

Le travail réalisé lors de cette thèse a conduit à la caractérisation de la diversité microbienne de l'air de 3 espaces clos de manière qualitative et quantitative. Les sites investigués sont des lieux sensibles d'un point de vue des occupants (Hôpital), de la densité de fréquentation (Le Musée du Louvre) ou d'un temps d'exposition prolongé (Bureau). La méthodologie est basée sur une étude *in situ* nécessitant le développement d'une stratégie d'échantillonnage spécifique des environnements clos en lien avec les outils analytiques de microbiologie moléculaire mis en œuvre dans l'étude. Ce travail apporte une nouvelle vision de la microbiologie de l'air, de sa dynamique temporelle et spatiale ainsi qu'une meilleure connaissance de l'exposition des occupants aux microorganismes de l'air intérieur. En particulier, il a permis la mise en évidence des espèces pathogènes ou allergisantes et la création d'une base de données permettant le développement de nouveaux outils de surveillance.

LA COLLECTE DES AEROSOLS MICROBIENS EN ENVIRONNEMENT INTERIEUR

Le travail de thèse a comporté en premier lieu, une dimension méthodologique avec la mise en place de deux types d'échantillonnage des aérosols microbiens dans les espaces clos (des prélèvements « ponctuels » dans l'ambiance des sites et des prélèvements « intégrés » réalisés au niveau des centrales de traitement d'air). Des optimisations ont également été apportées aux protocoles d'analyses moléculaires afin de les appliquer spécifiquement aux aérosols microbiens des environnements intérieurs.

Le premier axe de notre démarche expérimentale a consisté à développer puis à valider nos protocoles en environnements réels sur des bases qualitatives et quantitatives.

Nous avons mis en évidence l'intérêt de recourir à des collecteurs haut-débit qui permettent de s'affranchir de certains biais liés à une trop faible quantité d'ADN collecté, pour la réalisation d'analyses moléculaires dans des conditions optimales (Angenent *et al.*, 2005 ; Peccia et Hernandez, 2006 ; Tringe *et al.*, 2008). Ceci est concordant avec les observations de Kejun (2011), qui concluent à la meilleure efficacité des collecteurs par filtration et par impaction en milieu liquide en raison d'une plus haute efficacité de collecte.

En outre, un certain nombre de vérifications analytiques a été mis en œuvre permettant ainsi de s'assurer de la pertinence et de l'absence de différences significatives entre des collecteurs sélectionnés.

L'application de ces protocoles à des prélèvements *in situ* a permis de caractériser de manière pertinente la diversité microbienne en aérosols dans les environnements intérieurs.

II IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES AEROSOLS MICROBIENS DE L’AIR INTERIEUR

Dans le travail de thèse présenté, la microbiologie de l’air a été décrite grâce aux nouvelles techniques de séquençage permettant d’accéder à une diversité microbienne rare et souvent non cultivée (cas en particulier des microorganismes pathogènes). Les résultats montrent une vision qualitative différente de celle observée par des méthodes culturales. Ils ont conduit à une meilleure connaissance de l’exposition des populations des espaces clos aux microorganismes aéroportés.

Les résultats produits ont alimenté une base de données moléculaires locale (AirInt) sur la diversité bactérienne et fongique de l’air intérieur (Figure 52). Cette base a été réalisée à partir de 45 788 séquences bactéries et 53 339 séquences eucaryotes. Composée de 8 335 microorganismes identifiés, elle associe également des informations sur l’origine des microorganismes en lien avec la base de données Genbank. Une telle base regroupe environ 100 fois plus d’information que l’ensemble des données de culture sur l’air intérieur publié depuis 1980 (Chapitre 1, § VI.2.B et § VI.2.A).

Les applications d’une base de données de ce type sont multiples. Tout d’abord, elle permet de faire un état des lieux de la qualité microbiologique d’un air « considéré comme sain » dans deux espaces clos différents, le bureau et le Musée du Louvre. En se référant à cette base, il est possible par comparaison de jeux de données de définir un air pouvant être qualifié de « dégradé ». Une démarche similaire a été mise en œuvre pour l’écosystème buccal, avec le développement d’une base spécifique mise en ligne appelée HOMD, qui permet à la communauté scientifique d’accéder à des données ordonnées spécifiques de la diversité microbienne retrouvée dans cet écosystème, au sein duquel la plupart des microorganismes sont non-cultivés (Chen *et al*, 2010b).

Dans le cadre d’une surveillance sanitaire (émergence, seuil critique) ou de défense (bioterrorisme), la base de données constituée peut être appliquée au développement de nouveaux outils de détection ou à la vérification *in silico* de la pertinence des outils de détection déjà développés. Par exemple, en s’appuyant sur les avancées récentes en termes de systèmes de capteurs (Ivnitsky *et al.*, 1999 ; Yeh *et al.*, 2012) et sur les progrès de la microfluidique en matière de détection biologique (Lee *et al.*, 2008), il paraît envisageable de développer un système de balise d’alerte, basé sur la détection d’indicateurs microbiens (espèces pathogènes, groupes ou espèces signant la diversité de l’air des espaces clos), et ce tout en intégrant biocollecte et analyse moléculaire, permettant d’assurer une surveillance de la qualité microbiologique de l’air. A l’heure actuelle, il est nécessaire de supprimer les éventuels verrous technologiques liés à la miniaturisation ainsi qu’à l’intégration de la biocollecte et de l’analyse moléculaire.

La démarche appliquée dans cette étude, permettant la réalisation d’un état des lieux qualitatif de la diversité microbienne de l’air intérieur, apparaît pertinente dans le but d’évaluer dans différents espaces clos (y compris les nouveaux bâtiments), et pourra être appliquée à plus grande échelle.

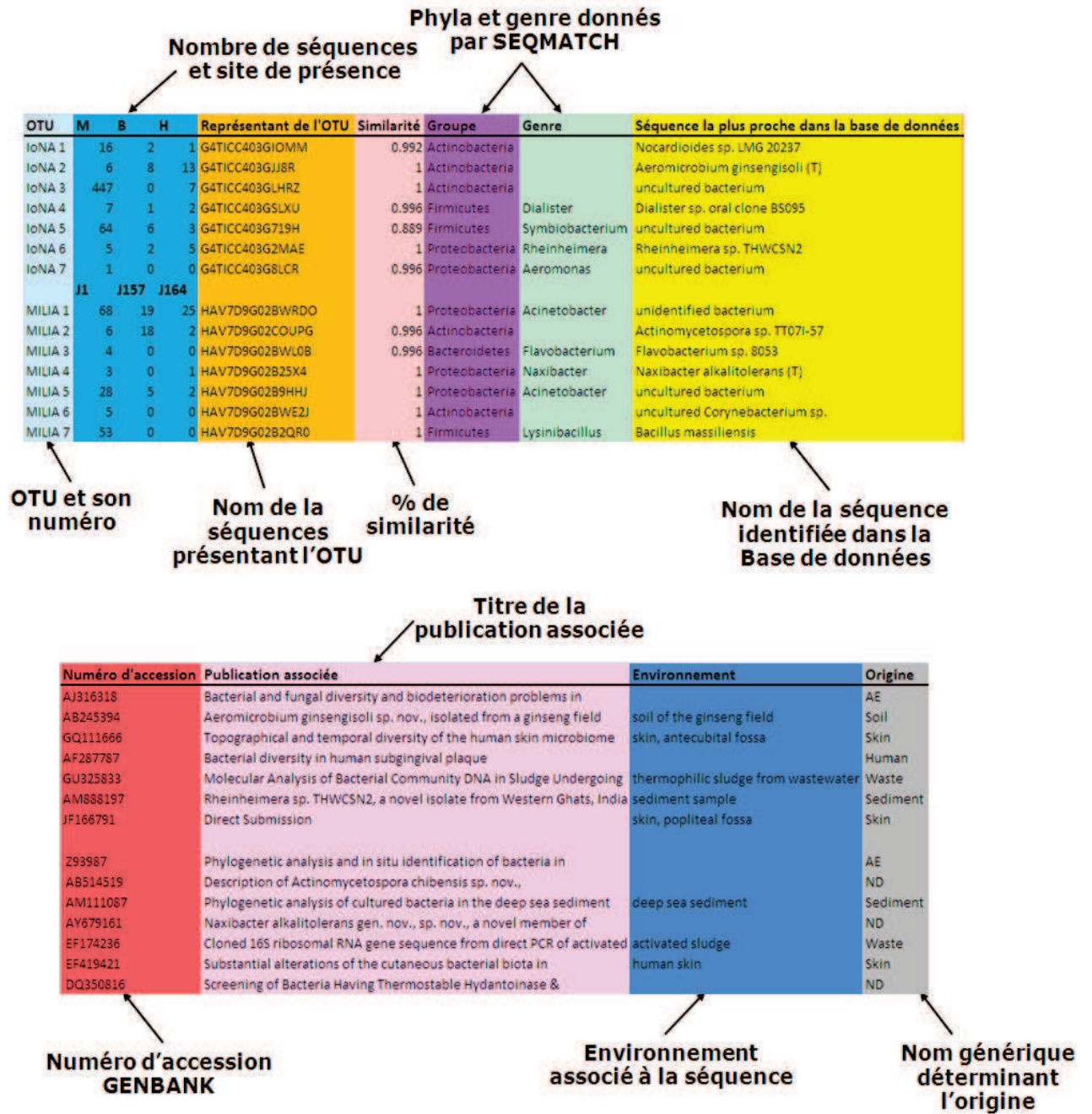


Figure 52 : Extrait de la base de données « AirInt ».

III IMPACTS SANITAIRES

La connaissance de l'exposition et des sources de microorganismes contribuant à la qualité de l'air intérieur, apparaît indispensable pour la compréhension des risques, ainsi que pour assurer une meilleure définition et gestion de la QAI. Un Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) a d'ailleurs été créé en 2001, afin de disposer d'un outil de surveillance de la QAI, afin d'aider les pouvoirs publics dans leurs prises de décision. L'objectif de surveillance et d'amélioration de la QAI, ont récemment été intégrés au Grenelle 2 de l'environnement, témoignant ainsi de l'intérêt des pouvoirs publics. La loi du 12 juillet 2010 pose d'ailleurs l'obligation de surveiller périodiquement la qualité de l'air intérieur dans certains ERP accueillant des populations sensibles ou exposées sur de longues périodes (les crèches, les écoles, les établissements d'accueil de personnes handicapées ou encore les établissements pénitentiaires pour mineurs).

Ce travail de thèse étudie pour la première fois, la dynamique temporelle et spatiale de la microflore bactérienne et eucaryote dans différents espaces clos, sans recours à la cultivabilité des microorganismes. Les résultats montrent que dans le cas des bactéries, la diversité varie peu dans le temps et l'espace, soulignant une signature microbiologique de l'air intérieur.

En effet, l'origine humaine de l'aérobiocontamination, déjà constatée dans la littérature par d'autres approches (culture, biomarqueurs...) (Favero *et al.*, 1968 ; Liu *et al.*, 2000 ; Pastuszka *et al.*, 2000 ; Clark et De Calcina-Goff, 2009), a été confirmée par les résultats de ce travail de thèse. Dans le travail présenté, la description de la diversité et de l'origine des séquences communes montre une proximité entre les structures des communautés de la peau et des muqueuses nasales, par rapport à la structure de la diversité de l'écosystème digestif ou buccal.

De plus, parmi les « *core species* », il apparaît qu'une forte proportion (72% des séquences) est proche de microorganismes pathogènes, pathogènes opportunistes ou commensaux humains. Les principaux groupes microbiens pouvant avoir un impact sur la santé étaient des microorganismes opportunistes (tels que *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* et *Iwoffii*, *Aerococcus viridians* ou *Thermoactinomyces vulgaris*) ou commensaux (tel que *Clostridium perfringens*). Des groupes microbiens pathogènes ont été retrouvés dans l'air des 3 sites investigués, comme dans les autres études portant sur la diversité microbienne de l'air intérieur. Il s'agissait de *Borrelia* spp., *Burkholderia* spp., *Legionella* spp., *Neisseria* spp. et *Mycobacterium* spp.

Ce résultat souligne le rôle de l'air comme vecteur de microorganismes pouvant avoir des implications sanitaires, établissant ainsi un lien fort entre qualité microbiologique de l'air intérieur et santé.

Ce constat amène à se poser plusieurs questions. En effet, ces dix dernières années, en raison des enjeux de lutte contre le réchauffement climatique, des efforts ont été consentis dans le milieu de la construction afin d'améliorer les performances énergétiques des bâtiments, qu'ils appartiennent au parc « ancien » ou « neuf et récent » (Derbez *et al.*, 2011). Ces efforts ont conduit à l'obtention de bâtiments moins consommateurs d'énergie tels que les bâtiments à basse consommation (BBC). En effet, ces nouveaux bâtiments ou encore certains lieux publics (écoles, musées, ...) sont soumis à certains usages anthropiques très intenses associés à des contingences du bâtiment tels que l'absence d'ouverture des fenêtres ou la diminution du taux de renouvellement d'air afin de limiter les déperditions de chaleur durant la période de chauffe hivernale. Ces pratiques favorisent les exigences énergétiques et le confort thermique par rapport aux concentrations de polluants

intérieurs. Ainsi, un des enjeux des bâtiments performants en énergie est de concilier les économies d'énergie avec une qualité de l'air satisfaisante et le bien-être des occupants (Derbez, 2009). A l'heure actuelle, le manque d'études et la diversité des méthodes d'évaluation de la QAI employées dans ces travaux, ne permettent pas d'aboutir à des conclusions (Derbez *et al.*, 2010). En outre, la qualité microbiologique de l'air de ce type de bâtiment, n'a jamais été investiguée. De part, les modes de vie actuels, essentiellement à l'intérieur et l'occupant comme source majeure de contamination microbiologique de l'air, un certain nombre d'interrogations essentielles se pose concernant ces bâtiments plus étanches. Ces restrictions énergétiques ne se font-elles pas au détriment de la qualité d'air ? Quelles solutions peuvent être apportées ?

En revanche, les résultats montrent dans le cas de l'air de l'hôpital, la présence de microorganismes impliqués dans les Infections Nosocomiales (IN) comme *Acinetobacter baumannii*. Celui-ci représente 0,2% des séquences dans l'air de cet environnement. Les dernières données françaises disponibles et publiées par le réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) en 2004, impliquent ce microorganisme dans 1,1% des infections nosocomiales. La difficulté de lutte contre les infections à *Acinetobacter baumannii* réside également dans le développement de souches multi-résistantes aux antibiotiques. Malgré l'organisation, dès 1988, de la surveillance et de la prévention des IN, le risque de contracter à l'hôpital une infection perdure. En effet, en moyenne 7% des patients admis déclarent une IN, cette proportion pouvant atteindre 30% dans certains services de réanimation (INVS, 2006). Pour lutter contre les IN, les établissements associés au Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) ont déployé de nombreuses mesures de préventions. Les principales concernent l'hygiène des mains, l'isolement des sujets sensibles, une surveillance de l'usage des antibiotiques pour lutter contre l'émergence de souches multi résistantes, ou encore la surveillance de la qualité microbiologique de l'air, de l'eau et des surfaces. Néanmoins le poids de chacun des compartiments de contamination environnementaux reste méconnu, y compris pour l'air.

La présence dans l'air de microorganismes impliqués dans les IN souligne le rôle potentiel de l'air dans leur transport. Ils sont susceptibles d'être par la suite transmis directement ou indirectement via les surfaces, à des personnes sensibles.

D'un point de vue sanitaire, les phénomènes d'allergies respiratoires sont de plus en plus fréquents et dans les causes identifiées la part de l'environnement apparaît importante (Bush *et al.*, 2006 ; Fisk *et al.*, 2007 ; Mendell *et al.*, 2011). Dans notre étude, les Basidiomycètes, apparaissent très largement présents dans l'air intérieur (entre 8 et 67%) en comparaison des études basées sur la culture dans lesquels ils sont rarement recherchés ou identifiés (Tableau 10). Néanmoins, ils sont impliqués dans quelques cas d'allergies respiratoires (Lehrer *et al.*, 1994 ; Helbling *et al.*, 1998). Les résultats de notre étude et des deux inventaires moléculaires de l'air intérieur mis en œuvre avec une approche sans *a priori*, soulignent la pertinence de prendre en compte ce groupe dans la compréhension des phénomènes d'allergies respiratoires (Angenent *et al.*, 2005 ; Tringe *et al.*, 2008).

IV CONCLUSIONS

L'objectif de cette thèse consistait à caractériser la diversité microbienne de l'air des environnements intérieurs. Plusieurs conclusions sont émises à l'issue de ce travail de thèse :

- Le recours à une analyse moléculaire a permis d'accéder à une vision de la diversité microbienne de l'air des espaces clos, qui apparaît pertinente.
- Un certain nombre d'éléments ont été apporté, permettant d'améliorer la connaissance actuelle de la diversité des aérosols microbiens dans les espaces clos, tels que la forte proportion de microorganismes à Gram négatif (*Proteobacteria*) par rapport aux méthodes par culture qui mettaient en évidence une diversité essentiellement dominée par les bactéries à Gram positif (*Bacillus* spp. ...). Les principaux groupes microbiens pouvant avoir un impact sur la santé étaient des microorganismes opportunistes (tels que *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* et *Iwoffii*, *Aerococcus viridians* ou *Thermoactinomyces vulgaris*) ou commensaux (tel que *Clostridium perfringens*). Des genres pathogènes tels que *Borrelia* spp., *Legionella* spp., *Neisseria* spp. et *Mycobacterium* spp. ont également été retrouvés. Ces résultats montrent le rôle de l'air intérieur comme vecteur potentiel pouvant être impliqués dans des problématiques sanitaires.
- L'air intérieur est stable dans le temps d'un point de vue quantitatif aussi bien pour les bactéries que pour les champignons (valeurs comprises entre $1,1 \cdot 10^3$ et $5,4 \cdot 10^3$ GE bacteria/m³d'air et $1,2 \cdot 10^3$ à $9,9 \cdot 10^3$ GE fungi/m³d'air).
- La diversité bactérienne de l'air intérieur est presque entièrement pilotée par l'Homme
 - o Mise en évidence d'une signature bactérienne de l'air intérieur dont une forte proportion (72% de séquences) est constituée de microorganismes pouvant avoir un impact sanitaires (pathogènes, opportunistes ou commensaux).
 - o Cette signature est en lien avec les apports individuels moyens tels que débris de peau, air expiré, poussières d'origine anthropique (vêtements, rue...).
- La diversité eucaryote de l'air intérieur est variable et partiellement associée à différents apports provenant de l'air extérieur.
- Une base de données a été constituée afin de caractériser l'air intérieur « considéré comme sain ».
- Des « core-species » tels que *Paracoccus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptococcus* sp. and *Sphingomas* sp., ont été définis grâce à cette base de données et peuvent servir de référence pour le développement d'indicateurs microbiens de l'air intérieur.

Dans l'avenir, pour compléter les connaissances actuelles sur la microbiologie de l'air et ainsi disposer d'une vision plus exhaustive, il serait intéressant d'appliquer à ce domaine d'étude, les dernières avancées en matière de description des écosystèmes et notamment les outils de métagénomique non ciblée. Cette approche sans a priori, précédemment appliquée aux espaces clos (Tringe *et al.*, 2008) permettrait d'accéder à la diversité des virus à ADN et des archées, ainsi qu'aux

gènes majoritairement retrouvés dans l'air intérieur (virulence, résistance, adhésion...). Les virus à ARN responsables d'une part importante des problématiques sanitaires sont également à prendre en compte mais demande pour lors, la levée de plusieurs verrous analytiques notamment leur collecte dans des environnements peu contaminés.

En ce qui concerne la caractérisation des aérosols microbiens, le déploiement d'une méthodologie similaire dans d'autres environnements clos permettrait à terme de mieux définir les niveaux d'exposition des personnes, mais également d'alimenter la base de données initiée. Celle-ci ainsi que le recours aux nouvelles techniques de séquençage, pourra servir de cadre pour la mise en place d'une surveillance de l'air intérieur et la validation d'une QAI de référence à différents niveaux d'alerte. En effet, l'établissement des nouvelles pratiques de construction (Bâtiments BBC), de gestion de l'énergie ou encore du cycle de l'eau et des déchets, ne doivent pas être développées au détriment de la qualité de l'air intérieur. En outre, dans un but préventif cette base pourra être appliquée pour l'étude de l'efficacité des systèmes d'épuration qui connaissent à l'heure actuelle un réel essor de part les enjeux sanitaires et économiques impliqués.