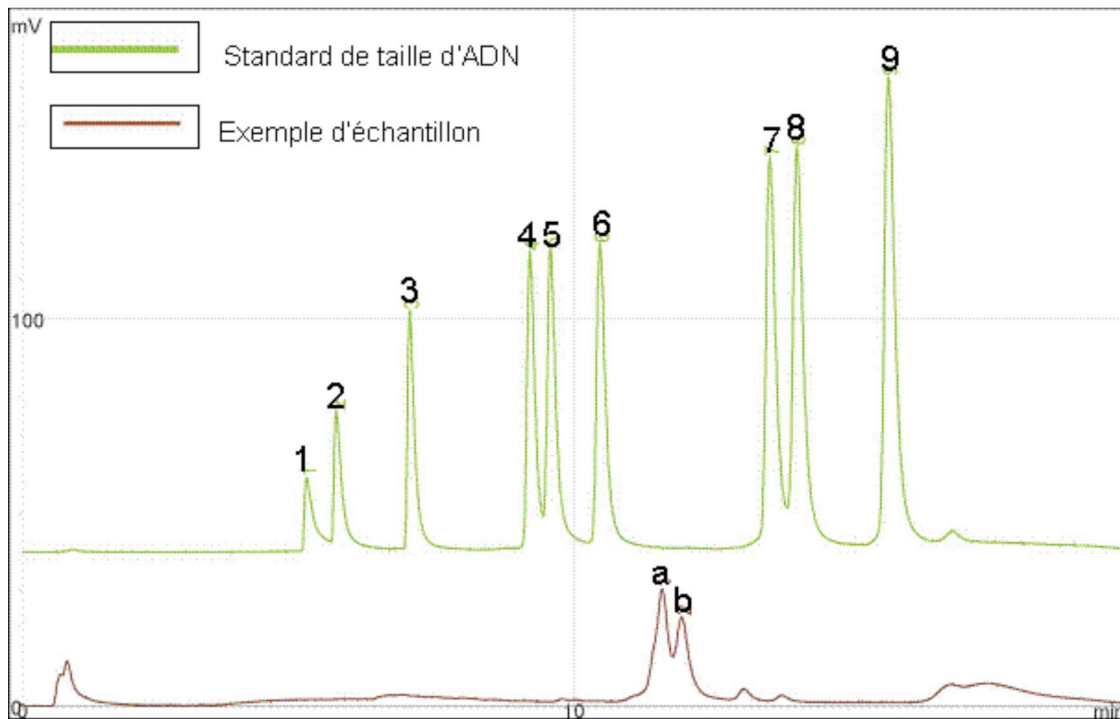


Figure 6 : Vérification de la taille des produits PCR avec les amorces Fungcont 1-3 par D-HPLC (environ 350 pb).

Standard de taille ADN : **1** : 80 pb ; **2** : 102 pb ; **3** : 174 pb ; **4** : 257 pb ; **5** : 267 pb ; **6** : 298 pb ; **7** : 434 pb ; **8** : 458 pb et **9** : 587 pb.

La figure 7 montre les différentes températures testées lors de la mise au point de la séparation des fragments amplifiés par Fungcont 1-3 par D-HPLC. La température qui correspond à la meilleure séparation des amplificats à partir des prélèvements d'air est 63°C.

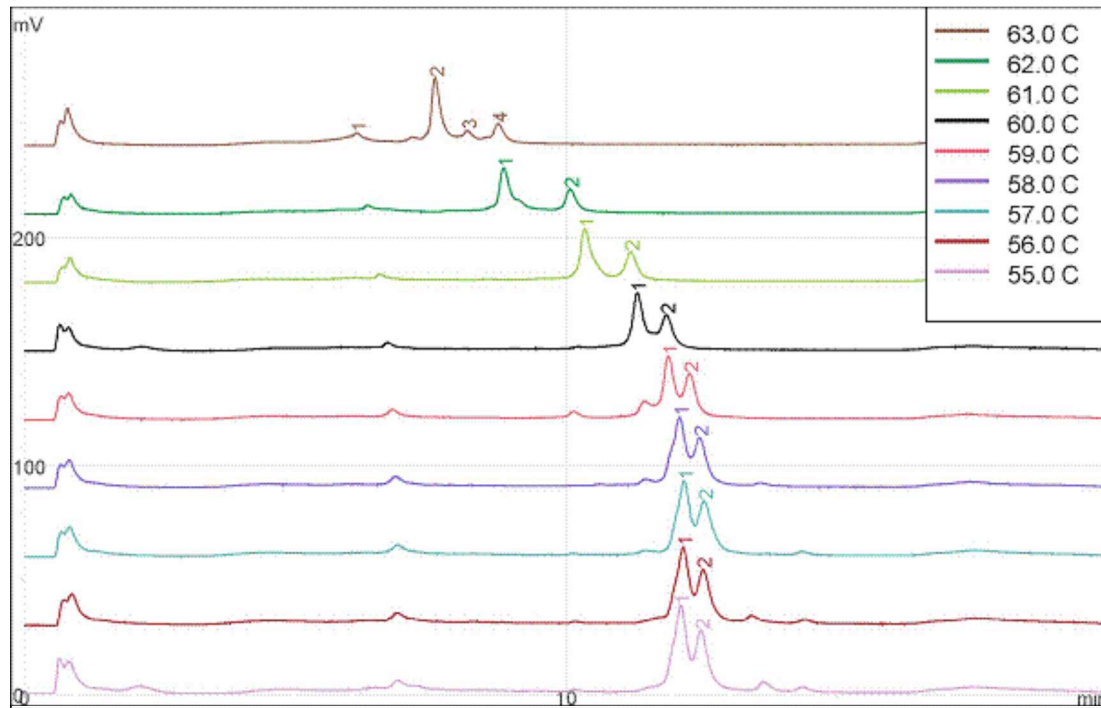


Figure 7 : Mise au point de la température adaptée pour les amplificats issus des prélèvements d'air : les différentes températures ont été testées sur un produit PCR issu d'un même prélèvement d'air.

La séparation des amplifiants par D-HPLC permet la collecte des différents pics obtenus par échantillon testé. La figure 8 est un exemple de chromatographe après une collecte de pics qui sont représentés en couleur.

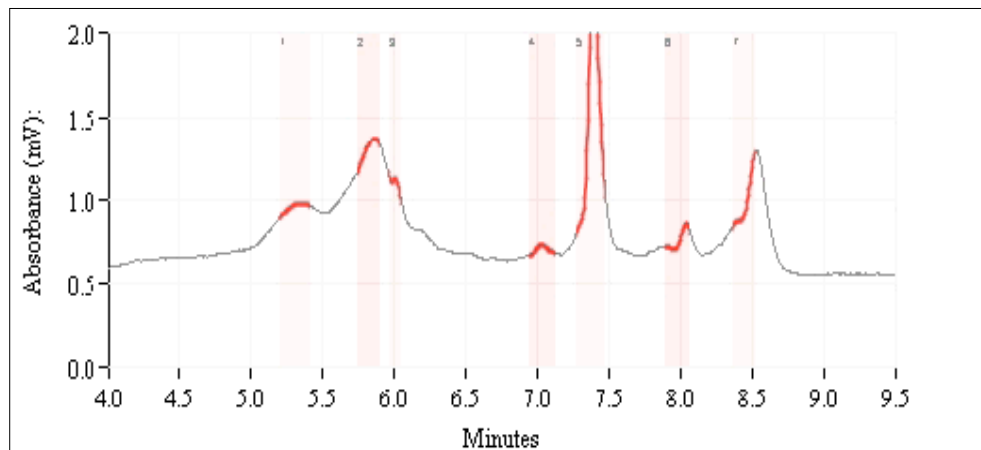


Figure 8 : Exemple de profil après une collecte de pics. les différentes fractions récupérées sont représentées en rouge.

Discussion

La mise au point de la technique de PCR-TTGE sur les échantillons d'air du CIP 10-M a nécessité plusieurs étapes : extraction d'ADN total ; conception des amorces ; optimisation des réactions PCR et des conditions de migration sur gel de polyacrylamide.

Pour la mise au point de l'extraction de l'ADN total des échantillons plusieurs méthodes ont été testées. Les difficultés rencontrées au cours de l'extraction proviennent de la présence et de la nature d'une paroi fongique qui est résistante aux techniques classiques d'extraction (Cenis, 1992 ; Van Burick *et al.*, 1998).

La technique retenue consiste en une première étape de broyage fin et automatisé (Bead Beater, Qiagen), suivie d'une extraction d'ADN total utilisant un kit commercial (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel). La qualité de l'extraction d'ADN est confirmée par l'amplification d'un fragment codant l'ARN ribosomal 18S des champignons testés.

L'utilisation des amorces décrites dans la littérature pour l'étude de communautés fongiques dans les écosystèmes variés (vin, rhizosphère, sol et peau) s'est relevée infructueuse à partir des prélèvements d'air. Nous avons défini trois nouvelles amorces sur l'ADNr 18S (Fungcont 1-3) qui permettent une PCR semi-nichée. Anderson *et al.* (2003) ont conclu qu'il faut éviter l'utilisation de la PCR simple pour l'étude de la diversité fongique.

Les amorces Fungcont 1-3 sont utilisées dans le même tube. Au sein de notre laboratoire, le principe de marche en avant est appliqué. Cela permet d'avoir une séparation physique des locaux : une salle de préparation du mélange réactionnel, une salle contenant une hotte à UV pour l'ajout du produit d'extraction, une autre salle où sont disposés les thermocycleurs et une salle pour la révélation des gels. Toutes ces précautions permettent de limiter les contaminations.

L'amplification par PCR reste fortement dépendante de l'échantillonnage et de la qualité de l'extraction de l'ADN. Nous avons appliqué une méthode d'élimination d'inhibiteurs environnementaux. Le protocole a été fourni par le Laboratoire d'hygiène de la Ville de Paris. L'ADNr 18S est un bon support pour confectionner les amorces permettant l'évaluation de la diversité des espèces fongiques dans les prélèvements environnementaux (Anderson *et al.*, 2003). Les amorces sélectionnées se fixent sur des zones très conservées et sont spécifiques des champignons. Cette spécificité donne une bonne fiabilité aux résultats positifs. Une PCR positive implique la présence de champignons dans le prélèvement.

Les conditions optimales de migration des amplificats ont été obtenues sur un gel de 10 % de polyacrylamide, sous un voltage de 80 V avec un écart de température de +55°C à +63°C et une élévation horaire de la température de +1°C.

De nombreuses d'études sur la caractérisation moléculaire des champignons du sol sont disponibles mais aucune ne concerne les prélèvements d'air. L'avantage de cette technique TTGE, semi quantitative (Muyers *et al.*, 1993) est de permettre l'analyse et la comparaison de plusieurs échantillons sur un même gel. La possibilité d'excision et de séquençage des bandes est un autre avantage de la technique.

La PCR-TTGE a été comparée à la mise en culture pour un même prélèvement. Cette comparaison a montré que les espèces fongiques observées en culture sont en plus grand nombre et pas forcément les mêmes que celles identifiées en TTGE.

Ces résultats montrent les limites de la technique PCR-TTGE, auxquelles s'ajoutent celles liées à la sélection qui est faite lors de l'extraction (taille, type de conidies) et aux limites de l'amplification (Hibbet, 1992 ; Smit *et al.*, 1999). Le manque de sensibilité des méthodes traditionnelles de révélation des gels est aussi une limite de la TTGE. Enfin une bande sur un gel de TTGE peut comprendre plus d'une séquence (Anderson et Cairney, 2004).

La différence de résultats dans certains prélèvements peut être due au fait que la culture ne permet d'identifier que les espèces fongiques viables et qui s'adaptent le mieux aux milieux de culture utilisés. Par ailleurs, on peut supposer que l'ADN des spores ou fragments d'hyphes morts peut être amplifié et identifié par TTGE.

Les résultats ne montrent donc pas de corrélation entre la technique classique de mise en culture et la technique moléculaire (PCR-TTGE). De manière générale, il y a plus d'espèces fongiques identifiées en culture qu'en TTGE et les espèces diffèrent d'une technique à l'autre. Culture et TTGE sont donc complémentaires et la TTGE ne peut en aucun cas se substituer à la culture.

La lourdeur de la technique TTGE et la difficulté rencontrée lors de la lecture des bandes sur certains gels TTGE nous ont conduit à nous intéresser à une autre technique automatisée reposant sur un principe proche. La D-HPLC permet la séparation des produits PCR mais aussi d'autres applications par exemple la vérification de la taille des fragments obtenus en PCR à l'aide d'un standard ou la vérification de la pureté des amorces. Les amorces utilisées en D-HPLC sont les mêmes que celles définies pour la PCR-TTGE (Fungcont 1-3). L'utilisation ou non du GC-clamp sur l'une des amorces a été testée : nous avons montré, à l'instar de Wurzbürger *et al.* (2003), que l'utilisation du GC-clamp permet une meilleure

séparation du mélange des fragments d'ADN. Celle-ci se fait pendant l'élution du mélange avec les fragments d'ADN partiellement dénaturés.

Les profils apparaissent comme une succession de pics correspondant aux fragments d'ADN détectés par UV ou par fluorescence.

La mise au point de cette technique et son application sur les différents prélèvements d'air ont été possibles grâce à la collaboration de la société Transgenomic (Angleterre) et du laboratoire de Biochimie et Génétique de l'hôpital Henri Mondor (Pr Serge Pissard, Créteil).

Cette technique initialement mise au point pour l'analyse des mutations (Fruet et Noyer-Weidner, 2003 ; Xiao et Oefner, 2001) est très utilisée pour l'analyse et l'identification de communautés de bactéries (Barlaan *et al.*, 2005 ; Glodenberg *et al.*, 2007). Elle a été appliquée pour l'identification des espèces de *Candida* à partir de cultures d'échantillons de sang (Goldenberg *et al.*, 2005b). Notre étude est la première application de la D-HPLC pour l'évaluation de l'aérocontamination fongique.

Les paramètres d'analyse par D-HPLC à partir des prélèvements d'air ont été mis au point à partir des produits de PCR avec les 3 amorces Fungcont1/Fungcont 2+GC/ Fungcont3. Pour une bonne séparation des fragments, la température optimale de dénaturation est de +63°C, le pourcentage de tampon B est de 48 % et le flux est 0,9 mL/min.

Ces conditions ont été testées avec succès sur des échantillons contenant une seule espèce ou un mélange d'espèces déterminées puis sur les échantillons issus de prélèvements d'air. Tous les échantillons testés en D-HPLC ont été aussi analysés en TTGE.

La D-HPLC s'avère plus avantageuse que la TTGE pour plusieurs raisons :

- Il est possible de passer un plus grand nombre d'échantillons (96 pour D-HPLC contre 30 pour TTGE),
- Il ne faut pas préparer de gels,
- La lecture est automatique alors qu'elle est manuelle en TTGE,
- La collecte des pics est également automatisée alors qu'en TTGE les bandes sont découpées à la main,
- L'analyse est plus rapide,
- La comparaison des profils est plus simple.

A partir des prélèvements d'air, les espèces identifiées après séquençage en TTGE sont quasiment les mêmes que celles identifiées en D-HPLC dans des environnements faiblement et moyennement contaminés. Cependant, la D-HPLC permet l'identification de plus d'espèces dans les environnements très contaminés.

Comme en TTGE où plusieurs bandes peuvent donner une même séquence, il peut y avoir plusieurs pics correspondant à une même séquence avec la D-HPLC (Barlaan *et al.*, 2005).

Le manque de fiabilité des informations fournies par les bases de données constitue une limite des techniques moléculaires utilisées dans cette étude.

Les espèces identifiées en D-HPLC ne sont pas les mêmes que celles identifiées en culture pour un même prélèvement d'air. Ceci confirme que la mise en culture et la biologie moléculaire ne donnent pas les mêmes informations pour évaluer l'aérocontamination fongique. Il faut appliquer les deux types de techniques pour avoir une meilleure représentation des espèces fongiques présentes dans un prélèvement d'air.

Pour la première fois les techniques moléculaires d'analyse de communautés de microorganismes ont été appliquées dans l'analyse des champignons présents dans l'air. La TTGE et la D-HPLC permettent la séparation des espèces fongiques après l'extraction et l'amplification de l'ADN fongique total contenu dans un prélèvement d'air.

Ce travail apporte des outils qui complètent une évaluation de base (observation et questionnaires) des environnements intérieurs.

2ème Partie

Application des différentes techniques de prélèvement et d'analyse dans les environnements intérieurs et semi-clos

INTRODUCTION

La présence de spores fongiques qui sont transférées par ventilation ou apportées par les activités des occupants est normale dans l'air intérieur. Au cours de ces dernières années, des études ont suggéré un lien possible entre l'exposition aux champignons en milieu intérieur et diverses atteintes à la santé (May et Kullman, 2002 ; Nolard et Beguin, 2003 ; Pieckova et Jesenska, 1999).

Une enquête de dimension européenne (European Health Community Respiratory Survey), réalisée entre 1991 et 1992, indique que les pays où la prévalence de l'asthme est la plus forte, ont un pourcentage plus important d'habitats humides. Cette enquête montre aussi que la sensibilisation aux champignons représente un facteur de risque élevé pour l'asthme sévère chez l'adulte (Zock *et al.*, 2002 ; Zureik *et al.*, 2002).

Dans les environnements de production animale, les espèces fongiques constituent une grande partie des contaminants microscopiques environnementaux.

L'objectif de cette partie est d'appliquer les techniques précédemment développées (PCR-TTGE et PCR-D-HPLC) dans des environnements variés (Bureaux, habitats et bâtiments d'élevage) tant en réalisant les cultures mycologiques classiques en parallèle.

1. Analyse de la qualité de l'air dans les lieux publics et privés

Introduction

Lorsque l'humidité relative dépasse 75 %, la croissance des champignons libérant des spores dans l'atmosphère est possible. La poussière des bâtiments eux-mêmes, le bois, le papier, les tissus, les aliments, les climatiseurs et les humidificateurs, les plantes d'intérieur constituent les supports nutritifs nécessaires à la croissance fongique. Les spores, en pénétrant dans les voies respiratoires, peuvent être à l'origine de problèmes de santé comme l'asthme et les pneumonies allergiques (CSHP, 1996 ; Leclère et Drouet, 2005 ; Roussel *et al.*, 2005) et parfois incriminés dans le Syndrome des Bâtiments Malsains (SBM) (Grimaldi et Pareil, 2006 ; Petrix *et al.*, 2005).

Si les espèces les plus souvent isolées dans le milieu extérieur appartiennent aux genres *Cladosporium*, *Alternaria* et *Aureobasidium*, les genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma* sont les plus souvent rencontrés dans les systèmes de climatisation (Vincent *et al.*, 1998). Les spores fongiques peuvent être introduites à l'intérieur des locaux par les fenêtres, les allées et venues des occupants ou visiteurs (chaussures, vêtements...), ou la poussière. Elles se développent ensuite sur la nourriture ou les supports de toute nature.

Les prélèvements d'air effectués dans les habitats et les bureaux sont des prélèvements ponctuels. Nous avons utilisé trois biocollecteurs d'air en parallèle : l'Air Test Oméga (Air Strategie Bio-Impactor), le CIP 10-M et l'AirPort MD8. Nous avons appliqué les méthodes décrites précédemment (la culture, la PCR-TTGE et la PCR-D-HPLC) sur les différents prélèvements d'air.

Matériels et méthodes

Lieux de prélèvements (en collaboration avec le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris)

Les 5 habitats (tableau VII) étudiés présentent des problèmes d'humidité ou présentent des champignons visibles sur les substrats (murs, joints, plafonds...). Les prélèvements ont été faits dans un immeuble équipé de système de conditionnement d'air (Direction Générale de la mairie de Paris, 4 bureaux) et dans un bâtiment à ventilation naturelle (bâtiment Goret à l'ENVA, 2 bureaux) (tableau VIII). Nous n'avons pas toujours utilisé l'Air Test Oméga (Air Strategie Bio-Impactor).

Prélèvements d'air (tableau VIII)

Les durées et les volumes des prélèvements d'air sont les suivants :

- 2 minutes pour l'Air Test Oméga (= 200 L)
- 20 minutes pour le CIP 10-M (= 200 L)
- 4 minutes pour l'AirPort MD8 (= 200 L)

Le volume de 200 L a été choisi parce qu'il est employé pour les audits environnementaux dans les habitats (Bex *et al*, 2006).

Les prélèvements ont été faits à proximité des zones susceptibles d'être contaminées par les champignons.

Stockage et transport des échantillons

Le liquide de collecte du CIP 10-M est récupéré dans des tubes stériles à l'aide d'une pipette et de cônes à filtre à usage unique.

Les membranes de gélatine du MD8 sont recueillies dans des boîtes de Petri stériles.

Tous les échantillons sont stockés dans une glacière contenant de la glace et transportés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'école Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA).

Analyse des prélèvements d'air (tableau IX)

Les prélèvements avec l'Air Test Oméga sont obtenus par impaction direct sur milieux de cultures (Malt et DG18)

Les membranes de gélatine de l'AirPort MD8 ont été dissoutes dans 10 mL d'eau stérile à 37°C sous agitation pendant environ 10 minutes. La solution de dissolution est centrifugée à 14000 tr/min pendant 15 min, et 2,5 mL du culot sont récupérés.

Le liquide de collecte (eau+Tween 20 à 0,01%) du CIP 10-M est récupéré (de 1 à 1,5 mL) dans un tube eppendorf de 2 ml

- La solution de dissolution de l'AirPort MD8 et le liquide de collecte du CIP 10-M sont ensemencés purs et dilués au 1/10, 1/100 et 1/1000 sur milieu Malt Agar Chloramphénicol et sur gélose DG18.
- 500µL de la solution pure ont été stockés à -20°C avant analyse par biologie moléculaire (PCR-TTGE et PCR-D-HPLC).

La dissolution des membranes de gélatine de l'AirPort MD8 et la mise en culture de tous les échantillons sont effectuées le jour des prélèvements.

Les différentes boîtes de Petri ont été incubées à +25°C (DG18 et malt) et à +37°C (malt). La lecture s'est faite à partir du 3^{ème} jour jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation. La lecture des boîtes comprenait le dénombrement des colonies, l'observation macroscopique et microscopique des espèces fongiques.

Tableau VII : Descriptif des habitations étudiées

Habitats	Type		Point 1	Point 2	Point 3
1	Appartement	Problèmes de fuites d'eau dans l'immeuble	Entrée : une forte odeur de moisissures	Chambre : une faible odeur de moisissures	
2	Appartement	Moisissures visibles sur les murs des lieux communs de l'immeuble	Pièce principale : présence de moisissures sur les bords de fenêtres et sur les murs avec une forte odeur	Salle d'eau : présence de moisissures sur les murs et les joints	
3	Pavillon	Une forte d'odeur de moisissures	Pièce de stockage : odeur de moisissures	Salon : pas de signe de moisissures	
4	Appartement	Murs extérieurs de l'immeuble avec peintures abîmées et présence de moisissures	Salon : présence de moisissures sur les murs	Salle d'eau : présence de moisissures au plafond	
5	Pavillon	Au bord de la Marne : odeurs et présence de moisissures	Sous-sol : régulièrement inondé	Rez de chaussé : forte odeurs de moisissures	Salon : pas de signe de moisissures

Tableau VIII : Descriptif des bureaux étudiés

Bureaux	Type	Caractéristiques	Problème
1	DGMP avec système de conditionnement d'air	Sous sol ; 2 personnes	aucun
2	DGMP avec système de conditionnement d'air	Rez de chaussée ; 4 personnes	aucun
3	DGMP avec système de conditionnement d'air	1 ^{er} étage (secrétariat) ; 2 personnes	aucun
4	DGMP avec système de conditionnement d'air	3 ^{ème} étage ; 1 personne	aucun
5	Bâtiment Goret, avec ventilation naturelle	1 personne	Problème d'humidité rencontré auparavant
6	Bâtiment Goret, avec ventilation naturelle	vide	archives Stockage de documents

Tableau IX : Tableau récapitulatif du devenir des prélèvements d'air effectués dans les habitats et les bureaux

Appareils	Volume prélevé (temps)	Support de prélèvement	Technique appliquée	Analyses
Air Test Oméga	200 L (2 min)	Boîte de culture	Culture :	- incubation 25°C et 37°C (malt) et 25°C (DG18) - lecture à 7 jours
CIP 10-M	200 L (20 min)	0.01 % tween 20/eau	Culture	- dilution (1/10 ; 1/100 ; 1/1000) - incubation 25°C et 37°C (malt) et 25°C (DG18) - lecture à 7 jours
			PCR/ Fungcont 1-3 avec et sans GC clamp	TTGE et D-HPLC
AirPort MD8	200 L (5 min)	Membrane de gélatine	Culture	- dilution (1/10 ; 1/100 ; 1/1000) - incubation 25°C et 37°C (malt) et 25°C (DG18) - lecture à 7 jours
			PCR/ Fungcont 1-3 avec et sans GC clamp	TTGE et D-HPLC

Résultats

a. Lieux publics : bureaux

Nous avons réalisé 3 séries de prélèvements avec les 3 appareils de prélèvement d'air. Chaque série comprend un prélèvement par appareil. Les appareils sont mis à une hauteur d'environ 1m et sont placés environ à 3 m de distance les uns des autres. L'Air Test Oméga n'a pas été utilisé dans le bâtiment Goret à l'ENVA et la technique PCR-D-HPLC n'a pas été appliquée aux prélèvements d'air effectués dans les bureaux de la Direction Générale de la mairie de Paris.

Les résultats représentés sous forme de tableau (tableaux X, et XI) sont listés en groupes et espèces de champignons les plus fréquemment isolés dans les environnements intérieurs (*Alternaria*, *Aspergillus* dont *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, levures, mucorales, *Penicillium*, *Scopulariopsis*). Un groupe « autres champignons » représente les champignons qui sont moins connus (décrits mais peu fréquents) mais déjà retrouvés dans l'air et les espèces que nous n'avons pas pu identifier (non sporulées ou difficilement identifiables).

Les champignons isolés dans les bureaux des deux bâtiments sont *Alternaria*, *Aspergillus* (dont *Aspergillus fumigatus*), *Cladosporium*, les levures, *Penicillium*, *Scopulariopsis* et les autres champignons.

Les résultats de l'immeuble de la Direction Générale de la Mairie de Paris sont présentés dans le tableau X. Dans ce tableau nous remarquons que l'espèce *Aspergillus fumigatus* et les levures sont identifiés uniquement par TTGE. La détection d'*Aspergillus fumigatus* s'est faite à partir des prélèvements avec les appareils CIP 10-M et AirPort MD8 dans les 4 bureaux prélevés. Les levures ont été retrouvées seulement dans les prélèvements à partir du CIP 10-M dans les bureaux 1, 2 et 4.

Les autres espèces d'*Aspergillus* sont identifiées dans trois bureaux par culture et TTGE dans le bureau 1 et uniquement par TTGE dans les bureaux 2 et 4.

Le genre *Penicillium* est identifié uniquement par culture à partir du prélèvement du CIP 10-M dans les bureaux 2, 3 et 4.

Les autres champignons sont retrouvés dans les 4 bureaux. Ils sont retrouvés dans les prélèvements à partir des appareils Air Test Oméga et CIP 10-M dans les bureaux 2 et 4 et à partir du CIP 10-M dans les bureaux 1 et 3.

Les trois appareils utilisés dans les bureaux de la Direction Générale de la mairie de Paris permettent d'isoler des espèces différentes. Le CIP 10-M semble être mieux adapté car il permet d'isoler plus d'espèces par les deux méthodes utilisées. Dans cet environnement, la PCR-TTGE montre une diversité plus grande des espèces identifiées que la culture. Ces espèces semblent être homogènes dans tout l'immeuble. Mais la répartition est différente dans les bureaux.

Tableau X : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des bureaux prélevés du bâtiment de la Direction Générale de la Mairie de Paris (DGMP). Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification.

Direction Générale de la Mairie de Paris										
Espèces ou groupes de champignons	Bureau 1					Bureau 2				
	Air Test Omega	CIP 10-M		AirPort MD8		Air Test Omega	CIP 10-M		AirPort MD8	
		Culture	TTGE	Culture	TTGE		Culture	TTGE	Culture	TTGE
<i>Alternaria</i> spp.										
<i>Aspergillus fumigatus</i>										
Autres <i>Aspergillus</i>										
<i>Cladosporium</i> spp.										
<i>Fusarium</i> spp.										
Levures										
Mucorales										
<i>Penicillium</i> spp.										
<i>Scopulariopsis</i> spp.										
Autres champignons										

Direction Générale de la Mairie de Paris										
Espèces ou groupes de champignons	Bureau 3					Bureau 4				
	Air Test Omega	CIP 10-M		AirPort MD8		Air Test Omega	CIP 10-M		AirPort MD8	
		Culture	TTGE	Culture	TTGE		Culture	TTGE	Culture	TTGE
<i>Alternaria</i> spp.										
<i>Aspergillus fumigatus</i>										
Autres <i>Aspergillus</i>										
<i>Cladosporium</i> spp.										
<i>Fusarium</i> spp.										
Levures										
Mucorales										
<i>Penicillium</i> spp.										
<i>Scopulariopsis</i> spp.										
Autres champignons										

L'air des deux bureaux du bâtiment Goret de l'ENVA comporte des spores d'*Aspergillus fumigatus* (tableau XI) (prélèvements dans le bureau 5 avec le CIP 10-M par la culture et la TTGE et dans le bureau 6 uniquement par TTGE à partir des prélèvements avec les deux appareils utilisés). Les autres espèces d'*Aspergillus* ont été identifiées par culture à partir des prélèvements des 2 appareils dans le bureau 5 seulement.

Des champignons du genre *Cladosporium* ont été détectés uniquement dans les prélèvements avec l'AirPort MD8 dans les deux bureaux. L'identification s'est faite par culture et TTGE dans le bureau 5 et par TTGE dans le bureau 6.

Le genre *Fusarium* n'a été identifié que par TTGE dans le bureau 6 et à partir du prélèvement avec le CIP 10-M.

Le genre *Penicillium* identifié uniquement par culture est présent dans le bureau 5 par collecte avec l'AirPort MD8 et dans le bureau 6 par collecte avec le CIP 10-M.

Le genre *Scopulariopsis* est identifié dans les deux bureaux à partir des deux appareils mais uniquement par DHPLC.

Les autres champignons sont retrouvés dans les deux bureaux. Dans le bureau 5, ils sont retrouvés dans le prélèvement avec l'AirPort MD8 par TTGE et D-HPLC. Dans le bureau 6, le CIP 10-M a permis leur détection par les trois méthodes et l'AirPort MD8 par culture et D-HPLC.

Les prélèvements d'air dans les deux bureaux du bâtiment Goret à l'ENVA où deux appareils ont été utilisés, donnent dans l'ensemble un nombre d'espèces identifiées comparable avec les deux appareils. Mais ce ne sont pas exactement les mêmes espèces. Les trois techniques utilisées ne permettent donc pas l'identification des mêmes espèces fongiques. La mise en culture semble avantageuse dans le bureau 5 autant pour le nombre que pour la diversité des espèces identifiées.

Tableau XI : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des bureaux prélevés du bâtiment Goret de l'ENVA. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Bâtiment Goret ENVA												
Espèces ou groupes de champignons	Bureau 5						Bureau 6					
	CIP 10-M			AirPort MD8			CIP 10-M			AirPort MD8		
	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.												
<i>Aspergillus fumigatus</i>												
Autres <i>Aspergillus</i>												
<i>Cladosporium</i> spp.												
<i>Fusarium</i> spp.												
Levures												
Mucorales												
<i>Penicillium</i> spp.												
<i>Scopulariopsis</i> spp.												
Autres champignons												

b. Lieux privés

Les prélèvements d'air ont été effectués dans 5 habitations différentes. Deux sites de prélèvements ont été sélectionnés dans chaque habitation. Le choix des sites de prélèvements s'est fait en fonction des endroits présentant plus d'humidité ou des pièces avec une forte odeur de moisissures.

Dans les habitations 4 et 5 l'Air Test Oméga n'a pas été utilisé.

Les résultats représentés sous forme de tableau (tableaux XII, XIII, XIV, XV et XVI) sont listés en groupes et espèces de champignons les plus fréquemment isolés dans les environnements intérieurs (*Alternaria*, *Aspergillus* dont *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, levures, mucorales, *Penicillium*, *Scopulariopsis*). Un groupe « autres champignons » représente les champignons qui sont moins connus (décrits mais peu fréquents) mais déjà retrouvés dans l'air et les espèces que nous n'avons pas pu identifier (non sporulées ou difficilement identifiables).

Dans l'habitat 1 (tableau XII), les mêmes espèces ont été identifiées au niveau des 2 points de prélèvements exception faite des levures identifiées seulement au point 1 de prélèvement à l'aide du CIP 10-M.

Les trois techniques permettent d'identifier l'espèce *Aspergillus fumigatus* au point 1 par CIP 10-M. Elle est également détectée par les deux autres appareils. Mais uniquement par biologie moléculaire pour l'AirPort MD8 aux deux points de prélèvement. Par contre, elle est absente dans le prélèvement avec l'Air Test oméga au point 2.

Les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont retrouvés dans les prélèvements des 3 appareils. Mais il est identifié uniquement par culture.

Les autres champignons sont détectés au niveau des 2 points de prélèvements, mais le sont seulement en culture et en D-HPLC.

Si on ne prend en compte que l'aspect culture, il ressort que quelque soit l'appareil employé, les même espèces sont pratiquement identifiées.

Tableau XII : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 1. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 1						Point de prélèvement 2									
	Air Test Omega	CIP 10-M			AirPort MD8			Air Test Omega	CIP 10-M			AirPort MD8				
		Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE		DHPLC	Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.																
<i>Aspergillus fumigatus</i>	■	■	■	■		■	■		■	■			■	■		
Autres <i>Aspergillus</i>		■			■	■		■	■			■	■	■		
<i>Cladosporium</i> spp.																
<i>Fusarium</i> spp.																
Levures			■													
Mucorales																
<i>Penicillium</i> spp.	■	■			■			■	■			■				
<i>Scopulariopsis</i> spp.																
Autres champignons	■	■		■	■		■	■		■		■		■		

Dans l'habitat 2 (tableau XIII), les espèces d'*Aspergillus* y compris *A. fumigatus* sont détectées par le CIP 10-M et l'AirPort MD8 seulement. Elles sont principalement identifiées en TTGE et D-HPLC. Seule la culture du point de prélèvement 2 est positive pour *A. fumigatus*.

Les levures sont détectées au niveau des 2 points de prélèvement avec des variantes selon l'appareil de prélèvement et la méthode d'analyse.

La culture permet de mettre en évidence des mucorales, *Penicillium* spp et *Scopulariopsis* spp qui n'apparaissent pas avec les autres techniques moléculaires. Le genre *Cladosporium* est identifié au point 2 par l'AirPort MD8 et uniquement par TTGE.

Les autres champignons sont identifiés aux 2 points de prélèvement et principalement par culture et D-HPLC.

Pour cet habitat, la culture permet d'identifier plus d'espèces que les techniques moléculaires dans les prélèvements issus des 3 appareils.

Tableau XIII : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 2. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 1						Point de prélèvement 2									
	Air Test Omega	CIP 10-M			AirPort MD8			Air Test Omega	CIP 10-M			AirPort MD8				
		Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE		DHPLC	Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.																
<i>Aspergillus fumigatus</i>																
Autres <i>Aspergillus</i>																
<i>Cladosporium</i> spp.																
<i>Fusarium</i> spp.																
Levures																
Mucorales																
<i>Penicillium</i> spp.																
<i>Scopulariopsis</i> spp.																
Autres champignons																

Dans l'habitat 3 (tableau XIV), les autres *Aspergillus* sont identifiés par culture et D-HPLC au niveau des 2 points de prélèvement. L'espèce *A. fumigatus* est identifiée uniquement dans les prélèvements de l'Air Test Oméga et l'AirPort MD8. La détection par l'AirPort MD8 se fait par les trois méthodes d'analyse au niveau du point de prélèvement 1 et par culture et TTGE au niveau du point de prélèvement 2.

Les levures sont principalement identifiées par D-HPLC dans les prélèvements avec le CIP 10-M et l'AirPort MD8 au niveau des deux points de prélèvement.

L'identification de mucorales au point 1 et de *Penicillium* spp au point 2 a été possible seulement en culture et dans les prélèvements par l'Air Test Oméga.

Dans cet habitat, les autres champignons sont identifiés seulement par les techniques moléculaires quel que soit l'appareil de prélèvement employé.

Tableau XIV : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 3. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 1							Point de prélèvement 2									
	Air Test Oméga	CIP 10-M			AirPort MD8			Air Test Oméga	CIP 10-M			AirPort MD8					
		Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE		DHPLC	Culture	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	
Alternaria spp.																	
Aspergillus fumigatus	■				■	■	■	■				■	■				
Autres Aspergillus	■	■		■	■			■	■			■		■			
Cladosporium spp.																	
Fusarium spp.																	
Levures		■		■			■				■					■	
Mucorales	■																
Penicillium spp.								■									
Scopulariopsis spp.																	
Autres champignons			■			■	■			■		■		■	■		

Les prélèvements d'air de l'habitat 4 (tableau XV) permettent l'identification d'*Aspergillus fumigatus* en culture et en TTGE au niveau du point 1 et uniquement en culture au niveau du point 2. Par contre, seule la D-HPLC a permis d'identifier d'autres *Aspergillus* avec les deux appareils au niveau du point 1. Au niveau du point 2 à l'aide du CIP 10-M les *Aspergillus* ont été identifiés par culture à partir du CIP 10-M et par culture et D-HPLC à l'aide de l'AirPort MD8.

Dans cet environnement, nous avons identifié *Alternaria* spp au niveau du point 1 par TTGE et à l'aide du CIP 10-M. Au point 2, *Alternaria* est retrouvé dans les prélèvements effectués avec les 2 appareils. Les 3 méthodes d'analyse permettent leur identification après collecte avec le CIP 10-M. Seule la D-HPLC les met en évidence dans le prélèvement réalisé avec l'AirPort MD8.

Les genres *Fusarium* et *Scopulariopsis* sont identifiés au niveau des 2 points de prélèvement à l'aide de l'AirPort MD8. Les méthodes qui ont permis l'identification sont la TTGE pour *Fusarium* et la D-HPLC pour *Scopulariopsis*.

Les *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, les mucorales et les levures sont identifiés uniquement au point 2. Dans le prélèvement avec le CIP 10-M, sont retrouvés *Cladosporium* spp par TTGE et des levures par D-HPLC. Alors que les mucorales et *Penicillium* spp sont retrouvés seulement par culture dans les prélèvements à partir de l'AirPort MD8.

Les autres champignons sont identifiés uniquement par les méthodes moléculaires au niveau des 2 points de prélèvement.

Tableau XV : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des deux points de prélèvement de l'habitat 4. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 1						Point de prélèvement 2					
	CIP 10-M			AirPort MDS			CIP 10-M			AirPort MDS		
	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.												
<i>Aspergillus fumigatus</i>												
Autres <i>Aspergillus</i>												
<i>Cladosporium</i> spp.												
<i>Fusarium</i> spp.												
Levures												
Mucorales												
<i>Penicillium</i> spp.												
<i>Scopulariopsis</i> spp.												
Autres champignons												

Dans l'habitat 5, nous avons défini 3 points de prélèvement qui correspondent au sous-sol (Point 1) au rez-de-chaussée (point 2) et à l'étage (point 3). Les résultats sont présentés dans le tableau XVI.

Les prélèvements d'air ont permis d'identifier *Aspergillus fumigatus* au niveau des 3 points de prélèvement. La détection d'*Aspergillus fumigatus* s'est faite à partir des prélèvements des deux appareils au niveau des points 1 et 2 et dans le prélèvement du CIP 10-M au niveau du point 3. L'identification s'est faite par les 3 méthodes sans tenir compte de l'appareil utilisé. L'espèce *Aspergillus fumigatus* a été détectée par TTGE essentiellement à partir des prélèvements avec le CIP 10-M, par culture et biologie moléculaire à partir des prélèvements avec l'AirPort MD8.

La détection des autres espèces d'*Aspergillus* et de mucorales s'est faite par culture dans le prélèvement avec l'AirPort MD8, (au niveau du point 2 pour *Aspergillus* spp et au niveau du point 3 pour les mucorales).

Le genre *Alternaria* n'a été identifié que par culture au niveau du point 3 et uniquement dans le prélèvement avec le CIP 10-M.

Les *Cladosporium* spp et *Penicillium* spp sont identifiés au niveau des 3 points de prélèvement à partir des 2 appareils. Le genre *Cladosporium* est identifié principalement par TTGE et *Penicillium* par culture et par D-HPLC.

Les levures ont été détectées dans les prélèvements avec CIP 10-M par la mise en culture au niveau des points 1 et 2.

Les autres champignons ont été identifiés par les 3 méthodes à partir des prélèvements avec les 2 appareils au niveau des points 1 et 2. Seul le CIP 10-M par D-HPLC, permet la détection des autres champignons au point de prélèvement 3.

Tableau XVI : Espèces ou groupes d'espèces identifiés dans chacun des trois points de prélèvement de l'habitat 5. Ces espèces sont représentées en fonction de l'appareil de collecte et de la technique d'identification

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 1						Point de prélèvement 2					
	CIP 10-M			AirPort MD8			CIP 10-M			AirPort MD8		
	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.												
<i>Aspergillus fumigatus</i>		■	■	■		■		■		■	■	
Autres <i>Aspergillus</i>										■		
<i>Cladosporium</i> spp.	■	■			■			■			■	
<i>Fusarium</i> spp.												
Levures	■						■					
Mucorales												
<i>Penicillium</i> spp.	■	■	■	■		■			■	■		■
<i>Scopulariopsis</i> spp.												
Autres champignons		■	■	■		■	■	■	■		■	■

Espèces ou groupes de champignons	Point de prélèvement 3					
	CIP 10-M			AirPort MD8		
	Culture	TTGE	DHPLC	Culture	TTGE	DHPLC
<i>Alternaria</i> spp.	■					
<i>Aspergillus fumigatus</i>		■				
Autres <i>Aspergillus</i>						
<i>Cladosporium</i> spp.					■	
<i>Fusarium</i> spp.						
Levures						
Mucorales				■		
<i>Penicillium</i> spp.	■		■	■		■
<i>Scopulariopsis</i> spp.						
Autres champignons			■			

Discussion

Pour les prélèvements d'air dans les bâtiments (bureaux et habitats), nous avons utilisés 3 biocollecteurs d'aérosols (AirPort MD8, CIP 10-M et/ou Air Test Oméga). Les prélèvements avec l'AirPort MD8 et le CIP 10-M nous ont permis d'appliquer la mise en culture et deux techniques de biologie moléculaire (TTGE et/ou D-HPLC) sur un même prélèvement. L'utilité de méthodes d'identification moléculaire (Nieguitsila *et al.*, 2007) est de compléter les techniques classiques est rappelée par Boutin-Forzano *et al.*, 2006.

Les bureaux disposant d'un système de conditionnement d'air (DGMP) semblent peu contaminés (le nombre d'espèces est plus faible). Dans cet environnement, la technique TTGE est plus sensible que la mise en culture et le CIP 10-M montre une meilleure efficacité de collecte que les deux autres appareils testés (plus d'espèces détectées dans 3 bureaux sur les 4 bureaux prélevés). Ces résultats sont différents de ceux que nous avons obtenus à partir des prélèvements d'air réalisés à l'hôpital. Dans le bâtiment hospitalier l'Air Test Oméga a été plus efficace que le CIP 10-M. cette contradiction appuie sur le fait que l'utilisation d'un biocollecteur est fonction du lieux de prélèvement (Gangneux *et al.*, 2006 ; Grimaldi et Pariel, 2006)

Dans les bureaux à ventilation naturelle (ENVA), les deux techniques moléculaires (TTGE et D-HPLC) ne permettent pas d'identifier les mêmes espèces fongiques. Il en est de même pour les deux appareils.

Les résultats de ces deux types de bureaux montrent que la mise en culture et les techniques moléculaires permettent l'identification d'espèces différentes et sont complémentaires.

Le bâtiment à ventilation naturelle présente plus d'espèces fongiques que le bâtiment à système de conditionnement d'air. Nos résultats confirment les conclusions tirées dans le rapport de 2001 sur l'inventaire des données françaises relatives à la qualité de l'air intérieur des bâtiments. Un bon système de conditionnement d'air assure un confort thermique (régulation de la température et de l'humidité). Il permet de distribuer l'air aux occupants et d'éliminer les odeurs et les contaminants de l'air extérieur (CHMT, 1995).

Il faut tout de même rappeler qu'une bonne ventilation seule ne suffit pas toujours à assurer une qualité d'air adéquate. L'environnement intérieur résulte de l'interaction de plusieurs éléments (disposition des lieux, conditions extérieures, système de chauffage, de ventilation et de climatisation, sources de contamination potentielles et activités des occupants). La circulation de l'air, donc la distribution des polluants est influencée par les composants du bâtiment (murs, plafonds, équipements...).

Les moisissures les plus couramment isolées dans l'habitat appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium* (Bex *et al.*, 2006 ; Shelton *et al.*, 2002). Dans notre étude, les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont retrouvés dans les 5 habitats investigués et *Cladosporium* identifié dans deux habitats. La présence de différentes espèces fongiques dans les habitats dépend de plusieurs facteurs : le type et la localisation de l'habitat (Lee et Jo, 2006), l'activité humaine (Buttner et Stetzenbach, 1993), la nature des supports et la compétition au sein de la microflore (Bex *et al.*, 2006).

L'ensemble des résultats montre une bonne corrélation entre les deux appareils de prélèvement d'air aussi qu'une complémentarité entre mise en culture et biologie moléculaire. La comparaison des outils moléculaires montre que la D-HPLC est plus sensible que la TTGE. Certaines espèces ne sont détectées que par une seule technique :

- par TTGE : Levures dans l'habitat 1 ; *Fusarium* dans l'habitat 4 et *Cladosporium* dans l'habitat 5,
- par D-HPLC : *Aspergillus* autres que *A. fumigatus* dans les habitats 2, 3 et 4 ; levure dans l'habitat 3 et *Scopulariopsis* dans l'habitat 4.

Les champignons identifiés dans les différents prélèvements peuvent être responsables de problèmes respiratoires. Les symptômes liés à la qualité de l'air intérieur ne sont pas spécifiques. Les champignons provoquent des maladies dans les bâtiments, mais on ne sait pas exactement dans quelle mesure ils contribuent au syndrome du bâtiment malsain (CHMT, 1995 ; Grimaldi et Pareil, 2006 ; Pertrix *et al.*, 2005).

Dans la plupart des études épidémiologiques traitant du rapport entre la présence de moisissures dans les milieux intérieurs et la santé, les espèces de champignons n'ont pas été identifiées. L'exposition a simplement été évaluée à la lumière des témoignages des occupants (rapport de Santé Canada, 2004). L'asthme sévère chez l'adulte a pour facteur de risque la sensibilisation aux moisissures et d'après l'enquête réalisée entre 1991 et 1992 par European Health Community respiratory Survey, les pays dont la prévalence de l'asthme est plus forte ont plus de logements humides. Par contre Shelton *et al.* 2002 n'ont pas trouvé de relation entre les problèmes de santé déclarés et la présence de champignons connus ou potentiellement toxigènes. Des différences existent entre les espèces fongiques non seulement dans leurs effets possibles sur la santé mais aussi dans les mécanismes par lesquels elles affectent la santé. Il faut donc reconnaître la complexité de la mycologie de l'air intérieur. Les méthodes d'identification doivent être diversifiées. En ce qui concerne les appareils de prélèvement d'air, il faut tenir compte des caractéristiques de chaque équipement et de la fonction de l'environnement étudié.

2. Analyse de la qualité de l'air dans les bâtiments d'élevage

Introduction

Les microorganismes dans l'environnement agricole (parasites, bactéries et champignons) peuvent se trouver sur les éléments de structures (cloison, plafond, équipement,...) dans la litière (matières fécales...) et l'air qui rentrent dans les bâtiments. Ces microorganismes associés à l'humidité et la température contaminent l'environnement des animaux. Leur accumulation est facile dans ces bâtiments où les animaux sont confinés. Cette accumulation est nuisible aux animaux et aux travailleurs, car il y a un risque de développement de maladies respiratoires (May et Kullman, 2002).

Les champignons sont mis en cause dans de nombreuses maladies respiratoires chez les animaux (Richard, 1997 ; Richard *et al.*, 1984 ; Tell, 2005) et chez les hommes qui travaillent en milieu agricole (American Thoracic Society and Medical Section of the American Lung Association, 1998 ; Dalphin, 1998 ; Dalphin *et al.*, 1993, 1994 ; Dalphin et Reboux, 2005).

La présence des toxines liées à la présence même très temporaire de champignons par exemple dans l'alimentation des animaux a un impact probablement sous estimé en santé publique (Pitt, 2000) et pourrait être la cause dans le développement des cancers ou de néphropathies graves (Khun et Ghannoum, 2003 ; Sorenson, 1999).

D'où l'importance de l'étude des champignons aéroportés dans le milieu agricole tant pour les animaux que pour les travailleurs. Cependant peu d'études ont dressé l'inventaire des espèces fongiques présentes dans l'environnement agricole (Edouard, 1997 ; Kotimaa, 1990 ; Kotimaa *et al.*, 1991 ; Lacey et Dutkiewicz, 1994 ; Lange *et al.*, 1997 ; Reboux *et al.*, 2006). Ces travaux se sont basés sur la mise en culture pour l'identification des espèces fongiques.

L'objectif de cette partie est dans un premier temps de comparer les espèces identifiées à partir des prélèvements d'air aux espèces qui sont isolées à partir des poumons d'animaux autopsiés. Ces animaux vivent dans l'environnement où sont effectués les prélèvements d'air. Puis d'appliquer les techniques moléculaires mises au point dans la première partie pour l'identification globale des espèces fongiques dans les prélèvements d'air.

Matériels et méthodes

a. Suivi de l'aérocontamination fongique d'une l'étable de l'ENVA

Un suivi de l'aérocontamination de l'étable de l'ENVA (tableau XVII) sur 13 semaines s'est déroulé pendant l'hébergement des animaux (moutons et vaches essentiellement) malades ou sains. Ce suivi a été mis en place pour contrôler exclusivement la présence d'*Aspergillus fumigatus* dans cet environnement.

Les prélèvements d'air

L'appareil utilisé est le CIP 10-M avec un débit de 10 L/min, il permet les prélèvements de longue durée. Dans notre cas 50 minutes pour un total de 500 L d'air prélevé.

Le suivi a été hebdomadaire. Un prélèvement d'air a été réalisé à hauteur des animaux, au centre de l'étable. Les particules sont recueillies dans un liquide de collecte ayant pour composition : eau + tween 20 à 0,01 %.

Traitement des prélèvements d'air

Le liquide de collecte a été récupéré à l'aide d'une pipette dans un eppendorf stérile. 500 μ L ont étéensemencés sur le milieu Malt Agar Chloramphénicol ; des dilutions décimales consécutives au 1/10 ; 1/100 et 1/1000 ont été effectuées.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à +37°C pendant 7 jours. Les colonies fongiques ont été identifiées en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques (et si nécessaires génotypiques).

Les prélèvements sur les animaux autopsiés

Lorsque les animaux hébergés dans l'étable sont finalement autopsiés, une culture mycologique a été réalisée à partir du tissu pulmonaire.

Quand les lésions pulmonaires sont mises en évidence, elles ont été prélevées puis en partie fixées dans du formaldéhyde à 10 % (en vue d'un examen histologique ultérieur) et l'autre partie envoyée (sans liquide de conservation) au laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'ENVA où a été effectuée une culture mycologique. La mise en culture est réalisée sur Malt Agar Chloramphénicol après un broyage du morceau du poumon dans du PBS tween 20. À l'aide du broyat, nous avons effectué un traitement identique aux prélèvements d'air.

b. Suivi d'un élevage de poulets de chair label dans l'Yonne

Lieu de prélèvement

L'élevage de M. Jean-Noël MASSUARD à GRANDCHAMP (Yonne) nous a permis de faire notre suivi.

Cet élevage contient deux bâtiments mais notre étude a été réalisée dans un seul bâtiment avec un seul point de prélèvement au centre du bâtiment. La température dans le bâtiment est régulée par le contrôle mécanique des entrées (fenêtres) et des sorties d'air (lanterneau).

Les animaux sont arrivés la semaine 11 (**12 mars 2007**). Les prélèvements d'air ont été faits une fois par semaine pendant toute la durée de la présence des animaux dans l'élevage soit environ 3 mois. Il y a eu une série de prélèvements d'air réalisée après décontamination du bâtiment (phase vide sanitaire) et avant l'arrivée des animaux (**avant le 12 mars 2007**). Puis une autre série après leur départ et après décontamination du local. Soit un total de 15 semaines de prélèvements.

Chaque semaine, des paramètres ont été relevés lors de nos différents prélèvements (température, hygrométrie relative, nombre d'oiseaux morts, poids moyen des animaux...)

Tenue recommandée pour accès au bâtiment : une cotte, une charlotte et des surbottes.

Prélèvements d'air

Localisation des prélèvements dans le poulailler : Un point A: au centre

La ventilation est statique (circulation d'air ajustée par le réglage des entrées et sorties d'air)

Les temps et volumes des prélèvements d'air :

- 50 minutes pour le CIP 10-M (prélèvement de 500 L)
- 10 minutes pour l'AirPort MD8 (prélèvement de 500 L)

Les prélèvements d'air ont été effectués au niveau du sol c'est-à-dire à hauteur des animaux.

Stratégies de prélèvement d'air

Les prélèvements d'air ont été réalisés de manière simultanée avec les deux appareils distants de 3 m.

Stockage et transport des échantillons

Le liquide de collecte (eau + tween 20 à 0,01 %) du CIP 10-M a été récupéré dans des tubes stériles à l'aide d'une pipette et de cônes à filtre à usage unique.

Les membranes de gélatine du MD8 ont été recueillies dans des boîtes de Petri stériles.

Tous les échantillons ont été stockés dans une glacière contenant de la glace et transportés au laboratoire de mycologie du centre de l'ENVA de Champignelles.

Analyse des prélèvements d'air au laboratoire de mycologie de Champignelles (tableau XVII)

Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C (DG18 et Malt Agar Chloramphénicol), à 37°C uniquement pour les boîtes sur milieu Malt Agar Chloramphénicol et la lecture à au 7^{ème} jour (comptage de colonies, identification macroscopique et microscopique).

Les échantillons prévus pour la biologie moléculaire ont été stockés à -20°C et transportés au laboratoire de l'UMR BIPAR (ENVA) pour y être analysés.

Tableau XVII : Conditions de prélèvements d'air dans le poulailler et liste des analyses

Appareils	Volume prélevé (temps)	Support prélèvement	Technique appliquée	Analyses
CIP 10-M	500 L (50 min)	0.01 % tween 20/eau	Culture	- dilution (1/10 ; 1/100 ; 1/1000) - incubation 25°C et 37°C (malt) et 25°C (DG18) - lecture à 7 jours
			PCR/ Fungcont 1-3 avec et sans GC clamp	TTGE et D-HPLC
AirPort MD8	500 L (10 min)	Membrane de gélatine	Culture	- dilution (1/10 ; 1/100 ; 1/1000) - incubation 25°C et 37°C (malt) et 25°C (DG18) - lecture à 7 jours
			PCR/ Fungcont 1-3 avec et sans GC clamp	TTGE et D-HPLC

Résultats

a. Suivi de l'étable à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (ENVA)

Dans l'étable, nous avons effectué des prélèvements d'air hebdomadaires avec le CIP 10-M (13 semaines) et l'identification a été obtenu uniquement par mise en culture (tableau XVII).

Les espèces identifiées à partir de prélèvements d'air ont été comparées aux espèces identifiées à partir des échantillons de poumons des animaux autopsiés (tableau XVIII).

Les prélèvements d'air ont été réalisés chaque semaine y compris en absence d'autopsie.

Durant, les 13 semaines de prélèvement d'air, 5 poumons d'animaux autopsiés (vache et veau) ont été mis à notre disposition. Nous avons identifiés en majorité des *Aspergillus* (*A. flavus* ; *A. fumigatus* ; *A. nidulans* ; *A. niger* et d'autres espèces non différenciées) et des mucorales (*Absidia* sp. et *Rhizopus* sp.). Les autres espèces sont des levures (*Rhodotorula* sp et autres) ou des champignons dont l'identification a été difficile en grande partie par manque de sporulation.

Fusarium sp. a été détecté à partir d'un prélèvement d'air et d'un fragment de poumon d'une vache autopsiée la même semaine. Par contre, *Penicillium* sp. a été retrouvé dans un prélèvement de poumon mais pas détecté dans les prélèvements d'air.

Parmi les espèces mises en évidence dans 4 poumons sur les 5 analysés, par culture, nous avons retrouvé au moins une des espèces parmi les espèces identifiées à partir des prélèvements d'air.

Tableau XVIII : Liste des espèces fongiques isolées dans l'air et à partir de poumons des animaux (bovins) autopsiés provenant d'une l'étable de l'ENVA. Les espèces retrouvées à la fois dans l'air et à partir du tissu pulmonaire sont indiquées en bleu.

Espèces fongiques isoées dans l'étable				
Semaine	dans l'air	ufc/m3	à partir du tissu pulmonaire des animaux	ufc/g
1	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Absidia</i> sp.	2 4	<i>Absidia</i> sp.	2
2	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Aspergillus nidulans</i> - <i>Absidia</i> sp.	2 6 12 2	1. <i>Aspergillus nidulans</i> 2. <i>Absidia</i> sp.	100 2
3	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Absidia corymbifera</i>	6 4 4	Pas d'autopsie	
4	- <i>Absidia</i> sp. - <i>Rhizopus</i> sp - <i>Aspergillus fumigatus</i>	2 2 10	1. <i>Absidia</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. Autre espèce 2. <i>Aspergillus fumigatus</i>	4; 6; 2 60
5	- <i>Rhizopus</i> sp. - <i>Aspergillus</i> sp.	6 5	Pas d'autopsie	
6	- <i>Aspergillus</i> spp.	24	Pas d'autopsie	
7	- <i>Absidia</i> sp. - <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Aspergillus nidulans</i> - <i>Rhodoturula</i> sp.	4 2 3 8	Pas d'autopsie	
8	- Levure - <i>Aspergillus</i> sp.	8 10	Pas d'autopsie	
9	- Autre espèce	6	Pas d'autopsie	
10	- Autre espèce - Levure	4 24	Pas d'autopsie	
11	- <i>Fusarium</i> sp.	8	<i>Fusarium</i> sp.; Levure; <i>Absidia</i> sp.	10; 21; 2
12	- Autre espèce - <i>Aspergillus</i> sp.	4 8	Pas d'autopsie	
13	- <i>Rhizopus</i> sp - <i>Aspergillus</i> sp - Levure	2 4 16	Autre espèce	8

b. Suivi d'un élevage de poulets

Résultats de la mise en culture des prélèvements d'air issus du poulailler

Les résultats sont obtenus par la mise en culture des prélèvements d'air hebdomadaires effectués pendant 15 semaines dans le bâtiment d'élevage de poulets (figure 9 à 14). On note une augmentation de la flore fongique en présence d'animaux quelles que soient les conditions de culture. Les deux premières semaines en présence d'animaux, les cultures issues des prélèvements par l'AirPort MD8 sont négatives.

L'analyse statistique de ces résultats est décrite dans l'article 1 « Comparative performance of two air samplers and mycological media for quantification of fungal aerocontamination in a poultry facility ».

Les conditions environnementales (température, hygrométrie relative et ammoniac) n'ont pas d'influence sur la collecte et l'identification des champignons dans le bâtiment.

Il n'y a pas de différence significative de concentration totale des champignons que l'on considère en fonction des différentes conditions de culture et d'appareil. Par contre il est possible de mettre en évidence des différences en fonction des espèces : le milieu DG18 permet une meilleure croissance des *Aspergillus* que le milieu au malt. Le milieu au malt permet une meilleure croissance de *Scopulariopsis* et des espèces non identifiées.

Les études statistiques ont montré que la sortie des animaux à la semaine 5 entraîne une modification de la concentration de la flore fongique dans le bâtiment. On note une augmentation de *Scopulariopsis* après l'accès des animaux à l'extérieur. Parallèlement l'accès à l'extérieur entraîne une diminution des espèces non identifiées.

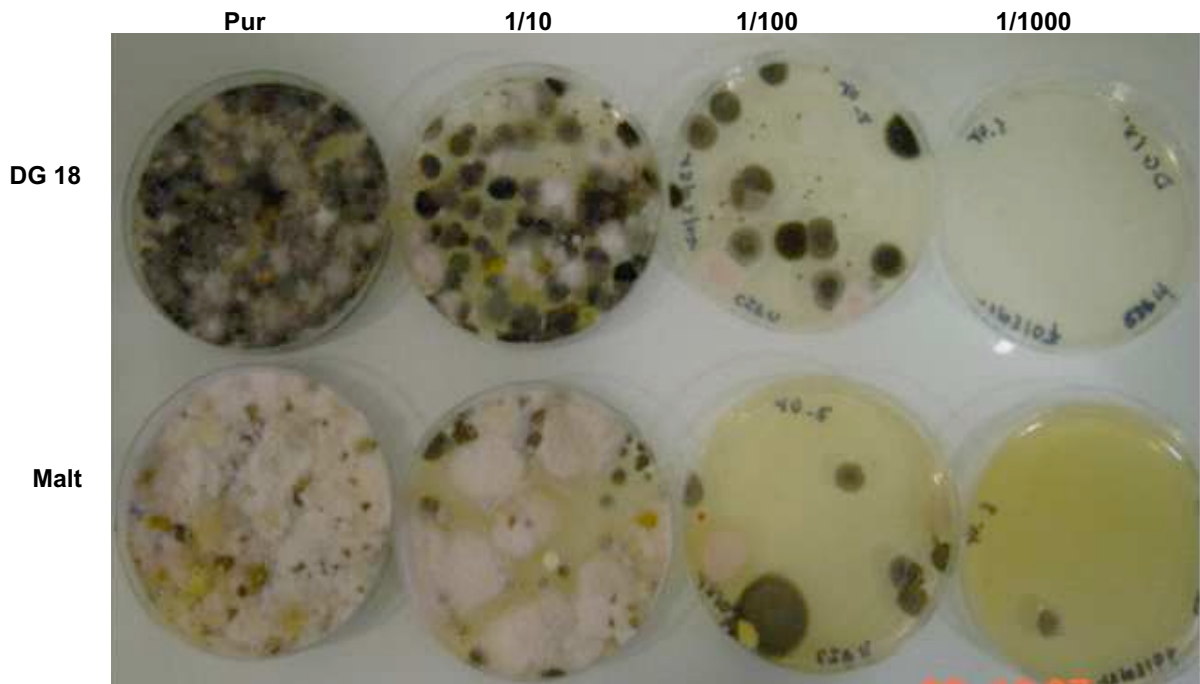


Figure 9 : Boîtes de culture sur les milieux DG18 et malt du liquide de collecte d'aérosols (pur et dilué) par CIP 10-M à la semaine 4, après incubation à 25°C.

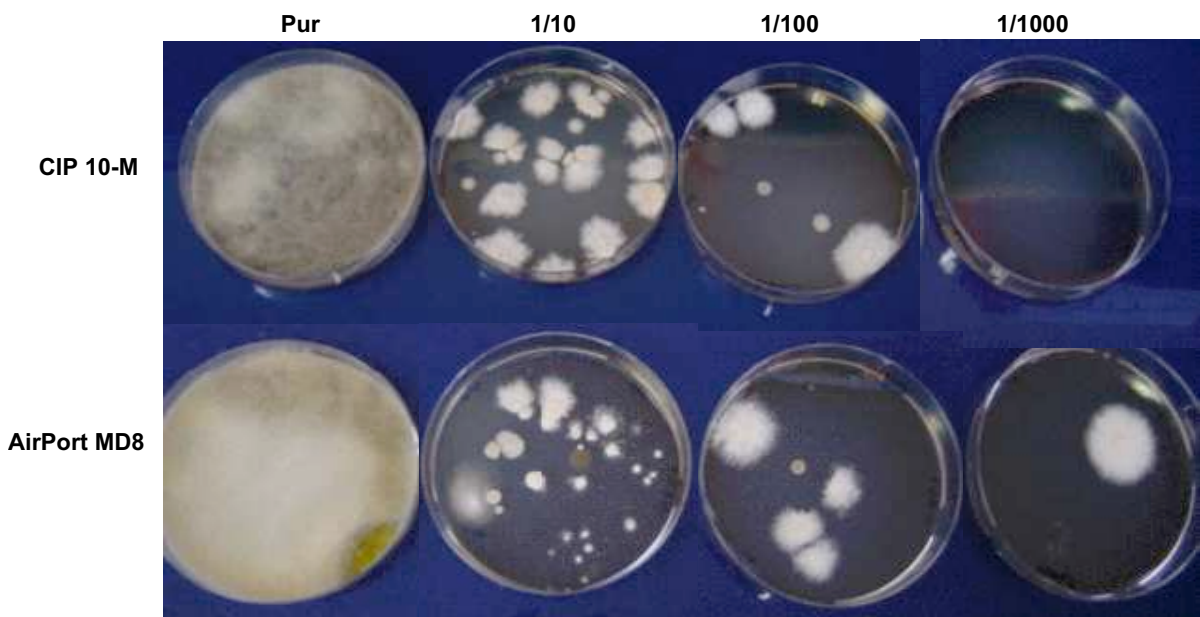


Figure 10 : Boîtes de culture sur le milieu malt des liquides de collecte d'aérosols (pur et dilués) par les appareils CIP 10-M et AirPort MD8 à la semaine 4, après incubation à 37°C.

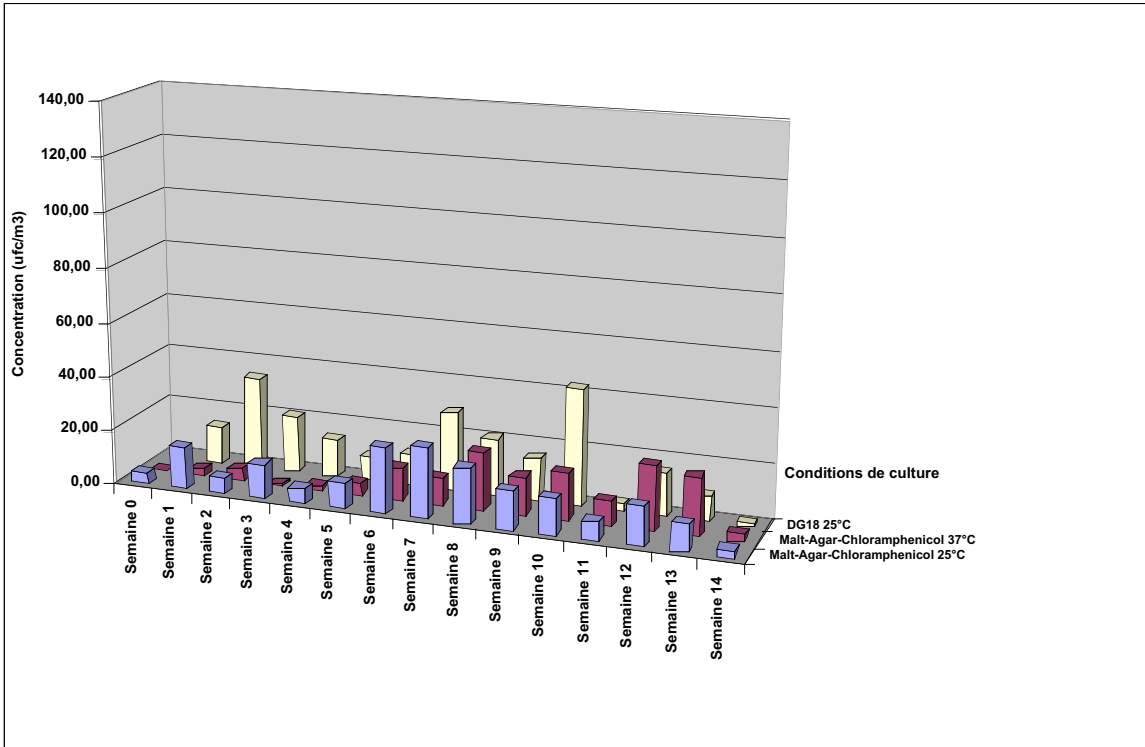


Figure 11 : Concentrations moyennes des champignons aéroportés collectés par le CIP 10-M dans le poulailler durant 15 semaines en fonction des conditions de culture.

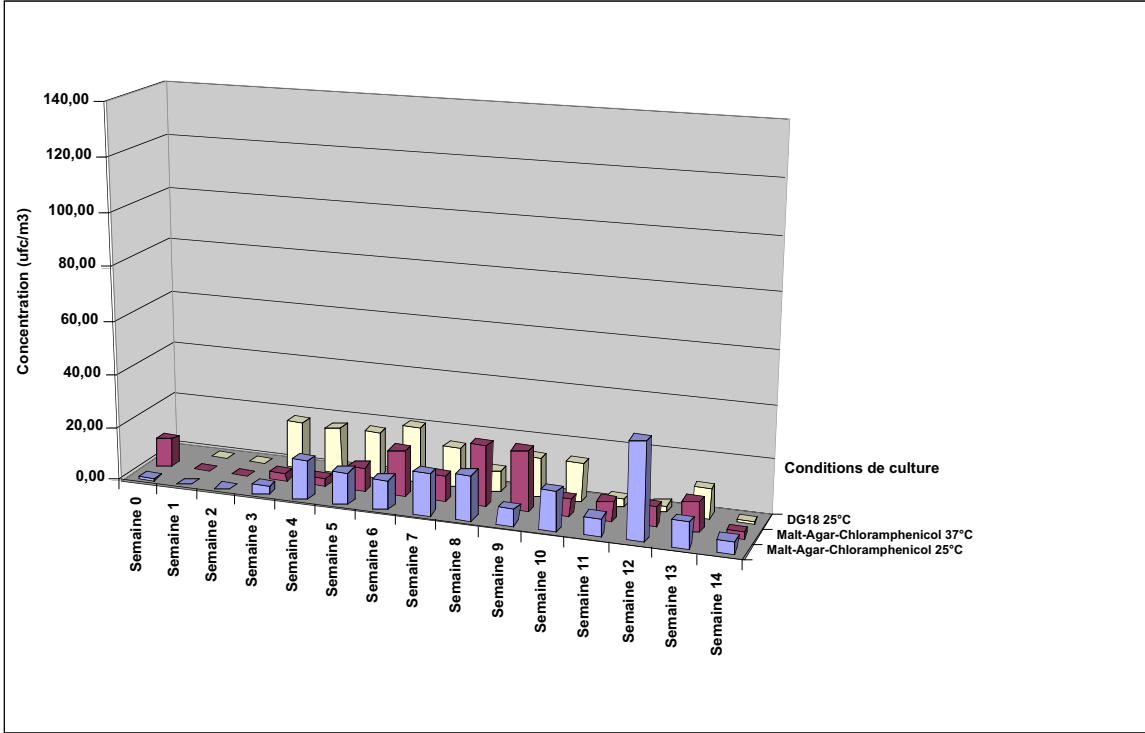


Figure 12 : Concentrations moyennes des champignons aéroportés collectés par AirPort MD8 dans le poulailler durant 15 semaines en fonction des conditions de culture.

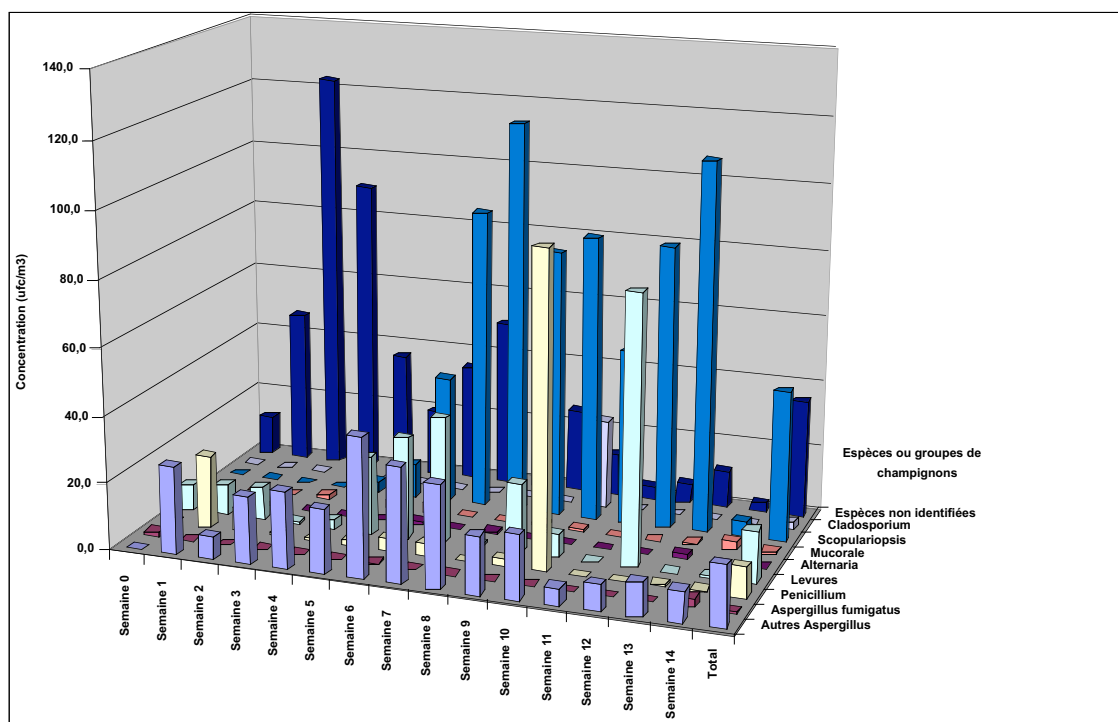


Figure 13 : Concentrations moyennes d'espèces et groupes de champignons identifiés après la collecte par CIP 10-M dans le poulailler durant 15 semaines.

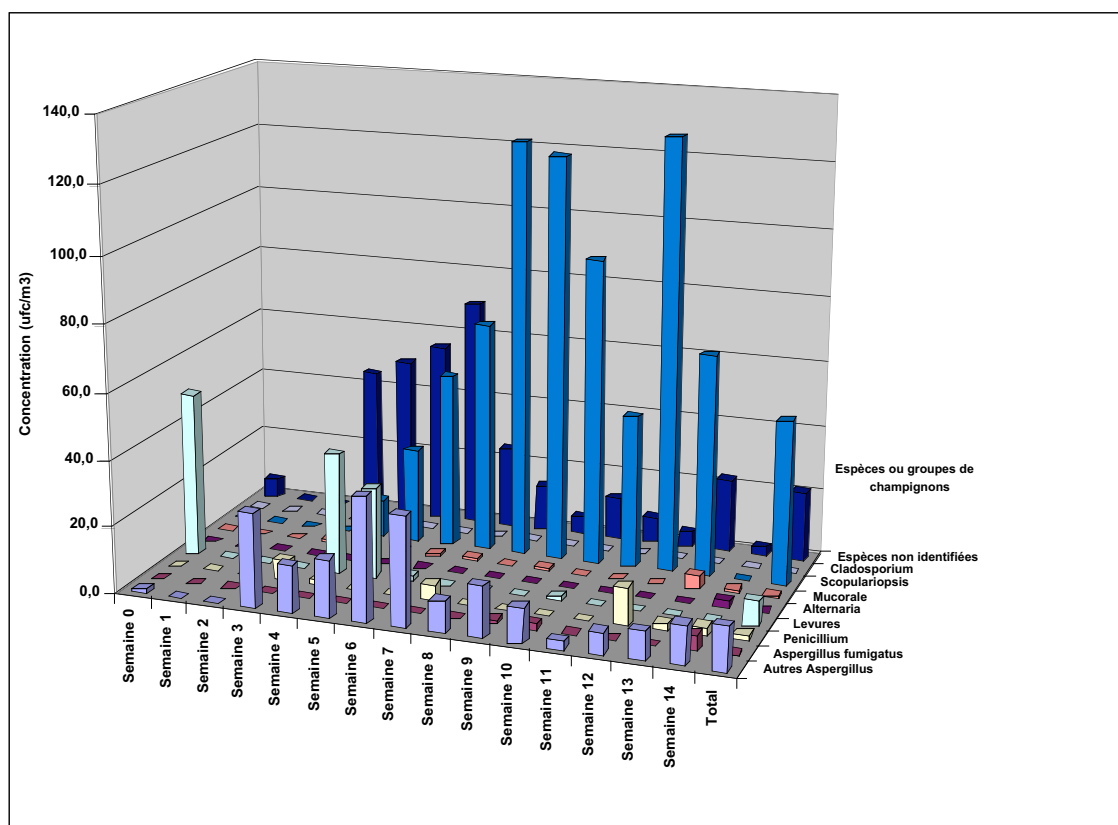


Figure 14 : Concentrations moyennes d'espèces et groupes de champignons identifiés après la collecte par AirPort MD8 dans le poulailler durant 15 semaines.

Résultats de l'analyse par TTGE et D-HPLC

Tous les prélèvements d'air réalisés avec les deux appareils ont été analysés par les techniques moléculaires (TTGE et D-HPLC). La figure 15 présente les profils TTGE des prélèvements d'air des 5 premières semaines. Pendant ces 5 semaines, nous pouvons voir que les profils des prélèvements pour une même semaine avec les deux appareils sont identiques. Les profils TTGE (figure 16) et les profils D-HPLC (figure 17) correspondent aux prélèvements de l'AirPort MD8 pendant les 15 semaines d'enquête. Nous pouvons remarquer la différence de profils d'une semaine à l'autre et comparer l'absence ou la présence de bandes ou pics d'un profil à l'autre.

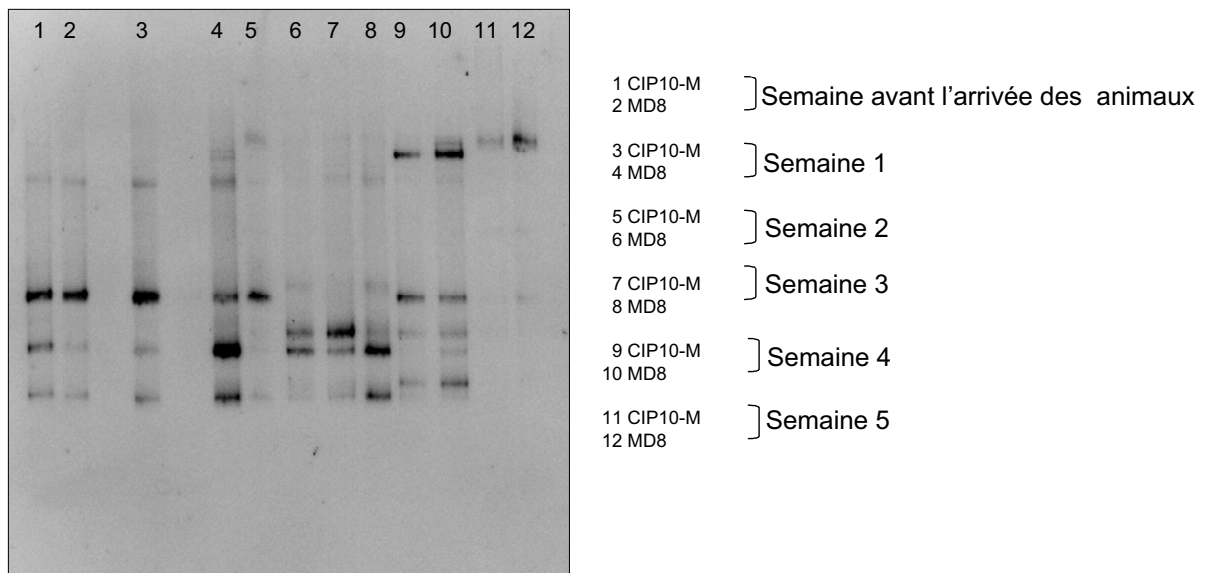


Figure 15 : Profils TTGE à partir des prélèvements d'air avec le CIP 10-M et l'AirPort MD8 (MD8) les 5 premières semaines d'enquête dans l'élevage de poulets.

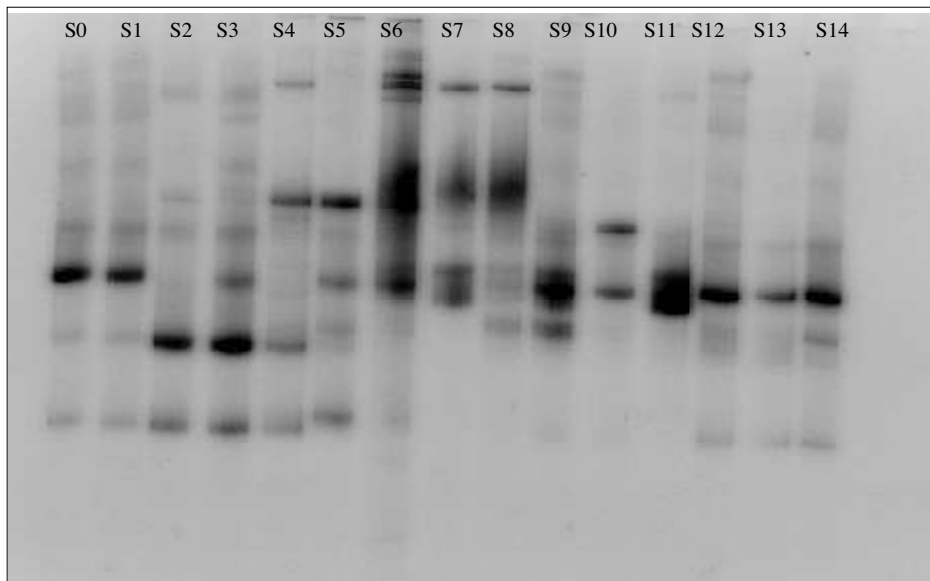


Figure 16 : Profils TTGE à partir des prélèvements d'air effectués par l'AirPort MD8 pendant 15 semaines d'enquête dans l'élevage de poulets. S0 : semaine avant l'arrivée des poulets ; S1 à S13 : semaines en présence des animaux et S14 : semaine après le départ des poulets.

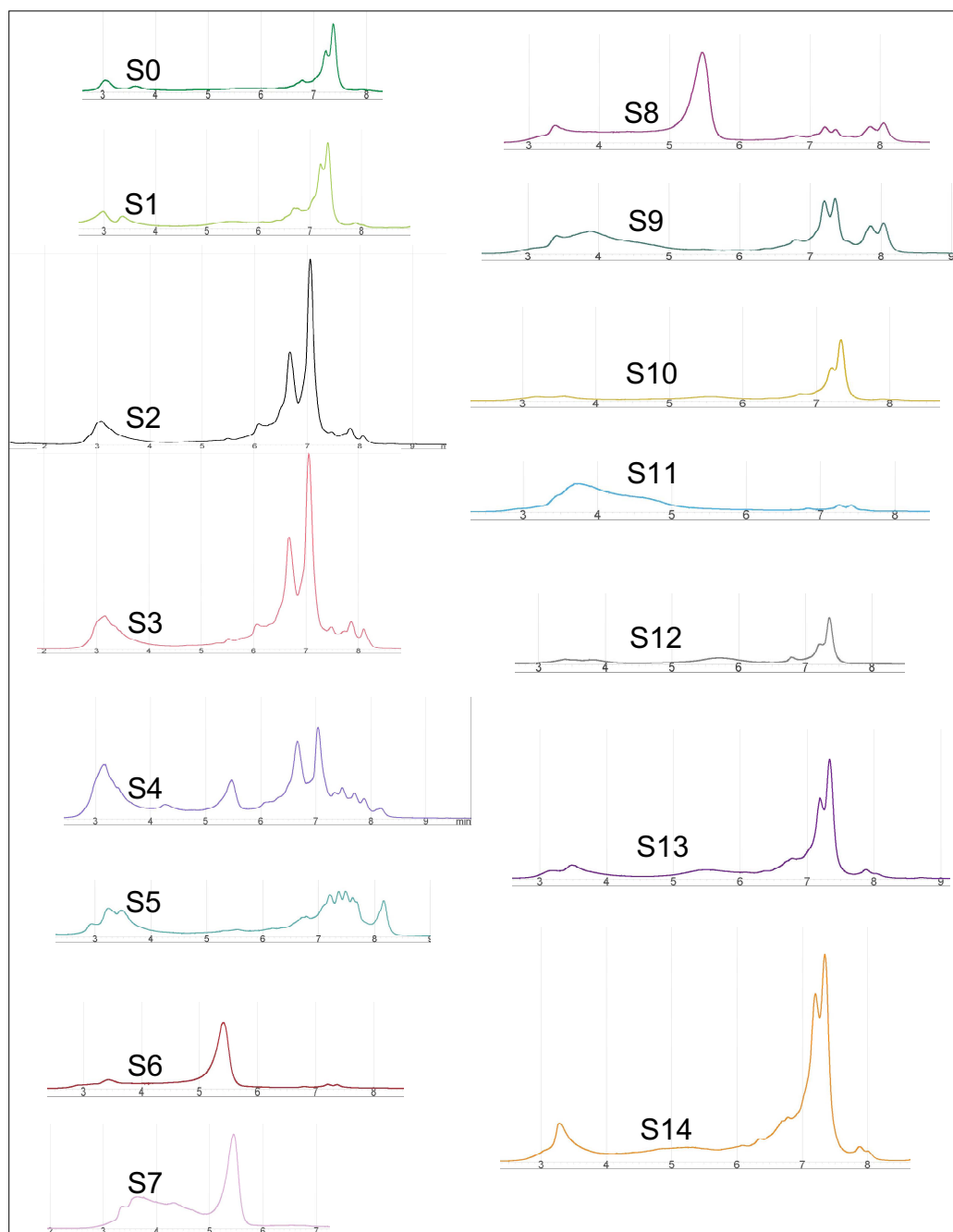


Figure 17 : Profils D-HPLC des prélèvements d'air réalisés avec l'appareil AirPort MD8 pendant les 15 semaines d'enquête dans l'élevage de poulets. S0 : semaine avant l'arrivée des poulets ; S1 à S13 : semaines en présence des animaux et S14 : semaine après le départ des poulets.

Le tableau XIX permet de comparer les espèces identifiées par les trois méthodes.

Celles identifiées par la mise en culture sont différentes des espèces retrouvées en biologie moléculaire. Par la culture, un groupe d'espèces (ou champignons non identifiés) n'a pas pu être identifié. Les deux premières semaines, la culture est négative mais des espèces ont pu être identifiées par biologie moléculaire.

La D-HPLC semble plus sensible (plus d'espèces identifiées) que la TTGE. Cette dernière a cependant permis l'identification de trois espèces (*Fusarium oxysporum*, *Cryptococcus neorformans* et *Neurospora crassa*) que l'on n'a pas pu mettre en évidence ni par culture, ni par D-HPLC.

En revanche le D-HPLC permet la détection de *Botryotinia fuckeliana*, *Lodderomyces elongisporus* et *Phaeosphaeria nodorum* qui ne sont pas retrouvés en culture et en TTGE.

Seule la mise en culture permet la détection de levure, mucorale, *Penicillium* et *Scopulariopsis*.

Tableau XIX : Liste des différentes espèces fongiques identifiées pendant les 15 semaines d'enquête par culture, TTGE et D-HPLC dans les prélèvements d'air effectués avec l'AirPort MD8. Les espèces détectées par au moins deux techniques sont indiquées en bleu.

Période de prélèvement	Espèces fongiques identifiées dans le poulailler		
	Culture	PCR-TTGE	PCR-D-HPLC
Avant l'arrivée des oiseaux (S0)	- Mucorale - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Gibberella morniliformis</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 1 (S1)		- <i>Candida albicans</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Gibberella morniliformis</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Lodderomyces elongisporus</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 2 (S2)		- <i>Cryptococcus neorformans</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Gibberella morniliformis</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 3 (S3)	- Autres <i>Aspergillus</i> - <i>Penicillium</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neorformans</i> - <i>Gibberella morniliformis</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Lodderomyces elongisporus</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 4 (S4)	- Autres <i>Aspergillus</i> - Levures - Mucorale	- <i>Cryptococcus neorformans</i> - <i>Fusarium oxysporum</i>	- <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>

	- <i>Penicillium</i> spp. - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Lodderomyces elongisporus</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 5 (S5)	- Autres <i>Aspergillus</i> - Levures - Mucorale - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Neurospora crassa</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Lodderomyces elongisporus</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine 6 (S6)	- Autres <i>Aspergillus</i> - Levures - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>
Semaine 7 (S7)	- Autres <i>Aspergillus</i> - Mucorale - <i>Penicillium</i> spp. - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Candida albicans</i>
Semaine 8 (S8)	- Autres <i>Aspergillus</i> - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Neurospora crassa</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i>
Semaine 9 (S9)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - Autres <i>Aspergillus</i> - Mucorale - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Neurospora crassa</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i>
Semaine 10 (S10)	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - Autres <i>Aspergillus</i> - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>
Semaine 11 (S11)	- Autres <i>Aspergillus</i> - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i>	- <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>
Semaine 12 (S12)	- Autres <i>Aspergillus</i> - <i>Penicillium</i> spp. - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Fusarium oxysporium</i> - <i>Neurospora crassa</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Gibberella moniliformis</i>
Semaine 13 (S13)	- Autres <i>Aspergillus</i> - Mucorale - <i>Scopulariopsis</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Lodderomyces elongisporus</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>
Semaine après départ des oiseaux (S14)	- <i>Alternaria</i> spp. - <i>Aspergillus fumigatus</i> - Autres <i>Aspergillus</i> - Mucorale - <i>Penicillium</i> spp. - Champignons non identifiés	- <i>Candida albicans</i> - <i>Fusarium oxysporium</i> - <i>Neurospora crassa</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	- <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Botryotinia fuckeliana</i> - <i>Gibberella moniliformis</i> - <i>Phaeosphaeria nodorum</i>

Discussion

L'évaluation des champignons présents dans les environnements agricoles est utile pour avoir des connaissances sur la nature de l'exposition des animaux et du personnel travaillant dans l'élevage.

L'impacteur CIP 10-M a permis d'effectuer la collecte hebdomadaire de bioaérosols dans l'étable de l'ENVA où séjournent des animaux sains ou malades. Pendant la période des prélèvements d'air, nous avons pu analyser des poumons d'animaux autopsiés. Nous avons montré que, dans cette étable, les champignons présents dans l'air pouvaient être retrouvés dans les poumons d'un animal ayant séjourné dans l'étable dans les jours qui ont précédé sa mort. Dans notre suivi de l'étable, la comparaison s'est limitée au genre et quand c'était possible à l'espèce. Ces résultats suggèrent une contamination aérienne des bovins au cours de leur séjour dans l'étable. Parmi les espèces fongiques identifiées à la fois dans l'air et dans les poumons des animaux, on retrouve des espèces potentiellement toxigènes (*Fusarium* sp, *A. fumigatus*).

Il est identifié des espèces fongiques dans les poumons des bovins qui ne sont pas retrouvées dans les prélèvements d'air. Cela peut signifier que ce sont des espèces qui n'ont pas pu croître dans les conditions de culture utilisées (compétitivité des espèces). Ces espèces ont contaminé les bovins à un autre moment et l'on suppose qu'elles étaient absentes au moment du prélèvement d'air.

Une étude identique dans un élevage de dindes a permis de corréler par la technique des microsattellites, les isolats d'*Aspergillus fumigatus* des prélèvements d'air et les isolats d'*Aspergillus fumigatus* retrouvées chez les animaux autopsiés (Lair-Fulleringer *et al.*, 2003).

En milieu hospitalier, le lien entre la présence d'espèces d'*Aspergillus* dans l'air et les cas d'aspergillose invasive que rarement établi (Alberti *et al.*, 2001 ; Carter et Barr, 1997 ; Gangneux *et al.*, 2002 ; Leenders *et al.*, 1999 ; Vandenberggh *et al.*, 1999 ; Walsh et Dixon, 1989).

L'environnement agricole est à priori très contaminé. Nous avons effectué les prélèvements d'air à l'aide de deux techniques (impaction et filtration) qui ont permis d'appliquer la mise en culture et la biologie moléculaire.

La mise en culture nous a permis de dénombrer les espèces. Nous avons ainsi montrer une influence des conditions de culture (milieux de culture et température d'incubation) sur la croissance de certaines espèces. La combinaison de plusieurs conditions de culture est nécessaire pour évaluer la contamination fongique globale dans un environnement donné

(Reboux *et al.*, 2006). Cette contamination dépend des méthodes de travail et de l'activité pratiquée.

Dans l'environnement de poulets Label, nous avons mesuré la contamination fongique moyenne de 95 et 86 ufc/m³ à partir du CIP 10-M et de l'Air Port MD8, respectivement. Cette contamination est plus faible que celle retrouvée par Chang *et al.*, 2001 dans les environnements porcins (entre 2,2x10³ et 3,6x10³ ufc/m³) et Adhikari *et al.* 2004 dans une étable (153 à 2121 ufc/m³). Il est difficile de comparer les valeurs obtenues dans l'élevage aviaire et dans des élevages de porcs ou des étables car la litière ou le niveau de confinement sont différents en fonction du type d'élevage. Par ailleurs, l'accès dans la journée à l'extérieur des poulets à partir de la 5^{ème} semaine a modifié la flore fongique dans l'élevage.

L'absence d'espèces sur les boîtes de culture à partir de l'AirPort MD8 (deux premières semaines de présence des animaux dans le bâtiment) peut s'expliquer soit par l'utilisation de membranes défectueuses, soit par une mauvaise manipulation des membranes avant l'ensemencement. On peut aussi supposer la présence de spores non viables sur les membranes.

Dans les environnements à priori très contaminés, il est nécessaire d'utiliser un grand nombre d'échantillons pour cerner l'exposition. Au niveau microbiologique, il est difficile de traiter un grand nombre d'échantillons dans un laps de temps court. L'identification par la mise en culture, qui consiste en l'analyse de l'aspect macroscopique et microscopique des colonies, sans exclure un examen direct voire le séquençage de l'ADN (Reboux *et al.*, 2006), conduit au développement de nouvelles techniques d'identification moléculaires de communautés de microorganismes comme la TTGE (Nieguitsila *et al.*, 2007) et la D-HPLC (Goldenberg *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus par la TTGE et la D-HPLC à partir des prélèvements d'air dans le poulailler montrent une bonne corrélation entre les profils pour une même semaine. Les deux appareils sont adaptés à la collecte des champignons dans ce type d'environnement pour une étude de biologie moléculaire.

La comparaison des trois méthodes montre encore la nécessité d'utiliser la culture. Celle-ci permet d'isoler des espèces que l'on a pas identifiées en biologie moléculaire et inversement. Les résultats des deux techniques moléculaires (TTGE et D-HPLC) prouvent qu'elles sont utilisables pour l'évaluation des champignons dans un suivi de l'aérocontamination fongique. Mais ces méthodes ne permettent pas la quantification des espèces identifiées. Il est envisageable de contourner la difficulté en développant des techniques moléculaires

spécifiques comme la PCR en temps réel ou les puces à ADN (Bretagne, 2003 ; Millon *et al.*, 2005, 2008 ; Morrison *et al.*, 2004).

Pour le moment, l'étude de l'aérocontamination fongique par culture associée aux méthodes moléculaires apporte de meilleurs renseignements sur l'exposition globale aux champignons en milieu rural.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail nous avons mis au point des techniques d'identification moléculaire des champignons aéroportés. Ceci nous a permis de montrer que les méthodes de prélèvement d'air par impaction et par filtration permettent la collecte de champignons dans des environnements plus ou moins contaminés. Ainsi nous avons mis au point à partir des différents prélèvements d'air une méthode d'extraction de l'ADN total, suivie d'une amplification (PCR semi nichée) à l'aide d'amorces originales (Fungcont 1-3). Nous avons adapté deux techniques de séparation des communautés de microorganismes : la TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) et la D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) pour la séparation des espèces fongiques présentes dans les prélèvements d'air. Ces techniques moléculaires permettent de donner des informations complémentaires par rapport à la méthode classique de mise en culture. Enfin nous avons appliqué les différentes techniques à des environnements variés.

Ce travail de thèse est une contribution au débat actuel sur les risques liés à l'aérocontamination fongique. Les concentrations ponctuelles et faibles ne permettent pas d'écarter la possibilité qu'il existe des problèmes de qualité de l'air subtils ou intermittents.

Les méthodes de prélèvements des bioaérosols qui permettent la mise en culture et d'autres applications sont nécessaires. Le choix doit se baser en priorité sur la facilité d'utilisation et le coût. Les techniques d'évaluation de l'aérocontamination fongique dans un milieu intérieur mettent en évidence la complémentarité des approches de mise en culture (avec une variété des conditions) et de biologie moléculaire. En effet, la mise en culture rend compte des espèces vivantes ou revivifiables et surtout des espèces qui s'adaptent aux conditions et milieux de culture utilisés. La biologie moléculaire contribue à évaluer l'ensemble des espèces fongiques vivantes ou non, ainsi que celles qui ne sont pas cultivables.

Par ailleurs, les outils de biologie moléculaire développés pendant ce travail peuvent servir à aider à établir un seuil quantitatif définissant une contamination fongique intérieure acceptable. Seuil qui permettra d'évaluer l'ampleur de la contamination le plus justement possible.

L'étude du suivi de l'aérocontamination pourrait être complétée par l'application d'une méthode biochimique (spectrométrie de masse). Elle est fondée sur l'étude et la caractérisation des biomolécules en trois étapes : (1) fractionnement du produit biologique à analyser ; (2) obtention de profils protéiques ; (3) analyse des spectres obtenus (mise en évidence des différences entre les échantillons).

Les mycotoxines sont des toxines capables de diffuser en dehors du champignon. D'où la nécessité de la mise au point et de la validation de techniques de dosage des mycotoxines dans les prélèvements d'air.

Le développement de PCR en temps réel peut permettre la quantification des espèces comme *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp et *Stachybotrys atra* qui sont les plus dangereuses pour la santé animale et humaine. Certains couples d'amorces sont déjà disponibles : ils permettent l'amplification et la quantification de l'ADN de *Stachybotrys atra* (Millon *et al.*, 2006 ; Roe *et al.* 2001), *Aspergillus fumigatus* (McDevitt *et al.*, 2004) et *Aspergillus* spp. (Goebes *et al.*, 2007). Le dosage des mycotoxines correspondantes (aflatoxines, ochratoxine, fumonisines et trichothécènes) permettra de mettre en évidence le lien possible entre l'intensité de l'aérocontamination par les spores fongiques et l'intensité de l'aérocontamination par les mycotoxines correspondantes.

Des études épidémiologiques réalisées dans plusieurs pays industrialisés (Royaume-Uni, Suède, Finlande, Canada, Etats-Unis, Pays-Bas, Danemark...) ont fait état d'effets sur la santé liées à l'humidité et aux champignons. Les observations sont cohérentes pour des climats différents, des sociétés différentes, des types différents d'habitations et de scientifiques différents (CHMT, 1995). La mycologie dans les milieux intérieurs est complexe. C'est pourquoi les études expérimentales et épidémiologiques doivent se nourrir les unes des autres et seule la combinaison de l'ensemble de leurs résultats permettra de mieux appréhender l'étude des champignons en milieu intérieur et leurs effets sur la santé animale et humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aden E, Weber B, Bossert J, Teppke M et al.** Standardization of *Alternaria alternata* : extraction and quantification of *Alternaria alternata* by using an mAb-based 2-site binding assay. *J. All. Clin. Immunol.* 1999 ; 103 :128-135.
- Adhikari A, Sen MM, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S.** Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Internat.* 2004; 29:1071-8.
- Adhikari A, Reponen T, Lee SA, Grinshpun SA.** Assessment of human exposure to airborne fungi in agricultural confinements: personal inhalable sampling versus stationary sampling. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2004; 11:269-277.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup ØJ, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW and Taylor MFJR.** The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2005 : 52(5) ; 399–451.
- Alberti C, Bouakline A, Ribaud P, Lacroix C, Rousselot P, Leblanc T, Derouin F.** Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J. Hosp. Infect.* 2001; 48:198-206.
- Al-Doory Y, Domson JF.** Mould allergy. *Lea and Febiger Ed. Philadelphia.* 1984.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-410.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).** 1989. Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).** Bioaerosols : assessment and control. , Cincinnati, Ohio.1999; Publication 31801989.
- American Industrial Hygiene Association (AIHA).** Report of Microbial Growth Task Force. *Fairfax VA, USA.* 2001.
- American thoracic Society and Medical Section of the Lung Association.** Respiratory health hazards in agriculture. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 1-76.
- Andersen AA.** New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol.* 1958 Nov;76(5):471-484
- Anderson IC, Cairney JW.** Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol.* 2004; 6(8):769-779.
- Anderson IC, Campell CD, Prosser JI.** Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ. Microbiol.* 2003; 5 (1):36-47.
- Autrup JL, Schmidt J, Seremet T, Autrup H.** Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin.. *Scand J Work Environ Health.* 1991;17(6):436-440.
- Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K.** Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods.* 2005;61:399-412.

- Basilico MLZ, Chiericatti C, Aringoli EE, Althaus RL, Basilico JC.** Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. *Science of Total Environment*. 2007; 376:143-50
- Bellin P, Schillinger J. Comparison of field performance of the Andersen N6 single stage and the SAS sampler for airborne fungal propagules. *Indoor Air*. 2001; 11(1):65-68
- ben Omar N, Ampe F.** Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough. *pozol. Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66:3664-3673.
- Bex V, Barral S, Dusséaux M, Bordenave L, Mouilleseaux A, Squinazi F.** audits environnementaux dans l'habitat : l'expérience du laboratoire d'hygiène de la ville de Paris. *J. Mycol. Med.* 2006 ; 16 (4) :197-203.
- Bex V, Mouilleseaux A, Bordenave L, Squinazi F.** Environmental audits in Ile-de-France. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2003 ; 35(7):259-263.
- Blanchard MM, Nowotny V.** High-throughput rapid yeast DNA extraction. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 1994; 11, 7-11.
- Blomquist G, Palmgren U, Ström G.** Improved techniques for sampling airborne fungal particles in highly contaminated environments. *Scand. J. Work Environ. Health.* 1984; 10:253-258
- Borrensens-Dale LA, Lydstad S, Langerod A.** Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) compared with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and constant denaturing gel electrophoresis (CDGE) in mutation screening. *Bioradiation* 1997; 99, 12-13.
- Boutin-Forzano S, Charpin-Kadouch C, Gouitaa M, Dumon H, Charpin D.** Audits environnemental des logements : intérêt d'identifier la ou les moisissure(s) en cause *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 2006 ; 46 (3) :197-203.
- Boutin-Forzano S, Kadouch-Charpin C, Hammou Y, Gouitaa M, Botta A, Dumon H, Charpin D.** Moisissures domestiques et risques sanitaires. *Environnement, Risques & Santé.* 2006 ; 5 :5
- Bretagne S.** Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9(6):505-511.
- Burg WA, Shotwell OL, Saltzman BE.** Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1981; 42(1):1-11.
- Burge HA, Chatigny M, Feeley J, Kreiss K, Morey P, Otten J, Peterson K.** Guidelines for assessment and sampling of saprophytic bioaerosols in the indoor environment. *Appl. Ind. Hyg.* 1987; 2:R10-6
- Burge H.** Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 86(5):687-701.
- Bush RK, Portnoy JM** The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001. 107: 430-440.
- Buttner MP, Stetzenbach LD.** Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(1):219-226

- Carter CD, Barr BA.** Infection control issues in construction and renovation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997; 18:587-596.
- Casewell MW, Desai N, Lease EJ.** The use of the Reuter centrifugal air sampler for the estimation of bacterial air counts in different hospital locations. *J Hosp Infect.* 1986 May;7(3):250-260.
- Cenis JL.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(9):2380.
- CEN TC 137. EN 13098 :** Workplace atmospheres – Guideline for measurement of airborne microorganisms and endotoxin. **Comité Européen de Normalisation, Bruxelles, 2000.**
- Chabasse D, Guiguen C, Contet-audonneau N.** Abrégé de Mycologie médicale. *édition Masson* 1999; 324 pages
- Chang CW, Chung H, Huang CF, Su HJJ.** Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses. *Apl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:155-161
- Chao HJ, Schwartz J, Milton DK, Burge HA.** Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ Health Perspect* 2002;101:777-782
- Chermette R, Bussi ras J.** Parasitologie vétérinaire (Mycologie): Service Parasitologie-mycologie de l' cole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 179 pages (*Abrégé de Parasitologie vétérinaire, fascicule V*) 1993.
- Chew GL, Douwes J, Doekes G, Higgins KM, van Strien R, Spithoven J, Brunekreef B.** Fungal extracellular polysaccharides beta (1-3) glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air.* 2001 ; 11 :171-178.
- Clark S, Lach V, Lidwell OM.** The performance of the Biotest RCS centrifugal air sampler. *J. Hosp. Infect.* 1981 ; 2 :181-186
- Cocolin L, Bisson LF, and Mills DA.** Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 189:81-87.
- Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail (CHMT).** Contamination fongique dans les immeubles publics. Guide facilitant la détermination et la gestion des problèmes. *Santé Canada.* 1995; 63 pages.
- Colosimo A, Guida V, Flex E, Conti E, Dallapiccola B.** Use of DHPLC for rapid screening of recombinant clones. *BioTechniques.* 2003 ; 34:706–708
- Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail (CHMT).** Guide technique pour l'évaluation de la qualité de l'air dans les immeubles à bureaux. *Santé Canada.* 1995; 90 pages.
- Conférence de consensus :** prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (H matologie, Transplantation). *Institut Pasteur Paris.* Mars 2000 ; 14 pages.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHP).** Pollution atmosphérique à l'intérieur des bâtiments: sources, expositions et risques sanitaires (section de l'évaluation des risques de l'environnement sur la santé). *Ministère des affaires sociales, de la santé et de la ville. Eds. Lavoisier.* Juillet 1996.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF).** Contaminations fongiques en milieux intérieurs : Diagnostic, Effets sur la santé respiratoire ; Conduites à tenir (groupe de travail Moisissures dans l'habitat). Septembre 2006.

- Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC.** Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup. Environ. Med.* 1998; 55:579–84.
- Courbon P, Wrobel R, Fadiès JF.** A new individual respirable dust sampler: The CIP 10. *Ann. Occup. Hyg.* 1988;3:129–143.
- Cramer R, Weichel M, Fluckiger S, Glaser AG, Rhyner C.** Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chem. Immunol. Allergy.* 2006; 91:121-133.
- Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS.** Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmos. Environ.* 1986 ; 20: 549-552.
- Cox CS.** Quantification and qualitative analysis of airborne spora. *Grana.* 1991; 30:407-408.
- Dales Re, Miller D, McMullen E.** Indoor air quality and health: validity and determination of reported home dampness and moulds. *Int. J. Epidemiol.* 1997; 26:120-125.
- Dalphin JC.** Pathologie respiratoire en milieu agricole. *Rev. Prat.* 1998; 48:1313-1318
- Dalphin JC, Debieuvre D, Pernet D, Maheu MF, Polio JC, Toson B, Dubiez A, Monnet E, Laplante JJ, Depierre A.** Prevalence and risk factors for chronic bronchitis and farmer's lung in French dairy farmers. *Br J Ind Med.* 1993; 50(10):941-944.
- Dalphin JC, Polio JC, Pernet D, Maheu MF, Toson B, Dubiez A, Monnet E, Laplante JJ, and Depierre A.** Influence of barn drying of fodder on respiratory symptoms and function in dairy farmers of the Doubs region of France. *Thorax.* 1994; 49(1): 50–53 .
- Dalphin JC, Reboux G.** Pneumopathies d'hypersensibilité en milieu professionnel. *EMC-Toxicol. Pathol.* 2005; 2:15-30.
- de Hoog GS, Gene J, and Figueras MJ.** Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands 2000.
- Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE., Dei-Cas E, and Guillot J.** Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 126-133.
- Demanche C, Wanert F, Herrenschmidt N, Durand-Joly I, Chermette R, Dei-Cas E, Guillot J.** Monthly evaluation of *Pneumocystis* carriage in a social organization of healthy macaques. *Applied Environ. Microbiol.* 2003
- Desai MR, Ghosh S Ann Agric Environ Med.** Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. 2003;10(2):159-162
- Desai MR, Ghosh SK.** Aflatoxin related occupational exposure to maize processing workers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003; 49(4):529-535
- Dewey S, Sagunski H, Palgrem U, Wildeboer B.** Microbial volatile organic compounds: a new approach in assessing health risk by indoor mould ? *Zbl. Hyg.* 1995; 197:504-515.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Loi F, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M.** Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron.* 1993; 64(4):621-625.
- Doare-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guerin L, Pernelle JJ, Ogier JC, Bouix M.** Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101:1340-1350.

- Douwes J, van der Sluis D, Doekes G, van Leusden F, Wijnands L, van Strien R, Verhoeff A, Brunekreef B.** Fungal extra cellular polysaccharide in house dust as a marker for exposure to fungi: relations with culturable fungi, reported home dampness and respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103 :494-500.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederick D.** Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 2003; 47:187-200
- Drouet M, Bouillaud E.** Réaction anaphylactique à l'*Aspergillus*. *Allergie Immunol.* 1996; 28 (3):88-89.
- Dutkiewick J.** Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1997;4:11-16
- Eduard W.** Exposure to non-infectious microorganisms and endotoxins in agriculture. *ANN. Agric. Environ. Med.* 1997 ; 4 :179-186.
- Eduard W, Heederik D.** Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments.. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1998; 59(2):113-127
- Elke K, Begerow J, Oppermann H, Krämer U, Jermann E, Dunemann L.** Determination of selected microbial volatile organic compounds by diffusive sampling and dual-column capillary GC-FID--a new feasible approach for the detection of an exposure to indoor mould fungi? *J Environ Monit.* 1999; 1(5):445-452.
- Engelhart S, Glasmacher A, Simon A, Exner M.** Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the merck Mas-100 portable bioaerosol sampler. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* 2007; 210:733-739
- Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TA, Dearborn DG.** Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 1998; 152: 757-762.
- European Community Respiratory Health Survey.** Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J.* 1996; 9:687-695
- Faggi E, Pini G, Campisi E.** Use of magnetic beads to extract fungal DNA. *Mycoses.* 2005; 48(1):3-7.
- Ferris MJ Ward DM.** Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63, 1375-1381.
- Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W.** FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 64 :63-77.
- Flannigan B, Miller JD.** Health Implications of fungi in indoor environments – *An overview*; in R.A. Samson, B.Flannigan, M.E. Flannigan, A.P. Verhoeff, O.C.G. Adan, E.S. Hoekstra. Health Implications of Fungi in Indoor Environments. Air quality monographs, *Elsevier publication*, 1994 ; 2 :602 pages.
- Flannigan B, McEvoy EM, McGarry F.** Investigation of airborne and surface bacteria in homes. In: *Proceedings of indoor Air'99, Edinburgh, the 8th International Conference on Indoor Air quality and Climate.* 1999; 1:884-889.

- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvette S, Gillet F, Aragno M, Rossi P.** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 2002; 4:634-643.
- Frueh FW, Noyer-Weidner M.** The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41(4):452-461
- Fung F, Hughson WG.** Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2003;18:535-554.
- Fung F, Tappen D, Wood G.** *Alternaria*-associated asthma. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2000; 15:924-927
- Gadanhó M, Sampaio JP.** Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *FEMS Yeast Res.* 2004; 5:253-261.
- Galloway LD, Burgess R.** Applied Mycology and Bacteriology. 3rd Edition Leonard Hill, London. 1952; 54-57
- Gangneux JP, Bousseau A, Cornillet A, Kauffman-Lacroix C.** Maîtrise du risque fongique environnemental dans les établissements des santé. *J. Mycol. Méd.* 2006 ; 16 :204-211.
- Gangneux JP, Bretagne S, Cordonnier C, Datry A, Derouin F, Grillot R, Kauffman-Lacroix C, Iebeau B, Morin O, Nicolle MC, Piens MA, Poirot JL.** Prevention of nosocomial fungal infection : the french approach. *Clin. Infect. Dis.* 2002 ; 35 :343-346.
- Gangneux JP, Poirot JL, Morin O, Derouin F, Bretagne S, Datry A, Kauffman-Lacroix C, paugam A, chandenier J, Bouakline A, Bordes M, Chachaty E, Dupeyron C, Grawey I, Lecso G, Lortholary J, Mourlhou P, Nesa D, Saheb F, Cornet M, Vimont AM, Cordonnier C.** Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive : Proposition de standardisation des méthodologies et des modalités d'application . *Presse Med.* 2002 ; 31 (18) :841-848.
- Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Gicquel G, Tanquerel JJ, Chevrier S, Poisson M, Aupé M, GuiguenC.** Bacterial and fungal counts in hospital air : comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2006; 27 (12):1405-1408.
- Garrett, M, Rayment, P and Hooper, M.** Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28:459-467
- Gemeinhardt H, Wallenstein G.** Occurrence of molds in airborne dusts in poultry farms. *Zbl. Mikrobiol.* 1985;140:375-379
- Godish D, Godish T.** Total airborne mold particle sampling: evaluation of sample collection, preparation and counting procedure and collection devices. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2008; 5 (2):100-106.
- Goebes MD, Hildemann LM, Kujundzic E, Hernandez M.** Real-time PCR for detection of the *Aspergillus* genus. *J Environ Monit.* 2007; 9(6):599-609.
- Goldenberg O, Herrmann S, Adam T, Maejoram G, Hong G, Göbel U B, and Graf B.** Use of denaturing high performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:5912-5915.

- Goldenberg O, Herrmann S, Maejoram G, Noyer-Weidner M, Hong G, Bereswill S, and Göbel UB.** Molecular monitoring of intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Microbiol.methods.* 2007; 68:94-105.
- Görner P, Wrobel R, Witschger O, fabriès J-F, Ambroise D.** Development and preliminary evaluation of the personal bioaerosol sampler CIP 10-M. *J. Environ. Monit.* 2006 ; 8 : 43–48
- Goyer, N., Lavoie J., Lazure L.et Marchand G..** Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).* Guide technique. 2001. 72 p.
- Graham JA, Pavlicek PK, Sercombe JK, Xavier ML, Tovey ER.** The nasal air sampler: a device for sampling inhaled aeroallergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2000; 84:599-604.
- Grant, C., Hunter CA., Flannigan B., Bravery AF..** The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int. Biodeterioration* 1988; 25 : 259-284.
- Green BJ, Mitakakis TZ, Tovey ER.** Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(2):285-289.
- Green BJ, Millecchia LL, Blachere FM, Tovey ER, Beezhold DH, Schmechel D.** Dual fluorescent halogen immunoassay for bioaerosols using confocal microscopy. *Anal Biochem.* 2006; 354(1):151-153.
- Gregory PH.** Microbiology of the atmosphere. John Wiley and sons, NY. 1961.
- Grimaldi F, Pareil D.** Polluants de l'air intérieur. «Dossier scientifique : Pollution atmosphérique et pollution de l'air» *Revue Francophone des Laboratoires.* 2006 ; 380 :29-33.
- Guillot J, Berthelemy M, Polack B, Lainé V, Lacube P, Chermette R, Roux P.** Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999:46:S94.
- Halos L, Mavris M, Vourc'h G, Maillard R, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M.** Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. *Vet. Res.* 2006; 37 (2): 245-253
- Hamilton RG, Eggleston PA.** Environmental allergen analyses. *Methods.* 1997; 13(1):53-60.
- Harrison JC, Pickering A, Faragher EB, Austwick PK, Little SA, Lawton L.** An investigation of the relationship between microbial and particulate indoor air pollution and the sick building syndrome. *Respiratory Medicine* 1992. 86: 225-235.
- Haugland RA, Heckman JL.** Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. *Mol Cell Probes.* 1998; 12(6):387-396.
- Haugland RA, Heckman JL, Wymer LJ.** Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J Microbiol Methods.* 1999; 37(2):165-176.
- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ.** Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol.* 2004; 27(2):198-210.
- Heineman S, Beguin H, Nolard N.** Biocontamination in airconditionning. *In Health implications of fungi in indoor environments.* 1994.

- Hendry KM, Cole EC.** A review of mycotoxins in indoor air. *J Toxicol Environ Health.* 1993; 38(2):183-198.
- Hernán-Gómez S, Espinosa JC, and Ubeda JF.** Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Letters* 2000; 93:45-50.
- Heuer H, Smalla K.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J. D., J. T. Trevors, E. M. H. Wellington, (Eds.). *Modern soil microbiology.* Marcel Dekker, New York, 1997; pp. 353-373.
- Hibbet DS.** Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 1992; 33:533-556.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* 2007; 111(5):509-547
- Hintikka EL.** Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem. In: Rodrick J.V, G.W. Hesseltine, M.A. Mehlman: *Mycotoxins in Human and Animal Health.* Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. 1978; 277-284.
- Hocking, A.D.,** Improved media for enumeration of fungi from foods. *CSIRO Food Research Quarterly.* 1981;41:7-11
- Hocking AD and Pitt JI.** Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980;39:488-492
- Hodgson MJ, Morey P, Leung WY, Morrow L, Miller D, Jarvis BB, Robbins H, Halsey JF, Storey E.** Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *J. Occup. Environ. Med.* 1998. 40: 241-249.
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB.** Fungal allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:161-179.
- Horner WE, Worthan AG, Morey PR.** Air and dustborne mycoflora in house free of water damage and fungal growth. 2004;70:6394-6400
- Husman T.** Health effects of indoor-air microorganisms. *Scand J Work Environ Health.* 1996; 22(1):5-13.
- Husman, T.,** 2000. Health effects of microbes in *Proceedings of Healthy Buildings* 2000; 3:13-24.
- Husman TM.** The Health Protection Act, national guidelines for indoor air quality and development of the national indoor air programs in Finland. *Environ Health Perspect.* 1999; 107 (3):515-7.
- Institut national de santé publique du Québec.** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. 2002

International Organization for Standardization (ISO). Cleanrooms and associated controlled environments: biocontamination control. Part 1: general principles and methods. Document ISO 14698-1:2003. ISO: september 2003. Available at: <http://www.iso.org> Accessed October 18, 2006.

Jarvis JQ, Morey PR. Allergic respiratory disease and fungal remediation in a building in a subtropical climate. *Appl Occup Environ Hyg.* 2001; 16(3):380-388

Jensen PA, Schaefer MP. Sampling and characterization of bioaerosols. In: *NIOSH Manual of analytical Methods 4th ed.* 1998; 82-112.

Jo WK, Seo YJ. Indoor and outdoor bioaerosols levels at recreation facilities, elementary schools, and homes. *Chemosphere.* 2005; 61:1570-1579.

Johanning E. Indoor moisture and mold-related health problems. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2004; 36(5):182-5

Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1996; 68: 207-218.

Johanning, E ; Gareis, M ; Nielsen, K ; Diertrich, R and Martlbauer, E. Airborne mycotoxin sampling and screening analysis. *9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California.* (2002).

Johanning E, landbergis P, Gareis M, Yang CS, Olmsted E. Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environ. Health Perspect.* 1999;107:489-494.

Kauffman HF, Tomee JFC, van der Werf TS, de Monchy JGR, Koeter GK. Review of fungus-induced asthmatic reaction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151:2109-2116.

Kauffmann-Lacroix C, Castel O, Laland C, Jacquemin JL, Rodier MH. Déclaration et signalement d'une infection nosocomiale fongique. *J. Mycol. Med.* 2004; 14:11122.

Kendrick, B. The fifth kingdom. *2nd edition. Mycologue Publications.* 1999.

<http://www.mycolog.com/fifthtoc.html>

Kennedy MJ, Sigler L. *Aspergillus, Fusarium* and other opportunistic moniliaceous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds): *Manual of clinical microbiology, 6th ed.*, 765-790. ASM Press, Washington 1995.

Kilpelainen, M ; Terho, E and Helenius, H, Home dampness, current allergic diseases, and respiratory infections among young adults. *Thorax.* 2001; 56: 462-467.

Kim SH, Uzunovic A, Breuil C. Rapid identification of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65:287-290.

King DA, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environm. Microbiol.* 1979; 37 :959-964

Kotimaa MH. Spore exposure arising from stored hay, grain and straw. *J. Agric. Soc. Finland.* 1990; 62:285-291

Kotimaa MH, Oksanen L, Koskela P. Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand J Work Environ Health.* 1991; 17(2):117-122

Kowalchuk GA, Gerards S, and Woldendorp JW. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram Grass) roots by denaturing gradient gel

electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63:3858-3865.

Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):144-172.

Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and occupational lung disease. *J. Aerosol Sci.* 1994; 25:1371-1404

Lugauskas A, Kriskstaponis A, Sveistyle L. Airborne fungi in industrial environments Potential agents of respiratory diseases. *Annals Agriculture Environmental Medicine* 2004; 11:19-25

Lair-Fulleriger S, Guillot J, Desterke C, Segui D, Warin S, Bezille A, Chermette R, Bretagne S. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (4):1798-1800.

Lair-Fulleriger S, Segui D, Warin S, Bezille A, Desterke C, Arné P, Chermette R, Bretagne S, Guillot J. Evolution of the environment contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poultry Science.* 2006; 85:1875-1880

Land CJ, Must A. Detection and identification of *Stachybotrys chartarum* from damp gypsum boards by the polymerase chain reaction (PCR). In: *Proceedings of indoor Air'99, Edinburgh, the 8th International Conference on Indoor Air quality and Climate.* 1999; 4:939-941.

Lange JL, Thorne PS, Kullman GJ. Determinants of cultivable bioaerosol concentrations in dairy barns. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1997; 4:187-194

Le Bars J, Le Bars P. les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. *Bull. Ass.E. Inst. Pasteur.* 1988; 30:8-21.

Leclère JM, Drouet M. allergie immédiate aux moisissures et exploitations. «Dossier scientifique : Impact des moisissures sur la santé humaine» *Revue Francophone des Laboratoires.* 2005; 373:45-50.

Lee JH, Jo WK. Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols at Korean high-rise apartment buildings. *Environmental research.* 2006; 101:11-17

Lee SA, Adhikari A, Grinshpun SA, McKay R, Shuklaand R, and Reponen T. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2006; 3:118-130.

Leenders AC, van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk A, Verbrugh HA. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6):1752-1757.

Littman ML. A Culture Medium for the Primary Isolation of Fungi. *Science.* 1947; 106(2744):109-111

Littman ML. Growth of pathogenic fungi on a new culture medium. *Am. J. Clin. Pathol. U.S.A.* 1948; 18:409-420,

Ljungqvist B, Reinmüller B. Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000; 54(2):112-116

- Macher JM, Chatigny MA, Burge HA.** Sampling airborne microorganisms and aeroallergens. In: *Cohen BS, Hering SV, eds. Air sampling instruments for evaluation of atmospheric contaminants, 8th ed. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. 1995; 589-617.*
- Madelin MF.** Fungal parasites of insects. *Annu Rev Entomol.* 1966; 11:423-448
- Madelin MT.** The effect of a surfactant in media for the enumeration, growth and identification of airborne fungi. *J. Appl. Bacteriol.* 1987; 63:47-52
- Malloch D.** Moulds: their isolation, cultivation and identification. Toronto: Department of Botany, University of Toronto, 1997. <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/lloch/oulds/oulds.html>.
- Marshall MN, Cocolin L, Mills DA VanderGheynst JS.** Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 2003; 95: 934-948.
- Matcham SE, Jordan BR, Wood DA.** Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985; 21:108-112.
- May JJ, Kullman GJ.** Agricultural safety and health in a new century. *Am. J. Ind. Med.* 2002; 2:1-2
- May LA, Smiley B, and Schmidt MG.** Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian J. Microbiol.* 2001; 47:829-841.
- McDevitt JJ, Lees PS, Merz WG, Schwab KJ.** Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples. *Mycopathologia.* 2004; 158(3):325-335
- Mehta SK, Bell-Robinson DM, Groves TO, Stetzenbach LD, Pierson, DL.** Evaluation of portable air samplers for monitoring airborne culturable bacteria. *AIHAJ.* 2000; 61 (6):850-854.
- Mehta SK, Mishra SK, Pierson, DL.** Evaluation of 3 portable samplers for monitoring airborne fungi (Note). *Applied and Environmental Microbiology.* 1996; 62:1835-1838
- Meier R, Zingre H.,** Qualification of air sampler systems: the MAS-100. *Swiss Pharma* 2000; 22:15-21
- Miller JD, laflamme AM, Sobol Y, Lafontaine P, Greenhalgh R.** Fungi and fungal products in some Canadian houses. *Int. Biodet.* 1988; 24:103-120.
- Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, Rohrllich P, Costa JM, Bretagne S.** Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10):5097-5101.
- Millon L, Bellanger P, Roussel S, Didier E, Grenouillet F, Dalphin JC, Piarroux R, Reboux G.** quantification des moisissures de l'environnement domestique par PCR en temps réel. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale novembre 2007.
- Millon L, Reboux G, Bellanger P, Roussel S, Sornin S, Martin et al.** Quantification de *Stachybotrys chartarum* par PCR en temps réel dans l'environnement domestique, hospitalier et agricole. *J. Mycol. Med.* 2006

- Mishra SK, Ajello L, Ahearn DG, Burge HA, Kurup VP, Pierson DL, Price DL, Samson RA, Sandhu RS, Shelton B, Simmons RB, Switzer KF.** Environmental mycology and its importance to public health. *J. Med. Mycol.*1992;30:287-305
- Möhlenhoff P, Müller L, Gorbushina AA, Pertersen K.** Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters* 2001. 195: 169-173.
- Morris MP, Fletcher OJ.** Disease prevalence in Georgia turkey flocks in 1986. *Avian Dis.* 1988; 32:404-406.
- Morris G, Kokki MH, Anderson K, Richardson MD.** Sampling of *Aspergillus* spores in air. 2000; 44:81-92.
- Morrison J, Yang C, Lin KT, Haugland RA, Neely AN, Vesper SJ.** Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building. *J Hosp Infect.* 2004; 57(1):85-87.
- Mosqueron L, Nedellec V.** Inventaire des données françaises sur la qualité de l'air à l'intérieur des bâtiments. *Observatoire de la Qualité de l'Air intérieur(OQA).* 2001; 173 pages.
- Mossel DA, Kleynen-Semmeling AM, Vincentie HM, Beerens H, Catsaras M.** Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *J Appl Bacteriol.* 1970; 33(3):454-457
- Muyzer G.** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 1999; 2:317-322.
- Muyzer G, deWaal EC, and Uitterlinden AG.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59:695-700.
- Muyzer G, Smalla K.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998; 73:127-141
- Nesa D, Lortholary J, Bouakline A, Bordes M, Chandeniers J, Derouin F, Gangneux JP.** Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J. Hosp. Infect.* 2001; 47:149-155
- New York City Department of Health (NYC).** Lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur. 2000. <http://www.nyc.gov/html/doh/pdf/eode/fungi-french.pdf>
- Nieguitsila A, Deville M, Taoufik J, Halos L, Berthelemy M, Chermette R, Latouche S, Arné P, Guillot J.** Evaluation of fungal aerosols using temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *J. Microbiol. Methods* 2007; 70:86-95
- Nielsen KF, Thrane U ; Larsen TO ; Nielsen PA and Gravesen S,** Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *International Biodeterioration and Biodegradation,* 1998; 42:9-16.
- Nikulin M, Reijula K, Jarvis BB, Veijalainen P, Hintikka EL** Effects of intranasal exposure to spores of *Stachybotrys atra* in mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1997 Feb; 35(2):182-188
- Nolard N, Beguin H.** Moisissures. Traité d'allergologie. D. Verveloet. Ed. Flammarion. 2003.

- Pasanen AL.** A review: fungal exposure assessment in indoor environments. *Indoor Air*. 2001; 11(2):87-98.
- Parks SR, Bennett SE, Speight SE, Benbough JE.** An assessment of sartorius MD8 microbiological air sampler. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996; 80:529-534
- Peat J , Dicherson J, Li J,** Effects of damp and mould in the home on respiratory health: a review of the literature. *Allergy*. 1998; 53:120-128.
- Pennanen T, Paavolainen L, Hantula J.** Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biol. Biochem*. 2001; 33:697-699.
- Perdelli F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimaldi M, Orlando P.** Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27(1):44-47
- Perdrix A, Parat S, Liaudy s, Maître A.** Syndrome des bâtiments malsains (SBM). «Dossier scientifique : Impact des moisissures sur la santé humaine» *Revue Francophone des Laboratoires*. 2005; 373:67-72.
- Petras E.** On the isolation of air microorganisms by means of fine pore filters. *Arch Mikrobiol*. 1966; 55(2):93-109.
- Piecková E, Jesenská Z.** Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med*. 1999; 6:1-11.
- Pitt JI.** Toxicogenic fungi: which are important? *Med. Mycol*. 2000; 38: 17-22
- Poirot JL, Gangneux JP, Fisner A, Malbernard M, Chalier S, Laudinet N, Bergeron V.** Evaluation of a new mobile system for protecting immune-suppressed patients against airborne contamination. *Am. J. Infect. Control*. 2007; 35:460-466.
- Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K.** Sampling for indoor fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(2):189-198
- Prigione V, Lingu G, Marchisio VF.** Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004; 70:1360-1365.
- Prosser J.I.** Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant soil* 2002; 244:9-17
- Reboux.** Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 2006 ; 46 :208-212
- Reboux G, Roussel S, Grenouillet F.** fungi in agricultural environment. *J. Med. Mycol*. 2006; 16:248-262.
- Recco P, Murriss M, Mallea M, Linas MD.** Allergènes fongiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1996; 281:21-28.
- Ren P, Jankun TM, Belanger K, Bracken MB, Leaderer BP.** The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* 2001; 56:419-424.
- Reponen TA, Gazonko SV, Grinshpun SA, Willeke K, Cole EC.** Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol*. 1998; 64:3807-3812.
- Reponen T, Lin X, Willeke K et al.** New method for long-term sampling of airborne bacteria and fungi. In: *Proceedings of indoor Air'99, Edinburgh, the 8th International Conference on Indoor Air quality and Climate*. 1999; 4:880-885.

- Richard JL.** Aspergillosis. In *B. W. Calnek (ed), Diseases of poultry*, 10th ed. Mosby-Wolfe, London, Kingdom. 1997: 351-360.
- Richard JL, Thurston JR, Peden WM, Pinello C.** Recent studies on aspergillosis in turkey poult. *Mycopathologia*. 1984; 87:3-11.
- Robine E, Lacaze I, Moularat S, Ritoux S, Boissier M.** Characterisation of exposure to airborne fungi: measurement of ergosterol. *J. Microbiol. Methods*. 2005; 63:185–192.
- Robbins CA, Swenson LJ, Nealley ML, Gots RE, Kelman BJ.** Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. *Appl Occup Environ Hyg*. 2000; 15(10):773-784.
- Roe JD, Haugland RA, Vesper SJ, Wymer LJ.** Quantification of *Stachybotrys chartarum* conidia in indoor dust using real time, fluorescent probe-based detection of PCR products. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2001; 11(1):12-20
- Rogerson A.** Diet and partial digestion in sections of the alimentary tract of the sheep. *Br J Nutr*. 1958; 12(2):164-76.
- Röling WFM, Kerler J, Braster M, Apriyantono A, Stam H, and van Verseveld HW.** Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67:1995-2003.
- Rose LJ, Simmons RB, Crow SA, Ahearn DG.** Volatile organic compounds associated with microbial growth in automobile air conditioning systems. *Current Microbiol*. 2000; 41:206-209.
- Rotter M, Koller W** Sampling of air-borne bacteria by gelatine-foam-filters *Zentralbl Bakteriol [Orig B]*. 1973; 157(2):257-270
- Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Piarroux R.** Alvéolites allergiques extrinsèques et exposition aux moisissures. «Dossier scientifique : Impact des moisissures sur la santé humaine» *Revue Francophone des Laboratoires*. 2005; 373:51-60
- Salvaggio JE.** Inhaled particles and respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1994; 94(2):304-309
- Samson RA, Flannigan B, Flannigan ME, Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES.** Health Implications of Fungi in Indoor Environments. *Elsevier, Amsterdam*. 1994.
- Santé Canada.** Contamination fongique dans les immeubles publics: Effets sur la santé et méthodes d'évaluation. 2004; 50 pages.
- Saunders G, Rogers ME, Adlard MW, Holt G.** Chromatographic resolution of nucleic acids extracted from *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet*. 1984; 194:343-345
- Savilahti R, Uitti J, Laippala P, Husman T, Roto P.** Respiratory morbidity among children following renovation of a water-damaged school. *Arch Environ Health*. 2000;55(6):405-10
- Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rolleke S.** Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J. Microbiol. Methods* 2003; 52: 251-260.
- Schabereiter-Gurtner C, Pinar G, Lubitz W, Rölleke S.** An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods* 2001; 45:77-87.
- Schabereiter-Gurtner C, Pinar G, Lubitz W, Rölleke S.** Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods* 2001;

47:345-354.

Seuri M, Husman K, Kinnunen H, Reiman M, Kreuz R, Kuronen P, Lehtomäki K, Paananen M. An outbreak of respiratory diseases among workers at a water-damaged building a case report. *Indoor Air*. 2000; 10(3):138-145.

Shelton BG, Kirkland KH, Flanders WD, Morris GK. Profiles of airborne fungi in building and outdoor environments in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:1743-1753

Shina A, Mon SK, Dawson S, Gaskell RM, Hart CA, Winstanley C. Use of temporal temperature gradient gel electrophoresis to identify *flaA* and *fim3* sequence types in *Bordetella bronchiseptica*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001; 32:384–387.

Sixt N, Dalle F, Lafon I, Aho S, Couillault G, Valot S, Calinon C, Danaire V, Vagner O, Cuisenier B, Sautour M, Besancenot JP, L'Ollivier C, Caillot D, Bonnin A. reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair™ system (Airspace). *J. Hosp. Infect.* 2007; 65:156-162.

Smid T, Schokkin E, Boleij JS, Heederik D. Enumeration of viable fungi in occupational environments: a comparison of samplers and media. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1989; 50:235-239

Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, and Wernars K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65:2614-2621.

Sorenson WG. Fungal spores: hazardous to health? *Environ Health Perspect.* 1999; 107 (3):469-472.

Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (acari/ *Ixodidae*) : a review. *Exp. Appl. Acarol.* 1999 ; 23 :926-960

Specht CA, DiRusso CC, Novotny PC, Ullrich RC. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* 1982; 119:158-163.

Stewart SL, Grinshpun SA, Willeke K, Terziera S, Ulevicius v, Donnelly J. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61:1232-1239.

Strachan DP, Flannigan B, McCabe EM, McGarry F. Quantification of airborne moulds in the homes of children with and without wheeze. *Thorax.* 1990; 45(5):382-387.

Szponar B, Larson L. Use of mass spectrometry for characterizing microbial communities in bioaerosols. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2001; 8:111-117.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 ; 65:4799-4807.

Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact in veterinary medicine. *Med. Mycol.* 2005; 43:71–73.

Theelen B, Silvestri M, Guého E, van Belkum A, Boekhout T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP™), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeasts Res.* 2001; 1:79-86.

- Thompson JD, Gibson TS, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-4882
- Thorn J, Brisman J, Torén K.** Adult-onset asthma is associated with self-reported mold or environmental tobacco smoke exposures in the home. *Allergy.* 2001; 56(4):287-292.
- Tobin, RS, Baranowski E, Gilman A P, Kuiper-Goodman T, Miller J.D, Giddings M.** Signification de la présence de champignons dans l'air intérieur des édifices : Rapport d'un groupe de travail. *Revue canadienne de santé publique.* 1987; 78 : S15-S32.
- Tovey ER, Green BJ.** Measuring environmental fungal exposure. *Med Mycol.* 2005; 43(1):67-70.
- Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kähkölä P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T.** Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(5):1899-1904.
- Vaino EJ, Hantula J.** Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 2000; 104:927-936.
- Vaitilingom M, Gendre F, Brignon P.** Direct detection of viable bacteria, mold and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998 ; 64:1157-1160
- van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D.** Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol.* 1998; 36(5):299-303.
- Van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolters A, Smit E.** Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 2000; 43:133-151.
- Vandenbergh MFQ, Verweij PE, Voss A.** Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 34:221-227.
- Van Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E.** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 21:213-229.
- Verhoeff, AP, Burge HA.** Health risk assessment of fungi in home environments. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 1997; 78(6) :544-556.
- Verhoeff AP, van Reenen-Hoeksstra ES, Samson RA, Brunzkreef B, van Wijnen JH.** Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure. *Allergy.* 1994; 49:533-9
- Verhoeff AP, van Wijnen JH, Boleij JSM, Brunekreef B, van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA.** Enumeration and identification of airborne viable mould propagules in houses. *Allergy.* 1990; 45:275-84
- Vincent D, Cabanes PA, Lambrozo J.** La colonisation microbiologique des systèmes de traitement d'air est-elle susceptible d'entraîner la contamination des personnes exposées?. *Energie santé.* 1998; 3 (90):309-319.
- Wakefield D, Bisby GR.** *Trans. Brit. Myc. Soc.* 1941; 25-50.
- Walsh TJ, Dixon DM.** Nosocomial aspergillosis: environnement microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. *Eur. J. Epidemiol.* 1989; 5:131-142.

- Wessen B, Ström G, Palmgren U.** Microbial problem building-analysis and verification. *In: Proceeding of indoor Air'99, Edinburgh, 8th International Conference on Indoor Air Quality and Climate.* 1999; 4:875-879.
- West AW, Grant WD, Sparling GP.** Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine content of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biol. Biochem.* 1987; 19:607-612.
- WHO (World Health Organization).** Air Quality Guidelines for Europe *Regional Office for Europe, Copenhagen.* 2000.
- Williams RH, Ward E, McCartney HA.** Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:2453-2459.
- Willeke K, Lin X, Grinshpun SA.** Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. *Aerosol Sci. Technol.* 1998; 28:439-456.
- Womble SE, Burton LE, Kolb L et al.** Prevalence and concentration of culturable airborne fungal spores in 86 office buildings from the Building assessment Survey and Evaluation (BASE) study. *In: Proceedings of indoor Air'99, Edinburgh, the 8th International Conference on Indoor Air quality and Climate.* 1999; 1:261-266.
- Wurzburger RJ, Gupta R, Parnassa AP, Jain S, Wexler JA, Chu JL, Elkon KB, Blank RD.** Use of GC clamps in DHPLC mutation scanning. *Clin Med Res.* 2003; 1(2):111-118.
- Wu J, Istepanian RH, Chen S.** Stability issues of nite precision controller structures for sampled data systems. *Int. J. Control.* 1999; 72 (15): 1331-1342
- Wu Z, Tsumura Y, Blomquist G, Wang XR.** 18S rRNA gene variation among common airborne fungi and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:5389-5397.
- Wu PC, Su HJJ, Ho HM.** A comparison of sampling media for environment viable fungi collected in a hospital environment. *Environ. Res. Sect.* 2000; 82:253-257
- Xiao W, Oefner, PJ.** Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* 2001; 17:439-474
- 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.
- Zhou G, Whong WZ, Ong T, Chen B.** Development of fungus-species PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell. Probes* 2000; 14:339-348.
- Zock JP, Jarvis D, Luczynska C, Sunyer J, Burney P.** European Community respiratory Health Survey: Housing characteristics, reported mold exposure, and asthma in the European Community respiratory Health Survey. *J. All. Clin. Immunol.* 2002 ; 110: 285-292
- Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F.** European Community respiratory Health Survey: sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory Health Survey. *Br. Med. J.* 2002; 325:411-414.

ANNEXES

Annexe 1 :

Milieux de culture utilisés au cours de cette étude

Milieu de Sabouraud-Chloramphénicol (SC)

Composition :

- 20 g d'Agar-Agar (LABOSI)
- 20 g de glucose anhydre pur (D+) (LABOSI)
- 10 g de Neopeptone (DIFCO)
- 0,5 g de chloramphénicol pur 99% minimum (LABOSI)
- 1 litre d'eau distillée

Préparation

Après mélange (sans ordre particulier) de l'ensemble de ces produits préalablement pesés aux quantités indiquées, le liquide est chauffé au bain marie durant 15 minutes. Puis le mélange est placé pendant 15 minutes à 120°C à l'autoclave pour stérilisation.

Le milieu est ensuite coulé en boîte (20 ml de milieu par boîte) sous une hôte à flux laminaire enfin de conserver une ambiance stérile.

Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour qu'elles soient correctement séchées

Les boîtes de milieu sont conservées au réfrigérateur (+ 4°C) jusqu'à leur utilisation.

Malt Agar + Chloramphénicol

Composition :

- 20 g Malt extract
- 15 g d'Agar-Agar (LABOSI)
- 20 g de glucose anhydre pur (D+) (LABOSI)
- 1 g de peptone
- 0,5 g de chloramphénicol pur 99% minimum (LABOSI)
- 1 litre d'eau distillée

Préparation

Après mélange de l'ensemble de ces produits préalablement pesés aux quantités indiquées, le liquide est chauffé au bain marie durant 15 minutes. Puis le mélange est placé pendant 15 minutes à 120°C à l'autoclave pour stérilisation.

Le milieu est ensuite coulé en boîte (20 ml de milieu par boîte) sous une hôte à flux laminaire enfin de conserver une ambiance stérile.

Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour qu'elles soient correctement séchées

Les boîtes de milieu sont conservées au réfrigérateur (+ 4°C) jusqu'à leur utilisation.

Agar Dichlorane-Glycérine (DG18)

Composition :

- 31,6 g d'Agar Dichlorane-Glycérine (5g de Peptone ; 10 g de Glucose ; 1 g de Dihydrogénophosphate de potassium ; 0,5 g de sulfate de magnesium ; 0,002 g de Dichloran et 15 g d'Agar)
- 220 g (175 mL) de glycérol
- 0,5 g de chloramphénicol
- 1 litre d'eau déminéralisée

Préparation

Dissoudre les 31,6 g d'Agar Dichlorane-Glycérine+ 0,5 g de chloramphénicol dans 1 litre d'eau déminéralisée par chauffage dans un bain marie bouillant ou sous une vapeur fluente.

Ajouter 175 mL (220 g) de glycérol et autoclaver (15 minutes à 121°C).

Refroidir le milieu de culture à 50°C puis le couler en boîte (20 ml de milieu par boîte) sous une hôte à flux laminaire afin de conserver une ambiance stérile.

Les boîtes de milieu sont conservées au réfrigérateur (+ 4°C) jusqu'à leur utilisation.

Le pH du milieu est de 5,6 à 25°C.

Annexe 2 :

Techniques d'extraction utilisées

Souches pures ou souches isolées des cultures des prélèvements d'air

1. Récupération des spores

- a. Prélever devant une flamme avec une anse quelques conidies d'une culture dans un Eppendorf stérile de 2ml contenant des microbilles.

2. Lyse des spores

- b. Incuber à -80°C pendant 1 heure, les tubes dans les portoirs du bead beater, en les mettant en équilibre
- c. Installer les portoirs sur le bead beater. Lancer un premier cycle de broyage de 15 minutes à une vitesse de 20. Retourner les portoirs pour rééquilibrer le broyage, puis lancer un deuxième cycle de broyage avec les mêmes paramètres.

3. Extraction de l'ADN par l'utilisation du kit commercial (NucleoSpin®, Macherey-Nagel)

- d. Mettre 180 μl de tampon de lyse **T1** dans chaque tube de manière à resuspendre les particules collées sur les parois et le couvercle
- e. Vortexer
- f. Centrifuger rapidement
- g. Laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes
- h. Repipeter la solution dans un Eppendorf de 1,5ml et récupérer les billes
- i. Ajouter 25 μl de protéinase K à 20mg/ml. Incuber pendant 1 heure à 58°C
- j. Ajouter 200 μl réactif **B3**. Incuber pendant 10 minutes à 70°C
- k. Mettre 210 μl d'éthanol absolu
- l. Transférer le contenu du tube sur des membranes dans les tubes de 2ml. Centrifuger 2 minutes à 14000 tr/min
- m. Laver avec 500 μl de tampon de lavage **BW** et 600 μl de tampon de lavage **B5** en centrifugeant 2 minutes à 14000 tr/min entre chaque lavage et en changeant de tube de 2ml
- n. Centrifuger 1 minute à 14000 tr/min (2X)
- o. Mettre les membranes sèches dans des Eppendorf de 1,5ml. Ajouter 40 μl de tampon d'élution (**BE**). Centrifuger 4 minutes à 14000 tr/min

Prélèvement d'air avec le CIP 10-M

1. Récupération des spores

- a) Récupérer les prélèvements d'air dans les tubes Eppendorf contenant les microbilles
- b) Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 14000 tr/min
- c) Enlever le surnageant, en laissant un fond de liquide

2. Lyse des spores

- a) Incuber à -80°C pendant 1 heure, les tubes dans les portoirs du bead beater, en les mettant en équilibre
- b) Installer les portoirs sur le bead beater. Lancer un premier cycle de broyage de 15 minutes à une vitesse de 20. Retourner les portoirs pour rééquilibrer le broyage, puis lancer un deuxième cycle de broyage avec les mêmes paramètres.

3. Extraction de l'ADN par l'utilisation du kit commercial (NucleoSpin®, Macherey-Nagel)

- a) Mettre 180 μl de tampon de lyse **T1** dans chaque tube de manière à resuspendre les particules collées sur les parois et le couvercle
- b) Vortexer
- c) Centrifuger rapidement
- d) Laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes
- e) Repipeter la solution dans un Eppendorf de 1,5ml et récupérer les billes
- f) Ajouter 25 μl de protéinase K à 20mg/ml. Incuber pendant 1 heure à 58°C
- g) Ajouter 200 μl réactif **B3**. Incuber pendant 10 minutes à 70°C
- h) Mettre 210 μl d'éthanol absolu
- i) Transférer le contenu du tube sur des membranes dans les tubes de 2ml. Centrifuger 2 minutes à 14000 tr/min
- j) Laver avec 500 μl de tampon de lavage **BW** et 600 μl de tampon de lavage **B5** en centrifugeant 2 minutes à 14000 tr/min entre chaque lavage et en changeant de tube de 2ml
- k) Centrifuger 1 minute à 14000 tr/min (2X)
- l) Mettre les membranes sèches dans des Eppendorf de 1,5ml. Ajouter 40 μl de tampon d'éluion (**BE**). Centrifuger 4 minutes à 14000 tr/min

Prélèvement d'air avec l'AirPort MD8

1. Récupération des spores

- a) Les membranes en gélatines dissoutes sont centrifugées pendant 15 minutes à 14000 tr/min
- b) Centrifuger le liquide transféré dans les tubes Eppendorf contenant les microbilles
- c) Enlever le surnageant, en laissant un fond de liquide

6. Lyse des spores

- c. Incuber à -80°C pendant 1 heure, les tubes dans les portoirs du bead beater, en les mettant en équilibre
- d. Installer les portoirs sur le bead beater. Lancer un premier cycle de broyage de 15 minutes à une vitesse de 20. Retourner les portoirs pour rééquilibrer le broyage, puis lancer un deuxième cycle de broyage avec les mêmes paramètres.

7. Extraction de l'ADN par l'utilisation du kit commercial (NucleoSpin[®], Macherey-Nagel)

- a) Mettre 180 μl de tampon de lyse **T1** dans chaque tube de manière à resuspendre les particules collées sur les parois et le couvercle
- b) Vortexer
- c) Centrifuger rapidement
- d) Laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes
- e) Repipeter la solution dans un Eppendorf de 1,5ml et récupérer les billes
- f) Ajouter 25 μl de protéinase K à 20mg/ml. Incuber pendant 1 heure à 58°C
- g) Ajouter 200 μl réactif **B3**. Incuber pendant 10 minutes à 70°C
- h) Mettre 210 μl d'éthanol absolu
- i) Transférer le contenu du tube sur des membranes dans les tubes de 2ml. Centrifuger 2 minutes à 14000 tr/min
- j) Laver avec 500 μl de tampon de lavage **BW** et 600 μl de tampon de lavage **B5** en centrifugeant 2 minutes à 14000 tr/min entre chaque lavage et en changeant de tube de 2ml
- k) Centrifuger 1 minute à 14000 tr/min (2X)
- l) Mettre les membranes sèches dans des Eppendorf de 1,5ml. Ajouter 40 μl de tampon d'élution (**BE**). Centrifuger 4 minutes à 14000 tr/min

Annexe 3 :

Protocoles des techniques de biologie moléculaire

Amplification PCR de l'ADN fongique présent dans les extraits à partir des prélèvements d'air

1) Préparation de la PCR

➤ Utilisation d'une série d'amorces dites « universelles » qui s'hybrident avec des sites très conservés du gène de l'ARN ribosomal 18S fongique

➤ Les amorces : Fungcont 1, fungcont 2 et Fungcont 3. Le fragment attendu est de 350 pb

Fungcont 1 : 5'-CTC GCA TCG ATG AAG AAC-3'

Fungcont 2 : 5'-GGG TAA TCC CAC CTG ATT-3'

Fungcont 3 : 5'-CCG CTT ATT GAT ATG CTT-3'

GC Clamp : CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG

(L'AMORCE Fungcont 2 EST DOTÉE D'UN CLAMP-GC À L'EXTREMITÉ 5'.)

- 1.1) **Préparation d'un mix** total de PCR calculé pour un volume final de 50 μL et pour 5 μL d'ADN initial par échantillon (toujours ajouter 1 échantillon en + dans le calcul)
Chaque PCR doit comporter un témoin positif et un témoin négatif (H₂O)

Pour 1 échantillon, amorces Fungcont 1 à 3:

- ADN : 5 μL
- Mix : 45 μL répartis comme suit:

Tampon 10X : 4.5 μL

Amorce 1 à 20 μM : 2 μL

Amorce 2 à 20 μM : 2 μL

Amorce 3 à 20 μM : 2 μL

dNTP : 4 μL

TaQpolymerase (taqara) : 0.3 μL

H₂O (ppi ou Ultra Pure) : 30.2 μL

1.2) **Distribution du mix** dans les microtubes

1.3) **Distribution de l'ADN**

1.4) **Amplification PCR** dans le thermocycleur :

Le programme d'amplification est:

Fungcont:

- 95°C pendant 2 minutes
 - 95°C pendant 30 secondes
 - 50°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 1 minute
 - 72°C pendant 10 minutes
 - 4°C jusqu'à arrêt
- } 25 cycles

2) Visualisation de l'efficacité de l'amplification sur gel à 2% d'agarose et sous lumière UV :

2.1) Coulage du gel

Valeurs pour 80 ml d'un gel à 2% d'agarose :

- **Agarose : 1,6 g**
- **TAE 1x : 80 ml**
- **BET : 2 à 3 gouttes**
 - 1) Peser l'Agarose, la mettre dans un erlenmeyer
 - 2) Préparer la solution de TAE 1x à ajouter (TAE 50x + H₂O) dans une éprouvette et la mélanger à l'agarose
 - 3) Faire dissoudre la solution d'agarose au micro-onde jusqu'à obtention d'un mélange limpide
 - 4) Ajouter sous la hotte, le BET une fois le mélange refroidi et homogénéiser
 - 5) Préparer le support : deux adhésifs + peigne (s)
 - 6) Couler sous la hotte, le gel dans le support
 - 7) Laisser solidifier environ 20 min (obtention d'une couleur bleutée)

2.2) Migration

- De manière standard la migration s'effectue entre 100 et 120 volts pendant 20 minutes à 45 min.
- On dépose 8 μ l d'ADN mélangés à 0,5 μ l de tampon de charge.
- Le témoin de taille utilisé est un marqueur par 100 paires de bases.

2.3) Visualisation sur lampe UV

Après migration déposer le gel sous la lampe et prendre la photo à l'aide du gel Doc system (Bio-Rad, France)

PCR-TTGE (Temporale Temperature Gradient Electrophoresis)
(Séparation des fragments amplifiés sous gradient de température dénaturant)

1) Préparation du gel de polyacrylamide (sous la hotte)

- Pour 2 gels, A et B d'une migration

Gel à **10%** de polyacrylamide:

- Urée : 25.2 g
- H₂O mQ : 26 ml
- TAE 50X : 1.5 ml
- Acrylamide bisacryl 40 % (Biorad) : 15 ml
- H₂O qsp 60 ml (en général on n'ajoute rien)

1.1) Mélanger sous agitation les composants (**attention !!!** le poly acrylamide est toxique) sous la hotte

1.2) A conserver à 4°C (si utilisation immédiate refroidir à température ambiante)

! NE PAS AGITER LE GEL

2) Montage des plaques (salle PCR)

- 2.1) Installer les mousses sur le support de coulage
- 2.2) Poser la grande plaque contre la paillasse
- 2.3) Installer les 2 cales d'épaisseur (gris foncé)
- 2.4) Poser la petite plaque. (si zones ébréchées sur les glaces, placer celles-ci vers le haut)
- 2.5) Fixer l'ensemble grâce aux 2 bras fléchés en respectant le sens des flèches.
- 2.6) Ajuster sur le support de coulage (! éliminer absolument tous les « jours » : fuites)
- 2.7) Blocage sur mousse
- 2.8) Installation des peignes : relevées sur le coté pour permettre coulage à la pipette

3) Coulage du gel sous la hotte

3.1) Ajouter 2 agents polymérisant :

- TEMED (biorad sous 5 ml) : 55 μ l pour 60 ml de gel
- APS (amonium persulfate biorad sous 10 g) : à mettre en solution (0.1 g/1 ml) : 550 μ l pour 60 ml de gel

3.2) Mélanger le gel à l'aide de la pipette de 50 mL

- 3.3) Couler le gel à l'aide de la pipette de 50 mL. Ajouter le gel par montage jusqu'à la moitié des dents du peigne
- 3.4) Abaisser les peignes, compléter le gel au montage.
- 3.5) Laisser polymériser 2 h00 (minimum). Le reste du gel sert de témoin de polymérisation (laisser le flacon ouvert : la polymérisation se fait en présence d'O₂)

4) Préparation du tampon de bain.

4.1) Préparer 7 litre de TAE 1.25X dans le bocal de 5 l et l'éprouvette de 2 l prévus à cet effet.

- Ajouter 125 ml de TAE 50X à 4875 ml d'eau distillée dans le bocal de 5 l
- Ajouter 50 ml de TAE 50X à 1950 ml d'eau distillée dans l'éprouvette 2 l

4.2) Verser le TAE 1.25X dans la cuve de migration (montée sur une plaque magnétique à agitation) jusqu'à la ligne « fill ». Garder du TAE1.25X pour la cuve supérieur et le nettoyage des puits.

4.3) Brancher l'appareil et lancer le préchauffage du bain à 63°C. Ajouter un agitateur magnétique pour que la température soit homogène (sinon mauvaise migration du gel B)

5) Préparation des échantillons

- 5.1) Préparer pour le dépôt maximum 36 échantillons (dans les eppendorfs 1,5 mL)
- 5.2) Ajouter 8 à 10 μ l de loading buffer (loading dye) par eppendorf
- 5.3) Ajouter 8 à 10 μ l de produit PCR par tube : donc dépôt des 16 à 20 μ l finaux
- 5.4) Centrifuger rapidement le mélange.

6) Installation des plaques dans le dispositif

- 6.1) Retirer les peignes des gels.
- 6.2) Nettoyer le haut des plaques et les puits un par un avec du TAE 1.25X et à l'aide d'une seringue 20ml.
- 6.3) Reforme les puits déformés avec l'objet métallique prévu à cet effet
- 6.4) Installer les plaques sur le support de migration
- 6.5) Une fois la température du bain atteinte, éteindre le dispositif de chauffage
- 6.6) Enlever le dispositif du bain (**Attendre quelques secondes avant de le sortir pour ne pas casser la porcelaine**)
- 6.7) Plonger le support de migration contenant les plaques dans le bain (
- 6.8) Ajouter du TAE1.25X dans la cuve supérieure

6.9) Nettoyer une nouvelle fois chaque puits

7) Dépôt des échantillons

7.1) Déposer les 16 à 20 μ l d'échantillons avec le cône à séquençage (très long).

Utiliser le même cône pour tous les dépôts en le rinçant dans le TAE1.25X entre chaque dépôt.

7.2) Ne pas utiliser les 4 puits bordant.

7.3) Réajuster la température à 55°C (**température de début de migration**).

8) Migration

9.1) Ajuster la température finale à 63 °C avec une augmentation horaire de +1°C/h

9.2) Mettre le voltage à 80V

9.3) Laisser la migration over-night.

9) Démoulage des gels et Révélation

10.1) Lorsque la température a atteint environ 63 °C, arrêter la migration

10.2) Enlever le support après avoir attendu quelques secondes

10.3) Ouvrir les bras des deux cotés

10.4) Poser les plaques sur la pailasse (de préférence la petite plaque contre la pailasse)

10.5) Faire une encoche du côté du premier dépôt du gel

10.6) Découper les puits (en laissant une trace quand même)

10.7) Laisser les gels au point 20 minutes dans le Syber green pour la révélation (50 μ l de Syber green 10000X dans 500ml de TAE 1.25X). Le SYBER GREEN ainsi dilué se conserve à l'obscurité à 4°C. (**Attention « toxicité » !!!**)

10.8) Récupérer le gel dans le Syber green avec deux feuilles de plastique

10.9) Faire la photo à l'aide du gel Doc system (Bio-Rad, France).

□ **Formule du loading buffer bleu :**

Bleu de bromophenol : 0.05g 0.05%

Xylène cyanol : 0.05g 0.05%

Formamide : 9.5ml 95%

0.5 EDTA, PH 8 : 0.4 ml (20mM)

Volume total de 10 ml

Analyse des résultats des gels TTGE

Découpage des bandes intéressantes

1. En présence de la photo, découper les différentes bandes au scalpel (lame nettoyée au TAE 1.25X entre chaque découpe)
2. Placer individuellement dans un tube eppendorf identifié de la même façon que la représentation de la bande sur la photo
3. Déposer 50 μ l de tampon d'éluion dans chaque tube, centrifuger rapidement
4. Laisser 3 heures au bain marie à 58 °C
5. Faire une nouvelle PCR Fungcont (sans GC !!!!) sur le tampon
6. Purifier les produits PCR (Qiaquick pcr purification kit)
7. Envoyer au séquençage

Purification des produits amplifiés après TGGE

(QIAquick PCR Purification Kit Protocol)

1. Additionner 250 μ l de tampon PB et 50 μ l de produit PCR, vortexer
2. Pipetter le mélange et le déposer sur une minicolonne installée sur un tube de 2 ml. Centrifuger, 30-60 secondes à 13000 tours/min
3. Vider le contenu du tube de 2 ml
4. Replacer la colonne sur le même tube de 2 ml et ajouter 750 μ l de tampon PE (tampon de lavage). Centrifuger, 30-60 secondes à 13000 tours/min
5. Vider le contenu du tube de 2 ml. Replacer la colonne sur le même tube de 2 ml et Centrifuger, pour une minute supplémentaire à 13000 tours/min
6. Placer la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et déposer 50 μ l de tampon EB (10 mM Tris.Cl, pH 8,5)(tampon d'éluion) et Centrifuger, à 13000 tours/min pendant une minute pour éluer l'ADN.

PCR-DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (Séparation des fragments amplifiés par chromatographie à température dénaturante)

L'analyse des produits PCR est faite par (WAVE® DNA fragment Analysis System, Transgenomic) utilisant une colonne (DNASep® cartridge). La chromatographie permet utilisation d'un système de deux tampon d'élution.

- Tampon A : solution aqueuse de 0,1 M de TEAA à pH 7,0
- Tampon B : solution aqueuse de 0,1 M de TEAA à pH 7,0 et 25% d'Acetonitrile (ACN)
- La longueur d'onde de détection des chromatogrammes est de 260 nm.

L'élution de l'ADN dans le système dépendant la température de la colonne (>50°C), le flux de la pompe, le gradient du tampon B et le temps d'élution.

1) Préparation et mise en place des échantillons

Les échantillons ne sont pas dilués

2) Introduction des données dans l'ordinateur

- Choix du type d'application : Universal Linear
- Choix de la méthode :
- Pourcentage du tampon B : 48%
- Le temps d'élution : 20 minutes
- Le flux : 0,9 Dyes
- La température de la colonne: 63°C

3) Lancer l'injection 5µL par échantillon

4) Les résultats sont récupérés à l'aide du logiciel (...) sous forme graphique (chromatographes)

5) Les chromatographes obtenus aident à la collecte des pics intérêts

6) La collecte :

7) Exploitation des pics collectés : Faire évaporé le liquide récupéré lors de la collecte puis resuspendre dans de l'eau distillée à la quantité souhaitée.

8) Faire une PCR avec les amorces utilisées pour la D-HPLC sans le GC Clamp sur l'amorce concernée.

9) Envoi au séquençage avec comparaison des séquences sous Blast.

Annexe 4 :

Liste des amorces utilisées dans cette étude

Amorces	region Amplifiée	Taille du fragment (pb)	Séquences (5'to 3')	type de PCR	Référence ou source
- Yuniv1(+GC) - Yuniv3	18S rDNA	244	AGC CTG AGA AAC GGC TAC CAC TTC AAC TAC GAG CTT TTT AA	Simple	Hernan-Gomez <i>et al.</i> , 2000
- NL1(+GC) - NL4	26S rDNA	640	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	Simple	Marshall <i>et al.</i> , 2003
- EF4 - EF3 - FUNG5 - NS3(+GC)	18S rDNA	250	GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG GTA AAA GTC CTG GTT CCC C GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC	Semi-nichée : -PCR1 :EF4/EF3 and EF4/FUNG5 -PCR2 : EF4/NS3+GC	Smit <i>et al.</i> ,1999
- NS1 - NS8 - NS2+10 - NS1(+GC)	18S rDNA	545	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA GAA TTA CCG CGG CTG CTG GC	Nichée : PCR1 : NS1/NS8 PCR2 :NS2+10/NS1 +GC	Theelen <i>et al.</i> , 2001
- FF1(+GC) - FF2 - FR1	18S rDNA	425	GTT AAA AAG CTC GTA GTT GAA C GGT TCT ATT TTG TTG GTT TCT A CTC TCA ATC TGT CAA TCC TTA TT	Semi-nichée PCR1 : FF1+GC/FR1 PCR2 : FF2/FR1	Zhou <i>et al.</i> 2000
- NL4A(+GC) - NL4	26S rDNA	244	CCG ATA GCA AAC AAG TA CCG TCT TTA AAG ACG GG	Simple	Oligo 4.0 logiciel and Marshall <i>et al.</i> , 2003
- NL1(+GC) - NL1-A	26S rDNA	244	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG CCC AAA CAA CTC GAC TC	Simple	Marshall <i>et al.</i> , 2003 and Oligo 4.0 software
- Fungcont1 -Fungcont2(+GC) - Fungcont 3	18S rDNA	350	CTC GCA TCG ATG AAG AAC GGG TAA TCC CAC CTG ATT CCG CTT ATT GAT ATG CTT	Semi-nichée	Logiciel Oligo 4.0
GC-clamp			CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G		Smit <i>et al.</i> ,1999

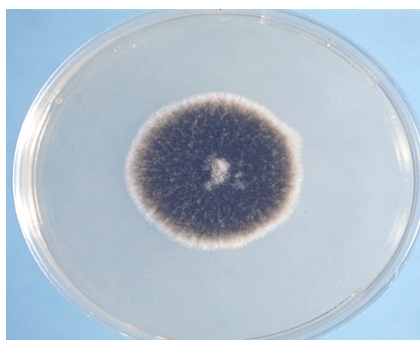
Annexe 5 :

Fiches synthétiques de quelques champignons retrouvés dans l'air provenant d'environnements intérieurs

Alternaria

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : sabouraud et malt
- Température de croissance : mini :2-6°C ; optimal : 25-28°C et maxi : 31-32°C

Substrats favorables au développement

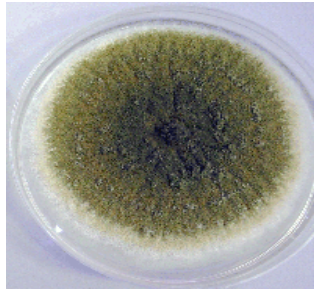
Textiles ; tapis ; surfaces horizontales à l'intérieur des bâtiments

Principale espèce :
Alternaria alternata

Aspergillus

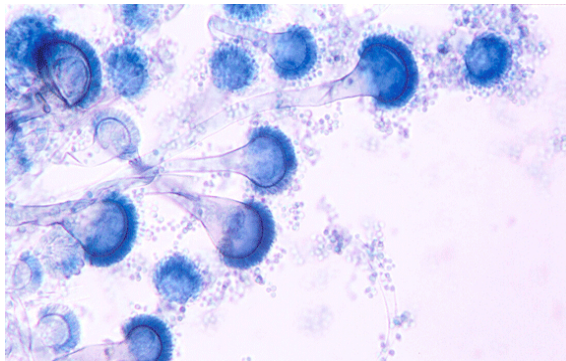
Morphologie

Aspect
macroscopique



A. fumigatus

Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : malt et DG18
- Température de croissance : de 17°C à 42°C

Substrats favorables au développement

Aliments, céréales, plantes et aliments peu hydratés

Principales espèces

A. clavatus ; *A. fumigatus* ; *A. flavus* ; *A. nidulans* ; *A. niger* ; *A. ochraceus* ; *A. versicolor*

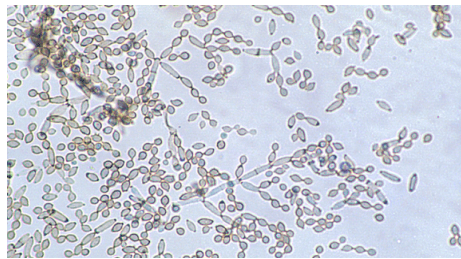
Cladosporium

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : malt
- Température de croissance : mini : 3-10°C ; optimale : 20-28°C

Substrats favorables au développement

En période de forte l'humidité sur beaucoup de substrats (textiles ; bois...)

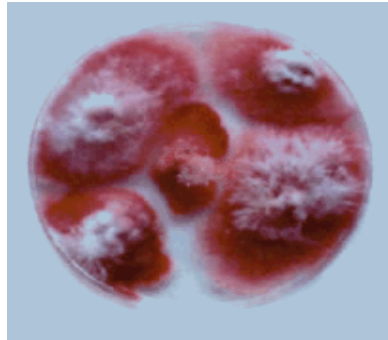
Principales espèces

Cladosporium cladosporoides ; *Cladosporium herbarum*

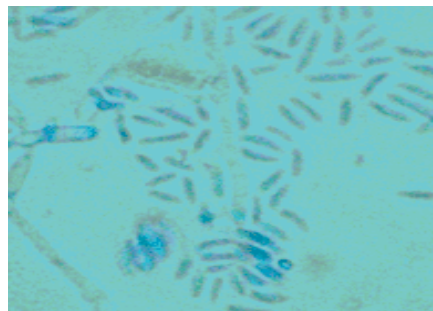
Fusarium

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : sabouraud et malt
- Température d'incubation : mini : 3-10°C ; optimale : 27-31°C ; maxi : 37°C

Substrats favorables au développement

Plantes, eau

Principales espèces :

F. culorum ; *F. graminearum* ; *F. oxysporum*

Levures

Morphologie

Aspect
macroscopique



Candida sp.

Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : sabouraud et malt
- Température de croissance : de 10°C à 37°C

Substrats favorables au développement

Des endroits humides (bois ; joints de robinets...) ; plantes ; les occupants peuvent contaminer l'air par les levures qui sont commensales sur leur peau ou leur cavité orale

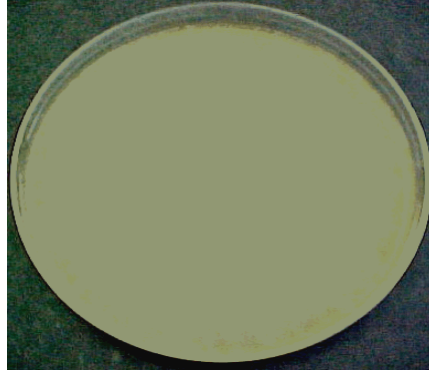
Principales espèces :

Candida albicans ; *Candida catenulata* ; *Cryptococcus* sp. ;
Eurobasidium pullulans ; *Rhodotorula* sp. ; *Saccharomyces* sp.

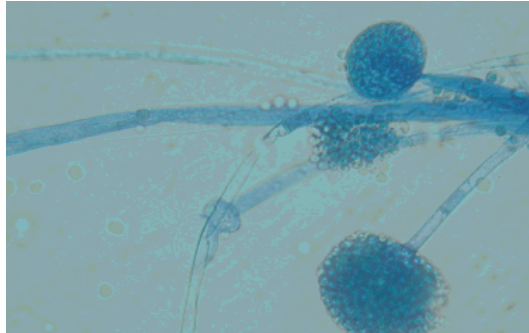
Mucorales

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : sabouraud et malt
- Température de croissance: de 5°C à 37°C

Substrats favorables au développement

Sur la matière organique en décomposition ; divers produits agricoles

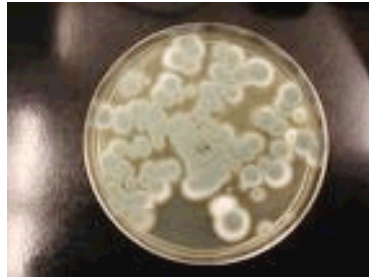
Principaux genres

Absidia sp. ; *Mucor* sp. ; *Rhizopus* sp.

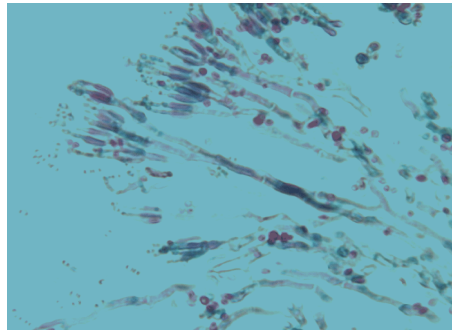
Penicillium

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : malt et DG18
- Température de croissance : 22-25°C

Substrats favorables au développement

Prédominant dans les régions tempérées ; dans la poussière ; dans une grande variété de substrats (papier endommagé par l'eau, peinture...) et dans divers produits alimentaires

Principales espèces

P. brevicompactum ; *P. chrysogenum* ; *P. expansum* ; *P. viridiatum*

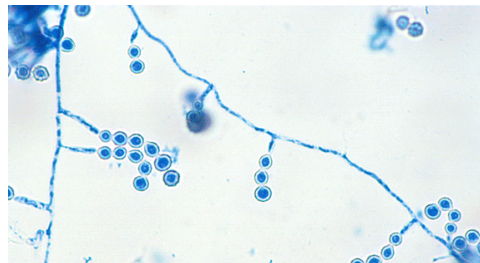
Scopulariopsis

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : malt
- Température de croissance: de 5°C à 37°C

Substrats favorables au développement

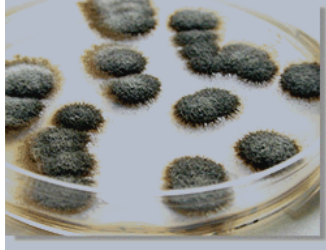
Poussière des maisons et sur une grande variété de matériaux

Principales espèces :
S. brevicaulis ; *S. fusca*

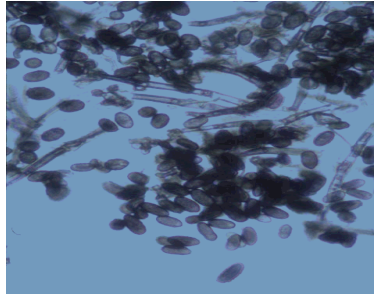
Stachybotrys

Morphologie

Aspect
macroscopique



Aspect
microscopique



Conditions de culture

- Milieu de culture : malt
- Température de croissance : 24-37°C

Substrats favorables au développement

Sur du matériel humide contenant de la cellulose (tableaux, matériaux à base de papier...)

Principales espèces
S. atra ; *S. alternans*

Annexe 6 :
Valorisation des compétences
«Un nouveau chapitre de la thèse ®»

Mentor : Barbara FILLER
CCH Conseil

Projet :

Évaluation de la contamination par des
champignons microscopiques dans les
environnements intérieurs

Adélaïde NIEGUITSILO

Ecole doctorale : Ecole doctorale de Science de la Vie et de la Santé

Option spécifique suivie au sein de l'école doctorale : Biologie moléculaire

Université: Université Val de Marne (Paris 12)

Sujet académique de la thèse :

**Caractérisation moléculaire et biochimique de l'aéro-contamination
fongiques des environnements intérieurs**

Directeurs de thèse : Sophie LATOUCHE-COTTENOT et Jacques GUILLOT

Date probable de soutenance : Mai 2008

I. Cadre général et enjeux de la thèse

1. La thèse

Nous passons de 70% à 90% de notre temps à l'intérieur de locaux divers (locaux d'habitation, de travail ou destinés à recevoir un public) et de moyens de transport, où nous sommes exposés à divers polluants (éclairage, température, hygrométrie, bruit, particules, composés organiques volatils, tabac, monoxyde de carbone, dioxyde de carbone, dioxyde d'azote, ozone, bactéries, champignons), principalement par inhalation. Les personnes âgées et les enfants sont les plus sensibles.

La qualité de l'air dans les environnements intérieurs (habitats, bâtiments d'élevage, hôpitaux et lieux de travail) constitue une source de risque qui a été longtemps sous-estimée.

Il est indispensable d'améliorer les connaissances des maladies (médecines humaines ou animales), des ambiances intérieures ainsi que la reconnaissance des affections (cutanées, digestives et surtout respiratoires) liées à la contamination de l'air. Les affections peuvent relever de phénomènes d'hypersensibilité telles que l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique, l'alvéolite allergique extrinsèque, l'asthme et certaines rhinites. L'aérocontamination peut aussi entraîner des effets simplement irritatifs tels que la fièvre d'inhalation, le syndrome des bâtiments malsains (sick building syndrom) et les risques infectieux chez les immunodéprimés. Tout cela a permis d'accorder plus d'importance à l'étude des agents spécifiques des différents milieux et de leurs effets sur la santé animale et humaine.

Dans mon étude, je ne m'intéresse qu'aux champignons qui se propagent par l'intermédiaire de spores microscopiques ou fragments de filaments en suspension dans l'air. La thématique de l'équipe qui m'accueille est de déterminer les conséquences de la présence des champignons microscopiques dans l'air sur la santé humaine et animale.

Les champignons sont des organismes uni ou pluri-cellulaires eucaryotes, saprophytes ou parasites. Les champignons microscopiques se présentent sous deux formes : une forme filamenteuse (moisissures) et une forme unicellulaire (levure). Le développement des moisissures dans les environnements intérieurs nécessite la présence de l'eau dans les substrats.

L'objectif de mon travail expérimental est de développer des outils analytiques globaux par biologie moléculaire permettant d'évaluer la contamination par des agents fongiques dans l'air.

Dans ce cadre, plusieurs appareils de prélèvements d'air ont été utilisés.

Pour chaque prélèvement d'air, je réalise la mise en culture et j'applique les autres techniques : de biologie moléculaire (PCR, Temperature Temporal Gradient Electrophoresis, Denaturing High Performance Liquid Chromatography, ...) et de biochimie (Spectrométrie de masse, ...).

Le développements de ces outils devraient permettre une caractérisation plus précise et plus rapide de la contamination de l'air par des champignons microscopiques dans les

environnements fermés ou semi-clos. Ces outils rendront plus accessible l'identification des champignons qui actuellement nécessite une expertise en Mycologie. Ces outils de détection et d'identification permettront également l'optimisation de la surveillance de la qualité de l'air en vue de l'évaluation des risques.

2. Enjeux

Les enjeux de santé environnementale deviennent une préoccupation essentielle au niveau national et international. La question du syndrome du bâtiment malsain doit être traitée en amont.

De plus la combinaison canicule et pollution nous rappelle non seulement que la qualité de l'air est un enjeu de santé publique mais aussi que la veille sanitaire et environnementale s'inscrit dans les priorités. Enfin, les changements climatiques qui se confirment vont générer de nouveaux besoins de rafraîchissement des locaux, de ventilation, de choix de matériaux dans la construction...

Par ailleurs ce domaine présente des enjeux technologiques, sociaux et économiques dont les implications sont encore peu approfondies.

Ce sujet nous permettra de mettre en place des procédures basées sur l'utilisation de l'ADN pour connaître de manière globale les différentes espèces de champignons aéroportés dans un environnement clos ou semi-clos. Les résultats fournis par ces méthodes sont obtenus plus rapidement (maximum 3 jours) que la technique standard (culture sur milieux mycologiques qui nécessite au moins 7 jours pour une identification complète).

Les méthodes vont permettre la prévention en améliorant les mesures de protection de l'homme et de l'animal (aération plus fréquente des pièces ou réalisation de travaux pour améliorer l'étanchéité des murs ou encore utilisation des matériaux adéquats permettant de ralentir ou d'empêcher le développement des moisissures).

La caractérisation de l'aérocontamination fongique peut également contribuer à meilleure prévention des mycoses. L'identification rapide de la contamination par des champignons responsables de maladies (surtout *Aspergillus fumigatus*) permettra ainsi la mise en place de mesures préventives dans les services hospitaliers qui hébergent des patients immunodéprimés.

Ces techniques peuvent également permettre indirectement l'amélioration des matériaux de construction. En évaluant les champignons aéroportés dans un environnement intérieur, les matériaux peuvent être améliorés en tenant compte de la quantité et la qualité des champignons présents.

L'aboutissement de mon projet de thèse va permettre au laboratoire de s'impliquer dans des réseaux nationaux et internationaux (Observatoire de la qualité de l'air intérieur, Centre scientifique et technique du bâtiment, Indoor Environment and Human exposure, International society indoor Air Quality...).

Mon projet nécessitera de porter une attention particulière sur le matériel et les réactifs indispensables pour la détection et l'identification des champignons microscopiques (appareils de prélèvements d'air, appareils d'identification moléculaire, appareil de broyage des échantillons, amorces nucléotiques, kit d'extraction, kit de purification, ainsi que les protocoles à appliquer...).

Le risque majeur de ce projet est de ne pas trouver une méthode alternative à la culture. Cela signifie qu'on ne pourrait pas faire une étude de communauté de champignons

microscopiques en se basant seulement sur l'application des méthodes d'identification moléculaire.

3. La thèse dans son contexte

Notre équipe fait partie d'une unité mixte de recherche (UMR BIPAR, Biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques) de quatre équipes. L'intitulée de l'équipe est « Mycoses opportunistes transmises par voie aérienne ».

Mon sujet de thèse consiste à choisir des techniques de prélèvement d'aérosols appropriées et de mettre en place des outils d'identification de champignons aéroportés plus fiables et plus rapides que la technique standard (mise en culture). Les études sur la détection et l'identification globale des champignons aéroportés ne sont pas nombreuses. Pour le moment l'identification des espèces de champignons dans un milieu est plutôt l'affaire de spécialistes car la méthode standard est la mise en culture associée à l'observation microscopique. La culture présente cependant des limites qui sont :

- L'impossibilité d'isoler des espèces non cultivables ou cultivables sur des milieux spécifiques,
- La compétition entre champignons et entre champignons et bactéries, compétition qui peut conduire à une inhibition de la croissance de certaines espèces (a priori cultivables sur les milieux usuels),
- La nécessité d'une expertise approfondie en Mycologie pour la reconnaissance des multiples espèces susceptibles de se développer,
- Le risque potentiel pour l'expérimentateur

Certaines moisissures se développent très rapidement et froment de très nombreuses spores en quelques jours.

Les méthodes alternatives à la culture sont essentiellement des techniques de biologie moléculaire (Techniques basées sur l'amplification de séquences nucléotidiques). L'équipe qui travaille sur les bactéries transmises par des arthropodes dans notre UMR, nous a initié dans le domaine de l'identification des communautés microbiologiques par biologie moléculaire.

Lors de ma thèse, j'utilise un appareil de prélèvement d'air qui a été utilisé pour la mise en évidence des champignons du genre *Pneumocystis* dans notre équipe. Le genre *Pneumocystis* désigne un groupe de champignons atypiques largement répandus chez les mammifères. En cas d'immunodépression, les *Pneumocystis* sont responsables d'une pneumonie grave, dont l'évolution spontanée est fatale. Ils se développent dans les alvéoles en contact étroit avec les pneumocytes mais restent extracellulaires. Ce fort tropisme pourrait expliquer les difficultés à les cultiver *in vitro*.

Ce sujet assez vaste présente un intérêt mais ne suscite pas une grande concurrence. Les intéressés sont principalement des médecins, des vétérinaires pour la gestion du risque lié aux champignons opportunistes, pathogènes respiratoires de l'Homme et des animaux (oiseaux surtout). Ce sujet intéresse aussi des organismes s'occupant de la sécurité des populations par le contrôle de la composition microbiologique des environnements fermés ou semi-clos.

Le projet est effectué dans un laboratoire aux normes européennes, disposant de moyens techniques (appareils d'identification moléculaire, logiciels et outils informatiques, appareils de prélèvements d'aérosols...), des moyens scientifiques (enseignants-chercheurs, chercheurs, ingénieurs, partenaires industriels et techniciens) et des moyens humains (élèves, occupants des appartements humides).

Le projet se fait dans le cadre d'un contrat CIFRE en collaboration avec un partenaire industriel (le groupe Thalès) et à l'aide de réseaux scientifiques (le Laboratoire d'Hygiène de la ville de Paris, le laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri-Mondor, l'unité Inserm U511, de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et la société Transgenomic).

Le laboratoire d'hygiène de la ville de Paris intervient dans les bâtiments privés et publics, en contrôlant l'aéro-contamination bactérienne, fongique et chimique des environnements intérieurs. Ce travail leur permet de mieux intervenir dans la maîtrise de l'hygiène des milieux intérieurs.

La société Transgenomic commercialise l'appareil qui permet de faire une identification automatisée (D-HPLC). Elle m'a permis de faire des essais dans ses locaux : les premiers résultats ont été encourageants. Elle m'a mis en contact avec le laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri-Mondor qui est en possession d'un appareil D-HPLC pour me permettre de poursuivre la mise au point de cette technique.

L'unité Inserm U511 de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, va me permettre d'utiliser une technique biochimique (spectrométrie de masse) qui est utilisée et maîtrisée dans le laboratoire.

L'entreprise Thalès, en particulier le service NRBC (Nucléaire, radiologie, Biologie et Chimie) de Thalès Security systems (TSS) traite avec des clients qui ont besoin de systèmes de sécurité performants (l'un de leur client est l'armée Française). TSS met au point et fournit des systèmes de sécurité NRBC. Le projet de cette thèse leur permet de déterminer un seuil de la contamination fongique dans l'air pour fournir des systèmes de sécurité adéquats et plus performants.

4. Moi dans ce contexte

Mes parents m'ont toujours motivée pour de longues études. Mon intérêt pour les sciences naturelles au lycée m'a permis de faire une maîtrise de biologie cellulaire et physiologique (Université de Bretagne Occidentale, Brest), puis j'ai obtenu un diplôme universitaire en effectuant un stage en biologie marine de 8 mois (Université de Bretagne Occidentale, Brest). Ce stage a renforcé ma motivation à poursuivre dans le domaine de la recherche par l'excellent encadrement et le bon fonctionnement de mon projet de recherche.

Après l'obtention de mon diplôme universitaire, je me suis inscrite en Master 2 (option Biologie moléculaire à l'université de Versailles Saint Quentin). Après plusieurs entretiens pour des stages fournis par l'université, j'ai acceptée la première réponse positive qui m'est parvenue. Mon choix de sujet de Master 2 est donc lié au retard que j'avais pris pour la validation de mon inscription.

Lors de mon stage de master 2, j'ai commencé à étudier la contamination aérienne par des champignons dans les environnements intérieurs. Le sujet m'ayant plu, la confiance et la motivation de mon directeur de thèse m'a permis d'obtenir une bourse en contrat CIFRE (collaboration avec l'entreprise Thalès) pour continuer sur le sujet.

Le projet me semble intéressant et important car je suis en contact avec des personnes (parents et amis) asthmatiques, allergiques aux aérosols ou ayant contractées des mycoses. Ces personnes sont dans des environnements assez variés (toutes les classes sociales dans les pays suivants : Gabon, Afrique du Sud, Madagascar et France).

II. Gestion et coût du projet

1. Cadrage du projet

Le projet est co-encadré par le professeur Jacques Guillot (enseignant chercheur de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) et le docteur Sophie Latouche-Cottenot (Docteur en biologie, employée par la société Thalès).

Les facteurs de succès dépendent de la mise au point des techniques (bonne adaptation des outils alternatifs à la mise en culture) mais aussi de la motivation et de l'assurance la collaboration de différents acteurs comme les éleveurs, les personnes habitant dans les milieux humides, les médecins travaillant dans les services hébergeant des patients immunodéprimés.... Le désistement des partenaires ou des collaborateurs représente le risque majeur d'échec. Il s'agit donc de motiver de façon permanente les différents partenaires par notre détermination et des résultats encourageants.

Pour ce projet, l'équipe reçoit un financement externe venant principalement de la société Thalès. Cette entreprise a signé une convention avec l'école vétérinaire dans le cadre de la bourse des Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) dont je bénéficie.

La signature de la convention entre l'équipe et le groupe Thalès a été difficile.

L'équipe scientifique qui m'accueille à Maisons-Alfort, fait partie d'une unité mixte de recherche (UMR) dépendant de quatre tutelles : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) ; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) ; Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) et Université de Paris Val-de-Marne (UPVM). Les intérêts particuliers (et pas toujours convergents) rendent difficile la signature des conventions. Il était initialement prévu que la convention soit signée entre l'INRA et Thalès mais les juristes n'étaient pas d'accord sur plusieurs points dont la propriété des résultats. Finalement, la convention a été signée entre l'ENVA et Thalès qui ont défini ensemble les conditions de collaborations.

Lors de la signature de mon contrat de travail avec le groupe Thalès, j'ai signé également une clause de confidentialité.

Notre équipe de recherche possède des locaux qui sont aux normes et des règles d'hygiène et sécurité y sont instaurées. Ces règles sont indispensables au bon déroulement de mon travail.

Nous avons établi un partenariat essentiellement sur le plan national. Le choix des partenaires se fait sur les apports des uns et des autres sur l'avancement du projet.

2. Conduite du projet

Pour le bon déroulement et l'aboutissement des projets il existe différents types de réunions :

- des réunions scientifiques au sein de l'UMR permettant aux enseignants-chercheurs, chercheurs, ingénieurs et étudiants de présenter l'avancement de leurs travaux une fois par mois. Dans ce cadre, je présente deux fois par an mes travaux à l'ensemble du laboratoire.
- des réunions mensuelles (2h), au sein de l'équipe qui m'accueille permettant de faire le point sur l'avancement des projets et d'organiser des présentations dans les différents congrès nationaux et internationaux. Ces réunions servent aussi à discuter de divers points (nouveaux projets, mobilité des personnes, financements...)
- un comité de pilotage à été mis en place pour superviser les travaux. Ce comité comprend un spécialiste en moisissures dans les environnements intérieurs, deux ingénieurs du laboratoire d'hygiène de la ville de Paris et mes deux encadrants. Il se réunit une fois chaque année.

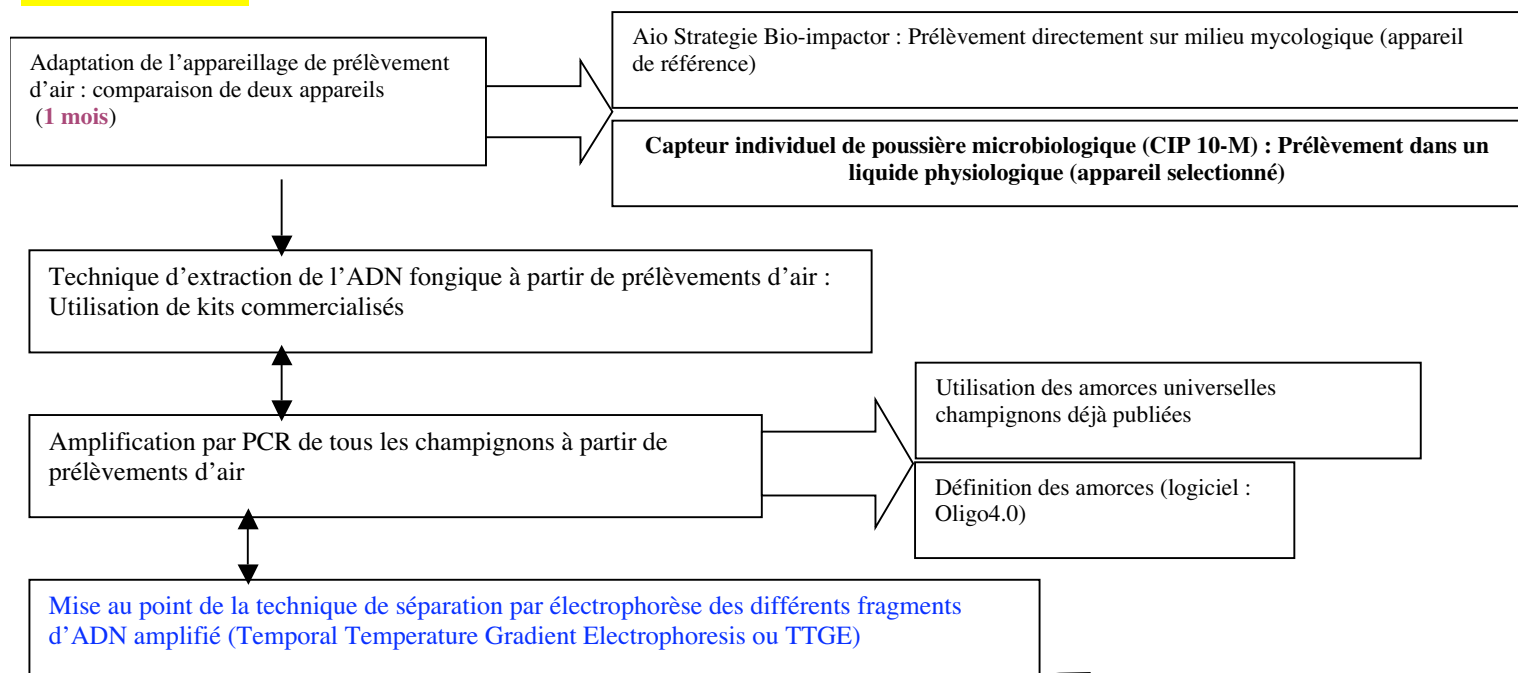
Je réalise également un point d'avancement avec mon directeur de thèse chaque semaine.

Enfin, bénéficiant d'un financement par l'entreprise Thalès, il est établi avec le partenaire industriel des réunions mensuelles. Ces réunions me permettent de présenter les résultats obtenus depuis la dernière réunion et de prendre des décisions sur les expériences futures (répétitions des expériences, prévisions d'autres méthodes, veille bibliographique, prévisions de la mise en disposition d'appareil et consommables associés...).

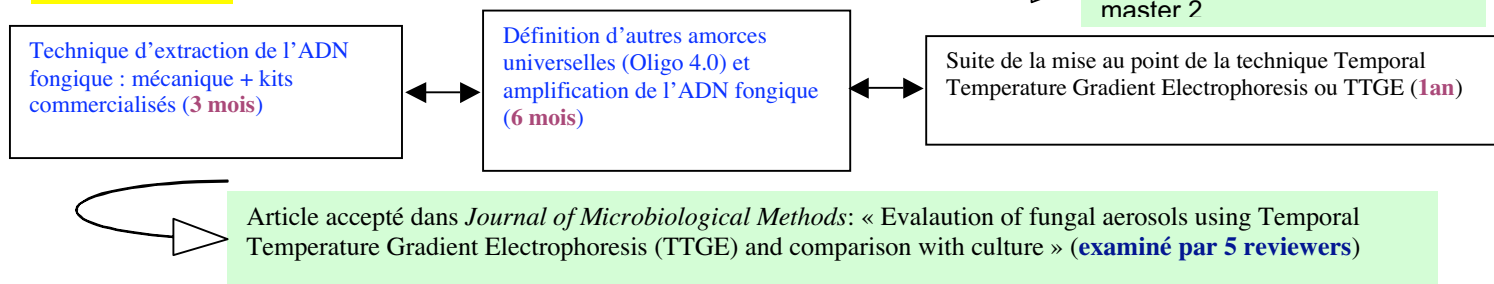
Le problème majeur rencontré dans le projet a été l'établissement d'un contrat entre l'entreprise Thalès et le laboratoire pour l'exploitation éventuelle des résultats.

Les principales étapes de mon projet :

DEA (6mois)

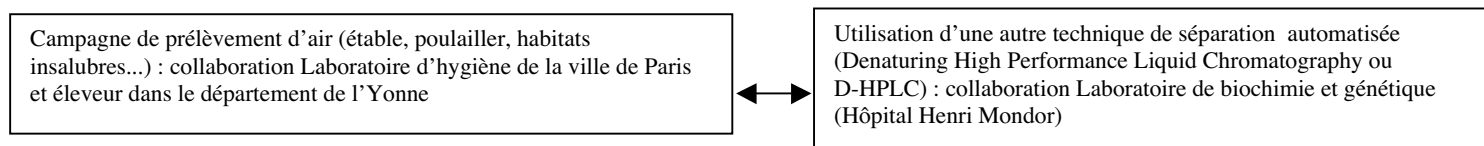


Thèse



Utilisation d'un autre appareil AirPort MD8 (prélèvement d'air sur membrane de gélatine) : Application de la mise en culture et de l'extraction de l'ADN fongique, PCR et TTGE (6 mois)

En cours



Perspectives

Utilisation de la Spectrométrie de masse : collaboration INSERM U511, Immunobiologie cellulaire et moléculaire des infections parasitaires (Hôpital de la Pitié Salpêtrière)

Utilisation de la PCR en temps réel pour le champignon *Aspergillus fumigatus* : collaboration Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris

3. Évaluation du coût de mon projet

Quatre personnes participent au projet dans l'équipe et une douzaine de personnes externes. Je suis la seule personne concentrée à plein temps sur ce projet, les autres personnes gérant d'autres projets en parallèle.

□ Dépenses (k€) pour 36 mois

	Salaires	Charges	Totaux
Doctorant	69.76	17.08	86.87 (Thalès)
Docteur	900	176.47	1076.47
Enseignant chercheur	1188	220.57	1408.57
Secrétaire	46.8	11.45	58.25
Sous-total			2630.16

	Coût (k€)
Consommables laboratoires	2
Logiciels	0.77
Produits chimiques	1
Produits biologiques	4
Matériels bureautiques	7.2
Appareils techniques	26
Déplacements	2
Infrastructure	150
Sous-total	192.97

Total	2823.13
--------------	----------------

□ Financements

Le financement de ce projet vient d'une part de l'entreprise Thalès (environ **30 k€** pour les trois années de thèse).

D'autre part il y a le financement provenant des quatre tutelles de notre UMR qui est difficilement estimable. Ce financement permet l'achat, l'entretien des appareils, l'achat de logiciels, du matériel bureautique et du consommable du laboratoire.

III. Les Compétences

1. Compétences scientifiques

Pendant toute la durée de mon projet, j'ai mis en pratique, approfondi et acquis des connaissances.

Trouver l'information : Il a fallu faire une recherche bibliographique pour mieux cerner ma problématique par rapport à d'autres projets déjà valorisés.

Synthétiser : la veille bibliographique (lecture de plusieurs articles) a développé mon **esprit critique et de synthèse** par rapport aux autres travaux. L'esprit de synthèse est nécessaire pour la rédaction d'articles et pour l'établissement d'un plan logique afin de valoriser le travail lors des présentations.

Innover : mon projet concerne la mise au point de techniques de biologie moléculaire qui n'avaient jamais été utilisées dans ce domaine (mycologie environnementale). Je cherche à trouver une **nouvelle technique** de détection et d'identification globale des champignons aéroportés en me basant sur la technique de référence qui est la mise en culture.

Collaborer avec des partenaires privés ou du domaine public : au cours de mon projet de thèse j'ai **développé et entretenu un réseau de partenariats** avec :

- Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris dans le cadre de campagne d'utilisation des appareils de prélèvement d'air dans les habitats insalubres parisiens ;
- Le centre d'application de l'Ecole vétérinaire d'Alfort à Champignelles (dans l'Yonne) pour une campagne de prélèvements dans un élevage avicole ;
- La société Transgenomic France et Grande-Bretagne dans le cadre de la formation du système automatisé (Wave DNA fragment Analysis System) pour la mise au point d'une identification microbienne globale (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) ;
- Le laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri-Mondor pour le développement de la technique D-HPLC ;
- L'unité INSERM U511, Immunobiologie cellulaire et moléculaire des infections parasitaires (Hôpital de la Pitié Salpêtrière), pour l'utilisation de la spectrométrie de masse

Développer et partager les connaissances : la présentation de mes travaux lors des réunions au sein de l'UMR (une fois par an) et au sein de l'équipe (une fois par mois) me permet de **justifier d'une démarche scientifique**. Mes travaux ont été déjà présentés lors de congrès nationaux (*Société Française de Mycologie Médicale, mai 2005, Besançon ; Société Française de Microbiologie, juin 2007, Nantes*), internationaux (*Advances against aspergillosis, septembre 2004, San Francisco, USA ; Society for Human and Animals Mycology (ISHAM), juin 2006, Paris*) et des séminaires (*journées du département de santé animale de l'INRA, juin 2007*)

Respecter rigoureusement un cahier des charges : j'ai participé à la rédaction d'un article scientifique de 10 pages en anglais publié dans Journal of Microbiological Methods et dont le titre est « Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture ». Le manuscrit a été

examiné par 5 reviewers. Il a fallu modifier le texte en tenant compte de chacune de leurs remarques.

Réaliser des tâches répétitives : il m'est arrivé de **recommencer plusieurs fois** mes expériences pour la mise au point des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques ont plusieurs étapes, elles sont toutes basées sur le principe de l'amplification génétique et de la séparation des fragments d'ADN. Il a été nécessaire de valider les PCR en testant plusieurs amorces (publiées et originales).

2. Gestion de projet

Etre moteur du projet : à l'issue de ce travail de thèse, je suis entièrement **autonome** sur le plan technique, tout en entretenant le contact avec les différents partenaires. L'acceptation de mon article montre bien la qualité des résultats obtenus lors de ce travail de thèse.

Comprendre les implications de son travail : nous avons des réunions mensuelles qui permettent de **rendre compte** et faire le point sur l'avancement du projet.

Ce projet va permettre à Thalès de disposer de techniques plus rapides pour renforcer leur systèmes de sécurité au niveau de l'environnement et d'avoir une meilleure connaissance sur l'aérocontamination fongique.

Pour le secteur public, ce projet va permettre une meilleure appréciation du risque représenté par la présence des champignons microscopiques dans les environnements.

Adapter sa stratégie aux ressources disponibles : j'ai pu obtenir l'aide de stagiaires en BTS Bio-analyse et contrôle pour les expériences. La présence de ces stagiaires m'a permis de me consacrer à la rédaction de l'article et l'actualisation de ma bibliographie.

Planifier les étapes : pour une bonne **organisation** de mon travail sur le terrain (prélèvements d'air dans les différents environnements) et au laboratoire (application des différentes techniques et interprétation des résultats), il a été nécessaire d'établir des plannings et de **définir les priorités**.

Savoir travailler en transversal : j'ai effectué une campagne de prélèvements d'air dans un élevage avicole dans l'Yonne (collaboration avec le centre d'application de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort à Champignelles) entre mars et juin 2007 (une fois par semaine pendant 15 semaines). J'effectue des prélèvements ponctuels dans des habitats insalubres et des bureaux avec la collaboration du laboratoire d'hygiène de la ville de Paris.

En dehors de ces périodes de prélèvements d'air dans différents environnements, je traite mes échantillons dans différents laboratoires.

La mise en culture se fait au centre d'application à Champignelles pour les prélèvements de l'élevage. Pour les échantillons des habitats et bureaux, le traitement se fait dans le laboratoire de Mycologie de l'ENVA à Maisons-Alfort.

Pour les techniques de biologie moléculaire, je travaille à l'ENVA pour la TTGE et au laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri Mondor à Créteil pour la technique D-HPLC.

Tous les échantillons de l'élevage avicole seront traités par une technique biochimique (Spectrométrie de masse) dans l'unité INSERM U511, Immunobiologie cellulaire et moléculaire des infections parasitaires (Hôpital de la Pitié Salpêtrière)

Anticiper : Je travaille dans les meilleures conditions de stérilité (hotte à flux laminaire, bec benzène) pour limiter les problèmes de contamination de mes cultures.

Le contrôle qualité du laboratoire me permet de **gérer** mes stocks de matériels et produits.

Apprendre de ses erreurs : mon premier article a été refusé par deux journaux avant d'être accepté par le troisième. Ces refus m'ont beaucoup appris sur la **rigueur, l'esprit critique et la synthèse** de l'interprétation des résultats.

Redéfinir des critères de travail : mon projet consiste à mettre au point des techniques d'identification globale qui n'ont pas encore été utilisées en mycologie environnementale. J'ai dû, lors de la mise au point de ces techniques de biologie moléculaire **redéfinir l'ensemble des paramètres expérimentaux**. Il a fallu par exemple tester plusieurs techniques d'extraction d'ADN avant de valider notre technique.

Savoir partager des ressources : ce projet de thèse m'a également permis de développer ma **capacité à travailler en équipe**.

Je suis dans une UMR avec 4 tutelles où 4 équipes cohabitent. La plupart du matériel est commun.

Les ressources financières venant des 4 tutelles sont utilisées par les 4 équipes.

Il existe des procédures pour l'utilisation du matériel dans le laboratoire pour une bonne organisation.

Sélectionner et choisir un fournisseur : j'ai eu la charge de mettre en place un contrat d'une année pour une prestation de service de séquençage. Pour choisir notre prestataire, j'ai dû contacter et mettre en concurrence quatre sociétés différentes afin de sélectionner celle qui nous offrait les prestations correspondant le mieux à notre besoin.

3. Compétences relationnelles et de communication

Ecouter activement : lors de la présentation des résultats pendant les réunions ou congrès, de nombreuses remarques et interrogations mènent à une **remise en questions**.

Pour un bon déroulement du projet, il a été important de savoir prendre du recul.

Transmettre : j'ai formé des stagiaires (BTS, Vétérinaires, Master 2) à la biologie moléculaire ou à l'utilisation d'un matériel du laboratoire dont je connaissais le fonctionnement.

Parler en public : mon travail de thèse m'a permis de **gérer mon stress lors de la prise de parole** en public.

J'ai dû à de nombreuses reprises **présenter mes travaux** à un public varié (réunions internes et externes au laboratoire et congrès nationaux et internationaux), ce qui nécessite de savoir adapter la présentation au public visé.

Communiquer en langue étrangère : j'ai participé à la rédaction d'un article en anglais ; j'ai aussi réalisé des posters en anglais et en français.

4. Management humain

Encadrer : j'ai eu l'opportunité **d'encadrer des stagiaires** (1^{ère} et 2^{ème} année) de BTS de bio-analyse et contrôle. Les stages se sont déroulés entièrement sur le projet de ma thèse.

Il a fallu définir leur charge de travail, les **recadrer**, les **rassurer**, les **écouter**, et **s'adapter** à leur niveau de connaissance ainsi qu'à leur rythme de travail.

Gérer la capacité de travail : pour une bonne exploitation des pistes et des opportunités, il a été important de **savoir prendre du recul face au stress et à la fatigue intellectuelle et physique** dus aux contraintes liées au projet et d'avoir une bonne stabilité émotionnelle. Cette stabilité est nécessaire pour une bonne prise des décisions et une meilleure gestion des difficultés.

5. Qualités personnelles

Ténacité et combativité : lors de ce projet la **patience** a été capitale car il a fallu mettre au point une technique qui n'avait jamais été utilisée dans ce domaine (mycologie environnementale). Entre le master et la Thèse il a fallu attendre une année pour obtenir le financement CIFRE, j'étais déjà inscrite en thèse à l'université. Pendant cette attente j'ai continué à avancer dans le projet.

Investissement dans le travail : je me suis investie avec un grand plaisir dans ce projet que j'ai commencé et apprécié lors de mon stage de master. Je suis très **disponible** pour mon travail en adaptant mon calendrier aux exigences et aux imprévus de mon projet. Je dois soumettre constamment mes résultats aux doutes pour ajuster ma méthodologie de recherche et proposer des pistes de réflexion sans cesse renouvelées (lors de différentes réunions). Je dois me montrer **souple, maîtriser plusieurs champs disciplinaires** (Mycologie, biologie moléculaire, anglais et informatique) et plusieurs méthodes (mise en culture fongique, PCR -TTGE, PCR - D-HPLC, spectrométrie de masse...)

Rigueur scientifique mais aussi dans la qualité du travail rendu, qualité du travail : l'expérience que j'ai acquise lors de la **rédaction et la modification de l'article** m'a permis renforcer ma **rigueur scientifique**. La **rigueur du travail** est une qualité nécessaire que j'ai développée lors de mes différents stages en laboratoire de recherche

Prudence et modestie : j'ai appris lors de mon travail de thèse à être **prudente et modeste** sur les interprétations apportées à mes résultats lors des exposés aux congrès qui réunissent de nombreux spécialistes.

IV. Impacts de la thèse et projet professionnel

Les résultats de ce travail vont permettre à nos partenaires d'intégrer les outils utilisés dans ce projet, dans leurs systèmes de détection et d'identification des communautés microbiennes. Lors de ce projet nous avons aussi mis en place la détection des champignons microscopiques avec deux types d'appareillage qui se complètent quelle que soit la méthode d'identification.

Mon projet a déjà permis à l'UMR et à l'entreprise Thalès de collaborer avec des laboratoires publics (*laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, laboratoire de biochimie et génétique de l'hôpital Henri-Mondor et l'unité INSERM U511,*) et avec de partenaires privés (*société Transgenomic France et Grande-Bretagne*).

Projet professionnel

Mon choix d'entreprendre un doctorat a été motivé par la volonté d'accéder aux métiers de la recherche dans toute sa diversité.

Avec les compétences acquises lors de ma thèse, je souhaiterais orienter ma carrière vers le secteur de l'environnement. Les postes susceptibles de m'intéresser sont **conseiller en environnement, ingénieur en analyse de l'air ou responsable de station d'épuration**.

Mon désir serait de participer à des projets concernant l'impact des microorganismes sur l'environnement. Mais aussi continuer dans le développement des outils plus performants dans l'étude des communautés microbiennes. Je voudrais avoir l'opportunité d'élaborer des projets innovants notamment dans le **domaine de l'écologie microbienne**.

Démarches menées pour l'instant et atouts

J'ai participé au Doctoriales Paris Sud (11-15 juin 2007) où j'ai eu l'opportunité de rencontrer un membre de l'incubateur Paris Sud (IncubAlliance).

J'ai déposé mon CV sur un site d'emploi (www.cadremploi.fr). J'ai essentiellement utilisé l'Internet (annuaire Internet des sites professionnels : www.indexa.fr) pour me renseigner sur les entreprises qui pourraient bénéficier de mes compétences. J'ai contacté plus particulièrement :

1. **Le Groupe Carso**, laboratoire spécialisé dans les analyses touchant à la sécurité sanitaire du bâtiment, situé à Lyon
2. **La Société nouvelle hydraulique (SNH)**, spécialisée dans la protection et la régulation pour les réseaux d'eau potable ainsi que l'intégration et l'assainissement. Elle réalise sur demande des appareils spécifiques. (Reyrieux, Ain)
3. **La société Point Air**. Importateur de matériel de purification d'air pour les professionnels et les particuliers. Ses appareils traitent les fumées et les odeurs par aspiration et filtration pour une redistribution d'air pur.
4. **L'Europôle Méditerranéen de l'Arbois**, structure qui accueille des entreprises qui intègrent la problématique environnementale dans leur stratégie de développement et qui participe à la diffusion des technologies de l'environnement.

Je peux apporter au sein d'une entreprise autonomie et polyvalence démontrées lors de la gestion d'un projet de développement au sein d'une équipe d'enseignants-chercheurs, de chercheurs, ingénieurs et techniciens. J'ai acquis et appliqué des techniques de mesure de prélèvement d'air et mis en évidence mes compétences techniques et celles d'analyse et de

synthèse, afin de résoudre le problème complexe de détection et d'identification de microorganismes (champignons) dans les environnements intérieurs.

A présent, je suis capable de travailler dans un contexte industriel, qui me permettra de contribuer de façon dynamique aux développements de nouvelles technologies dans le secteur de l'environnement.