

# Évaluation de la biomasse mycologique sur les surfaces des réseaux aérauliques des systèmes de ventilation

Geneviève Marchand  
Nancy Lacombe  
Carole Pépin  
Marie-Jeanne Biyeyeme Bi Mve  
Carol-Anne Villeneuve  
Marie Gardette  
Jacques Lavoie  
Maximilien Debia  
Yves Cloutier

RAPPORTS  
SCIENTIFIQUES

R-965

## NOS RECHERCHES travaillent pour vous !

**Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.**

### **Mission**

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail.

### **Pour en savoir plus**

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement :

- au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CNESST ([preventionautravail.com](http://preventionautravail.com))
- au bulletin électronique [InfoIRSST](#)

### **Dépôt légal**

Bibliothèque et Archives nationales du Québec  
2017  
ISBN : 978-2-89631-933-6  
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications  
et de la valorisation de la recherche  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec)  
H3A 3C2  
Téléphone : 514 288-1551  
[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)  
© Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
février 2017

# Évaluation de la biomasse mycologique sur les surfaces des réseaux aérauliques des systèmes de ventilation

Geneviève Marchand<sup>1</sup>, Nancy Lacombe<sup>1</sup>, Carole Pépin<sup>1</sup>, Marie-Jeanne Biyeyeme Bi Mve<sup>1</sup>, Carol-Anne Villeneuve<sup>1</sup>, Marie Gardette<sup>1</sup>, Jacques Lavoie<sup>1</sup>, Maximilien Debia<sup>2</sup>, Yves Cloutier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRSST

<sup>2</sup> Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal

RAPPORTS  
SCIENTIFIQUES

R-965



## Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document.

En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Cliquez recherche



Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.



#### ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## **REMERCIEMENTS**

L'équipe de recherche tient à remercier tous ceux qui, par leur participation et leur soutien, ont permis la réalisation du projet en rendant possibles les échantillonnages dans leur milieu de travail. Nous voulons aussi exprimer notre gratitude à Ève Nesham-Grenon pour son aide au début du projet, lors des premiers essais dans l'enceinte d'exposition et quelques essais méthodologiques.



## SOMMAIRE

Les systèmes de chauffage, de ventilation et de climatisation de l'air (CVCA) permettent le maintien d'une bonne qualité de l'air dans différents types d'édifices. Toutefois, lorsque ces systèmes ne sont pas bien entretenus, ils peuvent devenir des sources d'émission de polluants dans l'air ambiant. Actuellement, les critères de déclenchement du nettoyage des conduits de ventilation sont souvent basés sur les dépôts de poussières. Or, une évaluation de la biomasse mycologique des poussières devrait faire partie des critères d'entretien puisque l'importance d'un dépôt de poussières n'est aucunement indicatrice de la charge microbienne qu'il contient. Afin de tenir compte de l'ensemble des effets potentiels sur la santé, une évaluation adéquate de la salubrité des conduits de ventilation nécessite que les deux critères soient considérés : la biomasse mycologique et la masse de poussières. Ce projet vise à aider les gestionnaires des édifices à émettre un jugement éclairé sur l'état de salubrité des systèmes CVCA et, par conséquent, de prévenir l'exposition des occupants aux moisissures. Il a pour objectifs de 1) comparer deux méthodes de prélèvement des poussières déposées dans les conduits des systèmes CVCA en évaluant leurs performances et leurs limites, et 2) de mettre au point, de valider et de comparer des méthodes d'évaluation de la biomasse mycologique présente dans les poussières.

Le premier volet du projet consistait à déterminer la meilleure méthode de prélèvement des poussières déposées dans les CVCA. L'une des deux méthodes de prélèvement évaluées, l'approche par essuyage, a rapidement été abandonnée en raison de problèmes liés à la capacité de collecte des poussières sur les surfaces lisses des systèmes de ventilation. L'autre méthode, par aspiration avec la cassette *Environmental Monitoring Systems* (EMS) ayant un embout intégré, a démontré par contre une excellente efficacité de prélèvement, soit plus de 98 % lorsque la cassette entière était traitée.

Lors du second volet, les méthodes d'analyse de la biomasse mycologique ayant démontré des performances analytiques acceptables au moment de leur validation ont été comparées dans un environnement contrôlé. Ces mêmes méthodes d'analyse de la biomasse mycologique ont aussi été comparées sur le terrain lors de ce second volet. La méthode de la q-PCR universelle s'est avérée simple, rapide et performante, avec une limite de détection très faible et des délais de traitement inférieurs à 24 heures. En raison de ses performances, de son faible coût et du temps d'analyse nécessaire, la q-PCR universelle est à ce stade-ci la méthode la plus propice à l'évaluation de la salubrité des systèmes de ventilation.

En plus de fournir une méthode d'analyse d'évaluation de la biomasse mycologique, ce projet met en évidence le fait que l'évaluation de la salubrité des conduits des systèmes de ventilation doit nécessairement être jugée à la fois en fonction de la charge mycologique et de la masse de poussière déposée.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Mise en contexte</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Les moisissures</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 Écologie .....	2
1.2.2 Effets sur la santé.....	2
1.2.3 Limites d'exposition mycologique .....	4
<b>1.3 Les systèmes de chauffage, de ventilation et de climatisation de l'air (CVCA)</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Critères de nettoyage des CVCA .....	5
<b>1.4 Indicateurs mycologiques</b> .....	<b>5</b>
1.4.1 Flore cultivable .....	6
1.4.2 Flore totale – microscopie.....	6
1.4.3 ADN mycologique .....	7
1.4.4 Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA).....	8
1.4.5 $\beta$ -(1,3)-D-glucane .....	9
1.4.6 Ergostérol.....	9
<b>1.5 Méthodes de prélèvement</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6 Objectifs</b> .....	<b>10</b>
<b>2. MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Poussières</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Essais dans l'enceinte d'exposition</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 Génération.....	11
<b>2.3 Méthodes de prélèvement</b> .....	<b>12</b>
2.3.1 Prélèvement par aspiration.....	13

2.3.2	Prélèvement par essuyage (frottis).....	14
<b>2.4</b>	<b>Méthodes d'analyse.....</b>	<b>14</b>
2.4.1	Souches fongiques - validation et comparaison analytique .....	14
2.4.2	Extraction des poussières .....	15
2.4.3	Culture - flore cultivable.....	16
2.4.4	Microscopie - flore totale.....	16
2.4.5	Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA).....	17
2.4.6	q-PCR universelle.....	17
2.4.7	$\beta$ -(1,3)-D-glucane.....	19
<b>2.5</b>	<b>Validation des méthodes analytiques .....</b>	<b>20</b>
2.5.1	Limite de détection .....	20
2.5.2	Répliquabilité et répétabilité .....	20
<b>2.6</b>	<b>Comparaison entre les méthodes.....</b>	<b>20</b>
2.6.1	Essais en situation contrôlée .....	21
2.6.2	Essais en situation réelle .....	21
2.6.3	Évaluation des coûts et délais .....	21
<b>2.7</b>	<b>Analyse statistique .....</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Essais dans l'enceinte d'exposition.....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Paramètre de génération.....	23
<b>3.2</b>	<b>Méthodes de prélèvement.....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Prélèvement par essuyage (frottis).....	24
3.2.2	Prélèvement par aspiration.....	24
<b>3.3</b>	<b>Validation des méthodes analytiques .....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Culture - flore cultivable.....	27
3.3.2	Microscopie - flore totale.....	27
3.3.3	Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA).....	30
3.3.4	q-PCR universelle.....	30
<b>3.4</b>	<b>Comparaison des méthodes.....</b>	<b>31</b>
3.4.1	Essais en situation contrôlée .....	31
3.4.2	Essais en situation réelle .....	34
3.4.3	Évaluation des coûts et délais .....	38
<b>3.5</b>	<b>Biomasse mycologique en fonction de la masse de poussières .....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Méthodes de prélèvement.....</b>	<b>41</b>

<b>4.2</b>	<b>Méthodes d'analyse de la biomasse mycologique .....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Flore mycologique cultivable .....	42
4.2.2	Microscopie – spores de moisissures .....	43
4.2.3	Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA).....	44
4.2.4	q-PCR universelle .....	44
<b>4.3</b>	<b>Comparaison des méthodes analytiques .....</b>	<b>45</b>
4.3.1	Essais en chambre d'exposition .....	45
4.3.2	Essais en situations réelles .....	46
<b>4.4</b>	<b>Masse de poussières et biomasse mycologique comme indicateur de salubrité .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>LIMITES ET RETOMBÉES.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>53</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>55</b>



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences des amorces et sondes testées.....	18
Tableau 2 : Statistiques descriptives des masses de poussières recueillies avec les méthodes de prélèvement par aspiration testées (ASPEC et cassette EMS).....	25
Tableau 3 : Performance analytique des quatre méthodes sur des échantillons de poussières additionnés de spores de moisissures.....	27
Tableau 4 : Moyennes géométriques et étendues des concentrations de biomasse mycologique obtenues par les quatre méthodes analytiques .....	32
Tableau 5 : ANOVA sur les concentrations de spores de moisissures pour les échantillons prélevés dans l'enceinte de génération.....	33
Tableau 6 : Résultats du test de comparaison multiple Tukey-Kramer effectué sur les concentrations de spores de moisissures pour les essais réalisés dans l'enceinte de génération ( $\alpha=0,05$ ).....	33
Tableau 7 : Corrélations de Pearson calculées sur les concentrations log-transformées obtenues des quatre méthodes analytiques pour les essais effectués dans l'enceinte d'exposition.....	34
Tableau 8 : Moyennes géométriques et étendues des concentrations de biomasse mycologique obtenues par les quatre méthodes analytiques .....	35
Tableau 9 : ANOVA sur les concentrations de spores de moisissures pour les échantillons prélevés en situation réelle dans les systèmes de ventilation.....	36
Tableau 10 : Résultats du test de comparaison multiple Tukey-Kramer effectué sur les concentrations de spores de moisissures pour les essais réalisés dans les systèmes de ventilation ( $\alpha=0.05$ ).....	36
Tableau 11 : Corrélations de Pearson calculées sur les concentrations log-transformées des quatre méthodes analytiques.....	37
Tableau 12 : Comparaison des coûts, du temps technique et des délais d'analyse pour chacune des méthodes .....	38
Tableau 13 : Pourcentage d'échantillons prélevés dans les systèmes de ventilation nécessitant un nettoyage, selon les indicateurs de poussières proposés dans la littérature et cette étude.....	48
Tableau 14 : Pourcentage d'échantillons prélevés dans les systèmes de ventilation nécessitant un nettoyage, selon les indicateurs de moisissures proposés dans la littérature et cette étude.....	49



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principe de l'émission de fluorescence par la sonde de type TaqMan lorsque l'enzyme polymérase effectue l'amplification de l'ADN.....	8
Figure 2 : Principe du dosage de la $\beta$ -N-acétylhexosaminidase. ....	9
Figure 3 : Schéma de l'enceinte d'exposition et de la disposition des plaques d'acier (tiré de Skulinova <i>et al.</i> 2016).....	12
Figure 4 : Cassette de prélèvement des poussières avec bec collecteur biseauté intégré, préparée par EMS. ....	13
Figure 5 : Schéma de prélèvement démontrant la variation des sites de prélèvement lors de la comparaison ASPEC et EMS. ....	14
Figure 6. Photographie du prélèvement de spores à l'aide d'un écouvillon. ....	15
Figure 7 : Schéma de régions des gènes codant pour les sous-unités de l'ARN ribosomique du génome des eucaryotes et position des marqueurs testés.....	18
Figure 8 : Programme d'amplification pour la PCR universelle FungiQuant de la biomasse mycologique.....	19
Figure 9 : Schéma des vitesses moyennes de déplacement d'air mesurées à 36 points différents dans l'enceinte d'exposition. ....	23
Figure 10 : Échantillon par frottis sur une plaque de cuivre prépesée.....	24
Figure 11 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des masses de poussières pesées dans les cassettes, sur les filtres ou sur les plaques de l'enceinte. 25	25
Figure 12 : Pourcentages de perte de poussières pour les cassettes et pour les filtres, observés à partir des plaques de l'enceinte ( valeur extrême). N=54 .....	26
Figure 13 : Colonies de moisissures sur un milieu à l'extrait de malt après croissance à 25 °C durant 5 jours. ....	27
Figure 14 : Spores d' <i>Alternaria sp</i> colorées avec l'intercalant d'ADN double brin DAPI (grossissement de 400x).....	28
Figure 15 : Spores de moisissures sur un filtre ECM après transparence (grossissement de 400x). ....	28
Figure 16 : Concentration de spores rapportée selon le nombre de champs microscopiques traités lors de l'analyse d'un échantillon.....	29
Figure 17 : Régression linéaire entre la fluorescence relative et le nombre de spores. ....	30
Figure 18 : Exemple d'une courbe standard obtenue à l'aide du thermo-cycleur Realplex® 2S lors de la quantification des échantillons de poussières.....	31
Figure 19 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des concentrations de spores de moisissures obtenues à l'aide des 4 méthodes d'analyse pour les échantillons provenant de l'enceinte d'exposition.....	32

---

Figure 20 : Régressions linéaires (lignes pointillées) et orthogonales (lignes orangées) entre les méthodes d'analyse pour lesquelles des corrélations significatives ont été obtenues sur les échantillons provenant de l'enceinte d'exposition. Les ellipses sont la représentation de l'intervalle de confiance à 95 % du nuage de points.....	34
Figure 21 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des concentrations obtenues à l'aide des 4 méthodes d'analyse, pour les masses de poussières prélevées dans les systèmes de ventilation.....	35
Figure 22 : Régressions linéaires (lignes pointillées) et orthogonales (lignes orangées) obtenues entre les méthodes d'analyse pour les échantillons provenant des systèmes de ventilation. Les ellipses sont la représentation de l'intervalle de confiance à 95 % du nuage de points.....	37
Figure 23 : Concentrations de la biomasse mycologique en fonction des masses de poussières prélevées a) dans l'enceinte d'exposition; b) dans les systèmes de ventilation. Les limites proposées de 23 mg avec la méthode de l'ASPEC (Lavoie <i>et al.</i> 2011) et de 58 mg (cette étude) sont indiquées par les lignes bleues verticales. ....	39
Figure 24 : Masse de poussières/100 cm <sup>2</sup> prélevée et concentration en équivalent de spores pour la méthode de la q-PCR universelle.....	40
Figure 25 : Observation microscopique d'échantillons de poussières filtrés puis transparisés pour l'analyse de la biomasse mycologique. ....	43

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte

Les systèmes de chauffage, de ventilation et de climatisation de l'air (CVCA) permettent le maintien d'une bonne qualité de l'air dans différents types d'édifices. Toutefois, lorsque ces systèmes ne sont pas bien entretenus, ils peuvent être des sources d'émission de polluants dans l'air ambiant des bâtiments publics (hôpitaux, écoles) et professionnels (immeubles de bureaux) <sup>(1-5)</sup>. En effet, les poussières qui sont déposées sur les parois des conduits des systèmes de ventilation peuvent être une source de nutriment pour les microorganismes et contribuer à leur développement <sup>(6)</sup>. Des études ont d'ailleurs établi un lien entre des systèmes de ventilation contaminés et les syndromes des immeubles de bureaux <sup>(7,3,8)</sup>. Il est soupçonné que plusieurs symptômes non spécifiques puissent être reliés à la contamination microbienne des conduits des systèmes de ventilation <sup>(2,3,9)</sup>. Cette contamination microbiologique serait responsable d'épisodes de rhinite, de fièvre des humidificateurs, d'asthme et de pneumonite d'hypersensibilité <sup>(1-3,10)</sup>.

À l'échelle mondiale, les gens passent en moyenne plus de 80 % de leur temps à l'intérieur d'édifices. Au Canada, ce pourcentage atteindrait les 90 %. Plusieurs polluants d'origines chimique et biologique peuvent aussi affecter la qualité de l'air intérieur <sup>(11)</sup>. Selon Mandal et Brandl, jusqu'à 34 % de la pollution intérieure serait d'origine biologique <sup>(12)</sup>. Les occupants des bâtisses équipées d'un système de CVCA peuvent être exposés à des particules microbiennes ou à leurs sous-produits à la suite d'une remise en suspension des poussières déposées sur les surfaces internes des conduits <sup>(3,4,13,14)</sup>. Les bioaérosols présents dans l'air des bâtiments peuvent être des bactéries, des moisissures, des virus, des acariens de poussières ainsi que leurs sous-produits.

Actuellement, les critères de déclenchement du nettoyage des conduits de ventilation sont souvent basés sur une inspection visuelle du dépôt de poussières <sup>(6,15)</sup>. L'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) figure parmi les organismes qui ont déjà proposé des critères de déclenchement du nettoyage des réseaux aérauliques des systèmes CVCA, basés sur une méthodologie gravimétrique de l'évaluation des poussières <sup>(5)</sup>. Cette méthodologie permet une évaluation objective de la propreté des conduits et pallie la subjectivité attribuable aux inspections visuelles utilisées jusqu'à maintenant pour le déclenchement des nettoyages. Toutefois, bien qu'elle soit basée sur une qualification massive objective des dépôts, cette approche ne considère pas la charge mycologique contenue dans les poussières déposées. Une évaluation de la biomasse mycologique des poussières doit faire partie des critères d'entretien puisque l'importance d'un dépôt de poussières n'est aucunement indicatrice de la charge microbienne qu'il contient. Afin de tenir compte de l'ensemble des effets potentiels sur la santé, une évaluation adéquate de la salubrité des conduits de ventilation nécessite que les deux critères soient considérés : la biomasse mycologique et la masse de poussières.

### 1.2 Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques à croissance filamenteuse qui regrouperaient des millions d'espèces selon les dernières évaluations scientifiques <sup>(16)</sup>.

### 1.2.1 Écologie

Les moisissures sont ubiquistes dans la nature; elles se développent sur les végétaux, la matière organique en décomposition, à la surface des eaux stagnantes ainsi que dans ou sur les sols<sup>(16,17)</sup>. Même si toutes sortes de matières organiques peuvent constituer des substrats de croissance pour les moisissures, les exigences à cet égard varient entre les différentes espèces. Certaines croissent sur des feuilles en décomposition, d'autres sur des matières ligneuses, telles que le bois, alors que d'autres leur préféreront les matières chitineuses tels les cheveux et les ongles.

Dans les environnements intérieurs, les produits celluloseux comme les matériaux de construction, les cartons, le papier, les panneaux de plâtre, mais aussi les fibres naturelles et synthétiques comme celles qui entrent dans la fabrication des tapis et des tissus ainsi que les plantes et les poussières organiques sont tous de bons substrats qui permettent la croissance fongique quand les conditions sont favorables<sup>(18-21)</sup>. L'humidité relative du milieu et l'activité en eau (Aw) du substrat sont des paramètres qui influencent la capacité de croissance des moisissures. Dans un environnement intérieur, il est reconnu qu'une humidité relative supérieure à 65 % à la surface des matériaux favorisera la croissance fongique<sup>(22)</sup>. En dehors des conditions de croissance, il est connu que les spores de moisissures peuvent demeurer viables sur de longues périodes<sup>(22,23)</sup>.

De la même façon, lorsque les conditions environnementales sont adéquates, les poussières déposées à l'intérieur des systèmes de ventilation auront toutes les caractéristiques nécessaires permettant aussi la croissance mycologique. La flore mycologique présente dans les poussières peut être très diversifiée et identique à celle rencontrée dans les environnements extérieurs. Les moisissures d'intérêt proviennent principalement des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Alternaria*<sup>(20)</sup>.

### 1.2.2 Effets sur la santé

Les moisissures sont majoritairement saprophytes; elles vivent principalement de la décomposition de matières organiques. Peu d'entre elles sont reconnues comme pathogènes infectieux chez l'humain. Par contre, qu'elles soient viables ou non viables, les structures ou composantes fongiques telles que les spores, les mycotoxines, les composés organiques volatils (COV) les allergènes ou les  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes peuvent occasionner des effets néfastes sur la santé humaine<sup>(24-26)</sup>.

Les effets des moisissures sur la santé dépendent de plusieurs facteurs: la composante mycologique, la voie d'exposition, la dose ainsi que la susceptibilité individuelle. La voie principale d'exposition aux moisissures chez l'humain est l'absorption pulmonaire (inhalation). Leurs effets se manifestent donc plus particulièrement sur le système respiratoire<sup>(27,28)</sup>. L'exposition aux moisissures ne s'accompagne pas nécessairement de symptômes; par contre, des expositions répétées augmenteraient les risques de manifestations cliniques<sup>(22)</sup>. Les effets sur la santé humaine peuvent être infectieux, immunologiques, toxiques ou irritatifs<sup>(20,22,29)</sup>.

Il est à noter que peu de moisissures retrouvées en environnement intérieur provoquent des infections chez l'humain. L'aspergillose est l'infection fongique la plus répandue. L'aspergillose

invasive est une infection qui atteint habituellement les personnes dont le système immunitaire est affaibli.

Les mycotoxines sont des substances de faible poids moléculaire (< 1 000 daltons) issues des moisissures. Elles se retrouvent aussi sur le mycélium et les spores. Difficilement dégradables, les mycotoxines persistent dans l'environnement. Elles peuvent être présentes même si les structures fongiques ne sont plus viables. Des COV peuvent aussi être produits par le métabolisme des moisissures. Plusieurs ont été identifiés. Ils appartiennent aux groupes des alcools, des aldéhydes et des cétones<sup>(20)</sup> et sont responsables de l'odeur caractéristique de moisi. Des allergènes tirent leur origine aussi des moisissures et de leurs spores. Ce sont des constituants de la paroi et du cytoplasme des cellules dont le poids moléculaire est élevé. Ce sont principalement des protéines, des polysaccharides et des lipopolysaccharides<sup>(30)</sup>. Théoriquement, toute moisissure contient des substances allergènes<sup>(31)</sup>. Les  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes sont des sucres complexes qui constituent la membrane cellulaire de la plupart de moisissures. Il est par contre important de noter que ces sucres se retrouvent également chez des centaines de plantes et de bactéries. Sur le plan des effets sur la santé, une association positive a été rapportée entre le  $\beta$ -(1,3)-D-glucane et des problèmes respiratoires chez des étudiants<sup>(32)</sup> et une variation du débit expiratoire maximal chez les jeunes asthmatiques<sup>(33)</sup>. Par contre, aucune association entre l'exposition au  $\beta$ -(1,3)-D-glucane à un jeune âge et le risque de développer de l'asthme n'a été démontrée<sup>(34)</sup>.

Les effets immunologiques peuvent être allergiques ou d'hypersensibilité. La rhinite allergique, la conjonctivite, la dermatite, l'asthme allergique, l'aspergillose broncho-pulmonaire, la sinusite allergique, la dermatite sont des effets allergiques observables à la suite d'une exposition aux moisissures ou à leurs composantes<sup>(20,22)</sup>. La gravité des effets est variable selon l'individu et l'agent auquel l'individu est exposé<sup>(23)</sup>. Quant aux effets d'hypersensibilité, ils sont surtout observés lors d'expositions chroniques à de fortes concentrations. Ils se rencontrent particulièrement en milieux agricoles et industriels causant des pneumonites d'hypersensibilité.

Il a été observé qu'une exposition importante aux poussières organiques contaminées par des moisissures peut provoquer le syndrome toxique des poussières organiques (*Organic Dust Toxic Syndrome* – ODTS)<sup>(35)</sup>. D'autres affections, telles que les mycotoxicoses, peuvent également apparaître à moyen ou à long terme à la suite d'expositions répétées. Les mycotoxicoses peuvent produire des effets tels que la fatigue générale, les maux de tête, ou les effets systémiques (troubles neurocomportementaux ou cognitifs, douleurs articulaires ou symptômes gastro-intestinaux<sup>(1,3,9,10,36-39)</sup>). Pour l'instant, peu de données existent sur les maladies chroniques causées par l'exposition aux moisissures ou à leurs composants. Cependant, l'aflatoxine, une mycotoxine produite par certaines espèces du genre *Aspergillus*, est maintenant reconnue comme un cancérigène dans certains cancers du foie attribuable à une ingestion d'aliments fortement contaminés ou à l'inhalation de fortes doses principalement dans les milieux agricoles<sup>(23)</sup>.

Finalement, la présence de moisissures peut également être associée à des irritations des yeux, du nez, de la gorge ou de la peau ainsi qu'à des symptômes s'apparentant à la grippe ou au rhume. Il s'agirait alors d'une irritation mécanique, produite par les structures fongiques (spores et fragments) ou chimiques, produites par les COV, les glucanes ou les mycotoxines<sup>(22)</sup>.

### 1.2.3 Limites d'exposition mycologique

Bien qu'il n'existe ni norme ni règlement québécois recommandant des niveaux limites d'exposition aux moisissures, certaines organisations ou certains chercheurs ont tout de même proposé des lignes directrices ou des concentrations d'exposition au-delà desquelles un risque est présent. Eduard a rapporté, dès 2006, une dose minimale d'exposition de  $10^5$  spores/m<sup>3</sup> d'air entraînant un effet observable sur la santé (*Lowest Observed Effect Levels – LOEL*)<sup>(28,40,41)</sup>. Ce niveau a aussi été reconnu par le Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals qui a proposé, dans une optique préventive, un niveau d'exposition maximale de  $10^4$  spores/m<sup>3</sup> d'air. Au cours des dernières années, la Suva, qui est l'organisme paritaire chargé de l'indemnisation et de la prévention des lésions professionnelles en Suisse, utilise une limite maximale d'exposition pour les travailleurs de 1 000 UFC/m<sup>3</sup> d'air<sup>(42)</sup>. Il faut souligner que ces deux dernières recommandations sont identiques. La Suva exprime sa limite en colonies cultivables alors que le Nordic Expert Group l'exprime en spores totales. Un facteur de 10 % est effectivement utilisé de façon courante pour faire la conversion entre les fractions de la flore cultivable et celles de la flore totale.

En ce qui a trait aux poussières déposées, peu de recommandations sur les contaminations acceptables de moisissures sont proposées. Selon la norme 1992-01 de l'organisme américain, le National Air Duct Cleaners Association (NADCA), les moisissures totales cultivables dans les poussières de surface devraient être inférieures à 15 000 UFC/g de poussières<sup>(43-45)</sup>. Le niveau seuil proposé par le CIBSE (Chartered Institution of Building Services Engineers) de l'Angleterre pour des échantillons de surface est de 200 UFC/100 cm<sup>2</sup><sup>(46)</sup>. Alors que dans les laboratoires, un seuil de 100 UFC/100 cm<sup>2</sup> est couramment utilisé.

## 1.3 Les systèmes de chauffage, de ventilation et de climatisation de l'air (CVCA)

Le rôle d'une installation de climatisation est d'assurer l'ensemble des traitements de l'air soit le chauffage, le refroidissement, l'humidification et la déshumidification. Il permet de maintenir la température et le taux d'humidité de l'air aux valeurs désirées dans un bâtiment. Les CVCA peuvent être constitués de plusieurs composantes. Ils comprennent, en général, une partie ou la totalité des éléments suivants :

- prise d'alimentation qui permet l'apport en air frais;
- boîte de mélange pour mélanger l'air neuf et l'air en recirculation;
- filtre pour débarrasser l'air des particules ;
- serpentin qui sert à réchauffer ou à refroidir l'air en circulation;
- humidificateur afin d'assurer le taux d'humidité désiré;
- ventilateur essentiel à la circulation de l'air dans l'ensemble du système;
- silencieux nécessaire à la réduction du bruit;
- conduit d'alimentation et de retour pour le déplacement de l'air entre les composantes;
- boîte de modulation thermique;
- boîte de modulation de débit d'air;
- diffuseur d'air pour la distribution dans la pièce;

- prise de retour vers l'extérieur ou vers la boîte de mélange;
- sortie d'air extérieur.

### 1.3.1 Critères de nettoyage des CVCA

De par leur fonction première qui est de distribuer l'air dans les bâtiments, les CVCA peuvent disperser des particules comme les moisissures dans l'environnement intérieur.

Au Québec, l'article 104 du Règlement sur la santé et la sécurité au travail (chapitre S-2.1, r.19.01) stipule que « Tout système de ventilation mécanique doit être inspecté et réglé au moins une fois par année, et les filtres entretenus ou remplacés au besoin »<sup>(47)</sup>. Malgré ce règlement, il n'y a ni règle, ni consensus, ni méthode d'évaluation standardisée et uniformisée permettant de déterminer les besoins de nettoyage ou l'évaluation de ceux-ci. Le *Guide de qualité de l'air intérieur dans les établissements du réseau de la santé et des services sociaux* du Québec suggère que chaque organisme se donne ses propres fréquences de nettoyage selon ses spécificités particulières. Ces fréquences peuvent alors varier selon le type de CVCA, de la localisation des bâtiments et des activités qui s'y déroulent<sup>(48)</sup>.

Le niveau d'empoussièrement des systèmes CVCA peut être évalué de deux façons : soit par une approche subjective selon laquelle la propreté est estimée au moyen d'une caméra vidéo ou d'un endoscope, soit par une approche plus objective réalisée au moyen de tests gravimétriques effectués sur des prélèvements surfaciques de la poussière déposée. Quelques organismes ont d'ailleurs proposé des critères d'évaluation de la propreté. Par contre, la variation entre les méthodes de prélèvement et les seuils proposés rendent leur application difficile<sup>(5,15,49,50)</sup>.

À la suite des projets portant sur l'évaluation de méthodes de prélèvement et l'établissement de critères de déclenchement du nettoyage des CVCA, les chercheurs de l'IRSST ont recommandé la méthode de prélèvement de l'Association pour la prévention et l'étude de la contamination (ASPEC), en France, comme étant l'approche objective à préconiser pour procéder à l'évaluation de la propreté des systèmes CVCA. De plus, un nouveau critère de déclenchement du nettoyage correspondant à 23 mg/100 cm<sup>2</sup> a été proposé à la suite de l'étude réalisée sur le terrain par Lavoie et ses collaborateurs.

En Amérique du Nord, le déclenchement du nettoyage des systèmes de ventilation est basé uniquement sur la quantité de poussières déposées et ne tient pas compte que celles-ci peuvent contenir des microbes, plus particulièrement des moisissures, et être une source de contamination de l'environnement intérieur. Une évaluation gravimétrique, sans égard à la charge mycologique, ne devrait pas être le seul facteur de déclenchement de nettoyage tel qu'il est actuellement proposé. Logiquement, l'évaluation de la biomasse mycologique devrait aussi être considérée.

## 1.4 Indicateurs mycologiques

Il existe plusieurs approches analytiques permettant l'évaluation de la charge mycologique d'un milieu à partir d'indicateurs ou de l'organisme lui-même<sup>(23,51-54)</sup>. Certaines méthodes d'évaluation de la biomasse mycologique permettent la documentation de la particule mycologique (spore, conidie, hyphe) alors que d'autres permettent de documenter un sous-

produit (enzymes, mycotoxines) ou une composante structurale (B-1-3-D-glucan, ergostérol) <sup>(55-57)</sup>.

Lors de cette recherche, six méthodes analytiques ont initialement été ciblées pour l'évaluation du contenu mycologique. Celles-ci permettent la détection de différents indicateurs mycologiques et elles ont déjà été utilisées pour évaluer la présence de moisissures dans différents milieux <sup>(57-61)</sup>. Bien qu'elles puissent permettre de documenter la charge mycologique de la poussière déposée dans les systèmes de ventilation, elles montrent des limites qui sont soit reliées à la méthode d'évaluation ou à ses caractéristiques intrinsèques. Les six méthodes retenues sont les suivantes : la croissance sur milieu gélosé, la flore totale par microscopie, la détection de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par *polymerase chain reaction* (PCR), le dosage enzymatique par l'approche du mycomètre, le dosage du  $\beta$ -(1,3)-D-glucane et le dosage de l'ergostérol.

### 1.4.1 Flore cultivable

L'analyse des moisissures par culture sur milieux gélosés est la méthode classique utilisée en microbiologie <sup>(51)</sup>. Elle permet d'obtenir sur une gélose des colonies à partir de cellules fongiques aptes à se multiplier dans des conditions idéales en laboratoire. Il est reconnu que cette méthode sous-estime la flore mycologique totale réellement présente. En effet, elle se limite à la détection des organismes ayant la capacité de se multiplier sur les géloses dans les conditions offertes <sup>(52)</sup>. Selon certains auteurs, la fraction cultivable peut varier de 0,1 à 10 % <sup>(62-65,41)</sup>. La principale limite de l'évaluation de la flore cultivable, qui lui attire les critiques lors de son utilisation, est qu'elle ne permet pas d'analyser toute la flore mycologique reconnue comme pouvant produire des effets sur la santé <sup>(65)</sup>.

### 1.4.2 Flore totale – microscopie

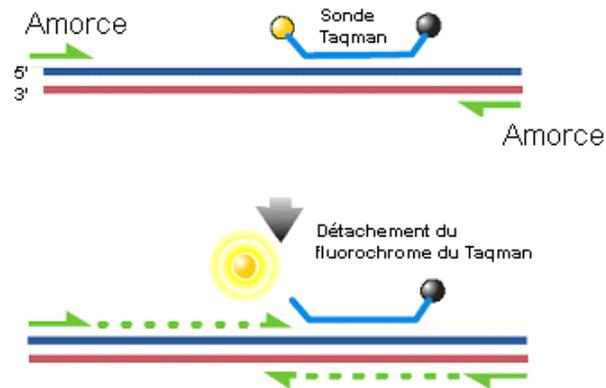
L'analyse des spores de moisissures par observation microscopique est largement utilisée <sup>(66-69)</sup>. Elle ne nécessite aucune incubation des cellules mycologiques et, par le fait même, ne présente pas de sous-évaluation attribuable à la capacité de croissance de la cellule fongique sur le milieu gélosé fourni <sup>(68,69)</sup>. Les échantillons sont préparés de façon à pouvoir être observés au microscope. Une fixation sur membrane est effectuée. L'approche, utilisant à la base la microscopie à fluorescence, a initialement été développée pour l'analyse de la population bactérienne dans les eaux naturelles. Plusieurs adaptations de la procédure initiale ont été rapportées <sup>(67,70,66,71)</sup>. Elle permet de dénombrer des cellules qui ont été marquées à l'aide d'un fluorochrome intercalé à l'intérieur des doubles brins d'ADN. Grâce à ce fluorochrome, les cellules marquées deviennent plus visibles. L'utilisation du microscope à fluorescence augmente la capacité de discrimination entre les cellules microbiennes et les particules d'autres origines. Un compte total des cellules mycologiques est obtenu. Le marquage fluorescent par intercalant d'ADN cellulaire est courant, mais n'est pas la seule approche d'aide à la visualisation possible <sup>(67,71,72,65)</sup>. Une technique de transpiration de la membrane de filtration peut également être utilisée pour faciliter la détection des spores et d'autres cellules mycologiques lors de l'analyse de l'échantillon <sup>(73-75)</sup>. Cette méthode est toutefois critiquée en raison de son haut degré de subjectivité analytique <sup>(64)</sup>.

### 1.4.3 ADN mycologique

La méthode d'amplification de l'ADN par la PCR permet l'analyse de l'ADN mycologique présent dans l'échantillon. C'est une technique de biologie moléculaire qui duplique une séquence d'ADN à partir d'une faible quantité initiale d'acides nucléiques (amplicons). La fluorescence émise est alors proportionnelle au nombre de copies polymérisées obtenues à la suite des cycles d'amplification. Les marqueurs moléculaires (amorces et sonde), à la base de cette méthode, sont choisis de façon à ce qu'ils amplifient les espèces voulues. Cette méthode d'analyse nécessite dans un premier temps, l'extraction efficace de l'ADN présent à l'intérieur des cellules ciblées. L'extraction de l'ADN mycologique présente certains défis comparativement à l'extraction de l'ADN bactérien. Effectivement, la paroi cellulaire des spores de moisissures est plus résistante que celles des bactéries; leur lyse, qui constitue une étape nécessaire à la libération de l'ADN cellulaire, peut parfois être ardue. Dans un second temps, l'amplification de l'ADN par la polymérase (enzyme responsable de la PCR) demande que les séquences complémentaires au brin d'ADN cible s'apparient afin d'être utilisées comme « ancrage » pour l'amorce du travail de l'enzyme. Ces séquences (amorces) doivent avoir démontré leur spécificité aux moisissures, puisque pour ce projet, l'ADN de la flore bactérienne ne doit pas être amplifié. Elles doivent également permettre l'amplification de tout l'ADN mycologique présent dans les échantillons. Le choix des amorces constitue donc une étape déterminante dans l'implantation d'une méthode de la q-PCR. Plusieurs amorces dites universelles pour l'amplification de l'ADN de la flore mycologique sont recensées dans la littérature<sup>(76,77)</sup>.

Les moisissures présentes dans la poussière des conduits de ventilation peuvent provenir de plusieurs phylum : *Basidiomycota*, *Ascomycota* et *Zygomycota*. Des marqueurs moléculaires ciblant la détection des fungi sont utilisés intensivement<sup>(78,77,79,80,76)</sup>. La très grande majorité des amorces utilisées ciblent les régions géniques de l'*internal transcribed spacer* (ITS), de l'unité ribosomique 18S inainsi que l'unité 5S. En 2009, Khot étudiait une région de l'unité 28S moins exploitée et a proposé d'autres amorces potentielles<sup>(81)</sup>. En plus des amorces, des sondes moléculaires peuvent être utilisées afin d'augmenter la spécificité des systèmes de détections.

Finalement, l'approche utilisée dans ce projet est celle du q-PCR, une technique à laquelle un fluorochrome est incorporé afin de permettre la détection et le suivi en temps réel de l'amplification de l'ADN à chaque cycle. Cette approche peut être réalisée soit avec une sonde de type TaqMan (Figure 1) comme dans ce projet<sup>(82)</sup> ou avec un marquage non spécifique utilisant des composés fluorescents possédant une haute affinité pour les doubles brins d'ADN<sup>(83)</sup>.



**Figure 1 : Principe de l'émission de fluorescence par la sonde de type TaqMan lorsque l'enzyme polymérase effectue l'amplification de l'ADN.**

#### 1.4.4 Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA)

La  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA) est une enzyme répandue dans le monde des vivants <sup>(69)</sup>. Elle serait présente dans toutes les moisissures contenant de la chitine <sup>(56)</sup>. Une corrélation positive entre l'activité enzymatique de la NAHA et deux indicateurs du contenu fongique, soit l'ergostérol et l'acide gras phospholipidique 18:2 $\omega$ 6 a été démontrée pour des échantillons de sol (Miller *et al.* 1998). Dans la même étude, aucune corrélation n'avait pu être établie entre cette enzyme et des indicateurs du contenu bactérien, conduisant ainsi les auteurs à proposer la NAHA comme un bon indicateur de la flore mycologique active. Un appareil, le Mycometer®<sup>1</sup>, a d'ailleurs été développé conséquemment à cette étude et en considérant que cette enzyme permettait d'évaluer la biomasse fongique d'un échantillon <sup>(85)</sup>. Une étude de Reeslev (2003) utilisant le Mycometer® a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre l'ergostérol et la NAHA cette fois sur des échantillons de gypse.

Le dosage de l'activité enzymatique de la NAHA est basé sur la capacité qu'a l'enzyme à hydrolyser un substrat marqué par un fluorochrome. Le clivage du substrat libère le fluorochrome qui peut alors être détecté et quantifié par le spectromètre. La fluorescence émise lors de cette réaction enzymatique est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme active présente dans l'échantillon et, par le fait même, selon les auteurs, au nombre de spores (Figure 2).

<sup>1</sup> <http://www.cetec.com.au/services/mycometer.html>

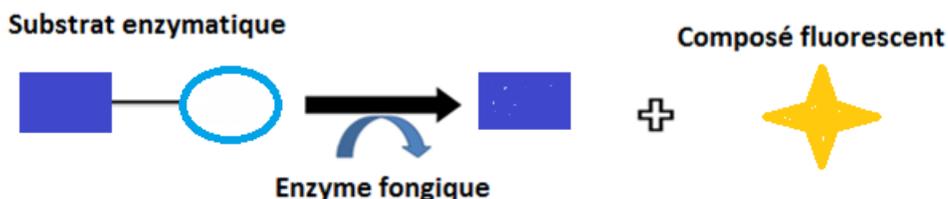


Figure 2 : Principe du dosage de la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase.

### 1.4.5 $\beta$ -(1,3)-D-glucane

Le  $\beta$ -(1,3)-D-glucane est un polymère de glucose qui compose une partie de la membrane cellulaire des moisissures. Il est aussi retrouvé comme composant de l'enveloppe membranaire externe des plantes, des bactéries et des champignons macroscopiques<sup>(86)</sup>. Bien qu'il ne soit pas exclusif aux mycètes, il est analysé fréquemment pour évaluer la qualité de l'air<sup>(57,87,88)</sup>. Il peut aussi être utilisé comme indicateur d'exposition totale aux moisissures<sup>(61)</sup>. L'analyse du  $\beta$ -(1,3)-D-glucane est simple et s'apparente à l'analyse des endotoxines réalisée communément par le test du lysat d'amœbocyte du limule. Des troussees commerciales sont produites par la compagnie Associates of Cape Cod Inc. Lors de l'analyse du D-glucan, la réaction enzymatique utilise la voie métabolique du facteur G contrairement aux endotoxines qui utilisent les facteurs B et C<sup>(86)</sup>. La faible limite de détection pouvant être atteinte pour cet indicateur est rapportée comme étant un avantage important<sup>(89)</sup>.

### 1.4.6 Ergostérol

L'ergostérol est un stérol membranaire retrouvé dans toutes les moisissures<sup>(58,90)</sup>. Le dosage de l'ergostérol permet d'obtenir une évaluation de la biomasse mycologique totale puisqu'il lui est spécifique<sup>(58,60)</sup>. L'utilisation de l'ergostérol à titre d'indicateur de la biomasse fongique s'est répandue depuis nombre d'années dans l'industrie alimentaire<sup>(51)</sup>. Son utilisation à titre de marqueur de la contamination fongique dans l'environnement intérieur est aussi généralisée<sup>(23,64)</sup>. Il est analysé généralement par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse<sup>(51)</sup>. La spectrométrie de masse est nécessaire lorsque la matrice analysée contient plusieurs contaminants comme dans le cas des échantillons de poussières<sup>(55)</sup>. L'utilisation de l'ergostérol comme indicateur de contamination fongique est limitée au domaine de la recherche en raison des équipements et de l'expertise spécialisés nécessaires à son dosage<sup>(64,85)</sup>. Le développement de cette technique n'a malheureusement pas été entrepris comme prévu lors de ce projet, par manque de disponibilité de l'équipement et de personnel qualifié.

## 1.5 Méthodes de prélèvement

Plusieurs méthodes de prélèvement des surfaces peuvent être utilisées selon les objectifs et les analyses subséquentes qui doivent être effectuées<sup>(91,92)</sup>. Les techniques par aspiration, frottis et membrane adhésive sont rapportées fréquemment. La méthode par membrane adhésive ne peut toutefois être utilisée lorsque la quantité de poussières est importante. En effet, elle ne parvient

pas à prélever de façon efficace toute la poussière en raison de la perte d'adhésivité <sup>(91)</sup>. Traditionnellement, les techniques par frottis de surface ont été largement utilisées pour effectuer l'évaluation de l'exposition dermique ainsi que pour la détermination des contaminations de surface en hygiène environnementale et du travail <sup>(93)</sup>. Le prélèvement par frottis a été adopté par plusieurs comme étant le standard <sup>(92)</sup>. L'approche par aspiration étant recommandée seulement lorsque les frottis de surface ne sont pas ou peu praticables <sup>(92)</sup>. Par ailleurs, d'autres chercheurs rapportent que les exigences minimales requises en hygiène industrielle pour le prélèvement des poussières déposées ne sont pas atteintes par l'approche de frottis; ils préconisent plutôt l'aspiration <sup>(94)</sup>. Plusieurs variantes tant par frottis que par aspiration sont rapportées <sup>(91,92,94,95)</sup>. Des méthodes de prélèvement spécifiquement adaptées à l'échantillonnage des poussières déposées dans les systèmes de ventilation sont aussi rapportées <sup>(62,15,91)</sup>. La méthode de prélèvement doit non seulement permettre un échantillonnage représentatif de la surface, elle doit également être adaptée aux techniques d'analyse utilisées une fois le contaminant prélevé.

## 1.6 Objectifs

Afin d'aider les gestionnaires des édifices publics et professionnels à porter un jugement éclairé sur l'état de salubrité des systèmes CVCA de leur édifice et, par conséquent, de prévenir l'exposition des occupants aux moisissures, ce projet a pour objectif principal de proposer une méthode d'évaluation améliorée et non subjective. Plus précisément, ce projet a comme objectifs spécifiques de :

- comparer deux méthodes de prélèvement des poussières déposées dans les conduits des systèmes CVCA en évaluant leurs performances et limites;
- mettre au point, valider et comparer des méthodes d'évaluation de la biomasse mycologique présente dans les poussières.

## **2. MÉTHODOLOGIE**

### **2.1 Poussières**

Les poussières utilisées pour réaliser la validation des méthodes analytiques dans la matrice réelle ainsi que pour tous les essais effectués dans l'enceinte de génération ont été récoltées à partir de balayeuses domestiques et industrielles. Les poussières ont été broyées avant d'être séparées à l'aide d'une tamiseuse mécanique Ro-tap® (W.S. Tyler Canada, St. Catharines, Ontario, Canada) munie de huit tamis en cascade dont le diamètre des mailles varie entre 1000 µm et 38 µm. Pour les essais dans l'enceinte d'exposition, seules les particules inférieures à 38 µm ont été utilisées en raison des limites reliées à la génération. Les poussières ont été stérilisées à l'autoclave puis asséchées avant d'être entreposées à la température pièce jusqu'à leur utilisation.

### **2.2 Essais dans l'enceinte d'exposition**

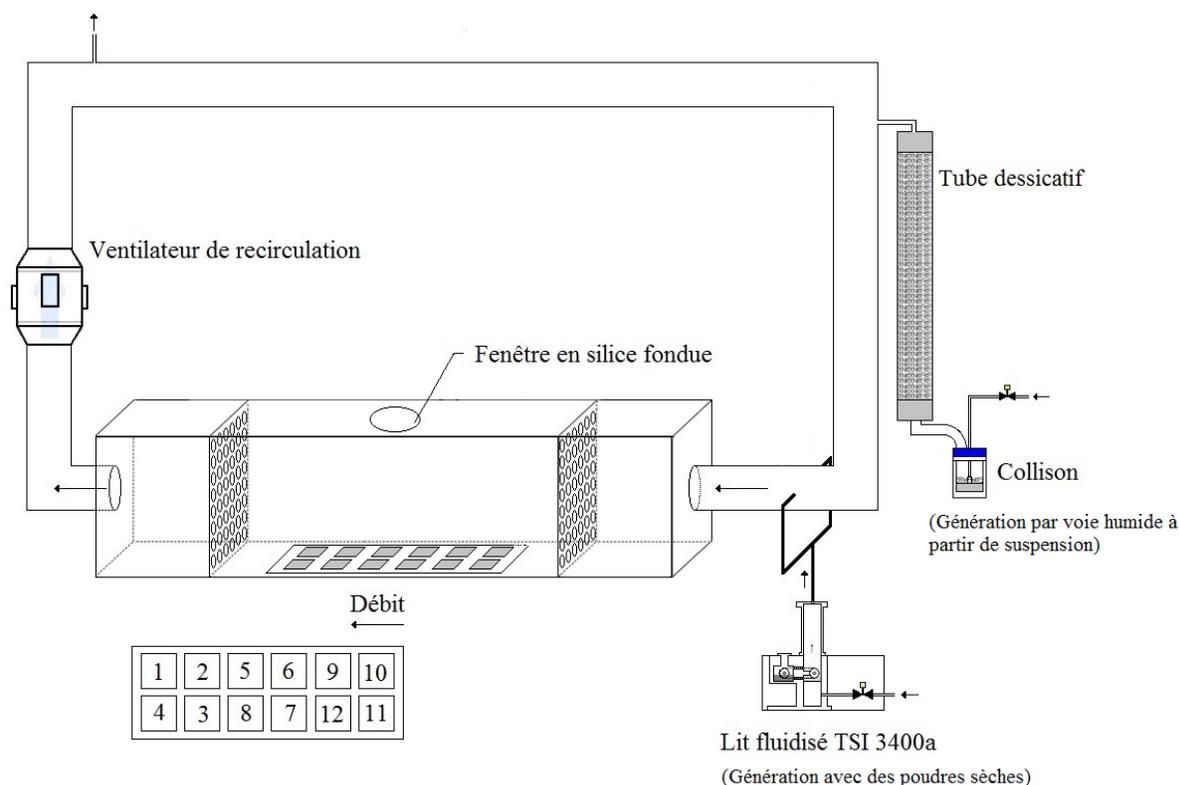
#### **2.2.1 Génération**

Les générations de poussières et de spores de moisissures ont été réalisées dans une enceinte reproduisant, en miniature, un conduit de ventilation (Figure 3). Douze plaques lisses en acier de 10 cm x 10 cm étaient placées sur la surface inférieure de l'enceinte.

En fonction des essais, des poussières étaient générées seules ou en concomitance avec des spores de moisissures. Les générations de poussières ont été réalisées par aérosolisation à partir d'un lit fluidisé modèle 3400A (TSI® Inc., Shoreview, MN, É.-U.), alors que celles des spores de moisissures l'ont été par nébulisation d'une mise en suspension avec un Collison à 6 jets (BGI, Butler, NJ, É.-U.).

L'air était recirculé dans l'enceinte en boucle fermée afin d'y créer une accumulation de particules et, par le fait même, des dépôts sur la surface inférieure du conduit. L'enceinte était maintenue à une pression légèrement négative par rapport à la pression ambiante de façon à éviter les fuites de particules et la contamination de l'environnement extérieur. La pression intérieure était indiquée par un manomètre à différentiel de pression Magnehelic modèle 3200-20 mm ayant une précision de 2 % (Dwyer® Instruments international, Michigan city, IN, É.-U.). L'ajustement de la pression interne était effectué par l'élimination plus ou moins importante d'un volume d'air. Cet ajustement était réalisé à l'aide d'une valve placée sur un conduit d'évacuation de l'air de l'enceinte. La vitesse de l'air dans l'enceinte était mesurée à plusieurs endroits à l'aide d'un anémomètre thermique VelociCalc Plus 8384 (TSI Inc., Shoreview, MN, É.-U.).

Afin de connaître les concentrations de poussières dans l'air de l'enceinte, un analyseur de particules DustTrak 8533 (TSI Inc., Shoreview, MN, É.-U.) y était relié en permanence. Cela permettait aussi de vérifier le bon fonctionnement des générateurs.



**Figure 3 : Schéma de l'enceinte d'exposition et de la disposition des plaques d'acier (tiré de Skulinova *et al.* 2016).**

### 2.3 Méthodes de prélèvement

Pour l'optimisation de la méthode de prélèvement, plusieurs essais de générations en enceinte ont été réalisés. Afin de reproduire les divers niveaux de poussières présents dans les systèmes de ventilation, les quantités déposées variaient d'un essai à l'autre. Ces variations étaient contrôlées soit en changeant les durées de génération ou en modifiant les concentrations de particules dans l'enceinte. Les plaques d'acier propres étaient pré-pesées avant chaque essai sur une balance électronique Ohaus modèle AP250P (OHAUS, Butler, NJ, É.-U.) précise à 0,01 mg. Elles étaient repesées après leur empoussièremement dans l'enceinte d'exposition de façon à pouvoir connaître la quantité de poussières réellement déposées sur sa surface.

Au cours de ce projet, deux méthodes de prélèvement ont été évaluées : une par essuyage ou frottis et une autre par aspiration. Pour chacune des plaques, le prélèvement s'effectuait par passage en lignes parallèles, puis de façon perpendiculaire, et ce, sur toute la surface de 10 cm x 10 cm. L'essuyage ou l'aspiration se poursuivait tant que des poussières étaient visibles sur la plaque d'acier.

### 2.3.1 Prélèvement par aspiration

La méthode de prélèvement par aspiration évaluée dans ce projet est une adaptation de celle de l'ASPEC<sup>(49)</sup> qui a été décrite et évaluée par Lavoie et collaborateurs<sup>(5,50)</sup>. Après cette évaluation, certaines limites avaient été soulevées par les chercheurs. Soulignons, entre autres, la perte de poussière par le bec collecteur de la cassette ainsi qu'un défaut d'adhérence du bec et de la surface prélevée en raison d'un manque d'uniformité de la coupe biseautée effectuée par l'utilisateur. À la Figure 4, il est possible d'apercevoir une cassette qui a été optimisée spécialement pour le présent projet par la compagnie Environmental Monitoring Systems Inc. (EMS), Charleston, SC, É.-U., afin d'effectuer le prélèvement des poussières dans les systèmes de ventilation. Cette cassette a été préparée comme prototype pour l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), avec comme objectif d'améliorer la qualité des prélèvements des poussières. Une membrane de chlorure de polyvinyle (CPV) ayant des pores de 5 µm, que l'on dépose sur un support de cellulose, est utilisée comme médium de filtration dans cette cassette. Un débit d'aspiration de 15 L/min a été utilisé avec la cassette EMS pour faire le prélèvement des poussières déposées. Les prélèvements ont été réalisés par des passages répétés sur la surface de 100cm<sup>2</sup>.

Lors d'essais préliminaires, les quantités de poussières prélevées par la cassette de type EMS ont été comparées aux résultats obtenus avec celle de l'ASPEC. Pour ce faire, 24 échantillons ont été prélevés dans l'enceinte de la chambre de génération lors de deux générations soit : 12 avec la cassette de l'ASPEC et 12 avec la cassette EMS.



**Figure 4 : Cassette de prélèvement des poussières avec bec collecteur biseauté intégré, préparée par EMS.**

Afin de réduire l'impact possible d'une génération de poussières non homogène, les échantillons ont été prélevés selon le schéma de la Figure 5, en variant de façon non systématique le côté de la chambre prélevée pour chaque paire d'échantillons.

Côté avant	ASPEC 1	EMS 2	EMS 3	ASPEC 4	ASPEC 5	EMS 6
Côté arrière	EMS 1	ASPEC 2	ASPEC 3	EMS 4	EMS 5	ASPEC 6

**Figure 5 : Schéma de prélèvement démontrant la variation des sites de prélèvement lors de la comparaison ASPEC et EMS.**

### 2.3.2 Prélèvement par essuyage (frottis)

Quelques systèmes permettant de faire des prélèvements par essuyage ont été testés, ceux-ci étaient soit des écouvillons ou des languettes fabriqués de différents matériaux. Le système de prélèvement par frottis pour lequel le plus d'essais ont été effectués était constitué d'une manchette de plastique SHW1340 Hand Wand (DSA Detection®, North Andover, MA, É.-U.) à l'intérieur de laquelle était introduite une lingette prépesée en polyester tricoté Anticon 100 ® stérile 100TM (Contec Inc., Spartanburg, SC, É.-U.). Après le prélèvement, la lingette était repesée afin de calculer la quantité de poussières extraite pour chaque échantillon.

## 2.4 Méthodes d'analyse

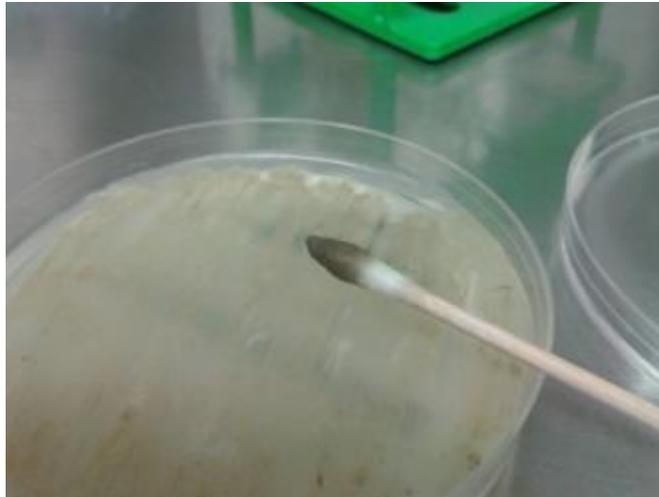
Les cinq méthodes d'analyse ont d'abord été adaptées aux besoins spécifiques de la matrice des poussières. Par la suite, leurs performances ont été évaluées sur des échantillons de poussières provenant de systèmes de ventilation. Lors de cette étape, des poussières stérilisées provenant des CVCA auxquelles ont été ajoutées des spores de moisissures étaient utilisées. Le comportement général des méthodes a ainsi pu être évalué.

Par la suite, pour les quatre méthodes ayant été jugées satisfaisantes, des validations supplémentaires comportant la détermination de la limite de détection, de la répétabilité et de la reproductibilité ont été faites avant d'effectuer la comparaison entre les méthodes analytiques sur des échantillons produits dans l'enceinte ou prélevés en situations réelles sur le terrain.

### 2.4.1 Souches fongiques - validation et comparaison analytique

Six souches de moisissures ont été utilisées lors de ce projet : *Cladosporium cladosporoides* (American type culture collection (ATCC) 16022), *Penicillium digitatum* (ATCC 10030), *Ulocladium chartarum* (ATCC18044), *Acremonium recifei* (ATCC24628), *Syncephalastrum racemosum* (souche terrain-surface contaminée) et *Absidia corymbifera* (essai de performance du programme Environmental Microbiology Proficiency Analytical Testing (EMPAT)). Elles ont été choisies en fonction des 3 critères suivants : 1) la taille de la colonie devait être limitée sur la gélose et les spores devaient être facilement différenciables au microscope; 2) les souches de moisissures devaient aussi présenter une forte sporulation permettant une récupération aisée et abondante des spores et 3) afin d'assurer la sécurité des manipulateurs, elles ne devaient pas produire de mycotoxines reconnues comme étant nocives pour la santé.

Le premier repiquage a été effectué à partir des souches congelées à -80 °C par dépôt de billes sur la gélose. Le milieu de culture utilisé était l'extrait de malt (MEA). Les géloses inoculées étaient ensuite incubées à 25 °C pour une période variant de 5 à 10 jours selon les besoins. Le prélèvement de spores a été fait sur le milieu de culture à l'aide d'un écouvillon, comme démontré à la Figure 6. Ces spores étaient ajoutées aux poussières lors de la validation préliminaire des méthodes. Par la suite, pour préparer les suspensions de spores nécessaires lors des générations dans l'enceinte d'exposition, elles étaient ajoutées à de l'eau stérile pour PCR (Fisher Scientific Company, Ottawa, Ontario, Canada).



**Figure 6. Photographie du prélèvement de spores à l'aide d'un écouvillon.**

#### **2.4.2 Extraction des poussières**

Dans le but de réduire la variabilité et de la limiter à la partie analytique, chaque échantillon a été extrait afin de produire une seule suspension, puis homogénéisé avant d'être séparé en quatre aliquotes, une pour chacune des techniques analytiques qui seront comparées. Lors de l'optimisation des méthodes de prélèvement des poussières, une perte significative a été observée au niveau des parois de la cassette. Afin de pallier cette déficience et d'obtenir des résultats les plus représentatifs possible, tous les prélèvements de surface effectués ont été récupérés directement dans la cassette. Pour ce faire, 3 mL d'eau stérile pour PCR était introduit dans la cassette par l'orifice d'aspiration à l'aide d'une pipette. Les cassettes entières étaient ensuite agitées pendant une période de cinq minutes au vortex Maxi (VWR, Radnor, É.-U.) à 2 500 rpm. Toutes les extractions ont été effectuées immédiatement après le prélèvement des échantillons. Les manipulations initiales pour les analyses par culture et pour celles du dosage de l'enzyme NAHA ont été réalisées le même jour. Les filtrations, la coloration et la préparation des lames de microscope pour la méthode par microscopie ont généralement été effectuées dans les 48 heures suivant le prélèvement. Les aliquotes utilisées pour les analyses par la q-PCR ont été mises en culot cellulaire après la mise en suspension de l'échantillon, puis congelées avant leur analyse.

### 2.4.3 Culture - flore cultivable

La méthode d'analyse par croissance de la flore cultivable est une modification de celle de l'IRSST (MA-343)<sup>2</sup>, utilisée de façon routinière dans son laboratoire de microbiologie (Marchand 2009). Elle a été adaptée pour les analyses dans la matrice de poussières. Cette méthode est la méthode de contrôle utilisée dans cette recherche.

À partir d'une des aliquotes prélevées directement de la suspension non diluée provenant de l'échantillon, deux dilutions 1/10 ont été effectuées en série. Par la suite, 100 µL de chacune de ces dilutions ont été étalés en triplicata sur des géloses à l'extrait de malt. Des étalements similaires ont été effectués avec la suspension non diluée. Toutes les géloses ont ensuite été placées dans un incubateur à 25 °C pour une période de 5 à 10 jours. La période d'incubation a été ajustée en fonction du nombre de colonies présentes sur la gélose, pour éviter leur confluence. Les colonies produites ont été comptées prioritairement sur les géloses ayant reçu l'échantillon non dilué. Dans le cas où les dénombrements étaient impossibles sur ces géloses, les décomptes étaient alors effectués sur les géloses dénombrables étalées en commençant par celles provenant de l'échantillon le moins dilué. Les trois géloses de la série ont été considérées pour le calcul des concentrations. La moyenne a été effectuée puis la concentration a été rapportée en UFC/100 cm<sup>2</sup>.

### 2.4.4 Microscopie - flore totale

Lors des premiers essais, différentes techniques de marquage favorisant la détection des spores ont été évaluées. Le marquage à l'aide de la molécule fluorescente DAPI fut le premier à être testé. La coloration obtenue pour l'ensemble des spores de moisissures n'étant pas satisfaisante, une approche dérivée des analyses d'amiante a été intégrée aux fins d'optimisation. Des échantillons étaient d'abord filtrés sur une membrane, qui était ensuite transparisée, avant d'être finalement montée entre lame et lamelle. Des membranes d'ester de cellulose mixte (ECM) (SKC Inc., Eighty Four, PA, É.-U.) ayant 25 mm de diamètre et une porosité de 0,8 µm ont été utilisées pour ce faire. Afin de diminuer les interférences produites par les particules de poussières sur les structures fongiques lors de l'examen au microscope, des dilutions 1/10 ont été effectuées pour tous les échantillons. Pour effectuer le dépôt sur membrane, 3 mL d'eau stérile étaient initialement vidés dans un cylindre de filtration. Par la suite, 100 µL de l'échantillon concentré ou de sa dilution 1/10 y étaient ajoutés. À cette suspension étaient ensuite ajoutés 100 µL d'une solution de safranine à 5 % (Becton Dickinson, Sparks Glencoe, MD, É.-U.). Finalement, un autre 3 mL d'eau stérile était ajouté afin de permettre une distribution homogène de l'échantillon sur la surface du filtre avant de procéder à la filtration sous vide. Une fois la filtration terminée, les filtres étaient asséchés à la température ambiante pendant une période de 24 heures. Une fois secs, les filtres étaient transparisés avec un vaporisateur *Vap-300* (BGI, Itham, MA, É.-U.) et de l'acétone chaude. Après la transparisation du filtre, le montage sur lame de ce dernier était effectué. Les échantillons étaient analysés au microscope Nikon Eclipse E400 (Nikon, Melville, É.-U.) à un grossissement de 750x. Les spores ont été préférentiellement comptées sur les préparations provenant des échantillons les plus concentrés. Les spores de moisissures ont été dénombrées en comptant un nombre optimal de 50 champs de

<sup>2</sup> <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/M-343.pdf>

façon aléatoire. Les concentrations ont ensuite été rapportées par nombre de spores/100 cm<sup>2</sup> de surface.

#### 2.4.5 Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA)

Le dosage de la NAHA a été réalisé à l'aide d'un protocole adapté à partir de celui proposé avec l'appareil Mycometre® (Mycometer, Tampa, FL, É.-U.). Ainsi, une aliquote liquide de l'échantillon a été analysée plutôt que d'examiner l'échantillon directement sur un écouvillon, comme proposé par le fabricant. La stratégie de comparaison des méthodes analytiques de ce projet exigeait qu'un seul échantillon soit utilisé pour toutes les analyses, cela imposait donc une extraction de l'échantillon.

La fluorescence de base du développeur a d'abord été mesurée à partir de 2 mL de celui-ci placés dans la cupule du spectromètre. Cette valeur, identifiée comme BV1, est nécessaire au calcul de l'activité enzymatique. Subséquemment, 100 µL du substrat fluorogénique ont été ajoutés au développeur et la fluorescence a été mesurée à nouveau. Il s'agit alors de la valeur BV2. Parallèlement à cela, 100 µL de l'échantillon sont ajoutés à 2 mL de substrat et incubés pendant une période de 30 minutes à la température ambiante. Ensuite, 100 µL de ce mélange sont ajoutés au mélange initial de développeur/substrat et une nouvelle mesure de la fluorescence est effectuée. Cette lecture correspond à la valeur AV. La fluorescence relative exprimée en unité relative de fluorescence (URF) s'obtient en calculant le *mycometer value* (MV) à partir de la formule fournie par le fabricant.

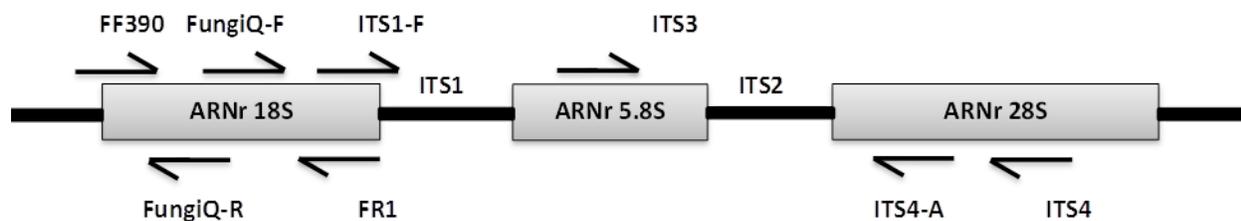
$$MV = AV - [BV2 + (BV2 - BV1) * 0,84] \quad (1)$$

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec le Mycometer® à ceux obtenus par les autres méthodes d'analyse, la valeur MV devait être convertie en nombre de spores/100 cm<sup>2</sup>. Cette conversion a été effectuée à l'aide de courbes standards réalisées avec des spores en suspension de *Penicillium digitatum* dont la concentration a été préalablement déterminée à l'hémacytomètre (Fisher Scientific Limited, Ottawa, Ontario, Canada).

#### 2.4.6 q-PCR universelle

L'ADN génomique des moisissures et des échantillons de poussières a été extrait à l'aide des trousseaux ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™ (Zymo Research, Irvine, CA, É.-U.). Les extraits d'ADN ont été congelés jusqu'à leur analyse. Le volume final de réaction pour les PCR a toujours été de 25 µL. Chaque réaction PCR contenait 2,5 unités de HotStarTaq® mix (Qiagen, Limburg, Pays-Bas); 1,25 µM des deux amorces (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, É.-U.); 0,375 µM de la sonde, lorsqu'inclus dans le système; 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, É.-U.); et 6,75 µL d'eau stérile. Pour l'ensemble des réactions, 2 µL d'extrait d'ADN ont été ajoutés comme amplicon de départ. Les amplifications ont été réalisées dans le Mastercycler Realplex2S (Eppendorf, Hamburg, Allemagne).

Tous les marqueurs moléculaires (amorces et sonde) testés ont été choisis dans les régions conservées du génome mycologique, notamment au niveau des sous-unités ribosomiques et de la région de l'ITS (*Internal Transcribed Spacer*). La Figure 7 présente un schéma de la région génomique ainsi que l'emplacement des marqueurs.



**Figure 7 : Schéma de régions des gènes codant pour les sous-unités de l'ARN ribosomique du génome des eucaryotes et position des marqueurs testés.**

Plusieurs systèmes de détection moléculaire ont été évalués. Certains étaient constitués uniquement de deux amorces ITS1/ITS2; ITS1/ITS4; ITS1-F/ITS4-A; ITS1-F/ITS2; ITS3/ITS4; ITS3/ITS4-A; FF390/FR1, alors que pour les systèmes FungiQuantF/FungiQuantR-FungiQuant-probe (Primerdesign Ltd, Southampton, Royaume-Uni) et ITS1/ITS4-ITS-probe, un marqueur sonde de type TaqMan a été ajouté. Les séquences de tous les marqueurs testés sont présentées au Tableau 1.

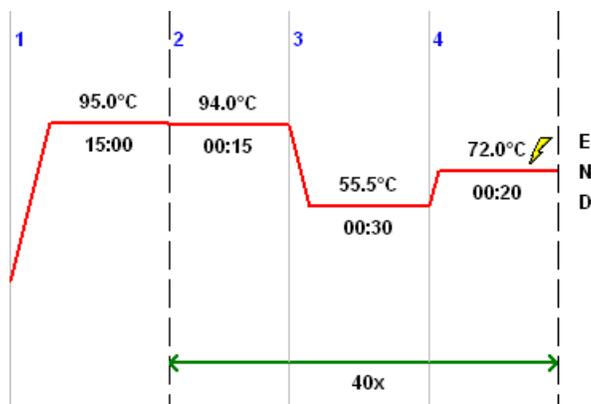
**Tableau 1 : Séquences des amorces et sondes testées**

Amorce	Séquence
<b>ITS1</b>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
<b>ITS1-F</b>	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA
<b>ITS2</b>	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
<b>ITS3</b>	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC
<b>ITS4</b>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
<b>ITS4-A</b>	CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG
<b>FF390</b>	CGA TAA CGA ACG AGA CCT
<b>FR1</b>	AIC CAT TCA ATC GGT AIT
<b>FungiQuant-F</b>	GGR AAA CTC ACC AGG TCC AG
<b>FungiQuant-R</b>	GSW CTA TCC CCA KCA CGA
<b>FungiQuant-probe</b>	TGG TGC ATG GCC GTT
<b>ITS-probe</b>	TCT TGG GAT TGG GTT GGG TTA TTT TAA CTC CT

Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, É.-U.

Les programmes d'amplification ont été adaptés pour chaque système évalué. La première étape d'évaluation de tous les systèmes a consisté à faire une étude par gradients de température. Lors de cette étude, quatre souches cibles (spécificité) ainsi que quatre souches non-cibles (sélectivité) ont été utilisées pour déterminer les températures optimales de discrimination et de détection des systèmes. Certains systèmes ont été rejetés dès cette étape préliminaire par manque de spécificité. Une fois les températures optimales identifiées, le programme d'amplification pour chaque système a été déterminé et utilisé pour effectuer les tests de spécificité et de sélectivité. Pour ce faire, un premier essai avec 54 souches de moisissures provenant de trois embranchements, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Zygomycètes, a été réalisé. Après l'obtention de résultats de détection spécifiques concluants, un essai de sélectivité était réalisé

avec 40 souches de bactéries afin de s'assurer qu'aucune ne pouvait être amplifiée par le système. Seuls les systèmes ayant démontré de bonnes spécificités et sélectivité ont été retenus pour les essais subséquents de validation quantitative. Un seul système a répondu aux exigences fixées pour la détection mycologique ainsi que pour les performances analytiques lors de la validation. C'est le système FungiQuantF/FungiQuantR-FungiQuant-probe qui a été conservé pour l'ensemble des essais sur les échantillons. Le programme d'amplification (Figure 8) pour ce système commence par une dénaturation de 15 min à 95 °C, suivi par 40 cycles définis comme suit : 15 secondes à 94 °C; 30 secondes à 55,5 °C puis 15 secondes à 72 °C.



**Figure 8 : Programme d'amplification pour la PCR universelle FungiQuant de la biomasse mycologique.**

La quantification des spores a été effectuée à partir d'une courbe standard préparée par la dilution d'une suspension de spores de *Penicillium digitatum* dont la concentration a été préalablement déterminée au microscope avec un hémacytomètre. La suspension de spores a ensuite été extraite. Lors de chaque essai, l'extrait d'ADN standard de *Penicillium digitatum* a été dilué pour produire 6 concentrations différentes allant de  $10^6$  à  $10^1$  spores/mL. La courbe standard était rapportée en spores par cycle PCR. Cette courbe standard permet de déterminer les concentrations en nombre de spores et de les comparer aux résultats obtenus par les autres méthodes.

#### **2.4.7 $\beta$ -(1,3)-D-glucane**

L'analyse du  $\beta$ -(1,3)-D-glucane a été effectuée dans des microplaques de 96 puits. Dans un premier temps, un volume de 25  $\mu$ L d'échantillon était incorporé dans chaque puits et 100  $\mu$ L de substrat étaient par la suite ajoutés. Puisqu'il s'agit d'une analyse utilisant une approche cinétique, le temps d'incorporation du substrat est une étape critique qui doit se faire rapidement afin de réduire les variations reliées au temps de chargement. La quantification se fait à l'aide d'une courbe standard produite à partir de glucane standard fourni dans la trousse. Le temps nécessaire à l'obtention d'une différence de densité optique de 0,1 est utilisé comme temps de réaction pour le dosage. Le temps de réaction est proportionnel aux concentrations déposées dans le puits. Les courbes standards ont été construites à partir de 5 points dont les concentrations ont varié entre 0,5 et 500 pg/mL.

La méthode du  $\beta$ -(1,3)-D-glucane n'a pas été validée pour la matrice des poussières. Les interférences produites par la présence de particules de poussières, malgré les essais de traitement au NaOH et de centrifugation, n'ont pu être contrôlées. Ces interférences ne permettaient pas de produire des courbes standards suffisamment similaires d'un essai à l'autre et rendaient le dosage imprécis. En plus des problèmes de répétabilité, les coûts importants reliés à cette analyse ont justifié son abandon pour la suite des essais réalisés dans l'enceinte de génération ainsi que sur le terrain.

## **2.5 Validation des méthodes analytiques**

Les quatre méthodes restantes ont été validées en suivant la même approche. Dans un premier temps, en déterminant la limite de détection et ensuite la répliquabilité et la répétabilité. Pour la q-PCR universelle, une validation de la spécificité et de la sélectivité de la méthode a été ajoutée et effectuée comme décrite précédemment.

### **2.5.1 Limite de détection**

La limite de détection (LD) correspond à la plus petite quantité décelable avec fiabilité par une méthode. La LD est déterminée par l'analyse de dix suspensions préparées à une concentration se situant près de la limite de détection estimée. Celle-ci est évaluée à partir de la préparation et de l'analyse de suspensions par dilutions sériées jusqu'à l'asymptote inférieure. Des suspensions différentes ont été préparées pour toutes les méthodes puisque chacune d'elle possède sa propre limite estimée. Après les analyses des suspensions, la limite de détection est calculée à partir de l'écart-type obtenu des dix résultats. La LD rapportée correspond à trois fois l'écart-type calculé.

### **2.5.2 Répliquabilité et répétabilité**

La répliquabilité d'une méthode est sa possibilité à être reproduite parfaitement dans des conditions d'analyses identiques. Elle a été déterminée par l'analyse répétée de suspensions préparées à quatre concentrations différentes. Chaque suspension a ensuite été analysée à six reprises. La répétabilité se calcule de la même façon, mais elle nécessite qu'au moins un paramètre de l'analyse soit différent. Dans cette étude, l'analyste et le jour ont été les paramètres qui ont varié. Le coefficient de variation obtenu pour chaque concentration permet de calculer le pourcentage de répétabilité de la méthode. Il s'agit de l'intervalle de confiance à 95 % calculé à partir de la moyenne des coefficients de variation de chacune des concentrations. La variabilité est exprimée en pourcentage à partir des coefficients de variation.

## **2.6 Comparaison entre les méthodes**

La comparaison des résultats de la biomasse fongique obtenus par les différentes méthodes a été effectuée en deux phases. Tout d'abord, pour la série d'essais, les échantillons ont été produits en situations contrôlées dans l'enceinte d'exposition du laboratoire puis, lors de la seconde phase, les échantillons ont été prélevés dans de véritables systèmes de ventilation.

### **2.6.1 Essais en situation contrôlée**

Des échantillons imitant ce qui pourrait être retrouvé en conditions réelles ont été générés en laboratoire comme décrit précédemment. Pour ce faire, l'aérosolisation de poussières a été effectuée en parallèle avec la nébulisation de suspension de spores provenant d'une ou de plusieurs souches de moisissures. Au total, pour ces essais en situations contrôlées, dix générations distinctes ont été réalisées. Les niveaux de poussières et de spores de moisissures variaient afin de produire des proportions différentes selon les générations. La méthode de prélèvement par aspiration a été utilisée pour tous les échantillons. Au total, 60 échantillons ont été prélevés et analysés selon les quatre méthodes d'analyse.

### **2.6.2 Essais en situation réelle**

En situation réelle, les prélèvements ont été effectués dans différents systèmes de ventilation provenant de types d'établissements diversifiés. Des prélèvements ont été effectués dans les systèmes d'une usine de filtration d'eau, d'un hôpital, de deux centres locaux de services communautaires (CLSC), dans un centre d'hébergement pour personnes âgées, dans une école secondaire, dans une université et dans une tour de bureaux. Deux cents prélèvements ont été réalisés dans les alimentations en air et cent dans les retours d'air. Le but de ces prélèvements n'était pas d'évaluer la salubrité des systèmes, mais bien d'obtenir une diversité d'échantillons reproduisant une multitude de situations possibles.

### **2.6.3 Évaluation des coûts et délais**

L'évaluation des délais nécessaires entre le prélèvement et le résultat final, et du temps technique nécessaire pour chaque analyse, ainsi que la détermination des coûts d'analyse ont été réalisés pour les 4 méthodes.

## **2.7 Analyse statistique**

La distribution des données a été vérifiée à l'aide des graphiques percentiles. Des tests de  $t$  appariés ont été effectués pour comparer les masses de poussières récoltées à l'aide de la méthode ASPEC à celles obtenues par la méthode d'aspiration avec la cassette EMS. En raison de leur distribution, les données ont été transformées de façon logarithmique. Les analyses de variance, de corrélation et de régression ont été réalisées avec les données transformées. Le test de comparaison multiple de Dunnett a servi pour établir les niveaux de signification entre les concentrations rapportées par la méthode de culture (contrôle) et celles obtenues par les autres. Le niveau d'association linéaire a été déterminé par les coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ). Toutes les valeurs rapportées comme étant inférieures à la limite de détection ont été remplacées par la  $LD/\sqrt{2}$ . Pour la méthode de la q-PCR, les échantillons ayant des cycles seuil (Ct) inférieurs à 35 ont été considérés comme positifs. Le logiciel NCSS 10 a été utilisé pour l'ensemble des tests statistiques<sup>(96)</sup>.

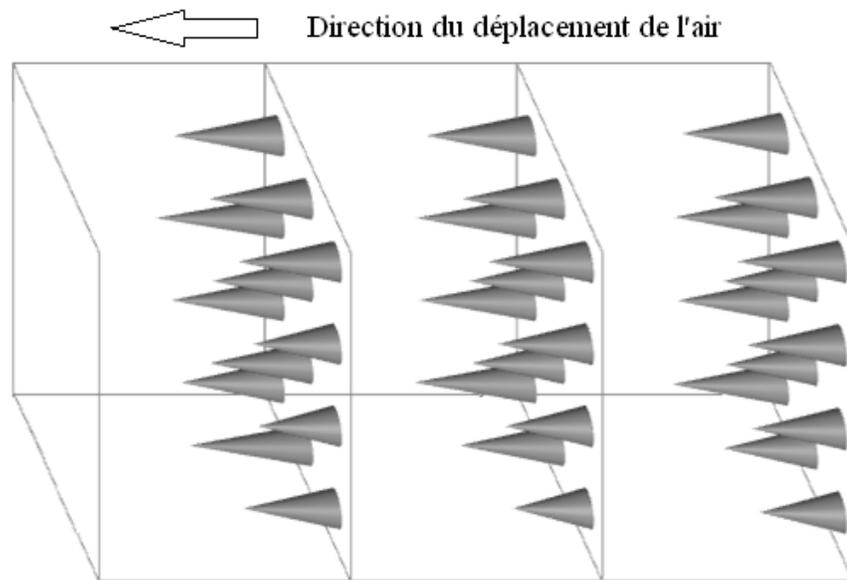


### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Essais dans l'enceinte d'exposition

##### 3.1.1 Paramètre de génération

Les vitesses de déplacement de l'air dans l'enceinte d'exposition ont varié de 0,3 à 0,47 m/s selon le point de mesure. Elles sont toutes inférieures à 0,5 m/s, soit la vélocité équivalant à un air calme. La Figure 9 présente schématiquement la vitesse moyenne pour chacun des points de mesure. Sur ce schéma, l'amplitude du cône est proportionnelle à la moyenne des vitesses mesurées. L'uniformité des vitesses y est facilement observable. L'uniformité et la faiblesse des vitesses de déplacement dans la chambre aident à optimiser l'uniformité des dépôts.



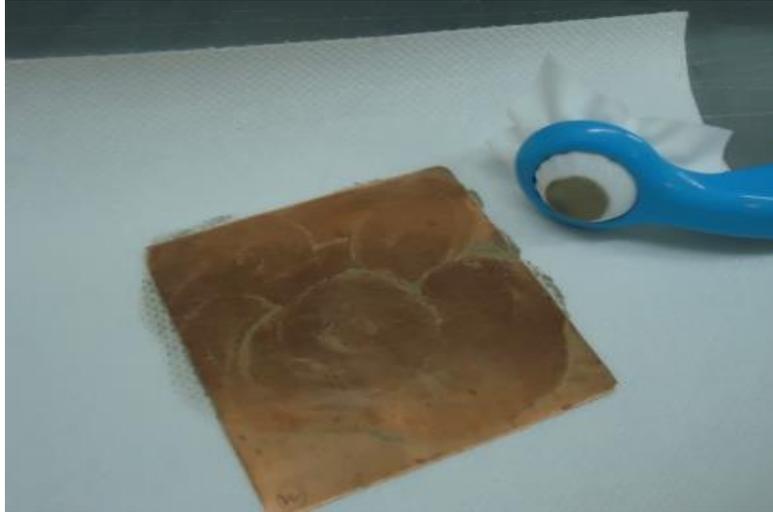
**Figure 9 : Schéma des vitesses moyennes de déplacement d'air mesurées à 36 points différents dans l'enceinte d'exposition.**

#### 3.2 Méthodes de prélèvement

Dans un premier temps, la méthode de prélèvement des poussières la mieux adaptée à la problématique des poussières déposées dans les systèmes de ventilation devait être déterminée. Différentes approches ont été comparées à partir des dépôts de poussières générées dans l'enceinte d'exposition du laboratoire. L'utilisation du conduit miniaturisé a permis d'obtenir un environnement contrôlé facilitant la réalisation des essais et la comparaison initiale des méthodes.

### 3.2.1 Prélèvement par essuyage (frottis)

Peu d'essais ont été réalisés avec la méthode par essuyage. Pour plusieurs échantillons, comme celui montré à la Figure 10 avec une lingette, une saturation du milieu collecteur a été observée. Cette situation provoquait le déplacement des poussières sur la surface et empêchait leur collecte. Quelques systèmes de prélèvement par frottis ont également été essayés, mais le même problème de saturation du média collecteur s'est reproduit. Cette approche de prélèvement a donc été éliminée *ipso facto*.



**Figure 10 : Échantillon par frottis sur une plaque de cuivre prépesée.**

Note : les plaques de cuivre ont été remplacées par des plaques d'acier en raison de leur trop grande fragilité.

### 3.2.2 Prélèvement par aspiration

#### 3.2.2.1 Comparaison de la méthode ASPEC par rapport à la cassette EMS

Lors des mêmes essais préliminaires, des poussières déposées sur le radier du conduit miniaturisé ont été prélevées à l'aide de deux méthodes de prélèvement par aspiration : la méthode ASPEC, recommandée dans une étude antérieure<sup>(5,50)</sup>, ainsi qu'une autre méthode d'aspiration utilisant la cassette EMS modifiée. Rappelons que l'enceinte d'exposition permettait de connaître exactement la quantité de poussières déposée sur les plaques de 10 cm sur 10 cm.

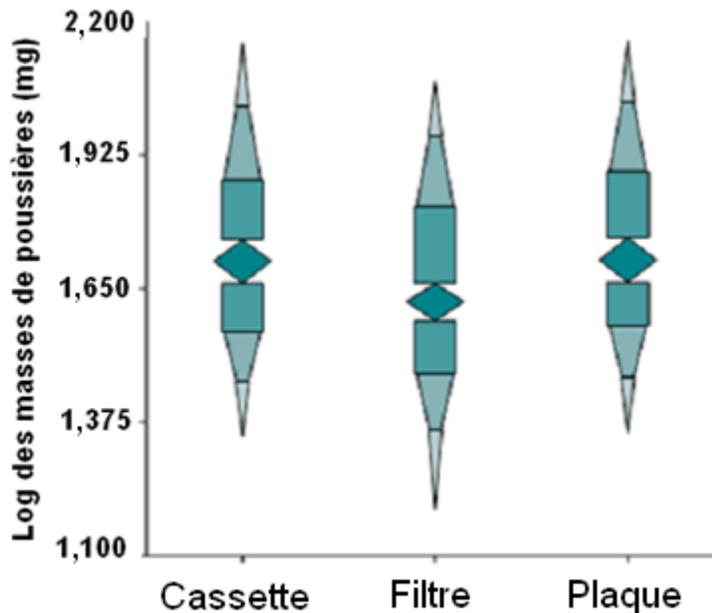
Le Tableau 2 présente les statistiques descriptives obtenues pour chaque méthode lors de ces essais. Le test de Martinez-Iglewicz permet de démontrer que les masses de poussières recueillies ont une distribution log-normale. Un test de *t* apparié effectué sur les données log-transformées des masses prélevées, a permis de déterminer que la moyenne de poussières prélevées avec la cassette EMS était significativement supérieure à celle obtenue avec la version non modifiée de la méthode ASPEC, et ce, à un niveau de probabilité de 0,001. Cette cassette a donc été utilisée pour le prélèvement des poussières lors de la réalisation des tests subséquents.

**Tableau 2 : Statistiques descriptives des masses de poussières recueillies avec les méthodes de prélèvement par aspiration testées (ASPEC et cassette EMS)**

	n	Distribution	Moyenne géométrique (mg)	Erreur standard
<b>ASPEC</b>	12	Log-normale	0,42	0,27
<b>EMS</b>	12	Log-normale	1,07	0,22

### 3.2.2.2 Efficacité de prélèvement de la cassette EMS

Selon le test de Martinez-Iglewicz, la distribution des masses de poussières sur le filtre, dans la cassette ainsi que celles déposées sur chaque plaque de l’enceinte sont distribuées de façon log-normale. La Figure 11 présente la distribution des données log-transformées à l’aide du graphique des percentiles. Ce graphique permet d’avoir une appréciation visuelle de la distribution des masses de poussières prélevées pour chacun des endroits.



**Figure 11 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des masses de poussières pesées dans les cassettes, sur les filtres ou sur les plaques de l’enceinte.**

Note : Les polygones de haut en bas correspondent aux percentiles suivants : 100 à 90, 90 à 75, 75 à 55, 55 à 45, 45 à 25, 25 à 10 et 10 à 0.

L’efficacité de prélèvement de la cassette EMS est déterminée à partir des pourcentages de pertes de poussières qui ont été observés entre les masses exactes de poussières déposées sur les plaques de l’enceinte et celles qui ont effectivement été recueillies dans la cassette. L’estimation de la perte déterminée à l’aide de la moyenne géométrique est de 1,6 % avec une erreur standard

de 2 %. Le pourcentage de perte minimum observée est de 0,3 % alors que le maximum observé est de 12 %. L'efficacité moyenne de récupération de la cassette EMS est de 98,4 %.

### 3.2.2.3 Masse de poussières : cassette par rapport au filtre

Pour les cassettes EMS, 15 % de la masse de poussières est perdue entre les plaques de l'enceinte et les filtres alors que lorsque les cassettes sont considérées complètement, c'est uniquement 1,4 % de poussière qui est perdue. La perte maximale observée lors de la pesée d'un filtre est de 35 % et de 12 % pour une cassette. La Figure 12 illustre graphiquement les pourcentages de masse de poussières perdus par le filtre et par la cassette. Le résultat du test U de Mann-Whitney permet de confirmer que le pourcentage de la masse de poussières perdu par la pesée du filtre seul est significativement plus élevé que celui obtenu lorsque la cassette entière est pesée.

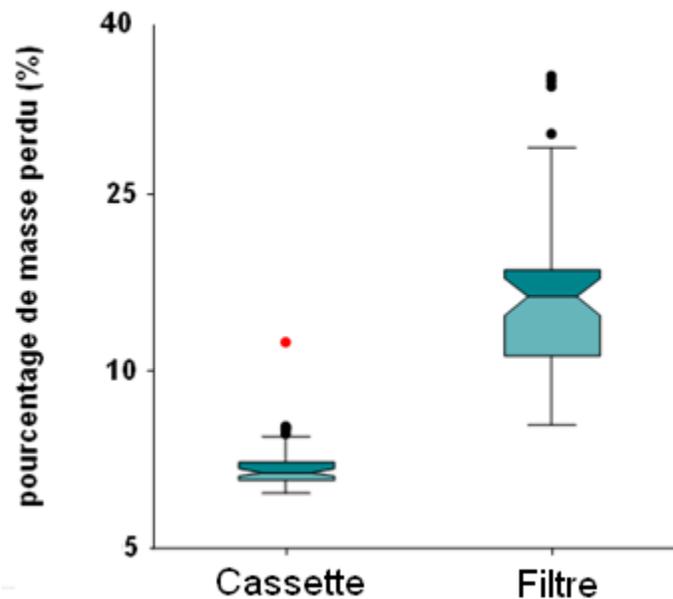


Figure 12 : Pourcentages de perte de poussières pour les cassettes et pour les filtres, observés à partir des plaques de l'enceinte (● valeur extrême). N=54

## 3.3 Validation des méthodes analytiques

Une première évaluation des méthodes d'analyse a été effectuée afin de permettre de déterminer le potentiel analytique de chacune pour la matrice des poussières. La validation doit être réalisée en fonction des objectifs d'intervention qui sont de permettre la détermination de la salubrité des systèmes de ventilation à partir d'échantillons de poussières déposées. Le Tableau 3 présente les résultats de cette validation. Pour la réplicabilité et la répétabilité, plus le résultat est petit, meilleure est la performance de la méthode.

**Tableau 3 : Performance analytique des quatre méthodes sur des échantillons de poussières additionnés de spores de moisissures**

Méthode	LD	Réplicabilité (%)	Répétabilité (%)
Culture	120 UFC/100 cm <sup>2</sup>	12	11
Microscopie	1 980 spores/100 cm <sup>2</sup>	4,7	9,6
NAHA	218 000 spores/100 cm <sup>2</sup>	5,6	16,4
q-PCR universelle	130 spores/100 cm <sup>2</sup>	1,3	1,4

### 3.3.1 Culture - flore cultivable

La Figure 13 illustre des colonies de moisissures obtenues dans un échantillon prélevé dans un système de ventilation. La validation de la méthode d'analyse par culture sur un milieu de culture à l'extrait de malt a établi la limite de détection à 120 UFC/mL d'extraits d'échantillon de poussières. La réplicabilité, évaluée sur quatre concentrations variant entre 80 et 4 570 UFC/mL, est de 12 % alors que la répétabilité, calculée sur des extraits de poussières dont les concentrations variaient entre 54 et 2 600 UFC/mL est de 11 %.

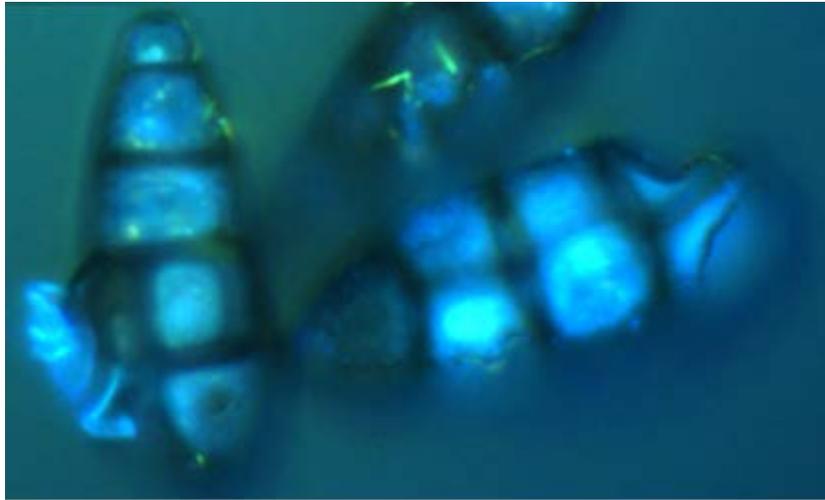


**Figure 13 : Colonies de moisissures sur un milieu à l'extrait de malt après croissance à 25 °C durant 5 jours.**

### 3.3.2 Microscopie - flore totale

#### 3.3.2.1 Optimisation de la détection

Afin de pouvoir distinguer les spores de moisissures lors de l'examen au microscope, deux approches d'observation permettant une meilleure détection ont été testées. La première approche consistait à colorer les spores après la filtration de la suspension sur membrane noire, à l'aide du 4',6-diamidino-2-phénylindole, dihydrochloride (DAPI), un intercalant de l'ADN double brin. Ce colorant produit une teinte bleue fluorescente des cellules exposées. La Figure 14 montre des spores d'*Alternaria sp* vues au microscope et ayant subi cette coloration.



**Figure 14 : Spores d'*Alternaria sp* colorées avec l'intercalant d'ADN double brin DAPI (grossissement de 400x).**

La seconde approche a été réalisée à l'aide de la filtration de la suspension sur des filtres ECM pouvant être transparisés à l'aide d'acétone chaude. Une coloration à la safranine a permis d'augmenter le contraste des spores hyalines et de délimiter le contour de la surface de l'échantillon afin de faciliter leur détection. Les spores observables sont présentées à la Figure 15.

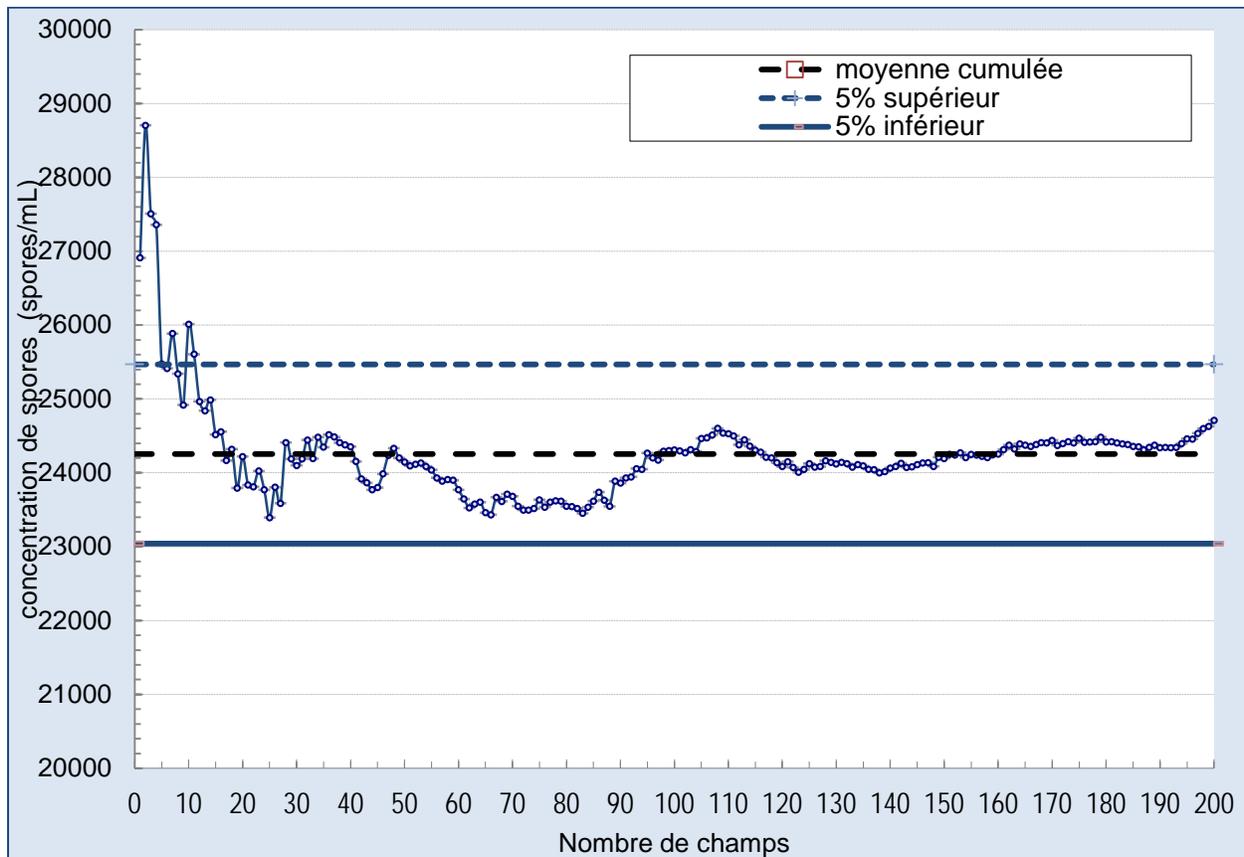


**Figure 15 : Spores de moisissures sur un filtre ECM après transparisation (grossissement de 400x).**

La coloration des spores de moisissures à l'aide du colorant DAPI était irrégulière d'un essai à l'autre et pouvait être réduite pour certains types de spores de moisissures ayant des parois plus étanches. En raison de ces limites, la validation de la méthode, par microscopie, a été restreinte à l'approche utilisant la transparisation.

### 3.3.2.2 Nombre de champs de microscope devant être analysé

Selon le diamètre du champ optique obtenu par le microscope, et en considérant la superficie totale du filtre ECM, il existe plus de 1500 champs différents sur la surface totale du filtre. La Figure 16 présente un exemple de la variation de la concentration de spores de moisissures rapportée par un analyste en fonction du nombre de champs microscopiques comptés. Une stabilisation de la variation est déjà observable à partir de 25 champs comptés. Selon cet essai une augmentation du nombre de champs compté n’apporterait que peu de précision sur le résultat final rapporté.



**Figure 16 : Concentration de spores rapportée selon le nombre de champs microscopiques traités lors de l’analyse d’un échantillon.**

### 3.3.2.3 Validation

Tous les paramètres de validation ont été déterminés à partir de la lecture de 50 champs microscopiques. La limite de détection de la méthode d’évaluation de la flore mycologique totale à partir des spores dénombrées au microscope est de 1 980 spores/mL. La réplicabilité, calculée sur des extraits de poussières additionnés de spores à des concentrations allant de 430 à 4 900 spores/mL, est de 4,7 %. La répétabilité réalisée à partir des mêmes extraits est de 9,6 %.

### 3.3.3 Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA)

Les résultats des analyses effectuées lors du dosage de la NAHA par le Mycometer® sont exprimés en nombre d'unités relatives de fluorescence (UFR). Afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus avec les autres méthodes analytiques, les résultats de fluorescence relative (MV) ont dû être convertis en nombre de spores présents dans l'extrait de l'échantillon, à l'aide de la droite de régression linéaire présentée à la Figure 17 : Régression linéaire entre la fluorescence relative et le nombre de spores.

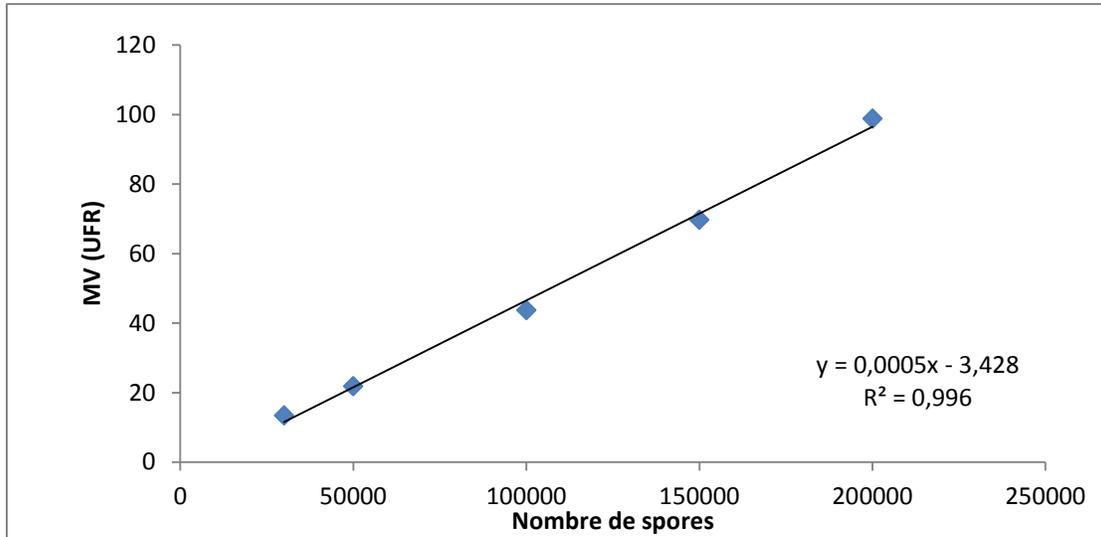


Figure 17 : Régression linéaire entre la fluorescence relative et le nombre de spores.

L'équation de régression linéaire entre les concentrations en spores et la fluorescence relative exprimée en URF qui a été utilisée pour toutes les conversions durant le projet est la suivante :

$$\text{nombre de spores} = (\text{MV} + 3,428) * 3 \text{ mL} / (0,0005 * 0,1 \text{ mL}) \quad (2)$$

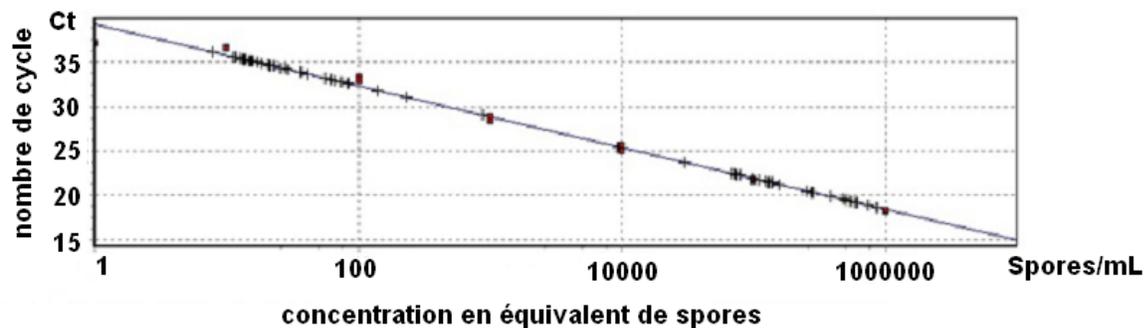
Un facteur multiplicatif de 3 mL/0,1 mL doit être appliqué sur le nombre de spores parce qu'uniquement 0,1 mL des 3 mL de la suspension de poussières recueillie de la cassette a été utilisé. La limite de détection pour le dosage de la NAHA présentée au Tableau 3 est de 218 000 spores/100 cm<sup>2</sup>. Elle est la plus élevée des méthodes testées. Sa réplicabilité de 5,6 % et sa répétabilité de 16,4 % sont comparables aux résultats obtenus par la méthode de microscopie.

### 3.3.4 q-PCR universelle

La sélection des marqueurs constituant les systèmes de détection est une étape déterminante d'une bonne méthode de la q-PCR. Seul le système FungiQuant F-R respectait l'ensemble des critères, il a donc été conservé pour les essais en chambre d'exposition. Les autres systèmes ont été rejetés lorsqu'ils ne parvenaient pas soit à démontrer une parfaite spécificité ou sélectivité. En plus de ces critères, les systèmes qui ne démontraient pas une efficacité d'amplification supérieure à 75 % ont également été éliminés.

Les courbes standards permettant la conversion entre le nombre de cycles de la q-PCR et la concentration de spores sont nécessaires à la quantification des spores dans l'échantillon. La Figure 18 montre un exemple de courbe standard puisqu'une nouvelle courbe était effectuée pour chaque plaque d'analyse. L'efficacité de cette courbe est de 94 % avec un excellent coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0,986. Le logiciel Realplex® convertit les CT nécessaires de chaque échantillon en équivalent de spore/mL. L'équation de la droite de régression produite à partir de la courbe standard a été utilisée.

La validation de la méthode de détection universelle des moisissures par q-PCR a produit une limite de détection de 130 spores/100 cm<sup>2</sup> avec une réplicabilité et une répétabilité de seulement 1,0 % lorsque calculées à partir du nombre de cycles (Ct) (Tableau 3).



**Figure 18 : Exemple d'une courbe standard obtenue à l'aide du thermo-cycleur Realplex® 2S lors de la quantification des échantillons de poussières.**

### 3.4 Comparaison des méthodes

Les quatre méthodes ayant passé le stade de validation ont d'abord été comparées en utilisant l'enceinte d'exposition en environnement contrôlé, puis avec des échantillons prélevés dans des conduits de ventilation en conditions de terrain réelles.

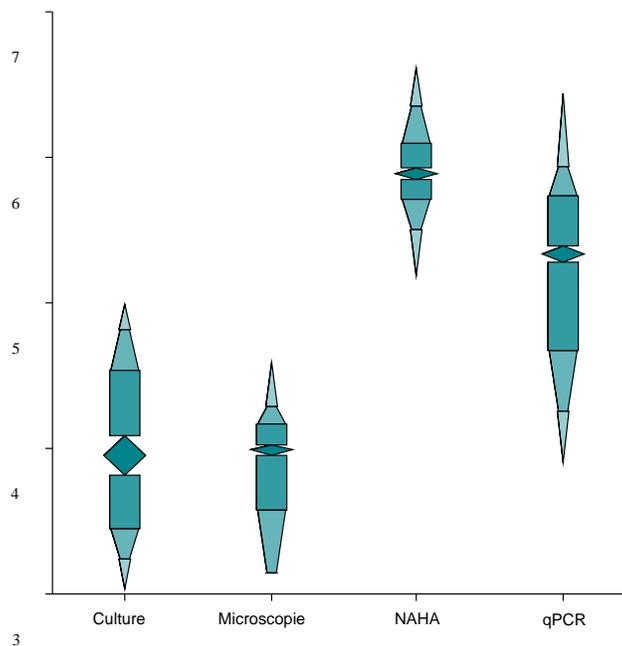
#### 3.4.1 Essais en situation contrôlée

Des poussières ont été resuspendues dans l'enceinte d'exposition simultanément avec des spores de *Penicillium digitatum* à différentes concentrations. Afin de s'assurer que chacune des méthodes évaluait une concentration identique, un seul extrait de poussière a été séparé en quatre fractions égales. Chacun de ces quarts était ensuite analysé par une des quatre méthodes. Le Tableau 6 présente les résultats des concentrations de moisissures pour les masses de poussières des échantillons prélevés lors de ces essais réalisés dans l'enceinte d'exposition. La moyenne géométrique de la masse des poussières est de 30 mg, variant entre 11 et 170 mg.

**Tableau 4 : Moyennes géométriques et étendues des concentrations de biomasse mycologique obtenues par les quatre méthodes analytiques**

	Moyenne géométrique	Min - Max
<b>Culture</b> (UFC/100 cm <sup>2</sup> )	9,9 x 10 <sup>3</sup>	1080 - 9,7 x 10 <sup>4</sup>
<b>Microscopie</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	7,2 x 10 <sup>3</sup>	1400 - 3,9 x 10 <sup>4</sup>
<b>NAHA</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	1,7 x 10 <sup>5</sup>	8,1 x 10 <sup>3</sup> - 2,7 x 10 <sup>6</sup>
<b>q-PCR universelle</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	8,2 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup> - 4,1 x 10 <sup>6</sup>

La Figure 19 illustre, à l'aide d'un graphique percentile, la distribution des concentrations obtenues pour chaque méthode, lorsque transformées de façon logarithmique puisque la distribution des données brutes ne répondait pas à la distribution normale.



**Figure 19 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des concentrations de spores de moisissures obtenues à l'aide des 4 méthodes d'analyse pour les échantillons provenant de l'enceinte d'exposition.**

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) pour les essais en situation contrôlée sont présentés au Tableau 5. Ce test permet de démontrer que le choix de la méthode utilisée a un impact significatif sur le résultat qui rapporté. Au Tableau 6 sont présentés les résultats des comparaisons multiples des moyennes de chaque méthode. Sur ce tableau il est possible

d'observer que la méthode du NAHA produit la concentration moyenne maximale et que celle-ci est significativement différente des concentrations moyennes produites par les trois autres méthodes.

**Tableau 5 : ANOVA sur les concentrations de spores de moisissures pour les échantillons prélevés dans l'enceinte de génération**

Terme	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F ratio	Niveau de probabilité	Puissance
Méthode	3	176,8168	58,93895	230,72	0,000000*	1,000000
Variance	236	60,28759	0,2554559			
Total (ajusté)	239	237,1044				
Total	240					

\* Seuil de significativité établi à  $\alpha = 0,05$

**Tableau 6 : Résultats du test de comparaison multiple Tukey-Kramer effectué sur les concentrations de spores de moisissures pour les essais réalisés dans l'enceinte de génération ( $\alpha=0,05$ )**

Groupe	n	Moyenne	Différent du groupe
Microscopie	60	3,85	NAHA, q-PCR
Culture	60	3,99	NAHA, q-PCR
q-PCR	60	5,22	Culture, microscopie, NAHA
NAHA	60	5,91	Culture, microscopie, q-PCR

n : effectif

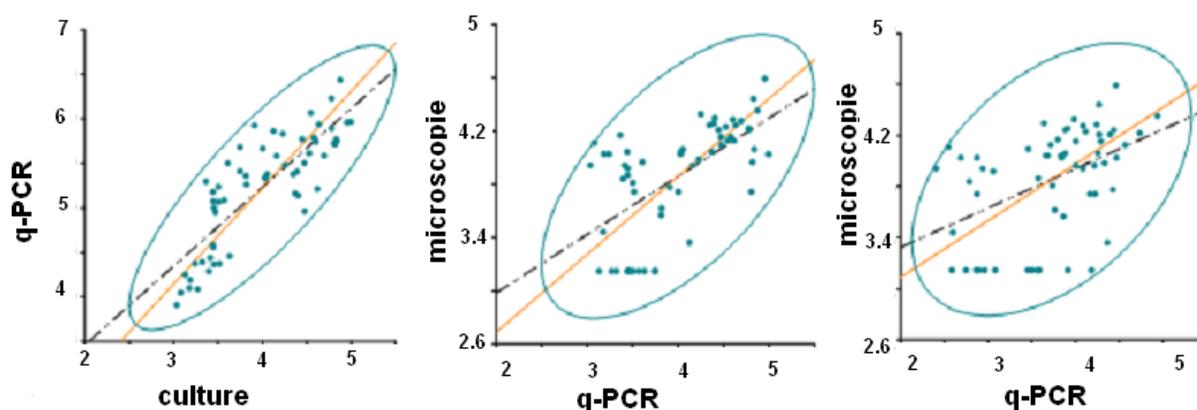
Un test de corrélation de Pearson permet d'évaluer l'existence d'une relation entre les concentrations rapportées par chaque méthode. Au Tableau 7 sont présentés les coefficients de corrélation calculés pour les quatre méthodes d'analyse de la biomasse mycologique à partir des échantillons produits en conditions contrôlées dans l'enceinte d'exposition. Un niveau de signification de 99 % est utilisé pour évaluer la signification statistique des coefficients.

**Tableau 7 : Corrélations de Pearson calculées sur les concentrations log-transformées obtenues des quatre méthodes analytiques pour les essais effectués dans l'enceinte d'exposition**

	Microscopie	NAHA	q-PCR	Culture
Microscopie	1,000	-0,074965	0,459870*	0,615112*
NAHA		1,000	0,278068	0,076409
q-PCR			1,000	0,828506*
Culture				1,000

\*  $p < 0,01$

La Figure 20 présente les graphiques produits pour les régressions linéaires (X vs Y) et orthogonales (Y vs X) mesurées entre les méthodes d'analyse pour lesquelles des coefficients de corrélations statistiquement significatifs ont été obtenus. Le diagramme en nuage de points produit ainsi que l'ellipse permettent d'observer la dispersion des données par rapport à la droite de régression calculée.



**Figure 20 : Régressions linéaires (lignes pointillées) et orthogonales (lignes orangées) entre les méthodes d'analyse pour lesquelles des corrélations significatives ont été obtenues sur les échantillons provenant de l'enceinte d'exposition. Les ellipses sont la représentation de l'intervalle de confiance à 95 % du nuage de points.**

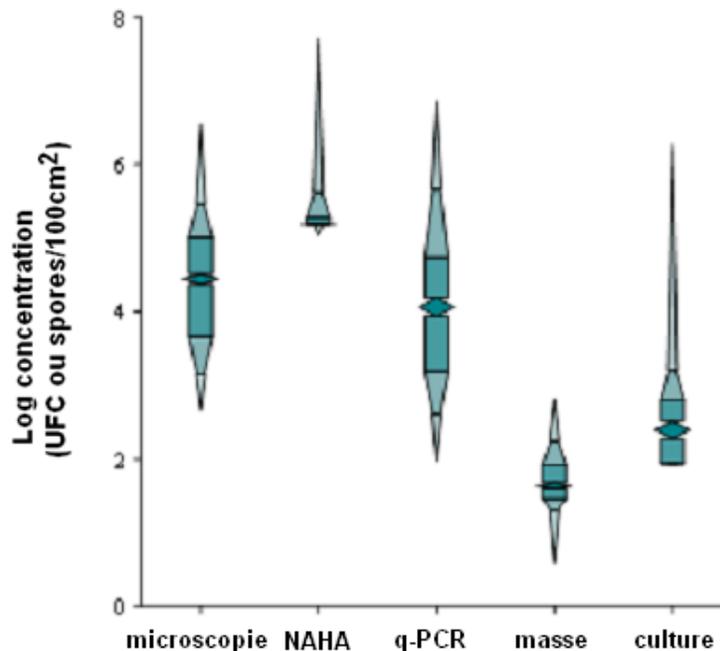
### 3.4.2 Essais en situation réelle

Les statistiques descriptives des concentrations obtenues par les quatre méthodes analytiques ainsi que celles pour les masses de poussières prélevées dans les systèmes de ventilation sont présentées au Tableau 8. Selon les méthodes, le nombre d'échantillons pour lesquels les concentrations sont inférieures à la limite de détection varie beaucoup. Pour la NAHA, 80 % des échantillons sont sous la limite, pour la culture c'est 35 %, la microscopie 15 % et la q-PCR n'a que 3 % des échantillons qui ne sont pas quantifiables. La moyenne géométrique de la masse des poussières est de 50 mg, variant entre 5 et 640 mg.

**Tableau 8 : Moyennes géométriques et étendues des concentrations de biomasse mycologique obtenues par les quatre méthodes analytiques**

	Moyenne géométrique	Min-Max
<b>Culture</b> (UFC/100 cm <sup>2</sup> )	330	85 - 1,8 x 10 <sup>6</sup>
<b>Microscopie</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	2,5 x 10 <sup>4</sup>	461 - 3,5 x 10 <sup>5</sup>
<b>NAHA</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	1,9 x 10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> - 5,2 x 10 <sup>7</sup>
<b>q-PCR</b> (spores/100 cm <sup>2</sup> )	1,2 x 10 <sup>4</sup>	93 - 7,2 x 10 <sup>6</sup>

La Figure 21 illustre, à l'aide de la représentation percentile, la distribution des données pour les concentrations de la biomasse mycologique détectées par chacune des quatre méthodes sur les échantillons prélevés dans les systèmes de ventilation. Bien que transformée de façon logarithmique, la distribution normale n'était pas observable pour toutes. Les données ont donc été traitées à l'aide de tests non paramétriques.



**Figure 21 : Distribution selon les percentiles pour les données log-transformées des concentrations obtenues à l'aide des 4 méthodes d'analyse, pour les masses de poussières prélevées dans les systèmes de ventilation.**

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) pour les essais effectués en situation réelle sont présentés au Tableau 9. Ces résultats confirment ce qui a été démontré par les essais réalisés dans l'enceinte d'exposition. La méthode d'analyse choisie a un impact significatif sur le résultat produit. Les résultats pour le test de comparaisons multiples de Tukey-Kramer se retrouvent quant à eux au Tableau 10. Il est également possible d'observer les concentrations moyennes de chaque méthode dans ce tableau. Lors des essais en situations réelles, les concentrations moyennes obtenues par la méthode par filtration se situent juste en dessous de la méthode NAHA alors que dans l'enceinte cette méthode avait produit les concentrations moyennes les plus faibles.

**Tableau 9 : ANOVA sur les concentrations de spores de moisissures pour les échantillons prélevés en situation réelle dans les systèmes de ventilation**

Terme	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F ratio	Niveau de probabilité	Puissance
<b>Méthode</b>	3	1197,612	399,2041	639,01	0,000000*	1,000000
<b>Variance</b>	1198	748,4152	0,6247206			
<b>Total (ajusté)</b>	1201	1946,027				
<b>Total</b>	1202					

\*  $p < 0,05$

**Tableau 10 : Résultats du test de comparaison multiple Tukey-Kramer effectué sur les concentrations de spores de moisissures pour les essais réalisés dans les systèmes de ventilation ( $\alpha=0.05$ )**

Groupe	n	Moyenne	Différent du groupe
<b>Culture</b>	297	2,52	Microscopie, NAHA, q-PCR
<b>q-PCR</b>	302	4,08	Culture, microscopie, NAHA
<b>Microscopie</b>	300	4,39	Culture, NAHA, q-PCR
<b>NAHA</b>	303	5,26	Culture, microscopie, q-PCR

n : effectif

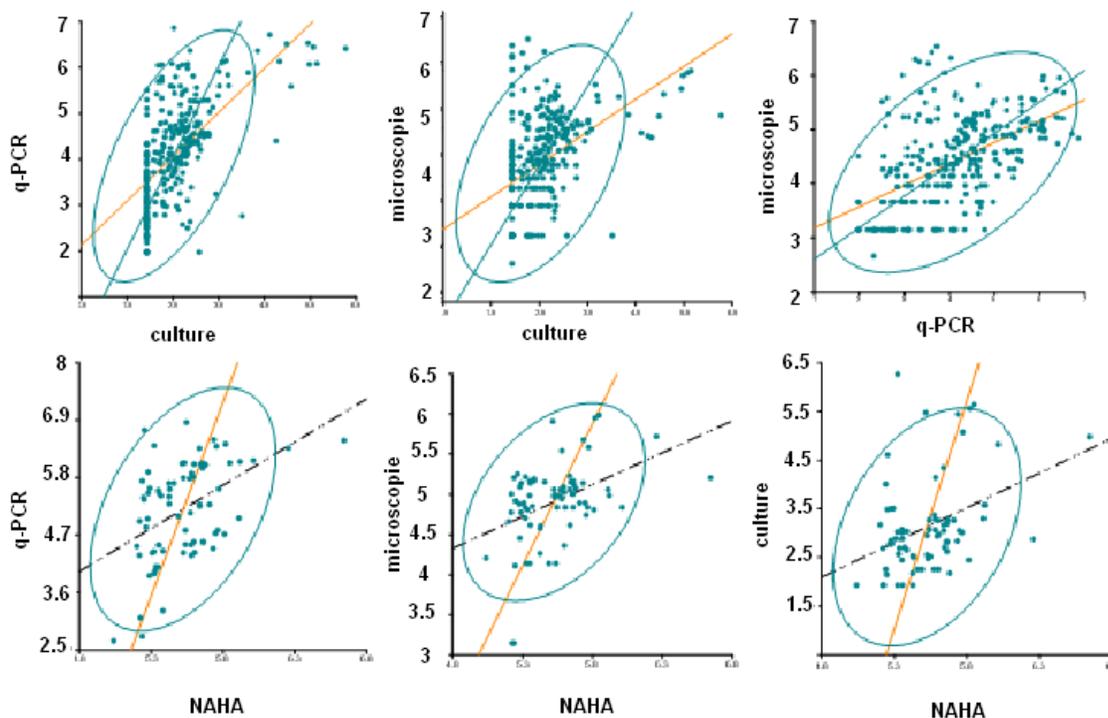
Les coefficients de corrélation de Pearson calculés entre les méthodes d'analyse de la biomasse mycologique à partir des échantillons-terrains sont présentés au Tableau 11. En raison du nombre très élevé de résultats sous la limite de détection pour la NAHA (70 %), les corrélations et les régressions ont été réalisées en retirant ces échantillons. Un niveau de signification de 99 % est utilisé pour évaluer la signification statistique des coefficients. La meilleure corrélation est obtenue entre la q-PCR universelle et celle de la culture alors que la plus faible est observée entre le dosage NAHA et celle par culture.

**Tableau 11 : Corrélations de Pearson calculées sur les concentrations log-transformées des quatre méthodes analytiques**

	Microscopie (sans LD)	NAHA	q-PCR	Culture
Microscopie (sans LD)	1,000	0,313*	0,540*	0,564*
NAHA		1,000	0,435 *	0,244*
q-PCR			1,000	0,653*
Culture				1,000

\*  $p < 0,01$

Les graphiques de nuage de points sur lesquels sont représentés les régressions linéaires et les régressions orthogonales obtenues entre les méthodes d'analyse pour les échantillons provenant des systèmes de ventilation sont présentés à la Figure 22. La forme de l'ellipse de l'intervalle de confiance 95 % permet de bien apprécier la dispersion des données.



**Figure 22 : Régressions linéaires (lignes pointillées) et orthogonales (lignes orangées) obtenues entre les méthodes d'analyse pour les échantillons provenant des systèmes de ventilation. Les ellipses sont la représentation de l'intervalle de confiance à 95 % du nuage de points.**

### 3.4.3 Évaluation des coûts et délais

Les méthodes ont été comparées selon différents critères de performance afin de choisir la mieux adaptée aux besoins de l'évaluation de la biomasse mycologique dans les poussières des conduits des systèmes de ventilation. Afin de compléter le choix de la méthode, un examen des coûts d'analyse en fonction des bénéfices, ainsi que la détermination des temps techniques et des délais analytiques nécessaires entre le prélèvement et le résultat final ont été considérés. Le Tableau 12 présente cette évaluation.

**Tableau 12 : Comparaison des coûts, du temps technique et des délais d'analyse pour chacune des méthodes**

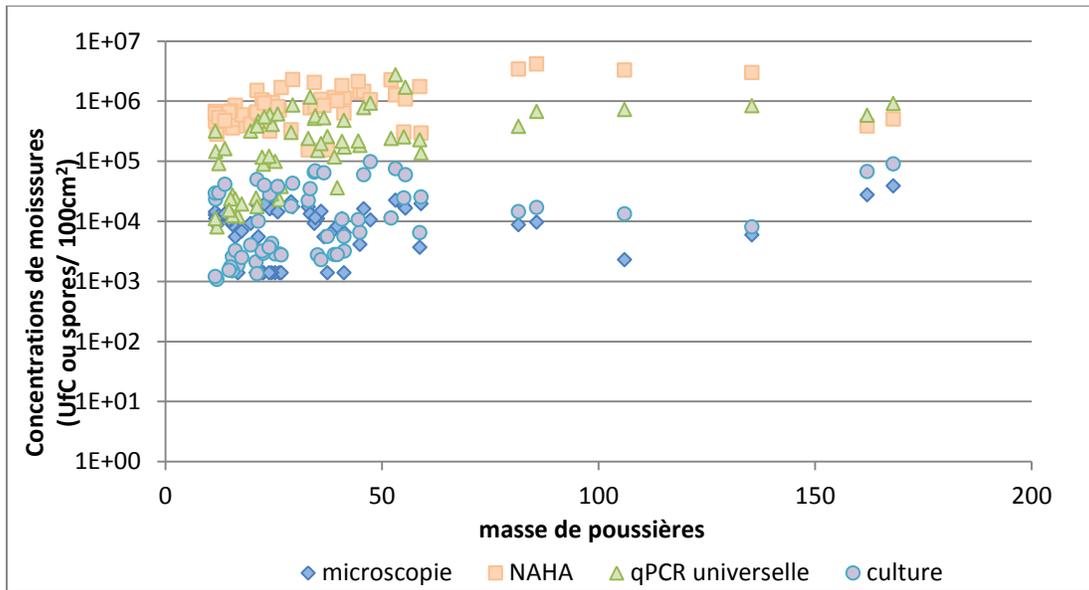
Méthode	Délai d'analyse (heure)	Temps technique (minute)	Coût (\$)	Résultat
<b>Culture</b>	120	40	10	Flore cultivable
<b>Microscopie</b>	24	25	2	Flore totale
<b>NAHA</b>	1	10	25	Flore totale
<b>q-PCR</b>	4	90	15	Flore totale

Les coûts en matière consommable pour la méthode par microscopie sont de 2 \$ seulement. Ceux-ci sont plus élevés pour la NAHA alors qu'ils atteignent 25 \$ par dosage. Au regard du temps technique, le dosage de la NAHA ne prend que 10 minutes comparativement aux 90 minutes nécessaires pour la méthode de la q-PCR. Sur le plan des délais d'analyse, la méthode par culture se démarque par sa durée extrêmement longue (120 heures, soit 5 jours complets) comparativement aux autres méthodes.

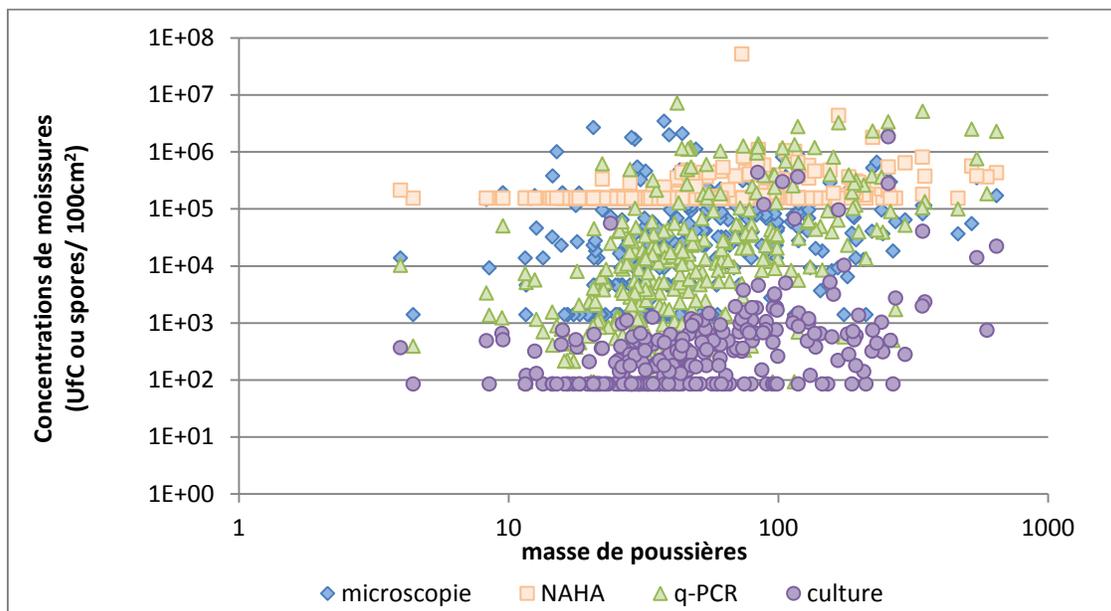
### 3.5 Biomasse mycologique en fonction de la masse de poussières

La Figure 23 illustre les concentrations pour les quatre méthodes d'évaluation de la biomasse mycologique en fonction des masses de poussières/100 cm<sup>2</sup> prélevées pour les essais dans l'enceinte d'exposition et pour ceux effectués dans les systèmes de ventilation.

a)

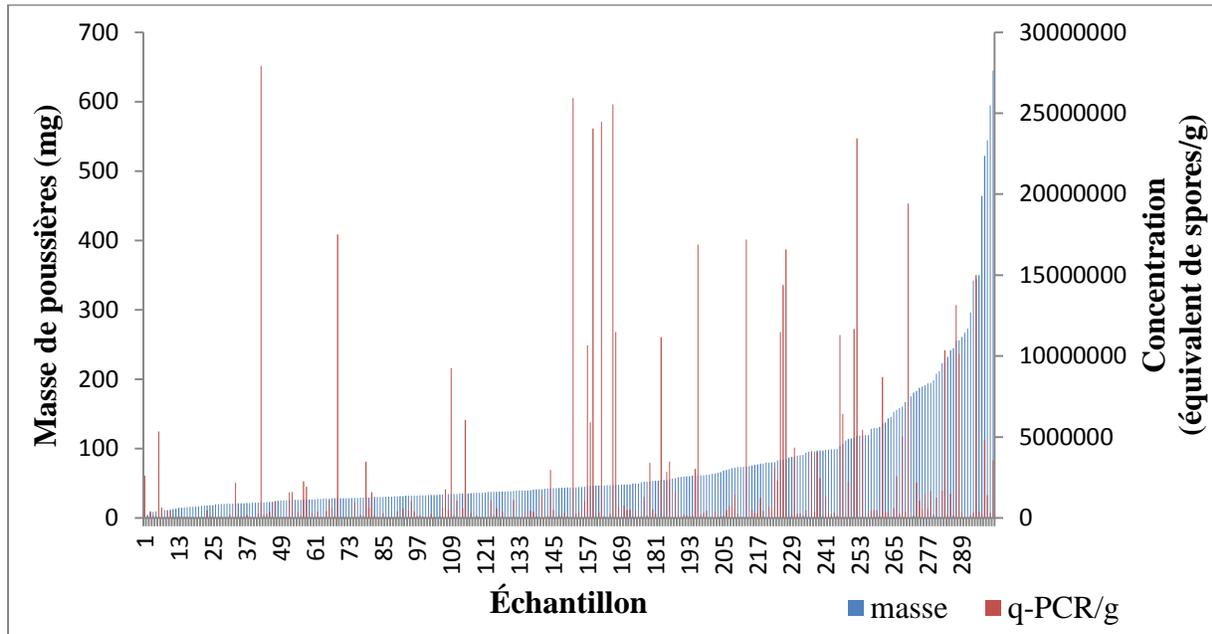


b)



**Figure 23 : Concentrations de la biomasse mycologique en fonction des masses de poussières prélevées a) dans l'enceinte d'exposition; b) dans les systèmes de ventilation. Les limites proposées de 23 mg avec la méthode de l'ASPEC (Lavoie *et al.* 2011) et de 58 mg (cette étude) sont indiquées par les lignes bleues verticales.**

La Figure 24 représente les masses de poussières prélevées ainsi que les concentrations en équivalent de spores pour tous les échantillons analysés à l'aide de la méthode de la q-PCR universelle. Cette figure permet de constater l'indépendance du facteur masse et du facteur charge mycologique.



**Figure 24 : Masse de poussières/100 cm<sup>2</sup> prélevée et concentration en équivalent de spores pour la méthode de la q-PCR universelle.**

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Méthodes de prélèvement

Aucune étude comparative de prélèvements des poussières déposées destinés à l'analyse de la biomasse mycologique n'était disponible jusqu'à maintenant. Cela a imposé dès le départ la recherche des différentes techniques applicables et utilisables lors d'une démarche d'investigation. De plus, ces techniques devaient pouvoir être adaptées facilement à la collecte et aux analyses subséquentes des microorganismes. Deux principes de prélèvement sont ressortis de ce questionnement et ont été investigués lors la présente étude : celui par essuyage ou frottis et celui par aspiration de la poussière déposée.

De ces deux principes de prélèvement, l'approche par essuyage ou frottis a rapidement été abandonnée en raison de problèmes sur le plan de la capacité de collecte des poussières sur les surfaces lisses des systèmes de ventilation. L'essuyage provoquait le déplacement de la poussière en raison de la saturation rapide du média collecteur (Figure 10). Bien qu'en hygiène du travail, les prélèvements par frottis ou essuyage soient reconnus et utilisés pour l'échantillonnage de plusieurs contaminants de surface <sup>(93,97-99)</sup>, certains problèmes, constatés lors de cette étude ont fait en sorte que cette technique a été mise de côté. Ces problèmes ont également été rapportés dans la littérature. En effet, Dufay et Archuleta ont démontré l'inefficacité de ce type de prélèvement. Ils ont observé des pourcentages d'efficacité de seulement 13,7 à 43,3 % pour les essuyages secs et de 65 à 84 % pour les essuyages humides <sup>(98)</sup>. Quoique les frottis ou les essuyages humides semblent être plus efficaces, Lichtenwalner a rapporté une faible reproductibilité de ces prélèvements <sup>(94)</sup>. Une étude de Reynolds rapporte des problèmes de résistance du média collecteur utilisé <sup>(97)</sup>. Même si les prélèvements par frottis (essuyage) peuvent être adéquats pour l'analyse de certains contaminants, les observations ont clairement montré que cette technique n'était pas appropriée pour les besoins de cette étude. L'alternative, utilisant des prélèvements par aspiration, s'est montrée nettement mieux adaptée.

En s'appuyant sur les résultats d'une étude réalisée à l'IRSST <sup>(50)</sup>, la méthode par aspiration, préconisée par l'ASPEC, avait été recommandée pour le prélèvement des poussières déposées dans les systèmes de ventilation. Cette méthode permettait une meilleure captation des poussières comparativement aux résultats obtenus par celle de la NADCA et par celle de l'IRSST. Elle s'apparente au standard D7144 de l'organisme de normalisation américain ASTM International pour le prélèvement des poussières et l'analyse des métaux <sup>(100)</sup>, ainsi qu'à la méthode DVM (*dust vacuum method*) développée par Hee et utilisée par Reynolds pour les analyses du plomb dans les poussières <sup>(97,100,101)</sup>. Toutefois, les études consultées ainsi que celle de l'IRSST ont identifié certaines lacunes reliées à l'approche de prélèvement par aspiration avec la cassette en plastique munie de l'embout de Tygon® biseauté. Plusieurs facteurs ont également été mis en évidence dans ces études <sup>(5,95,97,99,101)</sup>, dont la surface sur laquelle le prélèvement est effectué, le nombre de passages de l'embout sur la surface, le débit d'aspiration, l'angle de prélèvement avec l'embout et la perte de poussières sur les parois de la cassette.

Une cassette manufacturée avec un embout biseauté intégré, comme celle utilisée dans cette étude, permet de limiter les variations d'adhérence en raison de l'uniformité de l'angle de coupe de l'embout. Dans un premier temps, la comparaison avec la méthode de l'ASPEC a démontré

l'efficacité de captation de la cassette EMS qui prélevait 2,5 fois plus de poussières que la cassette en trois sections qui était munie du tube biseauté manuellement. À la suite de ces essais, l'optimisation et l'évaluation de la méthode de prélèvement ont été poursuivies uniquement avec la cassette EMS. La perte de poussières sur les parois internes des cassettes ainsi que des tubes de prélèvement est rapportée dans la littérature comme étant un problème récurrent important. Par exemple, des pertes non négligeables allant de 13 à 45 % ont été citées par différents auteurs<sup>(91,92)</sup>. La méthodologie basée sur l'utilisation d'une enceinte d'exposition et des plaques d'acier amovibles pouvant être pesées a favorisé l'évaluation, sans difficulté, de l'efficacité de récupération. Les pesées des plaques avant et après les essais de génération ont permis de quantifier de façon absolue les masses de poussières déposées et de comparer avec les masses recueillies sur le filtre ou la cassette. Dans la présente étude, les pertes observées sur les parois étaient de 13,6 %, cela correspond aux niveaux inférieurs rapportés par d'autres chercheurs. Par contre, lorsque la cassette était pesée dans son intégralité, une perte de seulement 1,4 % était alors observable. Ce résultat démontre franchement l'importance de peser toute la cassette et non pas uniquement son filtre comme réalisé habituellement. En général, l'efficacité de prélèvement des méthodes pour les poussières déposées varie entre 1 et 80 %<sup>(92,97,99,101)</sup>. La méthode de la présente étude a démontré une efficacité de prélèvement supérieure de 98,6 %.

## 4.2 Méthodes d'analyse de la biomasse mycologique

Des cinq méthodes initialement ciblées, quatre ont été validées afin d'être comparées dans l'enceinte d'exposition et sur le terrain. La méthode pour le  $\beta$ -(1,3)-D-glucane a été abandonnée en raison de problèmes de reproductibilité sur le plan de la préparation des courbes standards. Il a été impossible d'avoir des droites de régression stables : un critère essentiel à une quantification reproductible. Malgré des discussions avec le fabricant, la variabilité inter-lots du standard n'a pu être contrôlée afin de régler le problème.

### 4.2.1 Flore mycologique cultivable

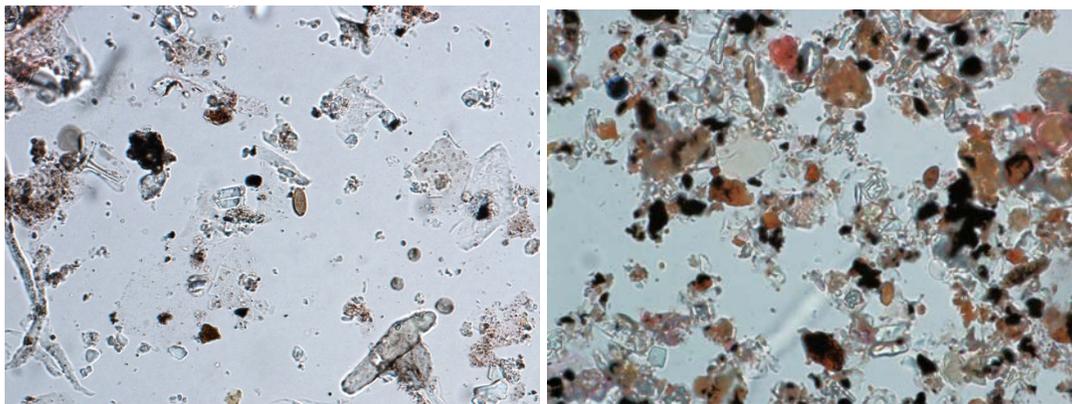
Il n'existe pas de méthode standard reconnue et acceptée par tous en mycologie environnementale. Bien qu'elle soit une des plus répandues et reconnue comme une des techniques de base en microbiologie, la méthode de culture possède plusieurs limites. L'analyse de la flore cultivable peut se faire à partir de plusieurs dizaines de milieux de culture différents dont la composition influencera le type de microorganismes pouvant s'y développer. Une sélection, et par le fait même une sous-estimation, bien qu'involontaire, sont ainsi réalisées dès le départ par la sélection du milieu de culture, puisqu'aucun milieu ne peut supporter les dizaines de milliers de moisissures existantes dans l'environnement. De plus, pour certains analystes, la distinction entre plusieurs colonies confluentes ou la présence de souches produisant des colonies envahissantes sont des facteurs qui auront un impact sur la précision de la méthode.

Une autre limite découle de l'hypothèse selon laquelle une colonie qui se développe sur une gélose ne provient nécessairement que d'une seule cellule microbienne. La réalité est tout autre; plusieurs cellules peuvent être agglomérées et contribuer à la formation de la colonie. Leur présence sera ignorée lors du compte et il s'en suivra une sous-évaluation de la concentration réelle. Les concentrations réelles sont également sous-estimées par le fait que seules les cellules viables pour lesquelles les conditions de croissances fournies sont adéquates peuvent se

multiplier, donc être comptées. Il est reconnu que la fraction cultivable de la flore ne représente qu'une faible proportion de la flore totale présente dans un environnement. Selon Russell, c'est moins de 9 % de la flore qui serait cultivable; par contre, pour d'autres auteurs, cette fraction varierait entre moins de 1 % à plus de 20 % <sup>(102,28,12)</sup>. Malgré tout, la culture a permis pour cette étude une limite de détection de 120 UCF/100 cm<sup>2</sup>. Par contre, sa réplicabilité et sa répétabilité sont près de 10 fois plus élevées que celles obtenues avec la méthode de la q-PCR universelle.

#### **4.2.2 Microscopie – spores de moisissures**

Pour les échantillons de poussières, tels que ceux obtenus dans ce projet, la présence de particules non mycologiques influence la capacité de détection et d'identification des spores et des autres cellules mycologiques présentes. Cette interférence affecte inévitablement la précision de la méthode, soit par une sous-estimation de la concentration réelle due à l'incapacité de différencier les spores des autres particules qui masquent leur présence, ou bien par une sous-estimation ou une surestimation en raison du manque d'aptitude d'un analyste à pouvoir discriminer une structure fongique d'une structure qui ne l'est pas. La Figure 25 illustre cette difficulté par un échantillon prélevé en situation réelle. La présence importante de particules de poussières complique ici substantiellement la capacité de détection des spores et autres structures mycologiques. Cette méthode demande le recours à un analyste hautement expérimenté en mycologie.



**Figure 25 : Observation microscopique d'échantillons de poussières filtrés puis transparents pour l'analyse de la biomasse mycologique.**

La proportion de l'échantillon qui a fait l'objet d'un dénombrement au microscope est un autre facteur qui influence les résultats rapportés par cette méthode. Ce facteur a un impact sur la précision de la méthode et par le fait même sur la concentration rapportée. Selon l'indice de champ de l'objectif et le grossissement utilisé pour l'analyse, la proportion de l'échantillon analysée par champ peut varier. Avec les paramètres microscopiques utilisés dans cette étude, le nombre de champs nécessaire pour couvrir la superficie totale du filtre de l'échantillon est de 1 535. Toutefois, après validation, il est suffisant, pour être représentatif, de ne dénombrer que 50 champs. Bien que la validation ait permis de démontrer une bonne répétabilité de 4,7 %, il apparaît rationnel de souligner qu'il s'agit au mieux d'une estimation de la concentration puisqu'une très faible proportion de l'échantillon est analysée. Par contre, en raison du temps

nécessaire à l'analyse d'un champ, il est peu justifiable d'exiger le dénombrement d'un très grand nombre d'entre eux si l'on considère le gain de précision qui en résulterait. D'autres chercheurs ont déjà souligné ce manque de sensibilité et considèrent cette méthode par comptage plutôt comme une analyse semi-quantitative <sup>(23,85,64)</sup>.

### 4.2.3 Enzyme $\beta$ -N-acétylhexosaminidase (NAHA)

Des quatre méthodes validées, le dosage enzymatique de la NAHA est celle pour laquelle la moins bonne répétabilité a été obtenue, soit 16,4 % de variation. Elle a aussi produit la limite de détection la plus élevée avec un équivalent de 218 000 spores/100 cm<sup>2</sup> ou 120 UFR/100 cm<sup>2</sup>. Lorsque cette limite de détection est convertie en mL, elle correspond alors à 72 000 spores/mL et en unité de fluorescence relative à 40 UFR/mL. Elle présente un manque de sensibilité par rapport aux autres méthodes évaluées. La limite de détection obtenue ici est comparable à celles rapportées par d'autres études; soit 120 et 140 UFR/mL ou 216 UFR/100 cm<sup>2</sup> <sup>(103,64,104)</sup>. La NAHA a été corrélée avec l'ergostérol présent dans les sols <sup>(84)</sup> et sur les surfaces de gypse contaminées <sup>(64)</sup>, ainsi qu'avec la quantité de spores de moisissures présente dans l'air et dans les poussières provenant d'une usine de biocombustible <sup>(56)</sup>. Selon Madsen, puisque les moisissures sont le contaminant principal des poussières, le dosage de la NAHA permettrait d'obtenir rapidement une estimation de la biomasse mycologique <sup>(56)</sup>. Le problème majeur rencontré avec l'utilisation de cette méthode au cours du présent projet est relié à sa limite de détection beaucoup trop élevée comparativement à celle des autres. La modification de la procédure d'analyse afin de pouvoir effectuer l'ensemble des analyses sur un même échantillon peut être responsable de cette limite importante et par le fait même de sa piètre performance.

### 4.2.4 q-PCR universelle

Les principaux avantages de la méthode de la q-PCR par rapport à celle de la culture sont sa rapidité, sa précision, sa sensibilité et sa capacité à détecter les spores viables et mortes <sup>(105-107)20)</sup>.

Ce dernier avantage est important et ne doit surtout pas être négligé puisque plusieurs des risques pour la santé attribuables aux moisissures ne sont pas dépendants de leur viabilité <sup>(20,28,41)</sup>, d'où l'importance de développer et de s'intéresser à toutes techniques d'analyse mycologique indépendantes de la viabilité et de la culture. La méthode utilisant l'approche de la q-PCR universelle a démontré ici les meilleures performances avec une limite de détection équivalent à 130 spores/100 cm<sup>2</sup> et des pourcentages de répliquabilité et de répétabilité légèrement au-dessus de 1 %. De plus, le système moléculaire utilisé a montré d'excellentes sélectivité et spécificité. Toutes les moisissures testées ont été amplifiées alors qu'aucune bactérie n'a produit de résultats faussement positifs. Plusieurs études ont utilisé des amorces et des sondes moléculaires pour documenter les moisissures présentes dans divers milieux comme les hôpitaux <sup>(108)</sup>, les maisons <sup>(109,107)</sup> et les garderies <sup>(110)</sup>. Par contre, contrairement au système universel utilisé dans la présente étude pour les poussières des systèmes de ventilation, leurs études utilisaient des systèmes de détection spécifique limitant l'analyse à une ou à quelques moisissures seulement. Ces systèmes ne peuvent fournir d'information sur la charge mycologique totale et ne sont pas utilisables pour de telles évaluations des poussières déposées des systèmes de ventilation. La charge mycologique totale doit être évaluée lors des analyses des poussières des systèmes de ventilation puisque l'objectif n'est pas de faire une évaluation de la contamination en comparant

les types de moisissures présentes, mais préférablement de faire l'évaluation de la salubrité des systèmes en fonction d'une charge globale de moisissures.

### 4.3 Comparaison des méthodes analytiques

Une approche novatrice de cette étude est l'utilisation d'une extraction commune permettant de réaliser les 4 analyses sur un même extrait. Cette approche préconisée dès le départ a permis l'attribution des variations directement aux différentes méthodes et non pas à une variation entre échantillons. L'inconvénient de cette approche est qu'une seule extraction devait répondre à l'ensemble des exigences de toutes les techniques analytiques. L'impact direct est l'augmentation des limites de détection puisque le volume d'extraction utilisé devait être suffisant pour la réalisation des 4 analyses. Pour certaines méthodes, comme celle de la q-PCR, cet inconvénient n'a que très peu d'impacts alors que pour d'autres, comme celle de la NAHA, cela est majeur.

#### 4.3.1 Essais en chambre d'exposition

Les masses de poussières générées et les concentrations de moisissures obtenues lors des essais dans l'enceinte se situent à l'intérieur des niveaux établis lors des essais en situation réelle dans les systèmes de ventilation (Tableau 8). Cela démontre l'intérêt de la méthodologie d'exposition à l'aide d'une enceinte qui permet aux expérimentateurs d'ajuster l'importance des dépôts et leur degré de contamination en situation contrôlée.

Le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer (Tableau 8) a permis de déterminer que la culture produisait des concentrations qui étaient significativement plus faibles que celles rapportées par la NAHA et la q-PCR, contrairement à celles obtenues par microscopie. La q-PCR produit des concentrations significativement différentes des trois autres méthodes. La NAHA est celle qui rapporte les concentrations moyennes les plus élevées. La culture se limite à la flore viable et cultivable et sa sous-performance n'est pas étonnante puisque les trois autres méthodes d'analyse permettent l'évaluation de la flore totale (spores et hyphes). Ce qui est surprenant au regard des résultats obtenus à partir de l'enceinte, c'est la piètre performance de la méthode par microscopie lorsqu'on la compare à la méthode par culture. La méthode par microscopie aurait dû générer des concentrations plus élevées que celles par culture parce qu'elle évalue le nombre total de spores et pas seulement la flore cultivable. Une proportion de moisissures cultivables variant entre 0,7 et 4,4 % a été rapportée dans les poussières des conduits de ventilation lorsque comparée aux spores totales<sup>(62)</sup>. Une telle proportion était attendue lors de ce projet, même pour les essais en milieu contrôlé. Bien que difficilement explicables, ces résultats pourraient être attribués au fait que la méthode de dénombrement des cellules microbiennes par microscopie est semi-quantitative et doit être considérée comme une estimation de la charge microbienne<sup>(23,64,85)</sup>. La difficulté de distinguer les spores des particules de poussières peut aussi expliquer ces résultats. Malgré les qualifications professionnelles des analystes, une grande variation des comptes est parfois observable<sup>(111,112,64)</sup>.

Les corrélations de Pearson ont permis de comparer les comportements des différentes méthodes, et ce, pour différentes charges mycologiques et densités apparentes de poussière. Une corrélation avait déjà été démontrée entre le dosage de la NAHA et l'ergostérol comme indicateur de

biomasse mycologique sur le gypse et dans les poussières<sup>(64,84)</sup>. Madsen a aussi démontré une corrélation significative avec la méthode de culture et celle du dénombrement microscopique des spores pour des échantillons d'air<sup>(56)</sup>. Dans ce projet, aucune corrélation significative n'a été obtenue, et ce, peu importe la méthode avec laquelle la NAHA a été mise en relation. Ce manque de corrélation pourrait être relié à la modification de la méthode et à sa limite de détection beaucoup plus élevée. En effet, puisque plusieurs échantillons étaient à la limite de détection de la méthode, l'évaluation statistique d'une relation est devenue difficile. La microscopie est corrélée avec la q-PCR universelle (0,45) ainsi qu'avec la culture des spores de moisissures (0,61) (Tableau 9). La meilleure corrélation est obtenue entre la q-PCR et la culture sur milieu gélosé. Pour ces deux méthodes, un coefficient de corrélation de 0,82 a été atteint. Cela démontre que les deux méthodes pourraient être de bon prédicteur.

### 4.3.2 Essais en situations réelles

Les masses de poussières prélevées en situations réelles dans les conduits des systèmes de ventilation ont varié entre 5 et 640 mg/100 cm<sup>2</sup> avec une moyenne de 50 mg/100 cm<sup>2</sup>. Lorsque comparées à l'étude sur les critères de déclenchement de Lavoie et collaborateurs (2011), les masses moyennes de poussières mesurées sont plus élevées. Dans la première étude, la moyenne des masses de poussières prélevées était de 10 mg/100 cm<sup>2</sup>, le minimum était de 0,4 mg/100 cm<sup>2</sup> et le maximum de 330 mg/100 cm<sup>2</sup>. De fait, dans une étude menée dans quelques systèmes de ventilation de tours de bureaux, Collett et Baer ont rapporté une masse moyenne des poussières retrouvées par la méthode NADCA de 120 mg/100 cm<sup>2</sup>, soit un résultat deux fois plus élevé que ceux rapportés dans notre étude<sup>(113)</sup>. La différence principale provient certainement des systèmes de ventilation ciblés. En effet, dans leur étude, les systèmes ciblés devaient tous être nettoyés et les prélèvements étaient réalisés avant et après le nettoyage<sup>(113)</sup>, alors que dans la présente étude, les systèmes de ventilation n'étaient pas sélectionnés en fonction d'un nettoyage éminent. Une autre partie de la différence est directement attribuable à la cassette de prélèvement EMS qui est beaucoup plus performante pour le prélèvement des poussières. En effet, comme montré précédemment à la sous-section 4.1, cette cassette permet de prélever 98 % des poussières déposées sur les surfaces et plus de deux fois la masse de poussières prélevées par la méthode de l'ASPEC.

Le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer (Tableau 8) des résultats obtenus des échantillonnages en situation réelle confirme que la méthode par culture produit des concentrations significativement plus faibles que les trois autres. La q-PCR donne des concentrations significativement différentes des trois autres. La NAHA est encore la méthode qui rapporte les concentrations moyennes les plus élevées qui s'expliquent de la même façon que précédemment. Toutefois, plus de 75 % des résultats frôlent la limite de détection ce qui provoque un biais important de la concentration moyenne rapportée qui ne peut être ignoré lors du choix définitif d'une méthode. Dans cette étude, en raison de ce biais important, la capacité de rapporter des concentrations les plus élevées ne doit pas influencer le choix de la méthode. Contrairement aux essais réalisés dans l'enceinte d'exposition, la méthode par microscopie a produit des concentrations significativement plus élevées que la méthode par culture et que celle de la q-PCR universelle. L'obtention de concentrations plus élevées par cette méthode est corroborée par ce qui est rapporté dans la littérature. Une explication de cette disparité entre les rapports des concentrations obtenus pour les deux séries d'échantillons résiderait dans le

changement de l'analyste entre les essais contrôlés et ceux en situation réelle. Stahl recommande autant que possible de ne pas changer d'analyste puisque le caractère subjectif de l'analyse risque d'en influencer la précision<sup>(112)</sup>. Cela expliquerait ces différences, car deux analystes avec des niveaux d'expertise différents, malgré leur excellente formation, ont été impliqués dans chaque série d'échantillonnages.

Les corrélations de Pearson ont permis de vérifier les corrélations entre les différentes méthodes pour les essais en situation réelle. Contrairement aux essais réalisés dans l'enceinte, il est possible d'observer des corrélations significatives entre toutes les méthodes. La méthode NAHA, qui ne présentait aucune corrélation significative lors des essais en situation contrôlée, possède maintenant des coefficients de corrélation significatifs variant entre 0,24 et 0,43 avec les autres. Bien que ces coefficients soient relativement faibles, ils demeurent significatifs avec un niveau de probabilité inférieure à 0,05.

La microscopie est corrélée avec la q-PCR universelle (0,54) et la culture des spores de moisissures (0,564). La meilleure corrélation demeure celle entre le q-PCR et la culture bien qu'elle soit inférieure à la corrélation observée lors des essais dans l'enceinte. Cette constatation est contraire à celle rapportée dans une étude réalisée avec des poussières déposées pour laquelle les résultats issus de la q-PCR et de la culture n'étaient aucunement corrélés (109). La méthode de la q-PCR utilisée dans leur étude ciblait quelques groupes spécifiques de moisissures et non la charge mycologique totale comme c'est le cas avec le système de la q-PCR universelle utilisé ici. Cette différence majeure peut expliquer la disparité observée entre les niveaux de corrélation des deux études.

#### **4.4 Masse de poussières et biomasse mycologique comme indicateur de salubrité**

Selon l'étude de Lavoie et collaborateurs (2011), la masse recommandée pour le déclenchement d'un nettoyage doit être de 23 mg lorsque la méthode de prélèvement proposée est celle de l'ASPEC. Ce seuil avait été établi à l'aide d'un croisement entre le jugement de plusieurs experts d'après leur inspection visuelle et les masses prélevées dans les systèmes. Dans la présente étude, 85 % des échantillons prélevés en situation réelle étaient supérieurs à ce niveau de déclenchement. Par contre, comme rapporté, la cassette EMS a une efficacité de prélèvement 2,5 fois supérieure à celle obtenue par la méthode de l'ASPEC utilisée dans l'étude de Lavoie et collaborateurs<sup>(50)</sup>. Un ajustement du critère de déclenchement doit donc être effectué. En effet, si une cassette EMS avait été utilisée dans l'étude de 2011, la masse recueillie aurait été d'environ 2,5 fois plus que 23 mg soit de 58 mg. D'après ces résultats, un critère temporaire de salubrité de 58 mg est proposé lorsqu'une cassette EMS est utilisée. Les auteurs soulignent l'importance d'utiliser ce nouveau critère lorsque la cassette EMS est utilisée, afin d'éviter que de nombreux nettoyages ne soient inutilement effectués. En utilisant ce nouveau critère qui tient compte de l'efficacité accrue du prélèvement de la cassette ESM, plus de 65 % des échantillons respecteraient maintenant le critère de salubrité (Tableau 13). D'autres travaux qui dépassent le cadre de ce projet sont toutefois nécessaires pour établir un critère conforme basé sur la cassette EMS.

**Tableau 13 : Pourcentage d'échantillons prélevés dans les systèmes de ventilation nécessitant un nettoyage, selon les indicateurs de poussières proposés dans la littérature et cette étude**

	<b>Indicateur</b>	<b>Critère de déclenchement</b>	<b>% des systèmes nécessitant un nettoyage</b>
<b>Inspection visuelle</b>	Poussière (moyenne et élevée)	Subjectif	30
<b>ASPEC (Lavoie <i>et al.</i> 2011)</b>	Poussières	23 mg/ 100 cm <sup>2</sup>	85
<b>NADCA (2006)</b>	Poussières	0,75 mg/100 cm <sup>2</sup>	100
<b>Nordic Ventilation Group (Eduard 2007)</b>	Poussières	50 mg/100 cm <sup>2</sup>	58
<b>IRSST/EMS (cette étude)</b>	<b>Poussières</b>	<b>58 mg/100 cm<sup>2</sup></b>	<b>37</b>

En considérant la charge mycologique, le Tableau 14 présente le pourcentage des systèmes ne répondant pas aux critères proposés par certains groupes ainsi que le critère utilisant la méthode de la q-PCR de cette étude.

Selon plusieurs études, des proportions de la flore cultivable variant entre 1 et 80 % sont rapportées selon les milieux étudiés <sup>(114-116,62,63)</sup>. Dans les conduits des systèmes de ventilation, Pasanen et collaborateurs rapportent des proportions inférieures à 5 % lorsqu'évaluées à partir de la microscopie <sup>(62)</sup>. Ils soulignent que la proportion de la flore cultivable est légèrement plus élevée dans les conduits de retour que dans ceux de l'alimentation. Les mêmes proportions sont observables dans la présente étude où la flore cultivable dans les conduits d'alimentation est de 4,38 % et de 4,89 % dans les retours. Par contre, lorsqu'évaluées avec la q-PCR universelle, les proportions sont plus grandes soit de 10,5 et 11,6 %, respectivement. À la connaissance des auteurs, aucune étude n'a rapporté des proportions de la flore cultivable dans les poussières des conduits de ventilation par rapport à une analyse faite avec une méthode de q-PCR universelle. La proportion obtenue se rapproche des valeurs rapportées dans d'autres situations par d'autres auteurs.

**Tableau 14 : Pourcentage d'échantillons prélevés dans les systèmes de ventilation nécessitant un nettoyage, selon les indicateurs de moisissures proposés dans la littérature et cette étude**

	<b>Indicateur</b>	<b>Critère de déclenchement</b>	<b>% des systèmes nécessitant un nettoyage</b>
<b>NADCA</b>	Moisissures cultivables	15 000 UFC/g	20
<b>Hunter <i>et al.</i> (2000)</b>	Moisissures cultivables	200 UFC/100 cm <sup>2</sup>	54
<b>Rask <i>et al.</i> (2002)</b>	Moisissures cultivables	10 <sup>6</sup> UFC/g	2
<b>Nordic Ventilation Group (Eduard 2007)</b>	Moisissures cultivables	3 000 UFC/g	70
<b>q-PCR</b>	Équivalent spores	300 000 spores/g	46

La masse de poussières déposée pourrait être un bon indicateur de salubrité pour certains échantillons alors que pour d'autres, la charge mycologique apparaîtrait meilleure. En effet, certains des échantillons-terrains avaient des niveaux de poussière acceptables, soit inférieur à 58 mg/100 cm<sup>2</sup>, malgré des charges de contamination mycologiques particulièrement élevées. La Figure 24 démontre bien, qu'à elle seule, la masse de poussières ne peut permettre de qualifier adéquatement la salubrité d'un système de ventilation. En considérant la q-PCR comme méthode de choix et en sachant qu'elle produit des concentrations environ 20 fois supérieures à la culture dans les poussières selon cette étude, une concentration de 300 000 équivalents de spores/g semblerait une recommandation acceptable pour un critère de salubrité mycologique. Cette proposition découle de la concentration en flore cultivable proposée par la NADCA de 15 000 UFC/g et de 5 % de la flore cultivable. Avec la q-PCR et le critère de 300 000 équivalents de spores/g, plusieurs échantillons jugés salubres selon la masse ne le seraient vraisemblablement pas du point de vue mycologique. Avec ce nouveau critère, 139 échantillons auraient dépassé le seuil, soit 46 % au total. Si le critère de la masse de poussières est ensuite ajouté à celui de la q-PCR mycologique, c'est 14 % d'échantillons supplémentaires qui dépasseraient ces seuils.

Ce projet met en évidence que la salubrité des conduits des systèmes de ventilation doit nécessairement être jugée en fonction de deux critères : un relié à la charge mycologique et l'autre à la masse de poussières déposée. Des critères ont été proposés, mais les auteurs sont conscients que le travail n'avait pas été conçu à l'origine pour faire de telles propositions. Des études subséquentes sont par conséquent nécessaires afin de les valider.



## 5. LIMITES ET RETOMBÉES

La méthode par microscopie est très simple et peu coûteuse; elle est malheureusement grandement influencée par la subjectivité de l'analyste et la charge de poussières. Le changement d'analyste entre les deux séries de prélèvement rend les conclusions plus difficiles à tirer et plus incertaines pour cette méthode. Il est possible qu'elle soit une méthode de choix selon la capacité de l'analyste à distinguer les structures mycologiques ou selon la nature de l'échantillon. Mais il n'en demeure pas moins que ces influences ne peuvent être ignorées et justifient son retranchement des méthodes de choix.

Cette étude ne permet pas de mettre en place une stratégie d'intervention visant à déterminer le nombre minimal de prélèvements nécessaires à l'évaluation de la salubrité d'un système. L'objectif de l'étude était de mettre en place une méthode d'analyse permettant l'évaluation de la salubrité mycologique. Bien que la stratégie d'échantillonnage soit un facteur très important lors de la détermination de la salubrité d'un système, celle-ci ne peut être abordée à partir des données de l'étude.

Le critère temporaire de la masse proposé pour un prélèvement avec une cassette EMS devrait être validé par des travaux supplémentaires. Il est proposé afin de rendre applicable dès maintenant les résultats de cette étude.

De la même façon, le niveau maximal de 300 000 équivalents de spore/g par la méthode de la q-PCR universelle est une proposition pour les systèmes de ventilation, mais pourrait peut-être également être utilisé pour d'autres milieux. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour valider ce critère.

Le système de la q-PCR universelle utilisé dans la présente étude pour déterminer la charge mycologique est utilisable dans tous les environnements et matrices dans lesquels la charge totale de moisissures doit être déterminée.



## **6. CONCLUSION**

Ce projet a permis de proposer une approche améliorée, optimisée et très performante pour effectuer des prélèvements de poussières déposées dans les conduits des systèmes de ventilation. Une cassette EMS manufacturée avec un bec collecteur intégré et une pesée complète de celle-ci ont permis d'atteindre une efficacité de prélèvement de plus de 98 %.

La méthode de la q-PCR universelle, validée pour la charge mycologique de poussières, s'est avérée simple, rapide et performante. Sa limite de détection est très faible et ses délais de traitement sont de moins de 24 heures. En raison de ses performances, de ses coûts réduits et du temps d'analyse nécessaire, la q-PCR universelle est, à ce stade, la méthode la plus propice à l'évaluation de la salubrité des systèmes de ventilation. Il s'agit d'une méthode avantageuse permettant l'évaluation de la salubrité des conduits des systèmes de ventilation ainsi que la qualification d'un nettoyage.

Ce projet a clairement démontré que la masse de poussières ne peut à elle seule déterminer la salubrité d'un système. Des moisissures en concentrations élevées ont été mesurées dans des masses de poussières faibles. La masse déposée n'est pas indicatrice de la charge mycologique dans la poussière.



## BIBLIOGRAPHIE

- (1) BURGE, P. S., M. FINNEGAN, N. HORSFIELD, D. EMERY, P. AUSTWICK, P. S. DAVIES et C. A. PICKERING (avril 1985). « Occupational asthma in a factory with a contaminated humidifier. », *Thorax*, vol. 40, n° 4, p. 248-254.
- (2) POPE, A. M., R. PATTERSON, H. BURGE et INSTITUTE OF MEDICINE (dir.) (1993). *Indoor allergens: assessing and controlling adverse health effects*, Washington, DC, National Academy Press.
- (3) MENDELL, M. J., G. M. NACO, T. G. WILCOX et W. K. SIEBER (juin 2003). « Environmental risk factors and work-related lower respiratory symptoms in 80 office buildings: An exploratory analysis of NIOSH data », *American Journal of Industrial Medicine*, [en ligne], vol. 43, n° 6, p. 630-641, <<https://doi.org/10.1002/ajim.10211>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (4) KRAUTER, P., et A. BIERMANN (1 avril 2007). « Reaerosolization of Fluidized Spores in Ventilation Systems », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 73, n° 7, p. 2165-2172, <<https://doi.org/10.1128/AEM.02289-06>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (5) LAVOIE, J., A. BAHLOUL, Y. CLOUTIER et R. GRAVEL (2010). « Cleaning initiation criteria for heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems in non-industrial buildings », *Extraction*, [en ligne], vol. 180, p. 0-1, <[http://www.inive.org/members\\_area/medias/pdf/Inive/clima2007/A10/A10C1143.pdf](http://www.inive.org/members_area/medias/pdf/Inive/clima2007/A10/A10C1143.pdf)> (consulté le 20 janvier 2016).
- (6) LAVOIE, J., et L. LAZURE (1994). *Guide de prévention contre la prolifération microbienne dans les système de ventilation*, [en ligne], <<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/RG-088.pdf>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (7) BERNSTEIN, R. S., W. G. SORENSON, D. GARABRANT, C. REAUX et R. D. TREITMAN (mars 1983). « Exposures to Respirable, Airborne Penicillium from a Contaminated Ventilation System: Clinical, Environmental and Epidemiological Aspects », *American Industrial Hygiene Association Journal*, [en ligne], vol. 44, n° 3, p. 161-169, <<https://doi.org/10.1080/15298668391404581>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (8) LI, Y., G. M. LEUNG, J. W. TANG, X. YANG, C. Y. H. CHAO, J. Z. LIN, J. W. LU, P. V. NIELSEN, J. NIU, H. QIAN, A. C. SLEIGH, H.-J. J. SU, J. SUNDELL, T. W. WONG et P. L. YUEN (février 2007). « Role of ventilation in airborne transmission of infectious agents in the built environment ? a multidisciplinary systematic review », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 17, n° 1, p. 2-18, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2006.00445.x>> (consulté le 29 mars 2016).
- (9) MENZIES, D., J. POPA, J. A. HANLEY, T. RAND et D. K. MILTON (2003). « Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers' health and

- wellbeing: double-blind multiple crossover trial », *The Lancet*, [en ligne], vol. 362, n° 9398, p. 1785–1791, <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603148970>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (10) MENZIES, D., et J. BOURBEAU (1997). « Building-related illnesses », *New England Journal of Medicine*, [en ligne], vol. 337, n° 21, p. 1524–1531, <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199711203372107>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (11) LEECH, J. A., M. RAIZENNE et J. GUSDORF (juin 2004). « Health in occupants of energy efficient new homes », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 14, n° 3, p. 169–173, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2004.00212.x>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (12) MANDAL, J., et H. BRANDL (2011). « Bioaerosols in indoor environment-a review with special reference to residential and occupational locations », *Open Environmental and Biological Monitoring Journal*, [en ligne], vol. 4, p. 83–96, <<http://www.benthamopen.com/contents/pdf/TOEBMJ/TOEBMJ-4-83.pdf>> (consulté le 19 novembre 2015).
- (13) AGER, B. P., et J. A. TICKNER (1983). « The control of microbiological hazards associated with air-conditioning and ventilation systems », *Annals of Occupational Hygiene*, [en ligne], vol. 27, n° 4, p. 341–358, <<https://doi.org/10.1093/annhyg/27.4.341>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (14) AHEARN, D. G., S. A. CROW, R. B. SIMMONS, D. L. PRICE, J. A. NOBLE, S. K. MISHRA et D. L. PIERSON (mai 1996). « Fungal colonization of fiberglass insulation in the air distribution system of a multi-story office building: VOC production and possible relationship to a sick building syndrome », *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 16, n° 5, p. 280–285.
- (15) NADCA (2006). *Assessment, cleaning and restoration of HVAC systems*, [en ligne], <[https://powervac.ca/pdf/ACR\\_2006.pdf](https://powervac.ca/pdf/ACR_2006.pdf)> (consulté le 20 janvier 2016).
- (16) BLACKWELL, M. (1 mars 2011). « The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? », *American Journal of Botany*, [en ligne], vol. 98, n° 3, p. 426–438, <<https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>> (consulté le 11 janvier 2016).
- (17) MALLOCH, D. (1997). *Moulds: isolation, cultivation, identification*, Department of Botany, University of Toronto Toronto.
- (18) GRANT, C., C. A. HUNTER, B. FLANNIGAN et A. F. BRAVERY (1989). « The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings », *International Biodeterioration*, vol. 25, n° 4, p. 259–284.
- (19) FOARDE, K. K., D. W. VANOSDELL et J. C. S. CHANG (juin 1996). « Evaluation of Fungal Growth on Fiberglass Duct Materials for Various Moisture, Soil, Use, and Temperature

- Conditions », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 6, n° 2, p. 83-92, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.1996.t01-2-00004.x>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (20) MÉHEUST, D., P. LE CANN, G. REBOUX, L. MILLON et J.-P. GANGNEUX (août 2014). « Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces », *Critical Reviews in Microbiology*, [en ligne], vol. 40, n° 3, p. 248-260, <<https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.777687>> (consulté le 26 janvier 2015).
- (21) MENSAH-ATTIPOE, J., T. REPONEN, A. SALMELA, A.-M. VEIJALAINEN et P. PASANEN (juin 2015). « Susceptibility of green and conventional building materials to microbial growth », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 25, n° 3, p. 273-284, <<https://doi.org/10.1111/ina.12140>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (22) HALEWYN, M.-A. D', J.-M. Leclerc, N. King, M. Bélanger, M. Legris, Y., Frenette, INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC, environnementaux Et occupationnels DIRECTION DES RISQUES BIOLOGIQUES et LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC (2002). *Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur rapport scientifique*, [en ligne], [Montréal], Institut national de santé publique Québec, Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels et Laboratoire de santé publique du Québec, [https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/126\\_RisquesMoisissuresMilieuInterieur.pdf](https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/126_RisquesMoisissuresMilieuInterieur.pdf) (consulté le 25 janvier 2016).
- (23) MACHER, J., et H. M. AMMANN (1999). *Bioaerosols: assessment and control*, Cincinnati, Ohio, ACGIH.
- (24) VERHOEFF, A. P., et H. A. BURGE (1997). « Health risk assessment of fungi in home environments », *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, [en ligne], vol. 78, n° 6, p. 544-556, <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1081120610632140>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (25) KORPI, A., J. P. KASANEN, Y. ALARIE, V. M. KOSMA et A. L. PASANEN (octobre 1999). « Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs », *Archives of Environmental Health*, vol. 54, n° 5, p. 347-352.
- (26) RYLANDER, R. (juin 1999). « Indoor air-related effects and airborne (1 --> 3)-beta-D-glucan. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, n° Suppl 3, p. 501-503.
- (27) MAZUR, L. J., et J. KIM (1 décembre 2006). « Spectrum of Noninfectious Health Effects From Molds », *PEDIATRICS*, [en ligne], vol. 118, n° 6, p. e1909-e1926, <<https://doi.org/10.1542/peds.2006-2829>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (28) EDUARD, W. (2007). *The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals: 139. Fungal spores*, Stockholm, National Institute for Working Life.

- (29) FISCHER, G., et W. DOTT (février 2003). « Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene », *Archives of Microbiology*, vol. 179, n° 2, p. 75-82.
- (30) HUSMAN, T. (1996). « Health effects of indoor-air microorganisms », *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, vol. 22, n° 1, p. 5-13.
- (31) HESELTINE, E., et J. ROSEN (2009). *WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould*, Copenhagen, WHO.
- (32) RYLANDER, R., M. NORRHALL, U. ENGDahl, A. TUNSATER et P. G. HOLT (1998). « Airways inflammation, atopy, and (1→ 3)- $\beta$ -D-glucan exposures in two schools », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 158, n° 5, p. 1685-1687.
- (33) DOUWES, J., A. ZUIDHOF, G. DOEKES, S. VAN DER ZEE, I. WOUTERS, H. MARIKE BOEZEN et B. BRUNEKREEF (2000). « (1→ 3)- $\beta$ -D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children », *American journal of respiratory and critical care medicine*, [en ligne], vol. 162, n° 4, p. 1348-1354, <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.162.4.9909118>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (34) BERTELSEN, R. J., K. C. LØDRUP CARLSEN, K.-H. CARLSEN, B. GRANUM, G. DOEKES, G. HÅLAND, P. MOWINCKEL et M. LØVIK (février 2010). « Childhood asthma and early life exposure to indoor allergens, endotoxin and  $\beta$ (1,3)-glucans », *Clinical & Experimental Allergy*, [en ligne], vol. 40, n° 2, p. 307-316, <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03424.x>> (consulté le 30 mars 2016).
- (35) REBOUX, G. (avril 2006). « Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques », *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, [en ligne], vol. 46, n° 3, p. 208-212, <<https://doi.org/10.1016/j.allerg.2006.01.036>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (36) GARRETT, RAYMENT, HOOPER, ABRAMSON et HOOPER (avril 1998). « Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children », *Clinical and Experimental Allergy*, [en ligne], vol. 28, n° 4, p. 459-467, <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00255.x>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (37) JARVIS, J. Q., et P. R. MOREY (janvier 2001). « Allergic Respiratory Disease and Fungal Remediation in a Building in a Subtropical Climate », *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, [en ligne], vol. 16, n° 3, p. 380-388, <<https://doi.org/10.1080/10473220117482>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (38) MEKLIN, T., T. HUSMAN, J. PEKKANEN, A. HYVÄRINEN, M. R. HIRVONEN et A. NEVALAINEN (2002). « Effects of moisture-damage repair on microbial exposure and

- health effects in schools », *Proceeding of Indoor Air*, [en ligne], p. 416–420, <[https://www.google.ca/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjyuYGIbPQAhUS24MKHZQyDc0QFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.irbnet.de%2Fdaten%2Ficonda%2FCIB7136.pdf&usg=AFQjCNGy5j60j5ais\\_8siFksoCMQ\\_hJkQ&sig2=f0SfFuQsMNUYZMje3DmHUw&cad=rja](https://www.google.ca/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjyuYGIbPQAhUS24MKHZQyDc0QFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.irbnet.de%2Fdaten%2Ficonda%2FCIB7136.pdf&usg=AFQjCNGy5j60j5ais_8siFksoCMQ_hJkQ&sig2=f0SfFuQsMNUYZMje3DmHUw&cad=rja)> (consulté le 20 janvier 2016).
- (39) PARK, J.-H., J. COX-GANSER, C. RAO et K. KREISS (juin 2006). « Fungal and endotoxin measurements in dust associated with respiratory symptoms in a water-damaged office building », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 16, n° 3, p. 192-203, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2005.00415.x>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (40) EDUARD, W. (2009). « Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting », *Critical Reviews in Toxicology*, [en ligne], vol. 39, n° 10, p. 799-864, <<https://doi.org/10.3109/10408440903307333>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (41) EDUARD, W., D. HEEDERIK, C. DUCHAINE et B. J. GREEN (2012). « Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances », *Journal of Environmental Monitoring*, [en ligne], vol. 14, n° 2, p. 334, <<https://doi.org/10.1039/c2em10717a>> (consulté le 25 janvier 2016).
- (42) SUVA, P. De la santé au poste de travail (2015). *Valeurs limites d'exposition aux postes de travail*, [en ligne], <<https://extra.suva.ch/webshop/54/54BC7469D03481C0E10080000A63035B.pdf>> (consulté le 18 novembre 2015).
- (43) NADCA (1992). *Mechanical Cleaning of Non-porous Air Conveyance System Components*, National Air Duct Cleaners Association.
- (44) RASK, D., T. LEWIS et C. MAKI (2002). « Bulk Sampling of Dust Loading in Ductwork », dans, *Indoor Air*, Monterey, California, p. 700-704.
- (45) CARLETTI, C., G. F. CELLAI, G. RAFFELLINI et F. SCIURPI (2003). « Air quality and ductwork contamination: state of the art and guidelines », dans, *Air pollution XI: International conference on modelling, monitoring and management of air pollution.*, Catania, Italie, WIT Press., Southampton. Royaume-Uni., p. 413-422.
- (46) HUNTER, C. A., P. F. GRIGG, J. T. SMITH et CHARTERED INSTITUTION OF BUILDING SERVICES ENGINEERS (2000). *Hygienic maintenance of office ventilation ductwork*, [en ligne], <<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHMOVDCI3/hygienic-maintenance-of>> (consulté le 3 novembre 2016).
- (47) RSST (2014). « Règlement sur la santé et la sécurité du travail », <[http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S\\_2\\_1/S2\\_1R13.HTM](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S_2_1/S2_1R13.HTM)> (consulté le 3 novembre 2014).

- (48) QUÉBEC (PROVINCE), MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX et DIRECTION DES COMMUNICATIONS (1999-) (2011). *Guide de qualité de l'air intérieur dans les établissements du réseau de la santé et des services sociaux répertoire des guides de planification immobilière: guides généraux.*, [en ligne], Québec, Direction des communications, Ministère de la santé et des services sociaux, <<http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/2096797>> (consulté le 3 novembre 2016).
- (49) ASPEC (2004). *Maintien en propreté des réseaux aérauliques pour salles propres et environnements maîtrisés apparentés*, Paris (10 Bd Diderot, 75012), ASPEC.
- (50) LAVOIE, J., G. MARCHAND, Y. CLOUTIER et J. LAVOUÉ (2011). « Validation of the Criteria for Initiating the Cleaning of Heating, Ventilation, and Air-Conditioning (HVAC) Ductwork Under Real Conditions », *Journal of occupational and environmental hygiene*, vol. 8, n° 8, p. 467-472.
- (51) SARAF, A., L. LARSSON, H. BURGE et D. MILTON (1997). « Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a Limulus amebocyte lysate assay. », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 63, n° 7, p. 2554–2559, <<http://aem.asm.org/content/63/7/2554.short>> (consulté le 2 février 2016).
- (52) GOYER, N., J. LAVOIE, LAZURE LOUIS et MARCHAND (2001). *Les bioaérosols en milieu de travail: guide d'évaluation, de contrôle et de prévention*, Montréal, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail du Québec.
- (53) IRSST (2005). *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail*, [en ligne], IRSST (Institut de recherche en santé et en sécurité du travail), <[http://www.airtechnovac.com/pdf/T06-Guide\\_echantillonnage\\_contaminants\\_air\\_milieudetravail.pdf](http://www.airtechnovac.com/pdf/T06-Guide_echantillonnage_contaminants_air_milieudetravail.pdf)> (consulté le 21 septembre 2015).
- (54) NEVALAINEN, A., M. TÄUBEL et A. HYVÄRINEN (avril 2015). « Indoor fungi: companions and contaminants », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 25, n° 2, p. 125-156, <<https://doi.org/10.1111/ina.12182>> (consulté le 20 juillet 2015).
- (55) LARSSON, L. (1994). « Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry-potential for diagnosis and studies on metabolism in situ », *Apmis*, [en ligne], vol. 102, n° 1-6, p. 161–169, <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1699-0463.1994.tb04861.x/abstract>> (consulté le 2 février 2016).
- (56) MADSEN, A. M. (2003). « NAGase activity in airborne biomass dust and relationship between NAGase concentrations and fungal spores », *Aerobiologia*, [en ligne], vol. 19, n° 2, p. 97–105, <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1024401523656>> (consulté le 2 février 2016).

- (57) FOTO, M., L. L. P. VRIJMOED, J. D. MILLER, K. RUEST, M. LAWTON et R. E. DALES (août 2005). « A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 15, n° 4, p. 257-266, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2005.00370.x>> (consulté le 2 février 2016).
- (58) NYLUND, J.-E., et H. WALLANDER (1992). « 5 Ergosterol Analysis as a Means of Quantifying Mycorrhizal Biomass », dans *Methods in Microbiology*, [en ligne], Elsevier, p. 77-88, <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0580951708700886>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (59) MILLER, J. D., et J. C. YOUNG (1997). « The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air », *American Industrial Hygiene Association Journal*, vol. 58, n° 1, p. 39-43.
- (60) MILLE-LINDBLOM, C., E. VON WACHENFELDT et L. J. TRANVIK (novembre 2004). « Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death », *Journal of Microbiological Methods*, [en ligne], vol. 59, n° 2, p. 253-262, <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.010>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (61) RAO, C. Y., J. M. COX-GANSER, G. L. CHEW, G. DOEKES et S. WHITE (2005). « Use of surrogate markers of biological agents in air and settled dust samples to evaluate a water-damaged hospital », *Indoor Air*, vol. 15 Suppl 9, p. 89-97.
- (62) PASANEN, A.-L., L. KUJANPÄÄ, P. PASANEN, P. KALLIOKOSKI et G. BLOMQUIST (1997). « Culturable and Total Fungi in Dust Accumulated in Air Ducts in Single-Family Houses », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 7, n° 2, p. 121-127, <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.1997.t01-2-00006.x/abstract>> (consulté le 16 octobre 2014).
- (63) TOIVOLA, M., S. ALM, T. REPONEN, S. KOLARI et A. NEVALAINEN (février 2002). « Personal exposures and microenvironmental concentrations of particles and bioaerosols », *Journal of environmental monitoring: JEM*, vol. 4, n° 1, p. 166-174.
- (64) REESLEV, M., M. MILLER et K. F. NIELSEN (1 juillet 2003). « Quantifying Mold Biomass on Gypsum Board: Comparison of Ergosterol and Beta-N-Acetylhexosaminidase as Mold Biomass Parameters », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 69, n° 7, p. 3996-3998, <<https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3996-3998.2003>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (65) ALBRECHT, A., R. WITZENBERGER, U. BERNZEN et U. JACKEL (2007). « Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods », *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, [en ligne], vol. 14, n° 1, p. 81, <<http://www.aem.pl/pdf/14081.pdf>> (consulté le 18 septembre 2015).

- (66) HOBBIÉ, J. E., R. J. DALEY et S. JASPER (mai 1977). « Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, n° 5, p. 1225-1228.
- (67) FRANCISCO, D. E., R. A. MAH et A. C. RABIN (juillet 1973). « Acridine Orange-Epifluorescence Technique for Counting Bacteria in Natural Waters », *Transactions of the American Microscopical Society*, [en ligne], vol. 92, n° 3, p. 416, <<https://doi.org/10.2307/3225245>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (68) FLANNIGAN, B., R. A. SAMSON et J. D. MILLER (dir.) (2001). *Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control*, Boca Raton [Fla.], CRC Press.
- (69) HYSKOVA, V. (2015). « Different Roles of  $\hat{I}^2$ -N-Acetylhexosaminidase in Metabolism », *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, [en ligne], vol. 04, n° 04, <<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000215>> (consulté le 2 février 2016).
- (70) BOWDEN, W. B. (1977). « Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 33, n° 5, p. 1229-1232, <<http://aem.asm.org/content/33/5/1229.short>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (71) PALMGREN, U., G. STRÖM, G. BLOMQUIST et P. MALMBERG (novembre 1986). « Collection of airborne micro-organisms on Nuclepore filters, estimation and analysis--CAMNEA method », *The Journal of Applied Bacteriology*, vol. 61, n° 5, p. 401-406.
- (72) MARCHAND, G. (2006). *Détection moléculaire d'Aspergillus versicolor et comparaison avec les méthodes d'analyses de l'air basées sur les cultures et les comptes de conidies*, Thèse (Ph. D.), Université Laval.
- (73) ADHIKARI, A., D. MARTUZEVICIUS, T. REPONEN, S. A. GRINSHPUN, S.-H. CHO, S. K. SIVASUBRAMANI, W. ZHONG, L. LEVIN, A. L. KELLEY, H. G. ST. CLAIR et G. LEMASTERS (novembre 2003). « Performance of the Button Personal Inhalable Sampler for the measurement of outdoor aeroallergens », *Atmospheric Environment*, [en ligne], vol. 37, n° 34, p. 4723-4733, <<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.08.021>> (consulté le 3 février 2016).
- (74) PREZANT, B., D. M. WEEKES, J. D. MILLER et AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION (dir.) (2008). *Recognition, evaluation, and control of indoor mold*, Fairfax, VA, American Industrial Hygiene Association.
- (75) REPONEN, T., U. SINGH, C. SCHAFFER, S. VESPER, E. JOHANSSON, A. ADHIKARI, S. A. GRINSHPUN, R. INDUGULA, P. RYAN, L. LEVIN et G. LEMASTERS (octobre 2010). « Visually observed mold and moldy odor versus quantitatively measured microbial exposure in homes », *Science of The Total Environment*, [en ligne], vol. 408, n° 22, p. 5565-5574, <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.090>> (consulté le 3 février 2016).

- (76) MANTER, D. K., et J. M. VIVANCO (octobre 2007). « Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 71, n° 1, p. 7-14.
- (77) LARENA, I., O. SALAZAR, V. GONZÁLEZ, M. C. JULIÁN et V. RUBIO (octobre 1999). « Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes », *Journal of Biotechnology*, [en ligne], vol. 75, n° 2-3, p. 187-194, <[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00154-6)> (consulté le 26 janvier 2016).
- (78) GARDES, M., et T. D. BRUNS (avril 1993). « ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts », *Molecular Ecology*, vol. 2, n° 2, p. 113-118.
- (79) ZHOU, G., W.-Z. WHONG, T. ONG et B. CHEN (novembre 2000). « Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment », *Molecular and Cellular Probes*, [en ligne], vol. 14, n° 6, p. 339-348, <<https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0324>> (consulté le 8 juillet 2014).
- (80) WU, Z., X.-R. WANG et G. BLOMQUIST (24 mai 2002). « Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi », *Journal of Environmental Monitoring*, [en ligne], vol. 4, n° 3, p. 377-382, <<https://doi.org/10.1039/b200490a>> (consulté le 17 juillet 2014).
- (81) KHOT, P. D., D. L. KO et D. N. FREDRICKS (15 mars 2009). « Sequencing and Analysis of Fungal rRNA Operons for Development of Broad-Range Fungal PCR Assays », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 75, n° 6, p. 1559-1565, <<https://doi.org/10.1128/AEM.02383-08>> (consulté le 3 février 2016).
- (82) HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK et P. M. WILLIAMS (10 janvier 1996). « Real time quantitative PCR. », *Genome Research*, [en ligne], vol. 6, n° 10, p. 986-994, <<https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>> (consulté le 22 avril 2014).
- (83) WITWER, C. T., M. G. HERRMANN, A. A. MOSS et R. P. RASMUSSEN (1997). « Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification », *Biotechniques*, [en ligne], vol. 22, n° 1, p. 130-139, <<http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf+html>> (consulté le 3 février 2016).
- (84) MILLER, M., A. PALOJÄRVI, A. RANGGER, M. REESLEV et A. KJØLLER (1998). « The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil », *Applied and Environmental Microbiology*, [en ligne], vol. 64, n° 2, p. 613-617, <<http://aem.asm.org/content/64/2/613.short>> (consulté le 3 février 2016).
- (85) KRAUSE, J. D., Y. Y. HAMMAD et L. B. BALL (juillet 2003). « Application of a Fluorometric Method for the Detection of Mold in Indoor Environments », *Applied*

- Occupational and Environmental Hygiene*, [en ligne], vol. 18, n° 7, p. 499-503, <<https://doi.org/10.1080/10473220301457>> (consulté le 20 janvier 2016).
- (86) FOTO, M., J. PLETT, J. BERGHOUT et J. D. MILLER (1 mai 2004). « Modification of the Limulus ameocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [en ligne], vol. 379, n° 1, p. 156-162, <<https://doi.org/10.1007/s00216-004-2583-4>> (consulté le 3 février 2016).
- (87) BEX, V., et F. SQUINAZI (avril 2006). « Mise en évidence de moisissures des ambiances intérieures par la mesure des (1→3)-β-D-glucanes », *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, [en ligne], vol. 46, n° 3, p. 184-187, <<https://doi.org/10.1016/j.allerg.2006.01.018>> (consulté le 26 janvier 2016).
- (88) WOUTERS, I. M., S. SPAAN, J. DOUWES, G. DOEKES et D. HEEDERIK (janvier 2006). « Overview of personal occupational exposure levels to inhalable dust, endotoxin, beta(1-->3)-glucan and fungal extracellular polysaccharides in the waste management chain », *The Annals of Occupational Hygiene*, vol. 50, n° 1, p. 39-53.
- (89) SEO, S.-C., T. REPONEN, L. LEVIN et S. A. GRINSHUPUN (janvier 2009). « Size-fractionated (1→3)-β-D-glucan concentrations aerosolized from different moldy building materials », *Science of The Total Environment*, [en ligne], vol. 407, n° 2, p. 806-814, <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.018>> (consulté le 2 février 2016).
- (90) HEADLEY, J. V., K. M. PERU, B. VERMA et R. D. ROBERTS (juin 2002). « Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural wetland », *Journal of Chromatography A*, [en ligne], vol. 958, n° 1-2, p. 149-156, <[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00326-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00326-6)> (consulté le 26 janvier 2016).
- (91) HOLOPAINEN, R., V. ASIKAINEN, P. PASANEN et O. SEPPANEN (2002). « The field comparison of three measuring techniques for evaluation of the surface dust level in ventilation ducts », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 12, n° 1, p. 47-54, <<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9512269767/article1.pdf>> (consulté le 28 avril 2015).
- (92) ASHLEY, K., G. T. APPLGATE, T. J. WISE, J. E. FERNBACK et M. J. GOLDCAMP (mars 2007). « Evaluation of a Standardized Micro-Vacuum Sampling Method for Collection of Surface Dust », *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, [en ligne], vol. 4, n° 3, p. 215-223, <<https://doi.org/10.1080/15459620601177461>> (consulté le 11 janvier 2016).
- (93) ASHLEY, K., P. SCHLECHT, R. SONG, A. FENG, G. DEWALT et M. MCKNIGHT (1 janvier 1996). « ASTM Sampling Methods and Analytical Validation for Lead in Paint, Dust, Soil, and Air », dans J. Morgan (dir.), *Sampling Environmental Media*, [en ligne], 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, ASTM International, p. 125-125-12, <<http://www.astm.org/doiLink.cgi?STP16568S>> (consulté le 3 février 2016).

- (94) LICHTENWALNER, C. P. (octobre 1992). « Evaluation of Wipe Sampling Procedure and Elemental Surface Contamination », *American Industrial Hygiene Association Journal*, [en ligne], vol. 53, n° 10, p. 657-659, <<https://doi.org/10.1080/15298669291360300>> (consulté le 28 avril 2015).
- (95) BYRNE, M. A. (2000). « Suction methods for assessing contamination on surfaces », *Annals of Occupational Hygiene*, [en ligne], vol. 44, n° 7, p. 523-528, <<http://annhyg.oxfordjournals.org/content/44/7/523.short>> (consulté le 3 février 2016).
- (96) HINTZE, J. (2013). *NCSS -NCSS Statistical Software*, [en ligne], LLC. Kaysville, Utah, USA., NSCC, <<http://www.ncss.com/software/ncss/ncss-documentation/>> (consulté le 18 juillet 2014).
- (97) REYNOLDS, S. J., L. ETRE, P. S. THORNE, P. WHITTEN, M. SELIM et W. J. POPENDORF (juin 1997). « Laboratory Comparison of Vacuum, OSHA, and HUD Sampling Methods for Lead in Household Dust », *American Industrial Hygiene Association Journal*, [en ligne], vol. 58, n° 6, p. 439-446, <<https://doi.org/10.1080/15428119791012685>> (consulté le 7 mars 2016).
- (98) DUFAY, S. K., et M. ARCHULETA (2006). « Comparison of collection efficiencies of sampling methods for removable beryllium surface contamination », *Journal of Environmental Monitoring*, [en ligne], vol. 8, n° 6, p. 630, <<https://doi.org/10.1039/b601526n>> (consulté le 7 mars 2016).
- (99) ASHLEY, K., G. BRAYBROOKE, S. D. JAHN, M. J. BRISSON et K. T. WHITE (30 octobre 2009). « Analytical Performance Criteria: Standardized Surface Dust Sampling Methods for Metals, with Emphasis on Beryllium », *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, [en ligne], vol. 6, n° 12, p. D97-D100, <<https://doi.org/10.1080/15459620903022597>> (consulté le 7 mars 2016).
- (100) ASTM (2011). *D7144-05a Standard Practice for Collection of Surface Dust by Microvacuum Sampling for Subsequent Metals Determination*.
- (101) HEE, S. S. Q., B. PEACE, C. S. CLARK, J. R. BOYLE, R. L. BORNSCHEIN et P. B. HAMMOND (octobre 1985). « Evolution of efficient methods to sample lead sources, such as house dust and hand dust, in the homes of children », *Environmental Research*, [en ligne], vol. 38, n° 1, p. 77-95, <[https://doi.org/10.1016/0013-9351\(85\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0013-9351(85)90074-X)> (consulté le 7 mars 2016).
- (102) GODISH, T. (2001). *Indoor environmental quality*, Boca Raton, Fla, Lewis Publishers.
- (103) KRAUSE, J. D., et Y. Y. HAMMAD (2002). « Measuring the Efficacy of Mold Remediation on Contaminated Ductwork », dans *Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate: Indoor Air*, [en ligne], p. 360-365, <<http://www.irbnet.de/daten/iconda/CIB6609.pdf>> (consulté le 20 janvier 2016).

- (104) MENSAH-ATTIPOE, J., S. SAARI, A.-M. VEIJALAINEN, P. PASANEN, J. KESKINEN, J. T. T. LESKINEN et T. REPONEN (mars 2016). « Release and characteristics of fungal fragments in various conditions », *Science of The Total Environment*, [en ligne], vol. 547, p. 234-243, <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.095>> (consulté le 2 février 2016).
- (105) AMANN, R. I., W. LUDWIG et K. H. SCHLEIFER (mars 1995). « Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation », *Microbiological Reviews*, vol. 59, n° 1, p. 143-169.
- (106) MACNEIL, L., T. KAURI et W. ROBERTSON (août 1995). « Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality of indoor air », *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 41, n° 8, p. 657-665.
- (107) MÉHEUST, D., P. LE CANN, T. REPONEN, J. WAKEFIELD, S. VESPER et J.-P. GANGNEUX (juin 2013). « Possible application of the Environmental Relative Moldiness Index in France: A pilot study in Brittany », *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, [en ligne], vol. 216, n° 3, p. 333-340, <<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.06.004>> (consulté le 26 janvier 2015).
- (108) NEELY, A. N., et M. P. MALEY (2000). « Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic », *Journal of clinical microbiology*, [en ligne], vol. 38, n° 2, p. 724-726, <<http://jcm.asm.org/content/38/2/724.short>> (consulté le 19 août 2015).
- (109) MEKLIN, T., T. REPONEN, C. MCKINSTRY, S.-H. CHO, S. A. GRINSHPUN, A. NEVALAINEN, A. VEPSÄLÄINEN, R. A. HAUGLAND, G. LEMASTERS et S. J. VESPER (15 août 2007). « Comparison of mold concentrations quantified by MSQPCR in indoor and outdoor air sampled simultaneously », *Science of The Total Environment*, [en ligne], vol. 382, n° 1, p. 130-134, <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.03.031>> (consulté le 8 mars 2016).
- (110) CAI, G.-H., K. BRÖMS, B. MÄLARSTIG, Z.-H. ZHAO, J. L. KIM, K. SVÄRDSUDD, C. JANSON et D. NORBÄCK (octobre 2009). « Quantitative PCR analysis of fungal DNA in Swedish day care centers and comparison with building characteristics and allergen levels », *Indoor Air*, [en ligne], vol. 19, n° 5, p. 392-400, <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2009.00600.x>> (consulté le 4 mars 2016).
- (111) MORGAN, P., C. J. COOPER, N. S. BATTERSBY, S. A. LEE, S. T. LEWIS, T. M. MACHIN, S. C. GRAHAM et R. J. WATKINSON (janvier 1991). « Automated image analysis method to determine fungal biomass in soils and on solid matrices », *Soil Biology and Biochemistry*, [en ligne], vol. 23, n° 7, p. 609-616, <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90072-R](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90072-R)> (consulté le 10 mars 2016).
- (112) STAHL, P. (août 1995). « Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil », *Soil Biology and Biochemistry*, [en ligne], vol. 27, n° 8, p. 1091-1097, <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00204-E](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00204-E)> (consulté le 10 mars 2016).

- (113) COLLETT, C. W., et K. BAER (1999). « The Impact of HVAC System Cleaning on Levels of Surface Dust and Viable Fungi in Ductwork »,.
- (114) HEIKKILÄ, P., M. KOTIMAA, T. TUOMI, T. SALMI et K. LOUHELAINEN (1988). « Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscope », *Annals of Occupational Hygiene*, vol. 32, n° 2, p. 241-248.
- (115) KARLSSON, K., et P. MALMBERG (1989). « Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method », *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, vol. 15, n° 5, p. 353-359.
- (116) HANHELA, R., K. LOUHELAINEN et A.-L. PASANEN (juin 1995). « Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of *Wallemia sebi* and *Fusaria* », *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, [en ligne], vol. 21, n° 3, p. 223-228, <https://doi.org/10.5271/sjweh.31> (consulté le 19 novembre 2015).