

Les problèmes de bio-contamination dans les environnements intérieurs (habitats et lieux de travail) ont conduit à une prise de conscience de leur impact sur la santé et de la difficulté à cerner les différents paramètres. La validation de méthodes microbiologiques et chimiques de contrôle des lieux de travail a pour but :

**« Développer des outils analytiques objectifs et performants permettant d'évaluer l'occurrence d'agents biologiques (fongiques et bactériens) et chimiques (ergostérol, mycotoxines, MVOCs, endotoxines, ...) produits par les moisissures et les bactéries, et susceptibles d'être délétères dans le milieu du travail »** ; selon deux axes complémentaires :

- L'identification des facteurs de risques liés à la présence et à la propagation de microorganismes dans les lieux de travail. Ces risques peuvent être liés aux microorganismes eux-mêmes ou aux composés chimiques qu'ils produisent.
- Parallèlement, la quantification des biomarqueurs fongiques (ergostérol, MVOC, etc.) a été envisagée avec la mise au point et validation de procédures chromatographiques et spectrométriques.

#### IV.1. Les étapes de la validation

Parmi les lieux de travail à analyser on trouve :

- Laboratoire manipulant des matières contaminées.
- Bâtiment à usage agroalimentaire (minoterie).
- Bâtiments à usage de bureaux, avec ou sans air conditionné.
- Bâtiments avec archives, livres.
- Bâtiments à usage industriel.

Les microorganismes recherchés sont :

- **Les champignons et les levures**

Les pathologies liées aux moisissures peuvent être d'ordre cutané, digestif, et surtout respiratoire en ce qui concerne les environnements intérieurs. Les effets toxiques, irritants et allergiques sont liés à l'occurrence et à la nature chimique de divers constituants cellulaires tels que certains éléments de la paroi cellulaire des spores fongiques, les mycotoxines, les composés organiques volatils ou encore les allergènes d'origine protéique.

Les moisissures synthétisent un stérol très spécifique (ergostérol) qui est un élément structural des membranes. En raison de cette spécificité, l'utilisation de l'ergostérol comme biomarqueur se trouve justifiée. Par ailleurs, des métabolites volatils tout aussi spécifiques comme la géosmine ou le 2-éthyl-hexanol, sont des indicateurs de la présence active des moisissures.

#### ▪ Les bactéries

Ce sont des organismes procaryotes dont l'importance en Indoor Pollution se situe principalement au niveau des toxines qu'elles libèrent. La recherche de ces molécules s'avère également importante sur des lieux de travail spécifiques. Certaines bactéries filamenteuses appelées actinomycètes et plus spécifiquement les espèces thermophiles telle que *Thermoactinomyces vulgaris* sont impliquées dans des cas d'alvéolite allergique extrinsèque.

**Dans la partie "industrielle" de la recherche**, une approche spécifique des fluides de coupe a été envisagée. En effet, ces milieux riches en substances organiques sont pulvérisés sous forme d'aérosols et sont généralement recyclés de nombreuses fois.

D'autre part, des systèmes d'échantillonnage et d'analyse de métabolites secondaires produits par les moisissures (MVOCs) ont également été effectués.

#### IV.1.1. Procédures d'échantillonnage

- Echantillonnage de l'air pour analyses microbiologiques (germes revivifiable).
- Echantillonnage de la poussière déposée sur support lisse, pour analyses microbiologiques (germes revivifiables).
- Echantillonnage de l'air pour dosage de l'ergostérol.
- Echantillonnage de l'air pour analyses des MVOC.
- Echantillonnage des poussières de moquette et supports apparentés, pour analyses microbiologiques et biochimiques.
- Echantillonnage des liquides pour analyses microbiologiques (germes revivifiables).
- Echantillonnage des liquides pour dosage de l'ergostérol.
- Echantillonnage des liquides pour dosage des endotoxines.

**IV.1.2. Procédures d'analyse**

Les procédures d'analyses mettent en évidence la complémentarité des approches microbiologiques et biochimiques.

- les premières rendent compte de la microflore vivante ou revivifiable,
- les secondes contribuent à mesurer l'ensemble des constituants fongiques (cellules vivantes, débris cellulaires et spores vivantes ou non) et bactériens.
- Un dernier aspect concerne la mesure de paramètres chimiques susceptibles de contribuer à un diagnostic précis.

**IV.1.2.1. Analyses microbiologiques (microflore revivifiable)**

- **Air et surfaces**

Le tableau (1) suivant résume les différents germes recherchés.

**Tableau 1** : Milieux de culture, température et temps d'incubation en fonction des germes recherchés (air et surface).

<b>Moisissures -Air</b>	<b>Milieux gélosés</b>	<b>T° incubation</b>	<b>Durée incubation</b>
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	HS+DRBC (en été)	25°C	5 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles	DG 18 de Biotest	25°C	5 jours
Moisissures totales thermophiles	YM de Biotest	45°C	2 jours
<b>Moisissures de surface</b> Moisissures totales mésophiles xérophiles	MC+ DRBC	25°C	5 Jours
Moisissures totales thermophiles	MC	45°C	2 jours
<b>Bactéries- Air, surface</b> Bactéries totales de l'environnement	Milieux gélosés TC de Biotset TSA actidione	25°C	5 jours
Bactéries totale d'origine humaine	TC de Biotest	37°C	2 Jours
Bactéries Gram -	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours

- **Les liquides**

Les différents germes recherchés sont :

- Moisissures totales hygrophiles.
- Bactéries totales de l'environnement et d'origine humaine.
- Bactéries gram – et les thermo actinomycètes.

▪ **Poussières de moquettes et supports apparentés**

Les incubations des germes sont affichées dans le tableau (2) suivant :

**Tableau 2** : Les incubations des germes.

Moisissures -Air	Milieux gélosés	T° incubation	Durée incubation
<b>Moisissures totales mésophiles hygrophiles</b>	MC+DRBC(en été)	25°C	5 jours
<b>Moisissures totales mésophiles xérophiles sur milieu sucré</b>	M4OY	25°C	5 jours
	M4OY + NaCl	25°C	5 jours

D'autres germes recherchés dans des environnements spécifiques à savoir :

- Les moisissures thermophiles (isolées à 45 °C).
- Le dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 25 °C.
- Le dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 37 °C.
- Le dénombrement total des bactéries Gram<sup>-</sup>.

#### IV.1.2.2. Analyses biochimiques (recherche de biomarqueurs)

- **ATP** : L'ATP, en tant que molécule énergétique de base utilisée par tous les êtres vivants est utilisé en tant que biomarqueur lié à l'occurrence de matériel biochimique issu d'organismes vivants ou morts.
- **Endotoxines** : Les endotoxines sont des lipopolysaccharide (LPS) constitutifs de la paroi des bactéries Gram- et sont pour une part responsable de leurs propriétés toxiques.

- **Ergostérol** : C'est le stérol membranaire majoritaire des levures et des champignons, ce qui le rend intéressant en tant que biomarqueur fongique. Comme pour les endotoxines, il s'agit d'un biomarqueur de la charge TOTALE de la fonge revivifiable ou non ; Dosage : chromatographie en phase gazeuse et GCMS. Milieux concernés : eau, fluides de coupe dilués, poussières, matériaux divers.
- **MVOC** : Les métabolites volatils d'origine fongique permettent de déceler des moisissures et constituent en fonction de leur nature un risque potentiel indirect de toxicité.
- **Mycotoxines** : Les mycotoxines représentent une gamme très vaste de métabolites secondaires. Selon les genres et les espèces, ils diffèrent considérablement, aussi bien en ce qui concerne leur structure chimique que leurs propriétés sur les organismes vivants.

