

LA MICROBIOLOGIE ET LA MICROBIOLOGIE DE L'AIR

Les organismes microbiens occupent une place à part dans notre vision de la vie. Ils ne reçoivent que peu d'attention dans les traités de biologie et ils ont été très souvent ignorés par la plupart des biologistes. La grande majorité du temps, ils sont inconnus du public, excepté dans les cas de maladies. Pourtant, le fonctionnement de la biosphère est assuré par les activités du monde microbien. Leur rôle dans les cycles du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du soufre permet d'assurer la vie sur les milieux terrestres et aquatiques.

Dans la plupart des esprits, lorsque l'on parle de biodiversité, les insectes terminent la chaîne alimentaire. Pourtant si l'on regarde l'intérieur d'un seul de ces insectes et si on examine son contenu sous un microscope, on observera des centaines de milliers d'espèces microbiennes distinctes. De la même manière, une main pleine de terre contient des milliards d'organismes microbiens (Pace, 1997). A l'heure actuelle, une faible part d'organismes non eucaryotiques a été décrite (en contraste avec le demi-million d'espèces d'insectes référencées) (Bull *et al.*, 1992). Le fait que les microbes soient très petits et donc invisibles à nos yeux, permet d'expliquer que notre connaissance du monde microbien soit si éparse (Pace, 1997).

Le développement de la microbiologie en tant que science à part entière est le fruit d'une longue réflexion qui s'étend sur plusieurs siècles et repose sur les observations d'un certain nombre de scientifiques restés célèbres.

Bien avant la découverte des microorganismes, il existait des suspicions concernant l'origine de certaines pathologies. Le philosophe romain **Lucrèce** (98-55 av. JC) et le médecin **Girolamo Fracastoro** (1478-1553) suggérèrent tous deux l'existence d'êtres vivants invisibles provoquant des maladies.

A partir de 1673, **Antonie Van Leeuwenhoek** (1632-1723) consigna dans des lettres adressées à la Royal Society de Londres, les premières observations et descriptions de microorganismes. Le contenu de ces lettres montre sans doute possible qu'il avait vu des bactéries et des protozoaires (Gregory, 1961 ; Beck, 2000).

En 1835, **Agostino Bassi** (1773-1856) mit en évidence le rôle des microorganismes dans les maladies. Pour cela, il montra que la mise en péril de l'industrie de la soie en 1835 était due à une maladie d'origine fongique qui touchait le ver à soie (Prescott *et al.*, 1995).

Ce ne fut pas avant le XIX^{ème} siècle et le développement des méthodes de culture, que les microorganismes purent être étudiés et caractérisés (principalement par des critères nutritionnels) en tant qu'entités.

La microbiologie de l'air (ou aérobiologie) est une discipline mal connue pour laquelle on ne dispose que d'une très faible quantité de données. Pourtant les interrogations concernant la dissémination des maladies se sont très vite retrouvées au cœur des débats du XIX^{ème} siècle.

En 1866, **Salisbury** essaya d'appréhender la relation existant entre les microorganismes de l'air et la malaria qui sévissait dans l'Ohio et la vallée du Mississippi.

De nombreuses données furent rassemblées par **Christian Gottfried Ehrenberg** (1795-1876) jusqu'à supposer que des particules microscopiques dans un état viable peuvent être emportées sur de longues distances par le vent.

Pendant de nombreuses années, le mystère de la « génération spontanée » est resté très présent parmi les cercles scientifiques. Bien que cette théorie ait été clairement mise en doute à plusieurs reprises, ce n'est qu'en 1861 que les expériences de **Louis Pasteur** (1822-1895) permirent de la réfuter. Il exposa des flacons à l'air et démontra la présence de germes dans la poussière et l'air (Figure 1). Il développa pour cela un système de filtration des poussières de l'air sur du coton. Il montra ainsi l'existence dans l'air de microorganismes (Gregory, 1961).



Figure 1 : Illustration d'un ballon à « col de cygne » utilisé par Pasteur pour la mise en évidence de germes dans l'air.

Durant les vingt cinq dernières années du XIX^{ème} siècle, il fut réalisé à Paris une description des bactéries et champignons de l'atmosphère, avec une démarche identique à celle déjà mise en place pour l'étude des animaux et des plantes. Un observatoire fut créé au Parc Montsouris, l'une de ses tâches étant l'étude culturale et microscopique des poussières organiques et inorganiques présentes dans l'atmosphère, incluant les bactéries et les champignons (Gregory, 1961). Pendant 34 ans, **Pierre Miquel** (1850-1922) a été en charge de l'observatoire et a ainsi relaté l'influence des conditions atmosphériques, du lieu géographique, de l'altitude et des saisons, sur les microorganismes observés (Comtois, 1997).

I.2 L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE

L'écologie microbienne vise à étudier les relations existantes entre les microorganismes mais également les liens établis entre ceux-ci et leur environnement. Cette compréhension passe par l'étude de la diversité génétique et métabolique présente au sein de l'écosystème ainsi que par la caractérisation physico-chimique des conditions du milieu.

Par définition, une communauté microbienne représente un groupe de microorganismes occupant un territoire déterminé. Une population se constitue de l'ensemble des individus d'une même espèce vivant sur un territoire commun. La connaissance des populations et des communautés est nécessaire à la compréhension des écosystèmes.

I.3 OUTILS DE MICROBIOLOGIE

L'étude de la diversité microbienne d'un écosystème (provenant de l'air, du sol, de l'eau ou de tout autre environnement) peut être effectuée grâce à deux méthodes distinctes : la culture et les méthodes moléculaires.

I.3.A Les méthodes de cultures « classiques »

Devant la faible diversité des morphologies observées chez les microorganismes, les limitations des observations microscopiques apparaissent très vite. En 1881, **Robert Koch** (1843-1910) bouleversa la microbiologie par la mise au point de techniques d'isolement sur milieu solide, améliorant ainsi l'identification des bactéries.

Les méthodes basées sur la culture permettent d'identifier aisément les bactéries avec des exigences de croissance connues. En effet, elles reposent sur la capacité des microorganismes à se développer sur un milieu artificiel, dans des conditions nutritionnelles (matière organique, sels minéraux...) et physiques (température, humidité, pH...) préalablement identifiées. De plus, ces méthodes sont nécessaires lorsqu'il s'agit de prouver la viabilité des microorganismes dans l'environnement. Cette approche passe généralement par une étape d'isolement des cultures pures, parfois précédée d'une phase d'enrichissement visant à favoriser la croissance d'un microorganisme précis. Les caractéristiques morphologiques et physiologiques des souches isolées par culture constituent des références sur les capacités phénotypiques d'espèces non isolées mais phylogénétiquement proches de ces souches. La description et la classification des microorganismes en fonction de leur phénotype (morphologie, activités physiologiques, composition des parois ou niches écologiques occupées), n'apportent que peu d'information quant aux relations d'évolution liant les microorganismes entre eux (Hugenholtz et Pace, 1996).

Bien que traditionnellement utilisées pour l'étude des microorganismes, les techniques de culture sur boîtes de Pétri ont, tout comme les observations microscopiques, montré leurs limites. En effet, un certain nombre d'études met en évidence des écarts importants entre les résultats de culture et les dénombrements par microscopie (Terzieva *et al.*, 1996).

Le développement des outils moléculaires a conduit les microbiologistes à reconsidérer leur vision du monde microbien. Il est estimé que la fraction cultivable des microorganismes se situe entre 0,001% et 15% selon l'écosystème considéré (Amann *et al.*, 1995) (Tableau 1).

Les techniques de microbiologie classiques conduisent à une vision partielle des communautés microbiennes d'un écosystème en favorisant l'observation des microorganismes cultivables. Ceci suggère qu'une vaste majorité de la « vraie » diversité pourrait être ignorée si l'on s'attache exclusivement aux méthodes de culture. Ces différences peuvent s'expliquer par :

- la difficulté à reproduire les conditions exactes d'un milieu, notamment les relations entre microorganismes (parasitisme, synergie, commensalisme...) et/ou avec l'ensemble des paramètres de l'environnement (Van Elsas *et al.*, 2000).
- La présence dans n'importe quel habitat, de microorganismes se trouvant dans un état de dormance, appelé également état viable non cultivable (VNC) (Roszak et Colwell, 1987). Il s'agit en fait de cellules ayant perdu leur capacité à se multiplier mais qui présentent encore une activité cellulaire (Aertsen et Michiels, 2004). Ces cellules peuvent dans certaines conditions appropriées, devenir de nouveau cultivables (Mukamolova *et al.*, 2003).

De nombreuses études ont démontré que la plupart des espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme (par exemple *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* ...) pouvaient exister sous forme de bactéries viables mais non cultivables (Roszak *et al.*, 1984 ; Rollins et Colwell, 1986 ; Ozcakir, 2007).

Tableau 1 : Cultivabilité des bactéries de divers habitats d'après Amann *et al.* (1995).

La valeur pour l'air est donnée par Radosevich *et al.* (2002).

Habitat	Cultivabilité (%)*
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non pollués	0,1-1
Boues activées	1-15
Sédiments	0,25
Sol	0,3
Air	0,1

*Déterminée par le pourcentage d'unité formant colonies (UFC) par rapport au nombre de cellules totales dénombrées par comptage direct au microscope.

Par opposition aux méthodes de culture, les outils moléculaires permettent de détecter ces microorganismes viables non cultivables. Néanmoins, la culture se définit comme le fondement des bases de nos connaissances actuelles. Elle a permis d'accéder au développement des outils moléculaires. Elle reste la technique de référence pour l'étude des microorganismes de l'environnement, elle est préférentiellement utilisée dans le cadre réglementaire et les microbiologistes disposent d'un recul plus important sur les méthodes culturales que moléculaires.

Les outils moléculaires

Malgré le développement des outils moléculaires depuis plus de 30 ans, peu d'études se sont intéressées à la diversité microbienne de l'air par des méthodes indépendantes de la cultivabilité.

I.3.B.a *L'horloge moléculaire*

L'utilisation de marqueurs moléculaires de l'espèce ainsi que le développement de la phylogénie moléculaire sont liés à l'émergence des technologies moléculaires dans les années soixante (Zuckerland et Pauling, 1965). Le concept de phylogénie moléculaire utilise les molécules comme des marqueurs de l'évolution des êtres vivants. Pour cela, il s'appuie sur la théorie de l'horloge moléculaire qui considère que des mutations s'accumulent au cours du temps dans le génome des êtres vivants. Pour cela, il faut supposer que :

- le taux d'accumulation des mutations dans le génome d'organismes différents est du même ordre de grandeur dans des régions homologues (régions soumises à la même pression de sélection).
- l'accumulation sera maximale pour des régions qui ne sont pas soumises à la pression de sélection naturelle (ne codant pas pour des gènes) et minimale dans les parties du génome soumises à une forte pression (c'est à dire les régions codant pour des fonctions essentielles à la survie de l'organisme).

Chaque séquence accumule les mutations à un rythme qui lui est propre et qui est dicté par l'intensité de la pression de sélection à laquelle elle est soumise. Pour reconstituer des phylogénies et ainsi dater la divergence entre deux espèces, il est possible d'utiliser différentes molécules en tant que marqueurs.

I.3.B.b *L'ARN ribosomique*

La séquence de l'ARN ribosomique (ARNr) s'est révélé particulièrement utile pour l'identification des organismes grâce à son haut niveau d'information, sa nature conservée, et sa présence dans tous les microorganismes de type procaryote ou archée (Woese *et al.*, 1990). En outre, les ADN ribosomiaux (ADNr) 16S et 18S possédaient les tailles les plus appropriées pour les techniques employées à l'époque.

L'ARNr répond notamment à plusieurs caractéristiques essentielles (Woese, 1987) :

1. Les ARNr étant indispensables pour la synthèse des protéines, leur présence est universelle. De plus, ils sont homologues chez tous les organismes.
2. Leur fonction est conservée, en outre leur séquence est suffisamment grande pour réaliser de multiples analyses phylogénétiques.
3. Leur rythme d'évolution est lent car la pression de sélection qui s'exerce sur l'ARNr n'est que peu soumise aux variations du milieu.
4. Ils sont constitués d'une alternance de séquences hautement conservées (spécifique de groupes de plus en plus larges) et de séquences variables (spécifiques de chaque espèce).

Actuellement, bien qu'il existe d'autres gènes marqueurs (la région ITS pour les champignons par exemple), les séquences d'ARNr 16S et 18S restent les plus utilisées lorsqu'il s'agit d'analyses de phylogénie microbienne. Le guide référence de la taxonomie procaryote, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, a adopté l'ADNr 16S pour la classification des procaryotes, remplaçant la caractérisation phénotypique traditionnelle (Boone *et al.*, 2001).

I.3.B.c L'analyse de la diversité microbienne

Le concept de diversité microbienne n'est pas bien défini. Il peut aussi bien faire référence (i) à la diversité génétique (taxonomique ou phylogénétique) couramment mesurée par des méthodes de génétique moléculaire, mais également (ii) à la diversité biochimique (physiologique) obtenue en laboratoire à l'aide de cultures pures. Les connaissances acquises quant à la diversité physiologique ou biochimique proviennent des moins de 1% des organismes pouvant être maintenu par culture et enrichissements. La diversité génétique provient des nombreuses applications liées aux techniques moléculaires, bien que celles-ci soient limitées pour l'identification de membres sous-représentés dans une communauté (Rusch *et al.*, 2007).

Par la comparaison des séquences d'ARNr, Carl Woese établit un arbre phylogénétique pouvant définir l'histoire de l'évolution. Il articula son arbre autour de trois domaines : Eucarya, Bacteria et Archaea (Figure 2) (Woese et Fox, 1977).

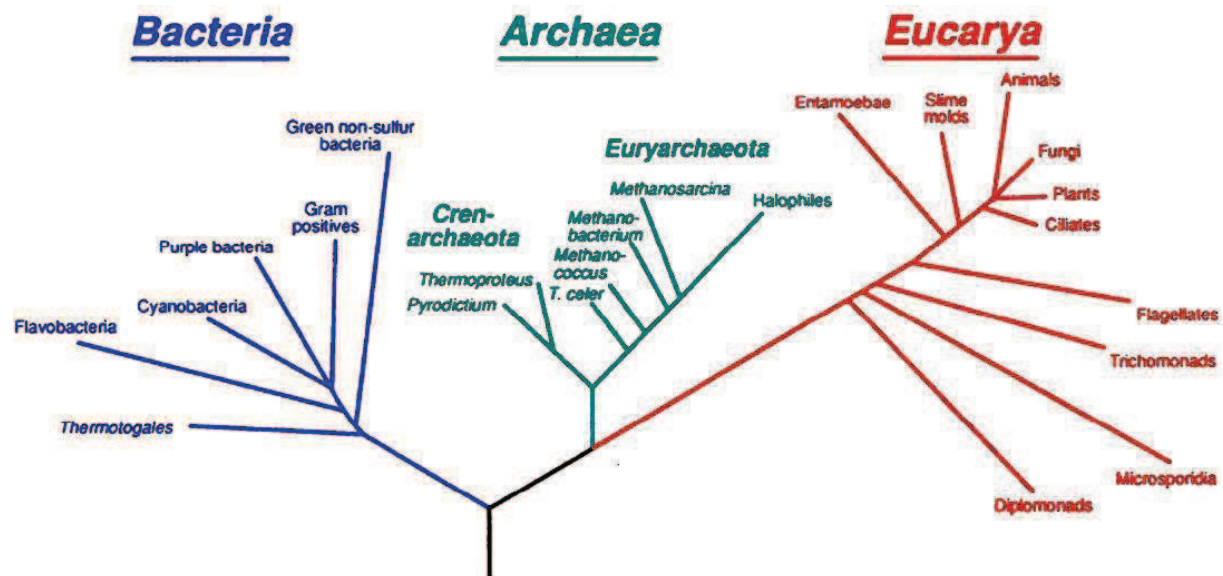


Figure 2 : Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant formé à partir de séquences d'ARNr 16S et 18S adapté de Woese *et al.* (1990) par Wheelis *et al.* (1992).

Un tel arbre se construit en alignant par paires des séquences d'ARNr de différents organismes, les différences sont comptées et considérées comme des mesures de « distances évolutives » entre les organismes (Pace, 1997 ; Handelsman, 2004). Les domaines Bacteria et Archaea appartiennent tous deux au groupe des procaryotes bien qu'ils soient phylogénétiquement très distincts (Woese *et al.*, 1990). Il définit également 12 phyla ou divisions dans le domaine Bacteria, sur la base des séquences d'ARNr 16S obtenues à partir d'organismes cultivés (Woese, 1987).

La caractérisation phylogénétique d'un organisme s'appuie uniquement sur la séquence d'un gène et non sur une fonction cellulaire. L'analyse des séquences d'ARNr permet d'accéder à différents niveaux de taxonomie. Les séquences les plus conservées permettent la différenciation des hauts niveaux de classification (règnes, embranchements...). A l'inverse, les groupes microbiens ayant des analogies mais se différenciant par leurs régions « hyper variables », seront classés en genre, espèce et sous espèce (Amann *et al.*, 1995).

Le développement des méthodes indépendantes de la culture basées sur le gène de l'ARNr 16S, utilisé en association avec les analyses phylogénétiques, a révélé une importante part de microorganismes inconnus ou non cultivés, incluant des nouvelles divisions complètes de bactéries (Figure 3). Alors qu'en 1987, le nombre de phyla bactériens était estimé à 12 (Woese, 1987), en 1998, 36 phyla étaient identifiés (Hugenholtz *et al.*, 1998a) et finalement 52 en 2004. Les premiers phyla étaient basés sur l'analyse des microorganismes cultivés (les cyanobactéries, les spirochètes et les bactéries à gram positif). Néanmoins, la majorité des divisions bactériennes est très peu représentée en culture. Vingt-six des 52 divisions sont uniquement caractérisées par des séquences environnementales et n'ont pas de représentants cultivés (par exemple OP11 (Hugenholtz *et al.*, 1998b) ou WS6 (Dojka *et al.*, 2000)).

Néanmoins, il existe des limites à ce type d'approche. La phylogénie basée sur l'étude du gène de l'ARNr ne permet pas d'accéder à toutes les informations et notamment celles qui traitent des fonctions cellulaires ou de l'activité biochimique des groupes microbiens dans l'environnement. De plus, les échanges horizontaux de matériel génétique affectant l'évolution des cellules ne peuvent être identifiés que par l'étude de la cellule elle-même et de son génome entier (Rappé et Giovannoni, 2003). Cette approche ne révèle qu'une faible part de l'évolution cellulaire et elle est sujette à certains biais analytiques. En effet, une large variété d'artéfacts (séquences chimériques, erreurs de séquençage...) et des erreurs méthodologiques (mauvaise référence, alignement incorrect...) conduisent à un placement inadéquate de la séquence clonée au sein de l'arbre phylogénétique (Rappé et Giovannoni, 2003).

Selon Stackebrandt et Goebel, un pourcentage d'hybridation d'au moins 70% correspondrait à une identité de séquence d'au moins 96%. En d'autres termes, les séquences ADN des souches d'une même espèce peuvent différer de 4%. En considérant que le génome d'*Escherichia coli* est constitué de 4 millions de bases, deux souches peuvent présenter 10^5 nucléotides différents, ce qui expliquerait la variabilité phénotypique observable entre les diverses souches d'*Escherichia coli* et de manière générale, entre les souches d'une même espèce. Pour Stackebrandt et Goebel, lorsqu'il existe moins de 97% d'homologie entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, alors celles-ci appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage d'homologie est égal ou supérieur à 97%, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN (Stackebrandt et Goebel, 1994).

La définition de l'espèce bactérienne la plus récente, a été donnée par le Comité Stackebrandt *et al.* en 2002. Ce comité s'est réuni les 6, 7 et 8 février 2002 à l'Université de Gand et a formulé les propositions suivantes (Stackebrandt *et al.*, 2002) :

- L'étude des pourcentages d'hybridation ADN-ADN ainsi que la stabilité thermique des hybrides demeure la référence pour définir une espèce bactérienne, lorsque les séquences des ARNr 16S des souches présentent plus de 97% d'homologie.

- Les hybridations ADN-ADN étant des techniques lourdes et délicates à mettre en œuvre, le comité préconise l'utilisation d'autres techniques (séquençage de divers gènes de ménage, séquençage de l'espace intergénique 16S-23S, analyse électrophorétique des protéines...) à condition que les résultats obtenus soient comparables à ceux des hybridations ADN-ADN. Le comité encourage également les taxonomistes à développer de nouvelles méthodes susceptibles de remplacer les hybridations ADN-ADN ou d'apporter des informations complémentaires.
- Toute description d'une nouvelle espèce devrait inclure la séquence de l'ARNr 16S de la souche type.
- Pour les bactéries d'intérêt médical ou vétérinaire, l'écologie et/ou le pouvoir pathogène peuvent prendre le pas sur les critères génétiques, ce qui peut conduire à conserver des nomenclatures distinctes pour des taxons très proches sur le plan génétique.

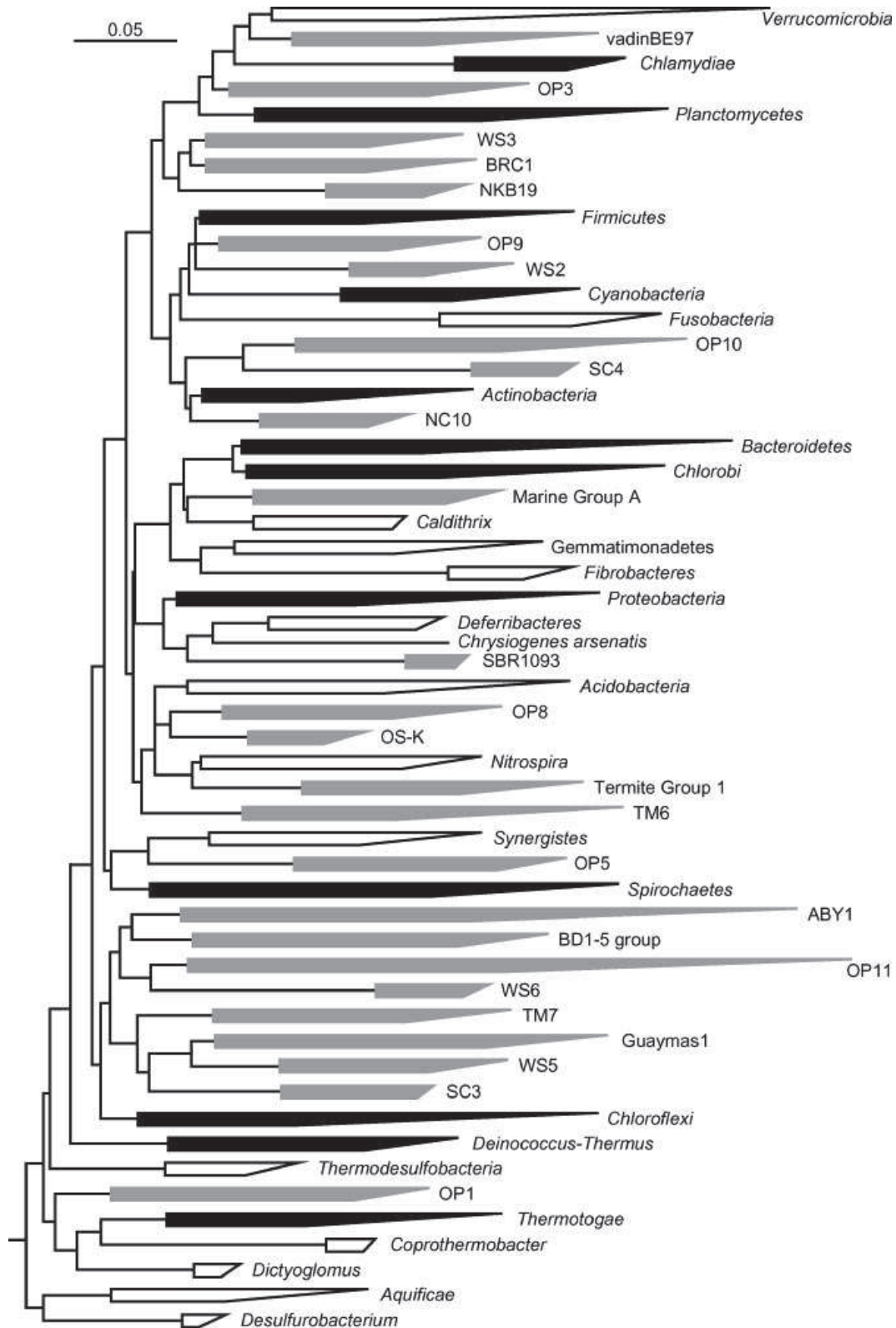


Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux phyla du domaine Bacteria.

Les branches noires correspondent aux 12 phyla initialement décrits par (Woese, 1987) ; les branches blanches correspondent aux 14 divisions ayant des représentants cultivés reconnus depuis 1987 ; en gris sont représentés les 26 phyla « candidats » n'ayant pas de représentants cultivés. Cet arbre a été construit par comparaison de 600 séquences d'ARNr 16S par la méthode des matrices de distance à l'aide du logiciel ARB (Rappé et Giovannoni, 2003).

I.3.B.d La PCR

Suite au développement des outils de biologie moléculaire dans les années 1960-1970, les méthodes moléculaires sont devenues incontournables pour l'identification des microorganismes. Ces vingt dernières années ont vu apparaître de nouvelles techniques pour la détection et l'identification des microorganismes et virus.

L'amplification ciblée d'ADN *in vitro* par PCR (Polymerase Chain Reaction ; Réaction de polymérisation en chaîne) a permis l'accès aux gènes et à leur séquence nucléotidique. Il s'agit en fait d'une réaction enzymatique qui va permettre l'amplification en multiples copies d'une séquence d'ADN (en général un gène spécifique ou une portion de gène). La PCR reste le moyen le plus simple et le plus rapide d'obtenir une quantité suffisante de matrice ADN. De plus, elle permet l'amplification directe de la séquence d'ADNr 16S à partir des ADN d'une communauté microbienne. L'étape primordiale est le *design* des amorces car elles vont cibler la séquence d'ADN d'un microorganisme spécifique, d'un groupe microbien ou d'un gène de fonction (Peccia et Hernandez, 2006).

Les amorces utilisées pour une PCR sont de deux types : universelles lorsqu'elles ciblent l'un des trois domaines du vivant (Bactéries, Archées ou Eucaryotes) ou spécifiques lorsqu'elles visent un gène dont la séquence est plus ou moins conservée parmi un « groupe », un « genre » ou une « espèce » au sens phylogénétique des termes.

L'utilisation de la PCR permet de s'affranchir des biais associés à la culture des microorganismes. Elle a permis la mise au point de plusieurs outils notamment avec l'utilisation de l'ARNr 16S comme marqueur moléculaire de l'espèce. Néanmoins, elle n'est pas exempte de biais. Parmi ceux-ci, nous pouvons distinguer :

1. La possible contamination des réactifs et ainsi l'amplification d'ADN contaminant, n'est pas à exclure (Grahm *et al.*, 2003). Elle contribue à la détection de faux positifs (Hilali *et al.*, 1997 ; Mohammadi *et al.*, 2005).
2. La création de séquences recombinées ou chimériques (Liesack *et al.*, 1991).
3. L'amplification préférentielle de certaines séquences notamment celles liées au nombre de copie de l'opéron (Farrelly *et al.*, 1995 ; Johansen *et al.*, 1996 ; Suzuki et Giovannoni, 1996).
4. La pseudo universalité des amorces (Pace, 1997 ; Horz *et al.*, 2000).

Un examen minutieux des résultats doit être réalisé afin de s'affranchir de ces biais (Hughes *et al.*, 1994 ; Tanner *et al.*, 1998). De plus, tout comme les milieux de culture conditionnent la détection de certains microorganismes, les amorces sont réalisées à partir de séquences connues et influencent directement la détection de nouvelles séquences. En conclusion, l'ensemble des méthodes sont à utiliser en complément les unes des autres afin d'obtenir une vision globale de la diversité de l'environnement étudié.

La PCR quantitative (PCRq) est une déclinaison de cette technique. Contrairement à une PCR classique, elle permet à l'aide d'une sonde fluorescente de mesurer en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADN, et ainsi de pouvoir quantifier l'ADN présent au départ dans l'échantillon. De nombreuses applications lui sont associées notamment dans le domaine médical (quantification d'un

gène cible ou de l'expression d'un gène), mais aussi en écologie microbienne où sa sensibilité et sa reproductibilité représentent des avantages certains.

Bien souvent, la PCR n'est qu'une étape préliminaire. Les produits de l'amplification peuvent être conservés et employés lors de l'identification ou de la quantification d'un microorganisme ou lors d'analyses de population et de diversité microbienne par l'utilisation de sondes nucléiques, de méthodes d'empreintes moléculaires ou d'inventaires moléculaires.

I.3.B.e Approche spécifique : les sondes nucléiques

Les sondes visent à obtenir des informations spécifiques sur des groupes microbiens, sur la présence d'un gène ou encore sur le niveau d'expression de celui-ci. Elles peuvent avoir des applications différentes mais reposent toutes sur le même principe. Un oligonucléotide complémentaire d'une séquence cible d'ARNr spécifique est construit (environ 20 nucléotides) puis marqué à son extrémité par une molécule rapporteuse fluorescente, radioactive ou enzymatique. Les bases de données, toujours plus importantes, fournissent les séquences nécessaires à l'élaboration de nombreuses sondes plus ou moins spécifiques (du domaine jusqu'au phylotype).

Trois modes d'utilisations de ces sondes sont applicables en microbiologie :

- L'hybridation *dot blot*

La première étape consiste à extraire les ARNr de l'échantillon avant de les fixer sur une membrane. La sonde peut être marquée par un radio-isotope ou une substance rapporteuse (Raskin *et al.*, 1994). La membrane est ensuite lavée avant la détection du marquage. Il est possible à l'aide d'une sonde de référence de quantifier la séquence cible dans l'échantillon à analyser.

- L'hybridation sur cellules entières en fluorescence

Sur un échantillon dont l'intégrité a été conservée, une ou plusieurs sondes sont appliquées afin d'observer « *in situ* » les microorganismes ou structures microbiennes hybridées avec les sondes. Dans un premier temps, un fixateur est appliqué à l'échantillon afin de stopper le métabolisme cellulaire et rendre les cellules perméables à la sonde. Les cellules sont par la suite hybridées à des sondes ciblant les groupes microbiens ou des gènes de fonction, sur une lame ou en milieu aqueux. L'utilisation de sondes fluorescentes permet une observation directe par microscopie à épifluorescence (DeLong *et al.*, 1989). L'emploi d'une combinaison de sondes ayant des spécificités variables vise à déterminer simplement l'abondance de certaines cellules ou de certains gènes.

- Les « puces à ADN »

Sur un support de type lame de verre ou lame de silicium vont être déposées des sondes. Par la suite, l'ADN simple brin, préalablement marqué, qui doit être analysé est mis en contact avec la puce et donc avec les sondes. Si l'ADN est complémentaire de la sonde oligonucléotidique, il va s'hybrider avec celle-ci et résister aux différents lavages. Aux endroits de la puce où il y aura

appariement des deux brins d'ADN, apparaîtra une fluorescence sous l'aspect d'un spot lumineux (Ye *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2002).

1.3.B.f Approche globale : les méthodes d'empreintes moléculaires

Alors que les techniques énoncées précédemment visent à identifier ou à quantifier une cible, les méthodes d'empreintes moléculaires ou de *fingerprints* donnent une image globale du monde microbien. La méthodologie à appliquer, peut être résumée ainsi :

- Extraction de l'ADN total des microorganismes (pouvant être extrait de n'importe quel milieu biologique ou environnemental).
- Le fragment d'ADN d'intérêt est ciblé par PCR.
- Séparation des fragments par électrophorèse.
- Obtention de bandes ou de pics apportant une image qualitative et/ou quantitative des microorganismes.

Le mode de séparation des fragments d'ADN distingue les différentes techniques de *fingerprints* (Figure 4). De ce fait, de nombreuses techniques ont vu le jour au cours des vingt dernières années. Le niveau de discrimination, qui dénote de la variabilité de l'échantillon, est défini par un site de restriction (RFLP, T-RFLP, ARDRA), par des modifications de base (CE-SSCP, DGGE, TGGE) ou par des modifications de longueur (RISA, ARISA).

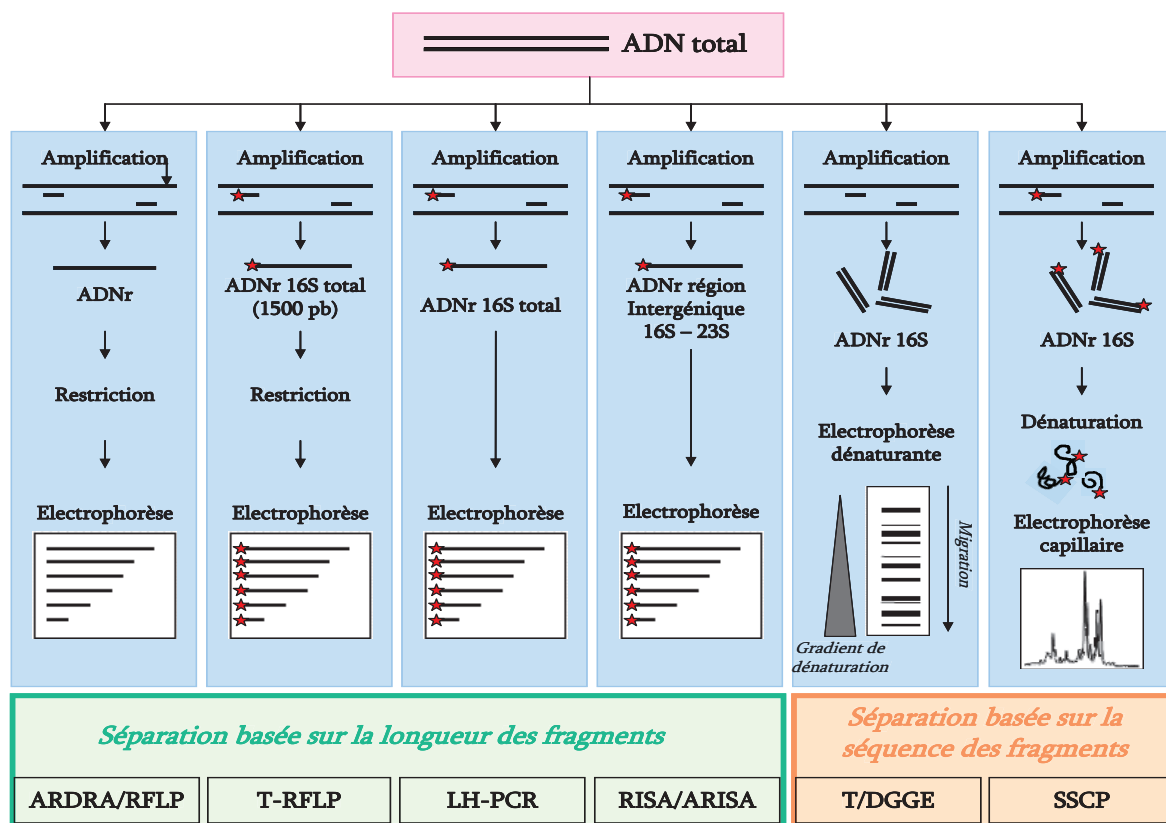


Figure 4 : Schémas et principes des principaux outils d'empreinte moléculaire pour l'étude des écosystèmes microbiens. D'après Cresson (2006).

Les techniques de T/DGGE (Temperature/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou de CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) s'appuient sur des différences de mobilités électrophorétiques dues à des divergences de conformations moléculaires, elles-mêmes influencées par la séquence nucléotidique des fragments d'ADN. Ces techniques nécessitent des fragments courts (500 pb pour la T/DGGE et 200 pb pour la CE-SSCP). En effet la mobilité électrophorétique diminue lorsque les fragments sont plus longs.

La T/DGGE est utilisée pour accéder à la diversité microbienne de communautés ainsi que pour des études de dynamique. Son principe repose sur la propriété selon laquelle deux fragments d'ADN d'une même longueur mais qui diffèrent d'un seul nucléotide, peuvent être séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide à travers un gradient croissant d'agents chimiques dénaturants comme l'urée et la formamide (DGGE) ou à travers un gradient linéaire de température (TGGE). Les fragments double brin migrent en fonction de leur taille jusqu'à l'obtention de conditions suffisamment dénaturantes où le double brin va s'ouvrir (en fonction de sa séquence nucléotidique) et ainsi ralentir sa migration. Une identification peut être réalisée par découpage et séquençage des bandes obtenues ou par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques (Muyzer *et al.*, 1993 ; Muyzer et Smalla, 1998).

La CE-SSCP diffère de la T/DGGE par ses conditions de migration électrophorétique non dénaturantes. Les produits PCR sont dénaturés (formamide et chaleur) avant d'être renaturés (dans de la glace). Les fragments simple brin obtenus vont adopter des conformations secondaires stables déterminées par des interactions intramoléculaires (Orita *et al.*, 1989). En fonction de la structure adoptée, ces fragments repliés présenteront des différences de mobilité, ce qui permet leur séparation durant l'électrophorèse. Une identification est possible par clonage des produits PCR et par la suite, séquençage des clones co-migrants avec les pics du profil complexe, équivalant à l'ensemble des séquences de la communauté microbienne étudiée. En 1996, cette technique fut pour la première fois appliquée à l'écologie microbienne par Lee *et al.*, afin d'accéder à la diversité des communautés microbiennes d'une eau surfacique.

L'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) et la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sont deux techniques applicables après digestion des fragments d'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction. Ces techniques reposent sur la variabilité de taille des fragments digérés, mise en évidence après migration sur gel d'agarose. Elles sont fréquemment mises en œuvre pour la discrimination au sein d'une même famille, d'une espèce ou d'une sous espèce, en raison de leur rapidité (Vanechoutte *et al.*, 1992 ; Vanechoutte *et al.*, 1995 ; Stakenborg *et al.*, 2005). Bien que peu coûteuses, ces méthodes ne sont pas adaptées à l'étude de communautés complexes. En effet, chaque espèce donne lieu à un certain nombre de fragments, lorsque le nombre d'espèces présentes est trop important, le gel devient illisible. L'utilisation de la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) a permis de palier ce problème en introduisant une amorce fluorescente afin de ne détecter qu'un seul fragment (Liu *et al.*, 1997). La méthode de LH-PCR (Length Heterogeneity) discrimine les microorganismes sur la base d'inégalités naturelles de longueur de la séquence d'ARNr 16S.

D'autres techniques séparent les fragments en fonction de leur taille : RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis) développée par Borneman et Triplett (1997) et ARISA (Automated RISA), qui est une version automatisée de RISA (Fisher et Triplett, 1999). Ces deux méthodes différencient la taille de la région intergénique 16S-23S. Maron *et al.* l'appliquèrent en 2005 pour l'étude de la variabilité de la

microflore de l'air extérieur, montrant ainsi une grande diversité dans la structure des communautés bactériennes. De plus, l'étude de deux échantillons révéla une importante variabilité dans le temps.

I.3.B.g Les inventaires moléculaires

En dépit de l'importance évidente des microorganismes, peu de choses sont connues quant à leur diversité : combien d'espèces ? Quelles fonctions écologiques remplissent ces espèces ? A l'heure actuelle, seules quelques approximations existent quant à la mesure de la diversité microbienne. Une analyse théorique suggère que la population bactérienne sur Terre avoisinerait les 10^{30} bactéries. Ce nombre représenterait à peine quelques ordres de grandeur de plus que le nombre d'étoiles de tout l'Univers connu (estimé à 10^{22} - 10^{24}) (Guazzaroni *et al.*, 2010).

Les inventaires moléculaires permettent d'accéder à une vision qualitative de la diversité microbienne indépendamment de la cultivabilité des microorganismes et ils ont par la même occasion confirmé que nous avons une vision partielle de celle-ci. Cette approche vise à inventorier et à identifier les différentes populations microbiennes présentes au sein des écosystèmes. Pour ce faire, l'ADN total de la communauté est extrait, puis l'ensemble des ADNr 16S ou 18S sont amplifiés à partir du mélange par PCR au moyen d'amorces spécifiques. Chaque fragment d'ADN est isolé par clonage dans un plasmide d'*Escherichia coli* avant d'être séquençé. Les séquences obtenues sont analysées afin de les situer phylogénétiquement vis-à-vis de microorganismes connus (Figure 5).

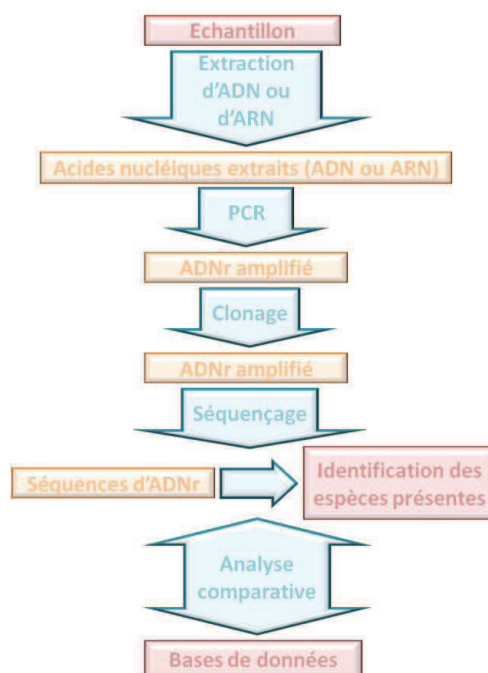


Figure 5 : Principales étapes nécessaires à l'analyse de la diversité microbienne par les inventaires moléculaires.

Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN furent décrites en 1977. Il s'agissait de celle de Maxam-Gilbert (Maxam et Gilbert, 1977) et de celle de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). A l'heure actuelle, la méthode de Sanger est principalement utilisée dans les laboratoires, elle est

également automatisée. Les signaux lumineux émis en fonction du nucléotide incorporé, sont analysés par un logiciel spécifique et le résultat de l'analyse peut être lu sous forme d'un électrophorégramme (Figure 6). Pour confirmer un résultat, toute réaction de séquençage d'un fragment d'ADN est systématiquement faite sur le brin sens et le brin antisens (Lamoril *et al.*, 2008). En général, cette technique permet d'obtenir des séquences de longueurs comprises entre 400 et 850 pb.

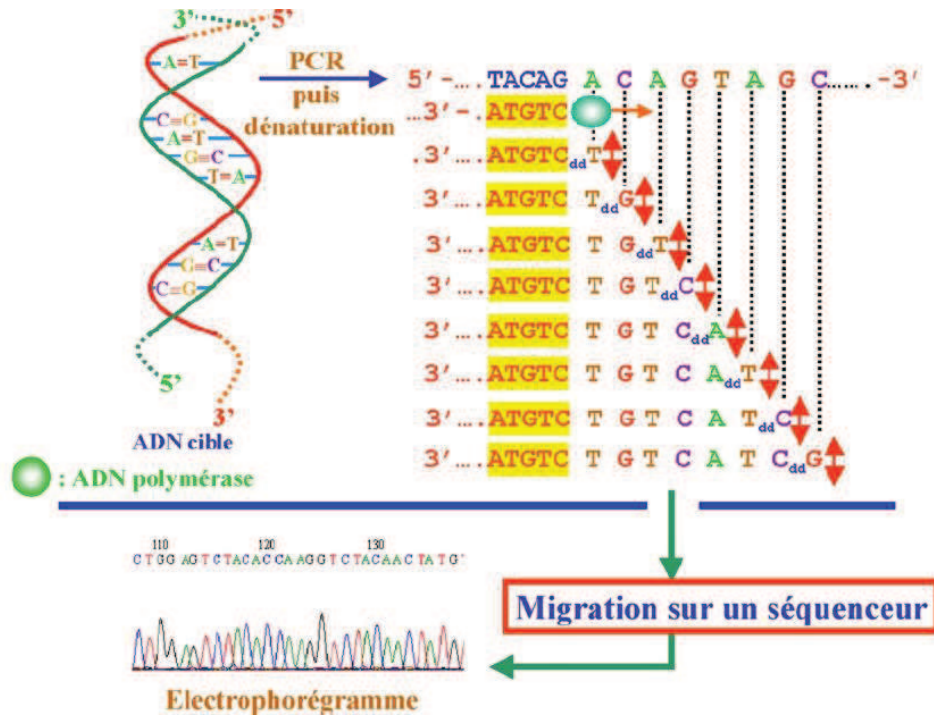


Figure 6 : Illustration du principe de séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

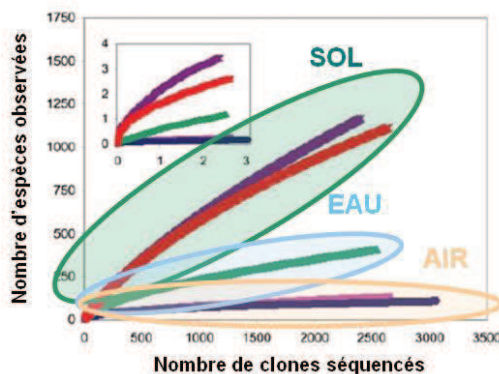
Les nouveaux inventaires moléculaires réalisés viennent un peu plus chaque année enrichir les bases de données améliorant notre vision du monde microbien. Une étude menée en mer des Sargasses met en évidence quelques 1800 espèces microbiennes différentes dont 148 phylotypes bactériens jusque là inconnus (Venter *et al.*, 2004)

Par la suite, les séquences présentant plus de 97% de similarité vont être regroupées au sein d'unités phylogénétiques appelées OTU (Operational Taxonomy Units) (Stackebrandt et Goebel, 1994).

I.3.B.h La diversité microbienne : la décrire et l'estimer ?

Néanmoins, se pose la question de savoir comment accéder à une description correcte de la diversité d'une communauté ou de l'abondance de certaines espèces. Plusieurs méthodes ont été mises au point afin d'estimer au mieux la richesse d'un échantillon et ainsi pouvoir comparer la diversité des différents environnements. Des outils tels que le pourcentage de recouvrement ou les courbes de raréfaction permettent d'évaluer la pertinence de séquencer plus de séquences afin de décrire au plus juste la diversité. Ces courbes sont obtenues en traçant le nombre de phylotypes

observés en fonction du nombre de séquences analysées. Pour une diversité infinie, chaque nouvelle séquence analysée correspond à une nouvelle espèce. Au fur et à mesure que les nouvelles séquences analysées correspondent à des espèces déjà obtenues, la courbe s'infléchit pour finir en plateau lorsque toutes les espèces de l'échantillon ont été décrites. Cette approche permet de comparer la richesse observée au sein de différents sites, habitats ou ayant subi différents traitements, bien que les échantillons ne soient pas égaux en terme d'échantillonnage (Figure 7).



**Figure 7 : Courbes de raréfactions de la diversité en phylotypes observés.
D'après Tringe *et al.* (2008).**

Par contraste, les estimateurs de richesse (Chao1 ou ACE) évaluent la richesse totale de la communauté d'un échantillon. Ces estimations peuvent alors être comparées entre les différents échantillons. L'idée que la « vraie » diversité microbienne ne peut être estimée vient de l'utilisation de ces outils. En effet, beaucoup de courbes de raréfaction sont linéaires ou du moins, proches de la linéarité, en raison d'une haute diversité, mais également souvent à cause du faible nombre d'échantillons (Hughes *et al.*, 2001).

Dans les écosystèmes où la diversité est très importante, l'utilisation des inventaires moléculaires peut s'avérer coûteuse en temps et onéreuse. Devant ces inconvénients cette technique ne convient pas pour des études de dynamique, on lui préférera les techniques de *fingerprints* (Dorigo *et al.*, 2005).

Les séquences d'ARNr servent de base à de nombreuses applications moléculaires comme l'hybridation ou les techniques d'empreintes moléculaires, elles sont regroupées sous le terme de « *full cycle rRNA approach* » (Figure 8).

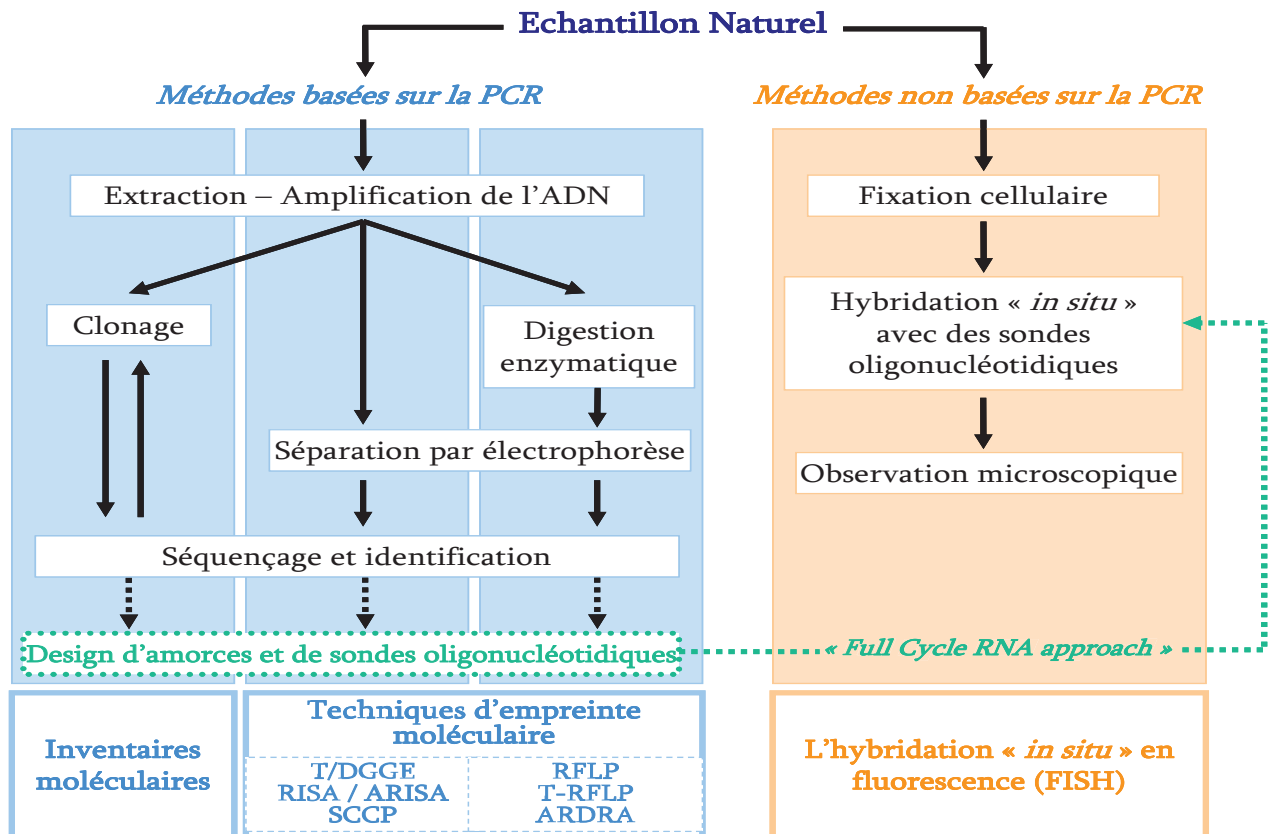


Figure 8 : Techniques moléculaires d'étude et « full cycle rRNA approach ». D'après Wilderer *et al.* (2002) ; Dorigo *et al.* (2005) ; Cresson (2006).

Ces techniques ont montré leur intérêt pour la caractérisation de communautés microbiennes de l'environnement en s'affranchissant de la culture et de l'isolation préalable. Bien qu'ayant un fort potentiel, les techniques moléculaires ont elles aussi leurs propres limites. Si les biais méthodologiques sont présents au long de chaque étape de l'analyse, la PCR reste une étape critique (§ 1.3.B.d).

1.3.B.i Les nouvelles technologies de séquençage ou Next Generation Sequencing (NGS)

Le pyroséquençage est une technique qui permet d'effectuer un séquençage plus rapide et à moindre coût qu'un séquençage par la méthode de Sanger. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc un gain de temps et un coût moindre), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage.

Ces dernières années, de nombreuses entreprises ou institutions académiques ont tenté de développer de nouvelles technologies de séquençage intégrant le haut débit, la rapidité et un coût moindre.

De nombreuses technologies sont actuellement sur le marché. Deux de celles ci sont représentatives de la nouvelle génération des séquenceurs à haut débit : la technologie 454 et la technologie CRT Solexa/Illumina.

La compagnie 454 Life Science a développé une technologie de séquençage innovante caractérisée par la mise en œuvre de la nanotechnologie pour le séquençage (Margulies *et al.*, 2005). Cette technique permet de traiter avec un seul instrument plus de 20 millions de bases nucléotidiques par cycle de quatre heures, ce qui correspond à plus de 100 fois la capacité des instruments reposant sur les techniques actuelles. Une seule machine génère en réalité (avec plus de 99% d'exactitude) autant de données que 100 séquenceurs capillaires à haut débit. Cette technologie est fondée sur l'intégration de plusieurs technologies distinctes : le pyroséquençage, la technologie des plaques en fibre optique picotitrées qui contiennent 1,6 millions de puits, la PCR en émulsion (emPCR) dans des microréacteurs qui permettent de réaliser jusqu'à 300 000 réactions PCR en parallèle, ainsi que des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images.

La société Solexa/Illumina a développé une technologie de séquençage sur puce, fondée elle aussi sur l'intégration de plusieurs techniques : les biopuces à ADN, la nanotechnologie, une variante de la technique de Sanger appelée CRT (Cyclic Reversible Termination) et toujours, des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images. Les coûts de séquençage sont réduits par (i) la suppression de l'étape d'amplification de l'ADN, par (ii) le fait de travailler dans un volume de réaction très réduit, par (iii) le fait d'avoir une préparation minimale de l'échantillon, et de (iv) supprimer l'étape d'électrophorèse. Le principe de séquençage est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents et par lecture optique de la fluorescence. Il s'agit d'un séquençage en temps réel, basé sur la détection de la fluorescence en présence des 4 nucléotides marqués comme pour la technique de Sanger mais sans recours à l'électrophorèse. La très haute densité de la puce (plus de 100 millions de molécules par centimètres carrés) permet de séquencer environ 100 000 paires de bases par seconde. Des molécules de 25 paires de bases sont séquencées puis alignées, grâce à un logiciel, et comparées à une séquence de référence pour reconstituer la séquence. Cette technologie est utilisée pour les grands projets de reséquençages, mais également pour la reconnaissance de SNP et les mutations.

I.3.B.j Métagénomique : quels apports et quelles limites ?

Les séquences du gène de l'ARNr 16S chez les procaryotes et du gène de l'ARNr 18S chez les eucaryotes, sont à l'heure actuelle les principales mesures des relations phylogénétiques et ainsi de la biodiversité. La détermination d'un grand nombre de séquences dans divers environnements a mis en évidence une abondante diversité en microorganismes. Néanmoins, seule une fraction de celle-ci peut être correctement analysée (Dinsdale *et al.*, 2008).

La métagénomique est analogue à la génomique à une différence près. En métagénomique, l'étude ne se base plus sur un seul génome issu d'un clone ou d'un microorganisme cultivé et caractérisé en laboratoire, mais sur l'ensemble de la communauté microbienne présente dans un échantillon environnemental, aussi appelée « communauté génome ». La métagénomique inclut des investigations sur trois niveaux majeurs (le traitement de l'échantillon, le séquençage de l'ADN et l'analyse fonctionnelle), avec l'objectif final d'obtenir la vision la plus exhaustive possible du fonctionnement du monde microbien (Guazzaroni *et al.*, 2010).

De nouvelles techniques ainsi que de nouveaux outils ont été développés pour l'échantillonnage et le séquençage de données de métagénomique. Ces outils incluent :

1. La possibilité de réaliser et de visualiser une analyse comparative lorsqu'une séquence de référence est disponible.
2. Des techniques permettant l'assemblage de fragments de génome afin de recomposer le génome d'un taxon microbien non cultivé mais suffisamment abondant dans l'échantillon.
3. Une comparaison de l'ensemble du métagénome en s'affranchissant des différents biais liés à l'analyse (Rusch *et al.*, 2007).

Bien que le principe du pyroséquençage ait été décrit en 1985 (Ahmadian *et al.*, 2006), cette nouvelle technique n'a été publiée qu'en 1998 (Ronaghi *et al.*, 1998). Son utilisation rend possible l'obtention de suffisamment de séquences pour estimer au mieux la diversité de communautés plus ou moins complexes à large échelle (Lozupone et Knight, 2008).

Le travail de métagénomique est en pleine expansion. Son atout majeur réside dans le fait de travailler sans sélection préalable des gènes séquencés. En effet, l'étape de PCR réalisée en amont lors d'un séquençage classique, n'a pas lieu. L'objectif de cette technique repose sur une caractérisation globale de l'écosystème (Zemb, 2007).

Des efforts importants de séquençage ont été consentis ces dernières années sur de nombreux écosystèmes : un site de drainage minier acide (Tyson *et al.*, 2004 ; Edwards *et al.*, 2006), la mer des Sargasses (Venter *et al.*, 2004), les carcasses de baleines et le sol d'une ferme (Tringe *et al.*, 2005) ou encore The Global Ocean Sampling expedition (Rusch *et al.*, 2007). De telles études permettent d'établir un lien entre la phylogénie et la fonction, révélant une surprenante abondance de gènes de différents types et également de reconstruire les génomes complets de microorganismes n'ayant pas pu être cultivés (Guermazi *et al.*, 2008).

Une étude récente de Tringe *et al.* portant sur la microbiologie de l'air intérieur de centres commerciaux montre, au travers de données du métagénome bactérien, la sur-représentation de certains gènes. Il s'agit notamment de gènes codant pour des facteurs d'adhésion ou de mobilité et aussi pour des protéines jouant un rôle dans la pathogénicité, la résistance à la dessiccation et aux UV ou pour la survie au stress oxydatif ou à la privation en fer (Tringe *et al.*, 2008).

Bien que beaucoup de limitations techniques aient été dépassées au cours de la dernière décennie (extractions d'ADN multi-puits, l'isolation d'une seule cellule ou l'analyse de séquences par la technologie de pyroséquençage 454 (Margulies *et al.*, 2005)), il reste encore quelques difficultés :

- L'obtention d'une couverture du métagénome adéquate alors que les gènes des différents organismes sont présents dans différentes concentrations dans l'ADN utilisé pour la construction des banques de données ou pour le séquençage.
- L'existence de nombreux gènes inconnus dont il est difficile d'identifier la fonction.

La grande quantité de données générée par ces approches sans *a priori* engendre des difficultés de traitement, d'archivage et d'analyse (Chen et Pachter, 2005).

I.3.B.k Outils de bioinformatique

Les programmes de génomique donnent lieu à une augmentation sans précédent des volumes de données biologiques à traiter. En effet, il est nécessaire de stocker ces données dans d'importantes bases de données informatiques, afin de permettre à tous les biologistes d'y accéder de façon simple et rapide, de les analyser et de les comparer entre elles. Ces étapes passent souvent par le développement d'outils mathématiques et informatiques appropriés. On parle alors de bioinformatique (Figure 9).

Les données de séquençage ne donnent pas tout de suite accès aux informations sur les gènes, souvent morcelés dans le génome. L'informatique apporte une aide essentielle voir indispensable, pour l'identification et la reconstitution de gènes codant pour des protéines. A partir des connaissances obtenues sur plusieurs milliers de gènes, des programmes informatiques sont conçus afin de prédire la localisation des parties codantes des gènes et ainsi d'apporter une aide à l'identification des gènes codant pour une protéine ou une autre. Comparer automatiquement des séquences, permet de rechercher dans la masse de données existante, les gènes qui présentent des ressemblances avec une séquence étudiée, que ce soit dans le même organisme ou dans une toute autre espèce. Lorsque l'on connaît déjà la fonction de ces gènes similaires, il est possible de proposer un rôle pour les gènes étudiés. Celui-ci devra être confirmé expérimentalement. L'analyse bioinformatique vise à établir des classifications et à proposer des hypothèses sur la fonction présumée des gènes.

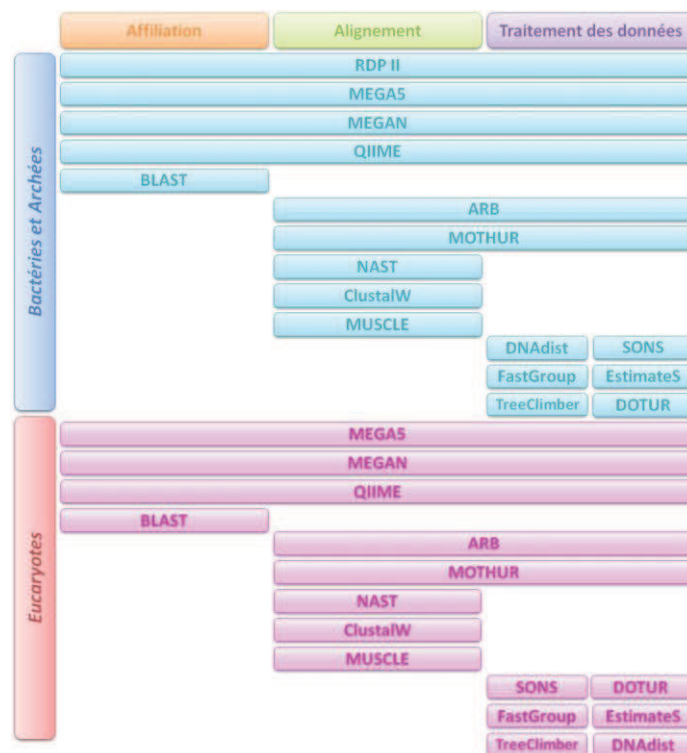


Figure 9 : Schéma récapitulant la liste non exhaustive d'outils de bioinformatiques en ligne disponibles pour le traitement de données de séquences microbiennes.

II LES BIOAEROSOLS

II.1 DEFINITIONS

Un aérosol est une suspension dans un milieu gazeux, de particules solides et/ou liquides, présentant une vitesse de chute négligeable (par convention $v \leq 25$ cm/s). Le terme de « bioaérosols » tient compte de la nature biologique de l'aérosol et notamment de ses propriétés, telles que la viabilité, le caractère infectieux ou allergénique (Renoux et Boulaud, 1998).

Les bioaérosols se présentent sous forme de cellules bactériennes, de fragments cellulaires, de spores fongiques, de pollens ou encore de composés libérés par les microorganismes présents dans la matrice de départ (endotoxines, mycotoxines, allergènes...) (Figure 10). On retrouve peu de microorganismes en tant que cellules individualisées lorsqu'ils sont sous formes d'aérosols. Dans la plupart des cas, ils sont sous forme d'agrégats (attachés les uns aux autres) ou fixés à des particules non viables (tels les particules de poussière, débris végétaux...) (Eduard *et al.*, 2001 ; Maron *et al.*, 2005).

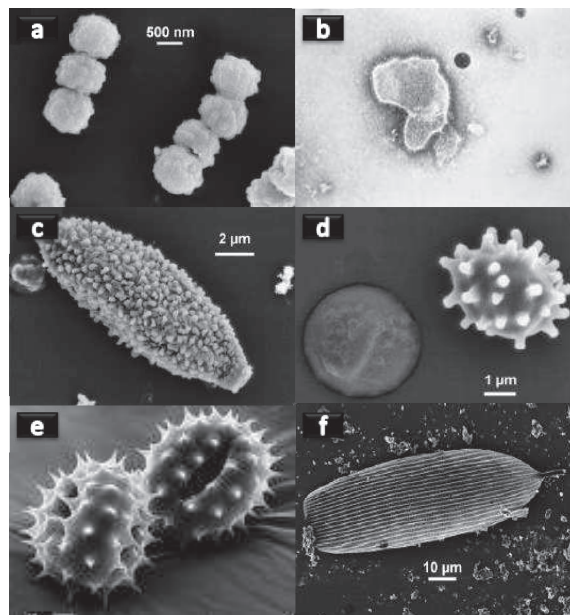


Figure 10 : Différents bioaérosols observés au microscope électronique à balayage.
a : bactéries ; b : Virus Respiratoire Syncytial (VRS) ; c : conidie de *Cladosporium herbarum* ;
d : conidie de *Penicillium* ou d'*Aspergillus* ; e : pollens ; f : écaille d'insecte.
D'après Wittmaack *et al.* (2005).

Les termes « aérosols microbiens » définissent l'ensemble des particules bactériennes, fongiques et virales. Ils présentent généralement un diamètre compris entre 0,1 et 100 μm . Les aérosols bactériens peuvent se présenter sous diverses formes (sphères, bacilles, spirales...) ou en amas de tailles variables (Eduard *et al.*, 2001 ; Maron *et al.*, 2005). Les microorganismes en aérosols sont ubiquitaires dans l'atmosphère. Des microorganismes cultivables (tels que les bactéries ou les champignons) ont été retrouvés à d'importantes altitudes dans la stratosphère (Imshenetsky *et al.*,

1978). Griffin *et al.* (2003) mirent en évidence le transport sur de longues distances de microorganismes attachés à des poussières provenant du Sahara.

Des bactéries et des champignons ont également été identifiés dans l'eau des nuages (Sattler *et al.*, 2001 ; Amato *et al.*, 2005 ; Amato *et al.*, 2007), dans le brouillard (Fuzzi *et al.*, 1997) ou dans l'eau de pluie (Casareto *et al.*, 1996 ; Sattler *et al.*, 2001).

II.2 L'AÉROSOLISATION : MECANISMES

L'aérosolisation correspond au passage d'un microorganisme d'une phase solide ou liquide à une phase gazeuse. Cette étape va s'effectuer en présence de certains paramètres physiques impliquant une mise en mouvement (vent, bullage, agitation mécanique...). En 2005, une étude de Paez-Rubio *et al.*, permet de constater une augmentation de l'aérosolisation avec la force du vent, mais également qu'une majorité d'espèces retrouvées dans l'air avaient une source hydrique. Les données présentées par Aller *et al.* (2005) indiquent des concentrations en microorganismes quinze à vingt-cinq fois supérieures au niveau de l'interface air/eau.

La dissémination de microorganismes dans l'air répond à un mécanisme parfois actif (quand l'énergie nécessaire à l'aérosolisation est apportée par le microorganisme lui-même) ou à un mécanisme passif lorsque cette énergie est fournie par des sources externes telles que la gravité, la pluie ou les courant d'air (Górny *et al.*, 2001).

En 2003 et 2004, les études de Kildesø *et al.* et Sivasubramani *et al.* démontrèrent qu'avec des conditions identiques de croissance, des espèces différentes de champignons ne libéraient pas les mêmes quantités de spores. De plus, cette libération pouvait avoir lieu lors de mouvement d'air inférieur à 0,3 m/s. Mais qu'en est-il pour les microorganismes procaryotiques ? En 2007, une étude comparative sur les microorganismes présents dans le biogaz de digesteurs menée par Moletta *et al.* montre la possibilité de trois types de comportement : l'aérosolisation passive, la non-aérosolisation préférentielle et l'aérosolisation préférentielle. Les groupes microbiens activement non-aérosolisés sont repérables en raison de leur sous-représentation ou leur absence dans le biogaz alors qu'ils étaient présents dans le digesteur. A l'inverse, les groupes microbiens préférentiellement aérosolisés sont sur-représentés ou identifiés en proportion équivalente dans le biogaz et le digesteur. Ce comportement n'est pas nouveau, déjà en 2005, Angenent *et al.* montraient par le biais d'outils moléculaires que *Mycobacterium sp.* était préférentiellement aérosolisé à partir de l'eau d'une piscine thérapeutique. Les données de Moletta-Denat *et al.* en 2010, révèlent une aérosolisation 30 à 220 fois supérieure pour *Staphylococcus spp.* et *Propionibacterium acnes* dans le biogaz. En revanche, les archées et les synergistes sont respectivement 8 à 20 fois moins aérosolisés que les bactéries. Cette étude fait une démonstration de l'aérosolisation sélective de certains microorganismes dans des digesteurs anaérobies (Moletta-Denat *et al.*, 2010).

II.3 DISPERSION ET DEPOSITION

Le transport aérien des microorganismes est régi par les caractéristiques physiques des microorganismes aéroportés mais également par les paramètres environnementaux. Les aérosols microbiens obéissent aux lois physiques inhérentes aux particules inertes (Renoux et Boulaud, 1998) :

- Le mouvement Brownien qui résulte de l'agitation aléatoire des molécules de gaz.
- La diffusion turbulente, qui est un phénomène macroscopique dû au mouvement propre de l'air (ventilation naturelle ou forcée, déplacements de personnes ou d'objets et convection thermique) et les forces d'inertie, qui lorsque le gaz porteur peut être considéré comme incompressible, résultent des accélérations et décélérations des petites masses de fluides présentes autour de l'aérosol.
- La sédimentation car, dans l'air, les particules ont une vitesse de chute liée à leur masse, leur forme et leur dimension. Cette vitesse résulte de l'équilibre entre deux forces, l'action du champ de pesanteur terrestre sur la particule et la résistance du milieu (Renoux et Boulaud, 1998).
- La force électrique. En effet, bien que les aérosols microbiens soient globalement chargés négativement, leur charge peut varier d'un microorganisme à l'autre. Cette différence peut entraîner des modes de transport et de déposition variables (Mainelis *et al.*, 2001).
- Les gradients thermiques lorsqu'ils existent, impliquent que les aérosols soient repoussés par les corps chauds. Ainsi, les particules vont se déplacer de la zone la plus chaude vers la plus froide.

La présence de bactéries cultivables à des altitudes de 41 km au dessus de la surface terrestre, met en évidence le rôle de l'air dans la stratégie de colonisation de certaines espèces microbiennes (Wainwright *et al.*, 2003). La dispersion est essentielle chez les microorganismes, elle peut être considérée comme la troisième priorité après la survie et la reproduction (Hamilton et Lenton, 1998).

Le transport atmosphérique est l'élément clé de la dispersion microbienne, et la transmission des aérosols pathogènes, issus des plantes ou des animaux, est un exemple non négligeable de leur rôle dans les écosystèmes (Fierer *et al.*, 2008).

II.4 RÔLE DANS L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE

Contrairement aux environnements dits « classiques » (le sol, l'eau et les sédiments), l'air n'est que rarement étudié par les écologistes microbiens. De ce fait, il n'existe que peu de connaissances liées à l'écologie des microorganismes de l'air, à leur implication dans les cycles biogéochimiques ou à leur rôle dans la dispersion biogéographique des espèces. Jusqu'à maintenant les bactéries et champignons aéroportés ont été préférentiellement étudiés dans un contexte lié à leur toxicité, aux réactions allergiques qu'ils suscitaient et plus généralement à leur implication sanitaire dans des environnements intérieurs spécifiques : hôpitaux, maisons, bureaux...

L'absence d'eau disponible représente la principale limite à la multiplication des microorganismes dans l'air. Néanmoins, l'étude de Dimmick *et al.* (1979) met en évidence la possibilité d'une division bactérienne en aérosol. De plus, des études récentes montrent que les nuages constituent un écosystème favorable à la multiplication des microorganismes en suspension dans l'air. Une grande diversité a été observée, avec notamment la présence dans les nuages de *phyla* habituellement retrouvés dans d'autres environnements : *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* (Amato *et al.*, 2005). En outre, certaines souches ont montré une adaptation aux conditions environnementales extrêmes des nuages (psychotrophie, pigmentation, production de spores...) et sont phylogénétiquement proches de bactéries isolées dans des régions polaires. Moins d'1% des microorganismes sont cultivables dans ces environnements extrêmes, néanmoins ils restent viables et sont étroitement liés à la composition chimique des nuages (Amato *et al.*, 2007). Récemment les travaux de Morris *et al.* (2004) ont montré que certaines bactéries, capables de catalyser la nucléation de la glace et responsables de dommages sur les feuilles des plantes, se disséminaient préférentiellement par le biais de l'air. Ces bactéries passent de l'air au nuage pour finalement coloniser d'autres feuilles grâce aux gouttes de pluie.

Le cas d'une de ces bactéries, *Pseudomonas syringae*, est particulièrement étonnant puisque cet agent de la bactériose du melon, a été retrouvé dans des niches écologiques surprenantes (biofilms sur des rochers, eau mêlée à de la neige) autres qu'agricoles tout en conservant sa pathogénicité. De plus, des « soupçons » pèsent sur son implication dans les processus de précipitations météorologiques et sur son impact dans l'atmosphère (Morris *et al.*, 2007).

L'air représente pour les pathogènes un moyen de dispersion à large échelle que ce soit à partir d'une source naturelle ou à partir d'une source anthropique (Maron *et al.*, 2005). Leur rôle en tant qu'agent de maladie, donne aux aérosols microbiens un impact sanitaire important. Même si un faible pourcentage d'aérosols microbiens est bien connu et identifié pour causer des maladies infectieuses, de récentes évidences montrent que la voie aéroportée serait un mode de transmission préférentiel pour plusieurs virus, bactéries ou champignons (Terzieva *et al.*, 1996 ; Sivasubramani *et al.*, 2004 ; Angenent *et al.*, 2005).

II.5 LA SURVIE DES AÉROSOLS MICROBIENS

Si les aérosols microbiens sont soumis aux mêmes lois physiques que les particules en aérosols, ils obéissent également à des lois plus spécifiques compte tenu de leurs caractéristiques biologiques.

La combinaison de faibles niveaux d'humidité et d'une faible disponibilité de nutriments, associées à de hauts niveaux de radiations Ultra-violet (UV), fait de l'atmosphère terrestre un environnement difficile pour la vie microbienne (Brodie *et al.*, 2007). Pour la plupart des microorganismes, l'air est un milieu extrême voire hostile. La survie d'un aérosol microbien va dépendre essentiellement de sa capacité à résister aux stress induits par l'aérosolisation (déshydratation, dessiccation) et par différents facteurs environnementaux (l'humidité, la température, les radiations, l'ozone et les « Open Air Factor »).

Le passage dans l'air et la collecte de ces microorganismes représentent un stress non négligeable pouvant aboutir à la perte de la cultivabilité dans une optique de survie qui se traduit par, une mise en veille de certains métabolismes afin de préserver l'intégrité de l'organisme.

Dans une étude réalisée en 1997, Heidelberg *et al.* évaluèrent l'effet de l'aérosolisation sur la cultivabilité de *Serratia marcescens*, *Klebsiella planticola* et *Cytophaga allerginae*. Moins de 10% des bactéries aérosolisées furent capables de former des colonies visibles. Pourtant, malgré les différents stress occasionnés, notamment dans des espaces clos (conditions particulières de température et d'humidité), de nombreuses bactéries et la plupart des champignons produisent des spores résistantes, qui peuvent survivre des années dans l'air de ces lieux (Stetzenbach, 1997).

L'étude des différents facteurs environnementaux ainsi que des relations qui les lient aux bioaérosols est très complexe, puisqu'elle se doit de tenir compte de l'ensemble des paramètres pas seulement pris séparément mais plutôt comme un groupement de paramètres étroitement liés.

II.5.A Rôle de l'humidité et de la température

L'eau est le principal acteur de la survie de l'aérosol microbien, mais elle peut également influencer la capacité de résistance du bioaérosol. L'humidité relative (HR exprimée en pourcentage) ainsi que la température sont des facteurs atmosphériques essentiels tant au moment de l'aérosolisation que dans la survie de l'aérosol microbien. Ces facteurs peuvent agir indépendamment, conjointement ou en synergie entre eux ou avec d'autres paramètres. Par exemple, *Serratia marcescens* serait plus sensible aux UV à des humidités relatives moyennes (Riley et Kaufman, 1972). Plus récemment, les études de Ko *et al.* (2000), Peccia *et al.* (2000) et Lai *et al.* (2004) présentèrent des conclusions similaires. Les sensibilités de *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium parafortuitum* et *Serratia marcescens* aux UV seraient accrues à de faibles humidités relatives. Walter *et al.* (1990) mirent en évidence l'influence des conditions d'humidité relative et de température sur la cultivabilité lors de l'aérosolisation. *Pseudomonas syringae* et *Erwinia herbicola* ont une cultivabilité 35 à 65 fois meilleure à une température de 12°C et une humidité relative de 80%, qu'à 27°C avec une humidité relative de 40%.

Il a été montré que, pour humidité relative fixe et une augmentation de la température de 24°C à 35°C, le taux de mortalité de *Pasteurella tularensis* s'élève (Ehrlich et Miller, 1973). D'après

deux études réalisées en 1970, *Flavobacterium* sp., *Serratia marcescens* et *Escherichia coli* voient leur taux de mortalité s'accroître progressivement lorsque la température passe de -18°C à 49°C (Ehrlich *et al.*, 1970a ; Ehrlich *et al.*, 1970b) (Figure 11).

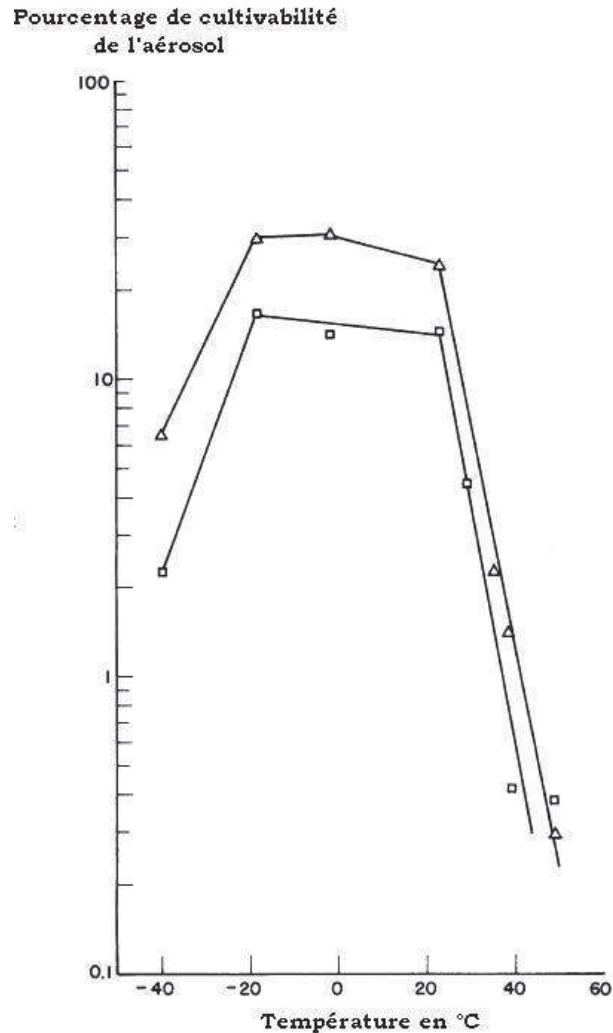


Figure 11 : Effet de la température sur la cultivabilité d'un aérosol de *Serratia marcescens* et d'*Escherichia coli* d'après Ehrlich *et al.* (1970b).

□, *Escherichia coli* ; Δ, *Serratia marcescens*.

En 2005, Ha met en évidence sur une durée d'observation de 1 à 3 jours, une résistance accrue de *Legionella pneumophila* dans un milieu sec. La survie révélée par l'intégrité membranaire décroît à partir de 4 heures de temps de séjour dans un environnement à 95% d'humidité relative. En revanche, les fonctions cellulaires sont maintenues et optimales à 30% d'humidité relative. Après 70 heures, il restait moins de 20% de la biomasse active initiale en ambiance humide (Ha, 2005).

Les virus ne réagissent pas de la même manière à une humidité relative plus ou moins élevée. En effet, Benbough (1969) observa une plus forte inactivation du « *Semliki Forest virus* » à de hautes humidités relatives (Figure 12). Une observation identique fut réalisée pour des virus lyophilisés alors qu'aucun effet n'avait été mis en évidence sur des virus en suspension liquide (Ehrlich et Miller, 1971).

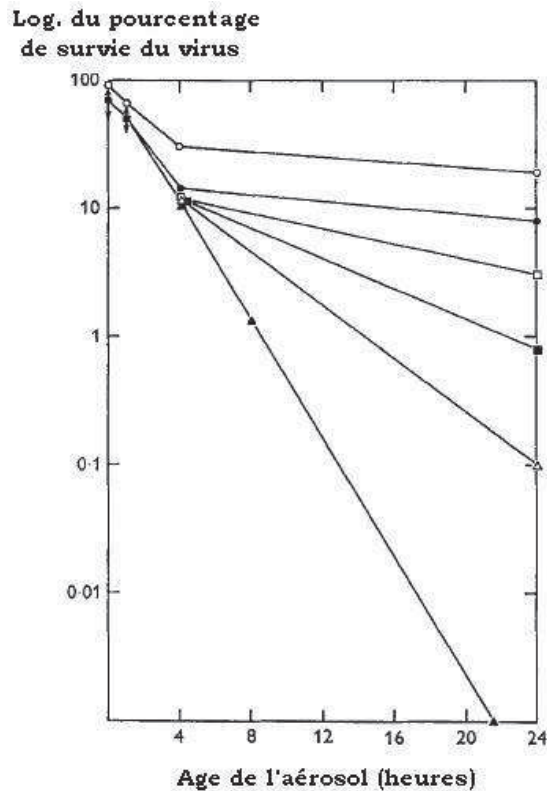


Figure 12 : Survie d'un "Semliki Forest virus" aérosolisé en fonction de différentes humidités relatives d'après Benbough (1969).

○, 20% HR ; ●, 49% HR ; □, 59% HR ; ■, 68% HR ; △, 84% HR ; ▲, 90% HR.

II.5.B Les radiations

Les rayonnements pourront être de différents types : Ultra-Violet (UV), X ou Gamma. Ils vont tous avoir sur les cellules un effet superoxydant. En effet, leur action va générer dans les cellules exposées des radicaux libres, des ions superoxydes. L'entrée dans le milieu intracellulaire des microorganismes d'un agent oxydant va bloquer les métabolismes cellulaires. De plus, les radiations vont entraîner la destruction de molécules enzymatiques ainsi que celle de macromolécules.

Ces caractéristiques sont très souvent utilisées dans un but de décontamination (Beggs *et al.*, 2000). Les UV qui n'ont pas de pouvoir pénétrant sont utilisés pour la stérilisation des surfaces et des salles dans les milieux sanitaires (Bolashikov et Melikov, 2007). Les rayons X et Gamma qui pénètrent en profondeur dans les cellules, vont être utilisés pour décontaminer le matériel plastique, les seringues ...

En 1982, Jakab et Knight menèrent des essais relatifs à l'influence de la dose d'UV sur la virulence d'un aérosol viral (*Influenza A/PR8/34*). Les virus irradiés par différentes doses d'UV connues furent inoculés à des souris. Le pourcentage de mortalité chez les souris infectées se révéla moins important lorsque la dose d'UV augmentait.

De plus, comme exposé précédemment (§ I.4.C.a), de nombreuses études sur les bactéries relient les effets des UV aux taux d'humidité relative observée.

II.5.C L'ozone et autres « Open Air Factor »

« Open Air Factor » (OAF) est un terme générique qui désigne un polluant créé à partir de l'interaction entre l'ozone et les oléfines. A de très faibles concentrations, ce composé peut être toxique pour les microorganismes en aérosols (déjà fragilisés par l'aérosolisation et la dessiccation inhérente à celle-ci). Sa concentration dans l'air peut fluctuer d'un jour à l'autre ainsi que varier en composition (Cox *et al.*, 1973).

A l'instar des rayonnements, les OAF et l'ozone vont avoir un effet superoxydant, chose courante chez les organismes aérobies qui sont en permanence soumis à ce type de stress. Néanmoins dans l'air, les cellules se trouvent déjà dans un état de stress qui ne leur permet pas toujours de lutter ou d'adapter leur physiologie à ces conditions oxydatives.

En 1993, Heindel *et al.* testèrent l'impact de différentes concentrations d'ozone (50 à 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) sur plusieurs espèces microbiennes dans des conditions stabilisées de température et d'humidité relative. Après une heure, ils montrèrent une diminution de 99% de la cultivabilité pour l'ensemble des espèces testées à des concentrations allant de 500 à 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. A des concentrations plus faibles (50 à 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), la diminution est moindre. Les données suggèrent également que les bactéries à Gram positif seraient plus sensibles que les bactéries à Gram négatif, alors qu'une levure *Candida albicans*, apparaît plus résistante. Cox *et al.* (1973) montrent également une diminution de la cultivabilité d'*Escherichia coli*, toujours dans des conditions stables de croissance, en fonction du temps et de l'augmentation du pourcentage d'OAF (Figure 13).

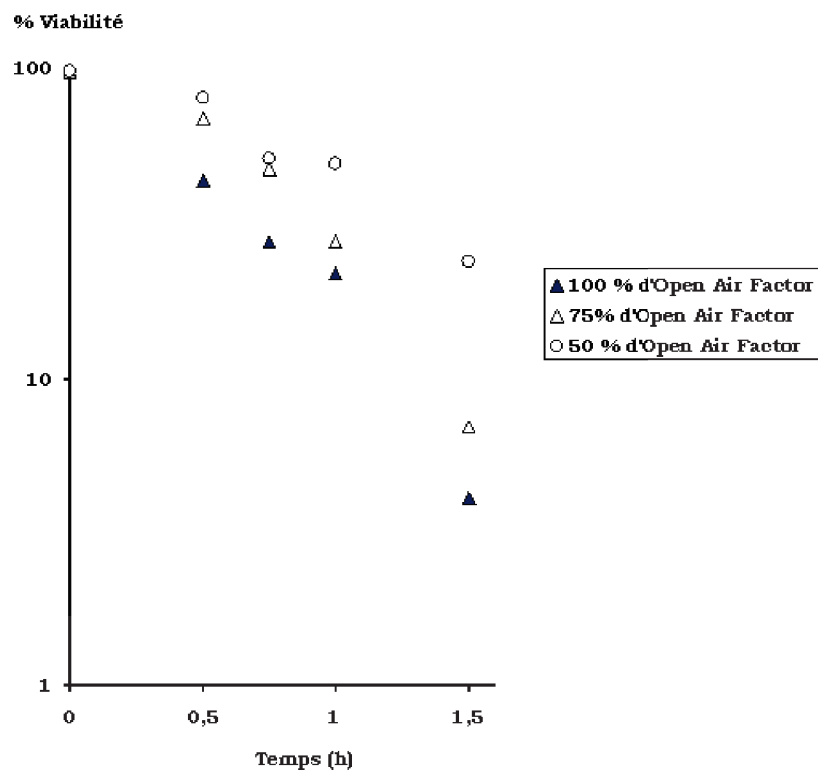


Figure 13 : Viabilité en fonction de différents pourcentages d'OAF.
Modifiée de Cox *et al.* (1973).

S'il existe plusieurs pistes d'études et de compréhension, les mécanismes impliqués dans la survie des microorganismes en aérosol restent encore méconnus. L'ensemble de ses facteurs agissent en synergie et ne sont donc pas dissociables les uns des autres. De plus, les études « *in situ* » ont des difficultés à reproduire l'ensemble des conditions environnementales.