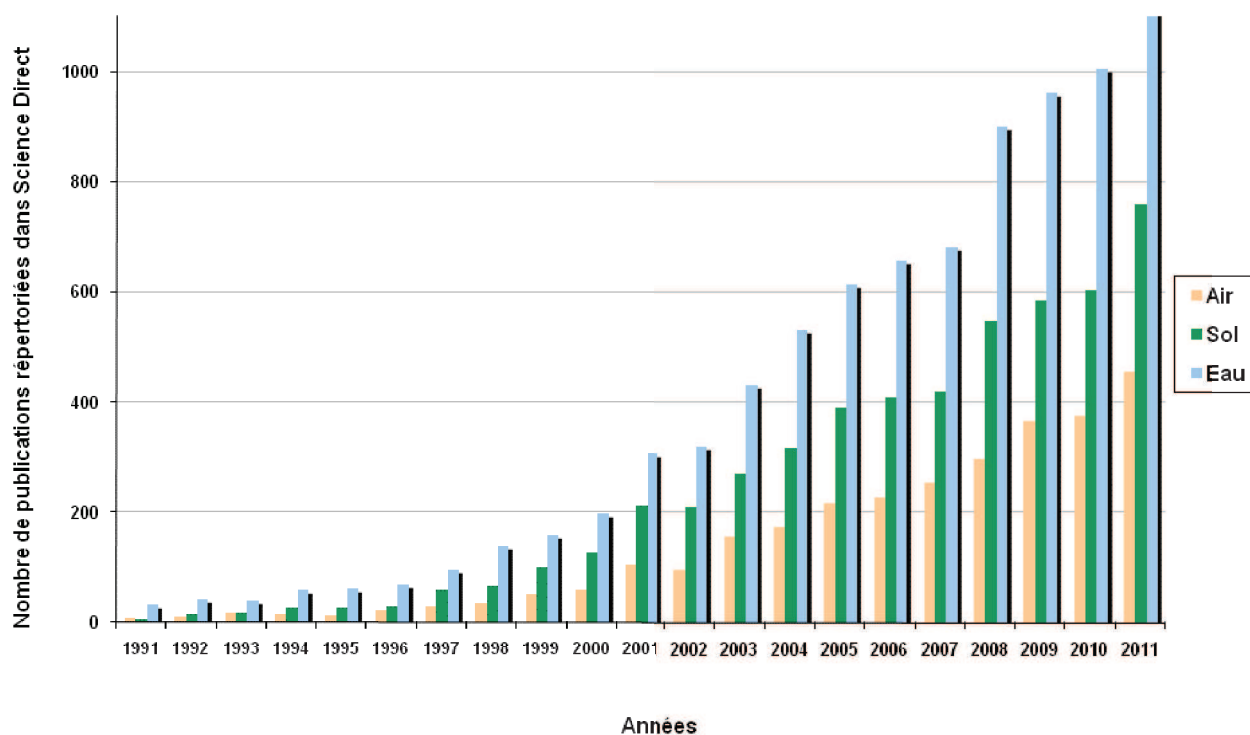


## ETUDE DES BIOAEROSOLS

### DIFFICULTES SPECIFIQUES

L'étude des bioaérosols est soumise à des contraintes liées aux systèmes de collecte ainsi qu'aux outils analytiques associés. Bien que la collecte des microorganismes ne présente pas à priori de difficultés dans d'autres environnements (sol ou eau), elle reste une étape « clé » lorsqu'il s'agit d'étudier l'air. La formation de colonies sur boîtes a longtemps été la méthode standard d'étude du contenu microbien de l'air. Elle ne nécessite pas la collecte de volumes importants tout en donnant accès à des informations tant quantitatives que qualitatives mais ne permet d'accéder qu'à une infime fraction de la diversité microbienne. En revanche, pour l'utilisation d'outils moléculaires, la collecte doit permettre l'échantillonnage de volumes plus importants. En outre, l'échantillonnage de grands volumes d'air permet également d'obtenir une part représentative de l'environnement investigué.

D'un point de vue analytique, la principale limitation existante pour l'étude de la microflore aéroportée par des outils moléculaires, est liée aux faibles quantités de matrice retrouvées dans l'air en comparaison avec d'autres écosystèmes (Figure 14). Néanmoins, il est possible de remédier à ce problème soit en augmentant la quantité de matière prélevée (Radosevich *et al.*, 2002), soit en abaissant le seuil de sensibilité des outils analytiques par une première amplification, en PCR nichée par exemple (Williams *et al.*, 2001). Il est également fréquent dans le cadre d'études de diversité microbienne de l'air, d'observer la présence d'inhibiteurs, nécessitant le développement de protocoles spécifiques.



**Figure 14 : Représentation graphique du nombre de publications répertoriées dans Science Direct et traitant des analyses moléculaires sur procaryotes depuis 1991 dans trois environnements : l'air, le sol et l'eau (mots clés : 16S rDNA ; air ; soil ; water).**

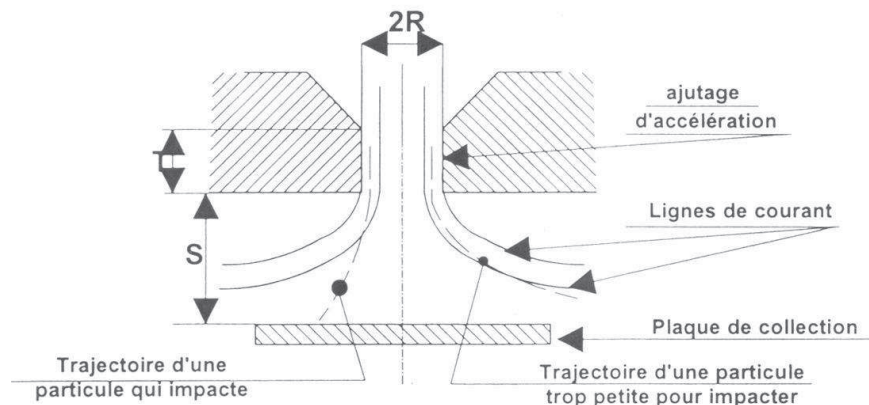
### III.2 LA COLLECTE

A l'exception de quelques méthodes (optiques notamment), l'étude d'un aérosol biologique débute par la collecte. De nombreuses techniques ont été évaluées et mises au point afin de collecter, de détecter et de concentrer les aérosols microbiens. Il existe des paramètres communs à prendre en compte lors de la collecte et en vue des analyses à réaliser ultérieurement. Il s'agit de l'efficacité biologique (pour des méthodes de culture) et du diamètre de coupure ( $d_{50}$ ) qui est défini comme le diamètre des particules pour lequel on a une efficacité de collection de 50% (Renoux et Boulaud, 1998). L'efficacité de collecte des petites particules augmente lorsque le diamètre de coupure diminue. Ce paramètre est essentiel à la fois lors d'analyses par culture ou lors d'études moléculaires.

#### III.2.A L'impaction

L'air est aspiré à travers un orifice calibré (par exemple une  $PM_{10}$ ) qui permet l'accélération du flux (Jensen et Schafer, 1998). L'impaction a lieu lorsque la particule sous l'effet de son inertie s'éloigne de la ligne de courant et vient frapper le milieu nutritif (Figure 15). Un compromis est nécessaire afin d'avoir une vitesse suffisante pour collecter les plus petites particules, tout en assurant le maintien de la viabilité cellulaire.

Les impacteurs collectent les bioaérosols sur un milieu donné pour mettre en œuvre des techniques de cultures directes afin d'énumérer les microorganismes aéroportés.



**Figure 15 : Principe de la collecte par impaction (Renoux et Boulaud, 1998).**

La principale limite de ce type de collecte réside dans la durée du temps de prélèvement (10 minutes maximum, au risque de dessécher la gélose et ainsi de diminuer l'adhésion des cellules). De plus, l'impaction peut provoquer une sous estimation du nombre de colonies comptées sur le milieu. En effet, plusieurs microorganismes peuvent se superposer ou arriver agrégés sur la boîte de Pétri et ainsi former des colonies confondues.

Il existe un certain nombre de systèmes d'impaction notamment « l'Andersen Sampler » que l'on retrouve préférentiellement cité dans la littérature (Andersen, 1958). L'air est collecté à un débit

constant de 28,3 L/min. Sur cette base, ont été développés des systèmes multi-étages (Figure 16) qui permettent de séparer les différentes tailles de particules (entre 0,65 et  $> 7 \mu\text{m}$  pour un impacteur à six étages). Les particules de tailles plus importantes sont collectées sur le premier étage alors que les plus petites le seront sur le dernier. Si cette méthode est couramment utilisée en association avec les méthodes de culture, elle ne permet pas d'analyses moléculaires.

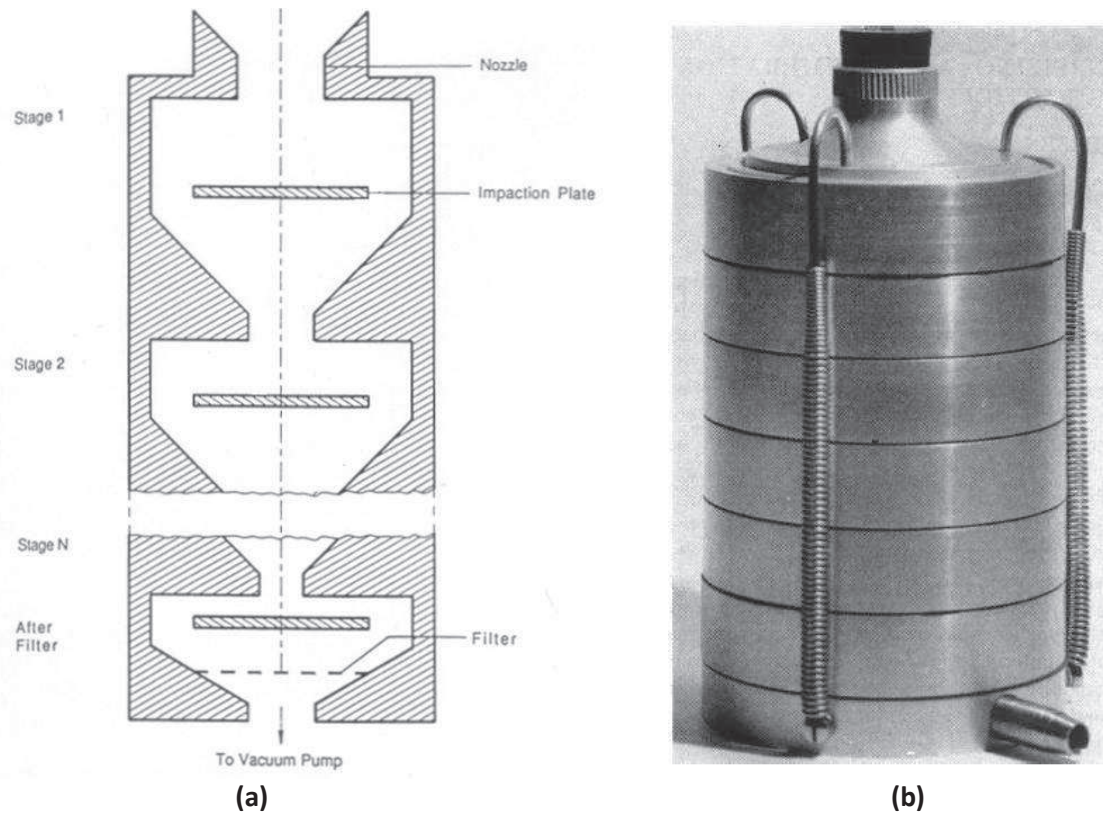


Figure 16 : Impacteur Andersen à six étages. (a) Schéma en coupe (Renoux et Boulaud, 1998) ; (b) Corps de l'appareil (Andersen, 1958).

### III.2.B La filtration

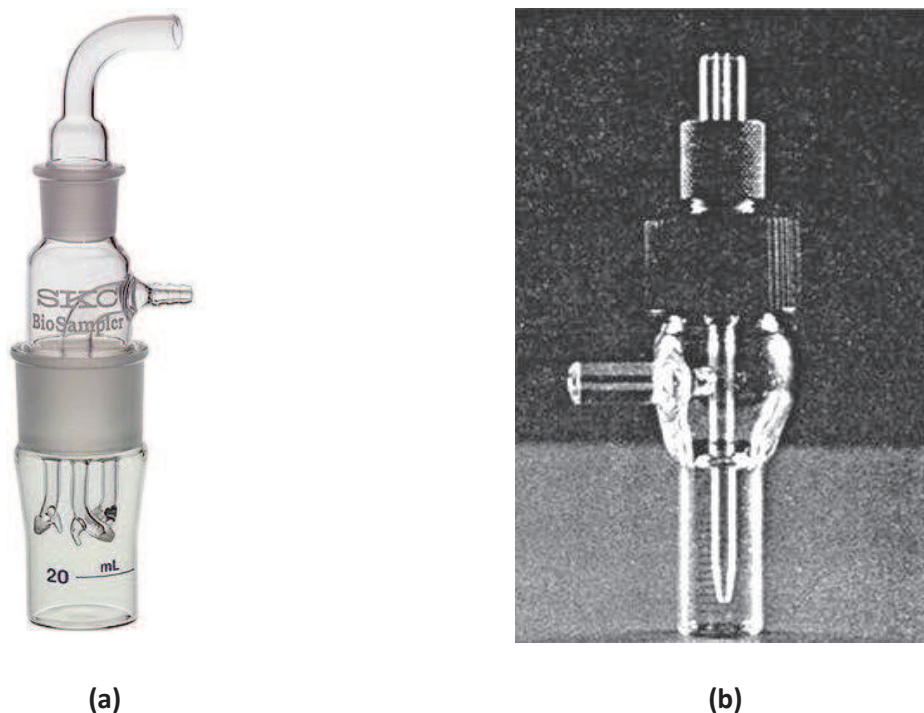
Le principe de la filtration consiste à faire passer un courant d'air au travers d'un filtre qui va retenir les microorganismes (Henningson et Ahlberg, 1994). En raison de sa rapidité et de sa facilité d'utilisation, ce système est couramment utilisé pour la collecte d'aérosols, notamment biologiques. La nature du filtre peut varier en fonction des analyses souhaitées (filtres en gélatine soluble, en fibres de verre, en polycarbonate, en polyvinylchloride, en cellulose...), et la taille des pores, en fonction des microorganismes à collecter (0,1  $\mu\text{m}$  pour les virus, 0,2  $\mu\text{m}$  pour les bactéries et 0,45  $\mu\text{m}$  pour les champignons) (Jensen et Schafer, 1998). Néanmoins, il a été montré que la composition du filtre influence la cultivabilité ; il en est de même pour le temps de prélèvement qui, s'il est trop long, augmente la dessiccation, diminuant ainsi la viabilité de certaines espèces sensibles à ce stress (Wang *et al.*, 2001 ; Durand *et al.*, 2002). Ces raisons font que cette technique est peu utilisée pour effectuer des analyses par culture. Par contre, elle est souvent citée, associée aux analyses moléculaires notamment lors de la collecte de volumes importants d'air nécessaires pour la réalisation d'inventaires moléculaires (Radosevich *et al.*, 2002 ; Angenent *et al.*, 2005 ; Tringe *et al.*, 2008).

### III.2.C L'impaction en milieu liquide

Les impacteurs en milieu liquide (aussi appelés Impinger) utilisent un liquide comme milieu de collecte. Les bioaérosols passent dans le liquide de collecte, qui peut (i) être directement étalé sur un milieu nutritif, (ii) subir une dilution avant l'ensemencement ou (iii) être entièrement filtré. Le filtre est ensuite mis en culture afin de dénombrer les colonies formées. Cette méthode permet de limiter le stress dû aux chocs mécaniques que peuvent induire les systèmes d'impaction ou de filtration.

Néanmoins, comme pour la méthode précédente, la présence d'agrégats de cellules, dispersés ou non, ne permet pas d'obtenir par culture une évaluation représentative du nombre de microorganismes. L'utilisation d'un liquide de collecte limite le temps de prélèvement. En effet, il est possible de voir apparaître des phénomènes de réaérosolisation et de multiplication des microorganismes, ainsi qu'une perte de la viabilité cellulaire (Terzieva *et al.*, 1996).

La littérature référence plusieurs types d'impingers (à un ou plusieurs étages), les plus utilisés étant le « All Glass Impinger (AGI) 30 » et le « SKC BioSampler Impinger » (Figure 17). Leur débit est de 12,5 L/min avec un  $d_{50}$  évalué à 0,3  $\mu\text{m}$ . Cette technique est utilisée avec la FISH (Lange *et al.*, 1997 ; Deloge-Abarkan *et al.*, 2007 ; Deloge-Abarkan *et al.*, 2009) ou en microscopie à épifluorescence (Rinsoz *et al.*, 2008), mais également en association avec les outils moléculaires (Alvarez *et al.*, 1995).



**Figure 17 : Les impacteurs en milieu liquide.**  
**(a) Le « SKC BioSampler Impinger » ; (b) Le « All Glass Impinger ».**

### III.2.D La concentration par aérocyclone

Dans un aérocyclone, l'aérosol est entraîné dans le flux d'air par force centrifuge avant de s'impacter sur les parois (sèches ou humides) du collecteur. L'utilisation d'un aérocyclone s'est avérée très efficace pour la collecte de petites particules, notamment pour concentrer les allergènes en vue d'essais immunologiques (Emberlin, 1995). En 2001, une étude réalisée par Williams *et al.*, a utilisé ce type de collecte pour récupérer dans l'air des spores de *Penicillium roqueforti* pour des analyses moléculaires (PCR, séquençage, Southern Blot...). Un échantillon sec est collecté dans un tube de type Eppendorf® avant d'être resuspendu dans de l'eau pour les analyses. Par la suite diverses améliorations ont été apportées. Un inventaire a été réalisé à partir de 144 m<sup>3</sup> d'air concentré pendant 3 heures par un aérocyclone à parois humides (Biotrace, UK), dans 100 ml d'eau additionnée de Tween (Maron *et al.*, 2005). Lindsley *et al.* (2006) ont mis au point un cyclone à deux étages pour la collecte de bioaérosols. Sur l'ensemble des deux tubes, 92% des spores de *Penicillium chrysogenum* et 95% des spores d'*Aspergillus versicolor* sont récupérées. Dans un contexte de crise sanitaire due à *Legionella* les émissions de cinq tours aéroréfrigérantes ont été investiguées à l'aide d'un cyclone expérimental dont les parois sont lavées en circuit fermé par de l'eau filtrée avec une efficacité de collection de 100% des aérosols  $\geq 1,2 \mu\text{m}$  (Mathieu *et al.*, 2006). Plus récemment, des échantillons d'air de différents sites de compostage furent collectés à l'aide d'un biocollecteur utilisant la force cyclonique et pouvant prélever jusqu'à 300 L d'air par minute (Figure 18). Les particules biologiques de l'air sont rassemblées dans un mélange de tween et d'eau stérile avant d'être utilisées pour des applications moléculaires de séquençage (Le Goff *et al.*, 2009).



**Figure 18 : Photo du biocollecteur d'air Coriolis<sup>®</sup> $\mu$  (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France).**



### III.3 METHODE DE COMPTAGE ET D'ETUDE

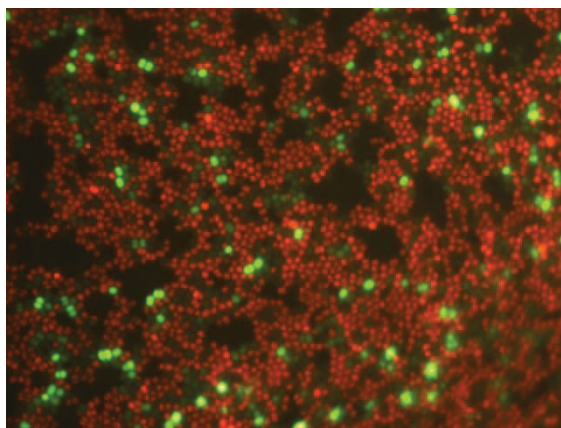
Le présent paragraphe présente et détaille une liste non exhaustive des méthodes analytiques existantes pour décrire d'un point de vue qualitatif et quantitatif les aérosols microbiens.

#### III.3.A La microscopie

L'observation directe au microscope est le plus souvent pratiquée pour les microorganismes de grande taille (plusieurs  $\mu\text{m}$ ). L'utilisation de cellules de Thoma ou de Malassez permet de compter le nombre de cellules dans une suspension. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle a été gravé un quadrillage. Néanmoins, cette méthode n'est pas aisément applicable aux microorganismes de petite taille comme les bactéries.

La microscopie a, elle aussi bénéficié d'un certain nombre d'avancées technologiques, notamment avec la mise au point du microscope électronique. Par cette technique, la lumière est remplacée par un faisceau d'électrons qui va balayer la surface de l'échantillon. Ce dernier émet alors des particules qui, une fois analysées par des détecteurs spécifiques, vont permettre la reconstruction d'une image en trois dimensions. Il est alors possible de visualiser des structures d'une taille inférieure à un dixième de micromètre. Ce procédé a été mis en œuvre pour l'identification et la caractérisation morphologique d'aérosols microbiens (bactéries, spores fongiques, écailles d'insectes...), mais il reste très peu exploité en raison du coût élevé de l'équipement et des difficultés rencontrées lors de l'interprétation des images par des non spécialistes (Wittmaack *et al.*, 2005)

L'épifluorescence permet de s'affranchir en partie des problèmes rencontrés avec les autres techniques de microscopie. Les microorganismes sont colorés par un fluorochrome qui se fixe à l'ADN (Acridine Orange, DAPI, BET) et fluorescer sous une lumière UV. Il est alors possible de dénombrer la flore totale de l'échantillon (Lange *et al.*, 1997 ; Mathieu *et al.*, 2006 ; Rinsoz *et al.*, 2008). En 1986, Palmgren *et al.* associent la filtration et la coloration à l'Acridine Orange dans une technique nommée « méthode CAMNEA ». Bien que la coloration à l'Acridine Orange permette en théorie de différencier les microorganismes morts (fluorescence rouge) de ceux qui restent vivants (fluorescence verte), l'interprétation des résultats est en pratique délicate (Davies, 1991). Le principe restant séduisant, un système plus performant a été mis en place afin de différencier les cellules dont l'intégrité membranaire est intacte et celles qui présentent une membrane cellulaire endommagée (système LIVE/DEAD BacLight®). Il se compose de deux fluorochromes distincts (le SYTO 9 et l'iodure de propidium) qui colorent la cellule en fonction de l'état de la membrane cellulaire. En effet, le SYTO 9 pénètre toutes les membranes cellulaires et va les colorer en vert, alors que l'iodure de propidium pénètre seulement les cellules dont l'intégrité membranaire est corrompue. La combinaison des deux colorations produit des cellules qui fluorescent en rouge (Figure 19) (Terzieva *et al.*, 1996). Les cellules vivantes fluorescent donc en vert alors que les mortes apparaissent en rouge.



**Figure 19: Photo d'aérosols de *Staphylococcus epidermidis* colorés par le système LIVE/DEAD BacLight®.**

Malgré ses différents avantages, la microscopie à épifluorescence n'est pas idéale pour l'étude des aérosols microbiens. En dépit de la simplicité du procédé, le dénombrement manuel des bioaérosols est long et laborieux, bien que l'automatisation des procédures d'analyse d'images, ait permis de s'affranchir des biais dus aux expérimentateurs (Eduard *et al.*, 2001). Les analyses automatiques ne permettent pas de différencier les microorganismes individualisés de ceux en agrégats (cas courant lors du dénombrement d'aérosols microbiens). Elles ne sont pas non plus adaptées à la présence d'impuretés et de particules qui autofluorescent (cas fréquent avec des échantillons d'air) créant ainsi des interférences (KildesØ et Nielsen, 1997). Il est possible de réduire les erreurs de non spécificité en utilisant le DAPI à la place de l'acridine orange. De même, le recours à des étapes de décolorations permet d'obtenir une meilleure qualité de détection. Cependant il existe une possibilité de dégradation de l'échantillon au moment de ces étapes (Heldal *et al.*, 1996).

### III.3.B La culture

Les microorganismes ont des besoins nutritionnels variables en fonctions des espèces, ce qui les rend plus ou moins exigeant vis-à-vis du milieu de culture sur lequel on souhaite les cultiver. Afin de reproduire au mieux les conditions de croissance des microorganismes, il est parfois nécessaire de fournir un certain nombre d'éléments (sels minéraux, matière organique, facteurs de croissance...). Il est également possible d'inhiber la croissance de certains microorganismes afin de favoriser celle d'autres. Cette pratique est très répandue pour la culture d'organismes bactériens, les milieux sont complétés avec des antibiotiques afin d'empêcher le développement des champignons. De même, bien que les temps d'incubation des bactéries soient d'environ un à sept jours à des températures comprises entre 27°C et 35°C, des bactéries comme *Thermoactinomyces sacchari* se développent à des températures de 55°C (Lacey, 1971).

L'étude des aérosols microbiens par des méthodes culturales n'en est pas à ses prémices, néanmoins les milieux utilisés sont très souvent des milieux à large spectre tels que les milieux TSA (Trypcase Soy Agar) et Nutrient Agar pour les bactéries ou MEA (Malt Extract Agar), DG-18 (Dichloran Glycerol 18 Agar) et PDA (Patato Dextrose Agar) pour les champignons (Asan *et al.*, 2004 ; Jo et Seo, 2005). Des milieux spécifiques peuvent être employés pour l'identification ou l'isolation de groupes bactériens ou fongiques précis.



La culture est associée à d'autres outils pour l'identification des groupes ou des espèces. Des techniques telles que la microscopie (morphologie, coloration de Gram...), les galeries API ou les tests portant sur le métabolisme sont souvent cités (Jaffal *et al.*, 1997 ; Seino *et al.*, 2005). Dans l'étude des aérosols microbiens, la culture est préférentiellement utilisée par rapport aux autres méthodes.

### III.3.C La PCR

C'est en 1995, qu'Alvarez *et al.* appliquèrent pour la première fois avec succès la PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'étude des aérosols microbiens. Néanmoins, les analyses moléculaires sont encore rarement utilisées dans ce type d'étude. En effet, 30% des articles traitant de la PCR comme principal outil analytique d'étude des bioaérosols ont été publiés après 2004 (Peccia et Hernandez, 2006).

Cette méthode est indépendante de la cultivabilité des microorganismes, assez faible pour les bactéries et champignons aéroportés en raison des stress occasionnés à la fois par l'aérosolisation et par la collecte. Il est reconnu que le caractère allergène et irritant des bioaérosols n'est pas dépendant de la cultivabilité. De plus, des disparités importantes sont régulièrement observées entre les comptages directs et les comptages de colonies (Tableau 2). La détection par PCR permet une étude complémentaire et distincte par rapport aux données importantes à disposition dans la littérature dédiée à la culture.

Cependant, les études ne cessent de se multiplier et la réglementation, alors exclusivement établie sur des méthodes de culture, tend à intégrer ces nouveaux outils (ex : Norme NF T90-471 relative à la quantification de *Legionella* dans les eaux). Elle a permis de mettre en évidence la présence de Mycobactéries dans l'air d'un bain bouillonnant intérieur (Schafer *et al.*, 2003) et dans l'air expiré par des patients tuberculeux (Wan *et al.*, 2004), ainsi que de détecter différents types de virus dans une étude de deux années sur les infections du tract respiratoire à Pékin (Ren *et al.*, 2009), dans des chambres d'hôpitaux (Sawyer *et al.*, 1994) ou chez de jeunes enfants (Marta *et al.*, 2008).

**Tableau 2 : Cultivabilité des bactéries et des champignons aéroportés.  
D'après Peccia et Hernandez, (2006).**

Environnement	Organismes (milieu de culture)	Cultivabilité (%)*	Référence
Bâtiments malsains	Bactéries (TSA)	<100	Moschandreas <i>et al.</i> (1996)
Elevage porcin	Bactéries (TSA)	1	Lange <i>et al.</i> (1997)
Elevage porcin	Bactéries et spores d'Actinomycètes (Agar nutritive)	1-10	Palmgren <i>et al.</i> (1986)
Fabrication de copeaux de bois	Spores fongiques (MEA)	10-40	
Agriculture rurale	Bactéries (Luria Bertani Agar (LB))	0,5-4	Tong et Lighthart (1999)
Eaux usées	Bactéries (R2A Agar)	0,1-1	Paez-Rubio <i>et al.</i> (2004)
Piscine thérapeutique	Bactéries (TSA)	0,1-0,2	Angenent <i>et al.</i> (2005)
Air urbain	Bactéries (TSA)	0,02	
Maisons ayant subi un dégat des eaux	Bactéries (TSA) et champignons (MEA)	0,001-30	Fabian <i>et al.</i> (2005)
Air extérieur	Bactéries (TSA) et champignons (MEA)	0,001-0,1	

\*Le pourcentage de cultivabilité est calculé comme étant 100 fois la concentration en microorganismes comptés sur une boîte de milieu non sélectif divisé par la concentration en microorganismes totaux déterminée par comptage direct au microscope.

### III.3.D La PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative permet la quantification d'un gène cible, elle représente donc une méthode de choix pour avoir une vision quantitative de la diversité microbienne de l'air. La spécificité et la sensibilité de cette technique conviennent à la détection et à la quantification des microorganismes aéroportés (Alvarez *et al.*, 1995 ; Stetzenbach *et al.*, 2004).

Néanmoins, il n'existe que peu d'analyses globales des bactéries (Oppliger *et al.*, 2008 ; Rinsoz *et al.*, 2008) et des champignons dans l'air. Il est donc difficile d'effectuer des comparaisons avec les données dont nous disposons déjà par culture. Bien que la PCR quantitative ait été largement utilisée dans d'autres environnements (eau et sol) ou pour des études cliniques (Watzinger *et al.*, 2004), dans l'air son utilisation a été limitée à la détection et à la quantification de genres microbiens (*Aspergillus*, *Penicillium*...) (Haugland *et al.*, 2004 ; Morrison *et al.*, 2004) ou d'espèces présentant un intérêt pour la santé publique (*Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Aspergillus fumigatus*, *Stachybotris chartarum*, *Alternaria alternata*, *Salmonella*...) (An *et al.*, 2006 ; Bellanger *et al.*, 2009 ; Fallschissel *et al.*, 2009) et pour la détection de virus (Monpoeho *et al.*, 2004).

### III.3.E L'hybridation *in situ*

Plusieurs études traitent de l'utilisation de la méthode FISH pour la détection et l'identification de microorganismes en aérosols. En 1997, Lange *et al.* montrèrent l'efficacité de cette méthode pour la détection d'un mélange artificiel de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli*. Néanmoins, cette technique paraît inadaptée pour l'étude d'échantillons environnementaux et notamment ceux de l'air. Le manque de sensibilité observé s'explique par la faible concentration en ARNr dans les cellules, celle-ci étant directement liée à la faible proportion de nutriments présents dans l'air. Deux études ont utilisé cette méthode avec succès pour la détection de *Legionella* en aérosol ainsi que dans un but informatif vis-à-vis de l'exposition des populations (Mathieu *et al.*, 2006 ; Deloge-Abarkan *et al.*, 2007).

### III.3.F Méthode d'identification : les inventaires

Une fois le principal verrou technologique contourné (par l'utilisation de la PCR notamment), les inventaires moléculaires se sont révélés particulièrement efficaces pour l'identification des microorganismes aéroportés. La littérature compte à ce jour 13 inventaires moléculaires réalisés sur des échantillons d'air en environnements intérieurs et extérieurs (Radosevich *et al.*, 2002 ; Hughes *et al.*, 2004 ; Boreson *et al.*, 2004 ; Angenent *et al.*, 2005 ; Maron *et al.*, 2005 ; Paez-Rubio *et al.*, 2005 ; Brodie *et al.*, 2007 ; Després *et al.*, 2007 ; Osman *et al.*, 2008 ; Tringe *et al.*, 2008 ; Bru-Adan *et al.*, 2009 ; Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009 ; Le Goff *et al.*, 2009). 8 491 séquences issues de l'air sont répertoriées dans les bases de données. Les avancées technologiques contribuent chaque année à l'augmentation de ce nombre.

## IV LA DIVERSITE DES AEROSOLS MICROBIEN

### IV.1 AIR EXTERIEUR

Bien que la composition chimique de l'atmosphère soit connue depuis des siècles, la composition en microorganismes de l'air n'a que très récemment suscité des interrogations vis à vis de son impact sur la biosphère (§ I.4.D) et sur les risques sanitaires.

La plupart des publications traitant de la charge et de la diversité microbienne au niveau de l'air extérieur étudie conjointement l'air intérieur. En effet, elles ont pour objectif principal de lier la population microbienne de l'extérieur à celle de l'intérieur afin d'identifier les principales sources en microorganismes (Pei-Chih *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2006 ; Sautour *et al.*, 2009).

Une autre approche consiste à identifier un environnement spécifique (rural, industriel...) et à le caractériser d'un point de vue microbiologique que ce soit par des méthodes culturales et/ou moléculaires.

#### IV.1.A Diversité bactérienne et eucaryote

Le premier inventaire de l'air a été réalisé par Radosevich *et al.* (2002). Depuis, plusieurs autres ont été également accomplis contribuant ainsi à l'augmentation de la quantité de données de séquences existantes dans les bases de données internationales.

Afin d'évaluer une partie de la diversité bactérienne de l'air extérieur, 768 séquences disponibles dans la littérature et issues de cinq inventaires moléculaires ont été regroupées et analysées (Figure 20). La répartition des différents phyla varie d'un inventaire à l'autre. Néanmoins, des tendances communes sont identifiables. En effet, le phylum des *Proteobacteria* domine dans 4 des 5 inventaires, avec des pourcentages allant jusqu'à 75% des séquences pour des échantillons atmosphériques (bien que l'échantillonnage soit faible, seulement 48 séquences). Pour un seul site, les *Firmicutes* dominent la diversité avec 54% des séquences retrouvées dans l'air de deux villes des Etats-Unis. Pour l'ensemble des inventaires ces deux phyla représentent la majorité de la diversité.

En 2007, Brodie *et al.* réalisèrent un suivi sur 17 semaines de la diversité bactérienne de l'air de deux villes américaines : Austin et San Antonio, par le biais d'outils moléculaires. Les estimateurs utilisés durant cette étude (Chao1 et ACE) prédirent entre 1 500 et 1 800 phylotypes pour l'échantillon d'air. Les analyses de raréfactions mirent en avant un niveau de diversité dans l'air similaire à celui retrouvé pour le sol dans une autre étude (Tringe *et al.*, 2005).

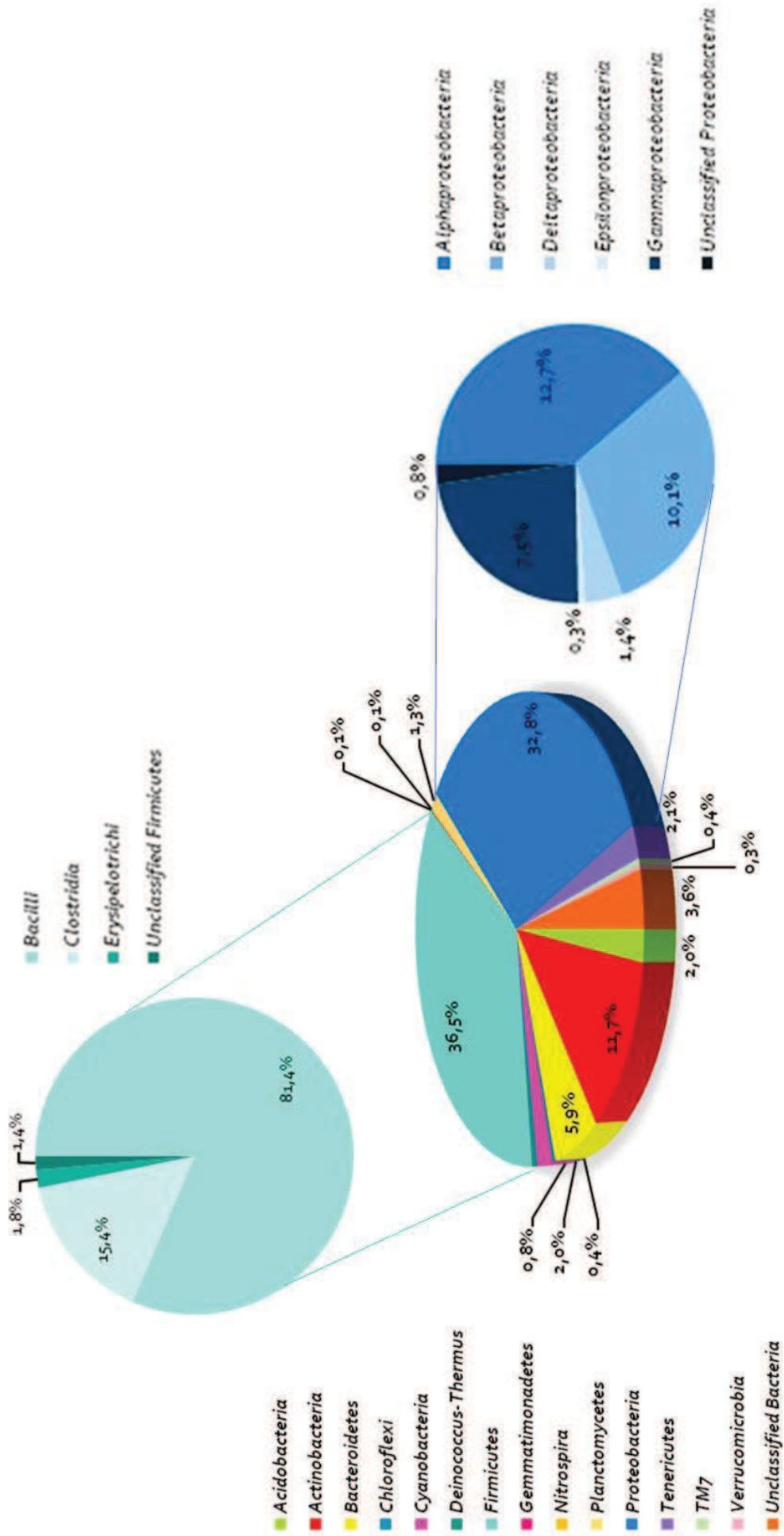


Figure 20 : Répartition de la diversité de 5 inventaires de l'air extérieur de ADNr 16S regroupant 768 séquences.

L'affiliation a été réalisée avec le logiciel Classifier de RDP II (Wang et al., 2007) à partir de séquences disponibles dans la littérature soit 768 séquences issues de 5 inventaires (Radosevich et al., 2002 ; Maron et al., 2005 ; Paez-Rubio et al., 2005 ; Brodie et al., 2007 ; Després et al., 2007).

L'étude de Després *et al.* (2007) fait apparaître une plus forte diversité bactérienne dans les environnements ruraux par rapport aux environnements urbains. Le minimum de diversité est quant à lui observé pour les prélèvements collectés en altitude. L'analyse T-RFLP des séquences met en évidence quelques pics retrouvés dans les échantillons des trois sites de prélèvements, mais la majorité est exclusive d'un des sites. Néanmoins, certains pics identifiés dans les échantillons pris en altitude existent également dans les échantillons d'air rural et urbain.

Cette étude met également en évidence la forte abondance dans l'air (entre 40% et 100%) de deux phyla fongiques : les *Ascomycota* et les *Basidiomycota*. Ils sont connus pour sporuler activement dans l'atmosphère, et ce sont leurs spores qui sont détectées en de grande concentration et dans de nombreux sites (Wu *et al.*, 2003 ; Griffin *et al.*, 2003 ; Boreson *et al.*, 2004 ; Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009, Després *et al.*, 2012).

#### IV.1.B Variabilité spatiale et temporelle

Par culture, il apparaît que les concentrations en bioaérosols sont plus importantes en milieux urbains qu'en milieux ruraux ou côtiers (Tableau 3). Un « effet site » est régulièrement observé que ce soit par culture ou par des méthodes moléculaires sur la diversité ou sur la concentration en microorganismes (Harrison *et al.*, 2005). Dans les régions polaires, le nombre de particules totales est inférieur aux valeurs potentiellement retrouvées dans les milieux ruraux ou urbains. Le nombre de microorganismes retrouvés dans l'air de ce type de site suit également cette tendance à la baisse. De plus, l'augmentation de l'altitude contribue à accentuer ce phénomène (Sattler *et al.*, 2001 ; Bauer *et al.*, 2002 ; Harrison *et al.*, 2005 ; Segawa *et al.*, 2005).

**Tableau 3 : Concentrations en cellules bactériennes et fongiques totales dans des prélèvements atmosphériques (aérosols, nuages et précipitations) pour différents sites, classés par concentration croissante pour chaque type de masse d'air.**

Echantillon	Site d'échantillonnage	Bactéries totales (Cellules.m <sup>-3</sup> ou Cellules.mL <sup>-1</sup> )	Champignons totaux (Cellules.m <sup>-3</sup> ou Cellules.mL <sup>-1</sup> )	Références
<b>URBAIN / ANTHROPIQUE</b>				
Aérosols	Site urbain (Sud de l'Angleterre)	3,2.10 <sup>3</sup> - 1,7.10 <sup>4</sup>		Harrison <i>et al.</i> (2005)
Aérosols	Zone de retraitement des déchets, extérieur	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>8</sup>	Durand <i>et al.</i> (2002)
Aérosols	Zone urbaine, au dessus d'un champ irrigué par des eaux usées (Mexique)	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>9</sup>		Paez-Rubio <i>et al.</i> (2005)
Aérosols	Bâtiments agricoles, intérieur (Danemark, Suisse, Espagne)	1,5.10 <sup>7</sup> - 4,7.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>6</sup> - 2,0.10 <sup>7</sup>	Radon <i>et al.</i> (2002)
<b>RURAL / BRUIT DE FOND</b>				
Nuage	Mont Sonnblick, 3106 m a.s.l. (Autriche)	7,9.10 <sup>2</sup> - 2,5.10 <sup>3</sup> (mL <sup>-1</sup> )		Sattler <i>et al.</i> (2001)
Pluie	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	6,0.10 <sup>3</sup> - 1,5.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )	2,4.10 <sup>2</sup> - 1,3.10 <sup>3</sup> (mL <sup>-1</sup> )	Bauer <i>et al.</i> (2002)
Neige (manteau)	Mont Sonnblick, 3106 m a.s.l. (Autriche)	9,5.10 <sup>3</sup> - 1,4.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )		Sattler <i>et al.</i> (2001)
Aérosols	Rural (Sud de l'Angleterre)	4,2.10 <sup>3</sup> - 1,6.10 <sup>6</sup>		Harrison <i>et al.</i> (2005)
Aérosols	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	6,7.10 <sup>3</sup> - 1,9.10 <sup>4</sup>	1,7.10 <sup>2</sup> - 3,2.10 <sup>3</sup>	Bauer <i>et al.</i> (2002)
Nuage	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	4,9.10 <sup>3</sup> - 8,1.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )	1,1.10 <sup>3</sup> - 1,1.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )	Bauer <i>et al.</i> (2002)
		1,5.10 <sup>3</sup> - 2,1.10 <sup>4</sup>	3,4.10 <sup>2</sup> - 5,0.10 <sup>3</sup>	Bauer <i>et al.</i> (2002)
Neige (manteau)	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	2,0.10 <sup>3</sup> - 3,3.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )	1,5.10 <sup>2</sup> - 1,4.10 <sup>3</sup> (mL <sup>-1</sup> )	Bauer <i>et al.</i> (2002)
Neige (manteau)	Montagnes Tateyama, 2700 m a.s.l. (Japon)	6,0.10 <sup>3</sup> - 2,3.10 <sup>5</sup> (mL <sup>-1</sup> )		Segawa <i>et al.</i> (2005)
<b>CÔTIER</b>				
Pluie	5 km de la côte (Japon)	8,0.10 <sup>2</sup> - 1,1.10 <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> )		Casareto <i>et al.</i> (1996)
Aérosols	Site côtier (Sud de l'Angleterre)	2,8.10 <sup>3</sup> - 1,4.10 <sup>4</sup>		Harrison <i>et al.</i> (2005)



Des variations saisonnières ont également été observées dans le cadre de plusieurs études. Lors de différentes campagnes menées en continu, il a été mis en évidence des pics de concentration fongique ou bactérienne, liés aux saisons et parfois même à la période de la journée (Huang *et al.*, 2002 ; Oliveira *et al.*, 2005 ; Oliveira *et al.*, 2009a ; Oliveira *et al.*, 2009b, Després *et al.*, 2011).

En 2006, Maron *et al.* montrèrent une hiérarchie dans cette variabilité : journalière < hebdomadaire < saisonnière. Les analyses effectuées corrélèrent la variabilité saisonnière des communautés bactériennes aux conditions climatiques, notamment la température et l'humidité relative, alors que les variations quotidiennes et hebdomadaires semblaient plutôt influencées par d'autres facteurs comme les activités anthropiques. De la même manière, Lighthart et Shaffer (1995) observèrent des concentrations minimales en bactéries la nuit (32,2 UFC/m<sup>3</sup>) et des pics de concentration au lever et à la fin du jour, qu'ils supposèrent directement influencés par les conditions météorologiques (notamment la brise de mer).

## IV.2 LES BIOAEROSOLS DANS LES ESPACES CLOS

L'exposition aux bioaérosols dans l'environnement intérieur a une influence significative sur l'intensité d'apparition de certains symptômes : irritation des muqueuses de la gorge, du nez, sécheresse et démangeaisons au niveau des yeux, difficultés respiratoires, maux de tête, difficultés de concentration ou fatigue (Tableau 4).

**Tableau 4 : Principaux symptômes associés à l'exposition à des biocontaminants des environnements intérieurs (Stetzenbach, 1998).**

<b>Agents</b>	<b>Effets sanitaires</b>
Algues	Réactions allergiques
Bactéries	Pneumopathies d'hypersensitivité Infections Irritations des muqueuses
Endotoxines	Toux Maux de tête Fièvre Malaise Douleurs musculaires Détresse respiratoire
Champignons	Réactions allergiques Asthme Irritations dermiques Pneumopathies d'hypersensitivité Infections Irritations des muqueuses
Mycotoxines	Maux de tête Problèmes musculaires Désordres neurologiques Détresse respiratoire Toxicoses
Virus	Infections

La mise en contact avec quelques unes de ces entités biologiques ainsi qu'avec des fragments microbiens, tels que des débris de membrane cellulaire, des métabolites microbiens (endotoxines, mycotoxines et Composés Organiques Volatiles) peut provoquer des effets néfastes sur la santé.

De nombreuses études basées sur la culture dans des environnements intérieurs ont montré que des niveaux bactériens et fongiques significatifs sont présents dans des endroits apparemment anodins tels que des bureaux de travail, des maisons résidentielles, des écoles et des centres de soins (Tableau 5). Les données issues de 12 publications parues entre 1999 et 2008 et portant sur la charge bactérienne et fongique cultivable des espaces clos montrent des concentrations comprises entre 10 et 10<sup>4</sup> UFC/m<sup>3</sup>.

Peu d'études se basent sur des méthodes moléculaires pour détecter et caractériser les bactéries aéroportées. Néanmoins, quelques études récentes ont été réalisées sur des échantillons d'air provenant de différents types d'industries. Deux études parues en 2008 se sont attachées à quantifier la concentration en bactéries totales dans l'air de plusieurs stations d'épuration ainsi que dans des élevages de volailles (Oppliger *et al.*, 2008 ; Rinsoz *et al.*, 2008). Les concentrations sont plus élevées dans les élevages de volailles (entre  $7,7 \cdot 10^7$  et  $1,3 \cdot 10^9$  cellules/m<sup>3</sup>) que dans les différentes stations d'épuration (en moyenne entre  $2,8 \cdot 10^5$  et  $3,2 \cdot 10^6$  cellules/m<sup>3</sup>). Plus récemment, une équipe canadienne mit en évidence des concentrations similaires dans différents élevages de volailles (Just *et al.*, 2001). En 2008 et 2009, Nehmé *et al.* ont évalué la charge totale en bactéries et en archées dans des porcheries. Ils ont obtenu des valeurs allant jusqu'à  $10^8$  bactéries/m<sup>3</sup> et  $10^8$  copies d'ARNr 16S/m<sup>3</sup> d'air pour les archées. Cayer *et al.* (2007) ont utilisés la PCR quantitative afin d'estimer les concentrations en espèces de *Mycobacterium* véhiculées par l'air d'usine de traitements de mousse de tourbe.

Si l'exposition des travailleurs fait l'objet de quelques recherches, l'étude des aérosols microbiens dans des lieux plus conventionnels (logements, transports, établissements publics...) est en revanche peu documentée. Seules deux études, publiées en 2007 et 2008, ont établi des valeurs comprises entre  $10^6$  to  $10^7$  cellules/m<sup>3</sup> d'air pour des échantillons collectés dans des cabines d'avions lors de vols commerciaux (La Duc *et al.*, 2007; Osman *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de données moléculaires quant à la quantification des charges fongiques totales.

Tableau 5 : Récapitulatif bibliographique des principales concentrations bactériennes et fongiques retrouvées dans différents espaces clos.

Auteurs	Lieux	Collecteurs	Bactéries cultivables (UFC/m <sup>3</sup> )	Champignons cultivables (UFC/m <sup>3</sup> )
(Górny <i>et al.</i> , 1999)	Logements	Impacteur à 6 étages	≈ 10 <sup>4</sup>	≈ 10 <sup>4</sup>
(Górny et Dutkiewicz, 2002)	Logements sains	Impacteur à 1 étage	8,8.10 <sup>1</sup> - 4,3.10 <sup>3</sup>	0 - 2.10 <sup>3</sup>
(Awad, 2002)	Logements contaminés		1,78.10 <sup>2</sup> - 4,7.10 <sup>3</sup>	4,9.10 <sup>1</sup> - 1,7.10 <sup>3</sup>
	Stations de métro au Caire	AGI 30	3.10 <sup>3</sup>	
(Guo <i>et al.</i> , 2004)	Marchés	Impacteur à 1 étage	<b>Maximum : 7,54.10<sup>4</sup></b> 1,03.10 <sup>3</sup>	
(Bouillard <i>et al.</i> , 2005)	Immeubles de bureaux	MAS 100	4,4.10 <sup>1</sup> - 2,5.10 <sup>3</sup>	
(Jo et Seo, 2005)	Bars, cyber cafés, maisons et écoles	Impacteur à 1 étage	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
(Lee et Jo, 2005)	Habitacles de voitures et bus	Impacteur à 1 étage	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>3</sup>
(Pastuszka <i>et al.</i> , 2005)	Hôpitaux	Impacteur à 6 étages	≈ 10 <sup>3</sup>	
(Jo et Kang, 2006)	Clinique vétérinaire, magasins d'animaux, jardins de fleurs	Impacteur à 1 étage	10 - 10 <sup>3</sup>	10 - 10 <sup>3</sup>
(Lee et Jo, 2006)	Appartements	Impacteur à 1 étage	10 - 10 <sup>3</sup>	10 - 10 <sup>3</sup>
	Hôpital		4,04.10 <sup>2</sup>	3,82.10 <sup>2</sup>
(Kim et Kim, 2007)	Jardin d'enfant		9,31.10 <sup>2</sup>	5,36.10 <sup>2</sup>
	Lieu d'accueil pour personnes âgées	Impacteur à 6 étages	1,34.10 <sup>2</sup>	2,66.10 <sup>2</sup>
	Infirmerie		2,54.10 <sup>2</sup>	2,89.10 <sup>2</sup>
(Tsai et Liu, 2009)	Fabrique de pâtes	MAS 100	7,06.10 <sup>2</sup> - 1,1.10 <sup>3</sup>	3,47.10 <sup>2</sup> - 9,17.10 <sup>2</sup>

Bien qu'ils soient souvent considérés comme étant des lieux de protection vis-à-vis des agressions extérieures, les environnements intérieurs sont parfois plus exposés aux bioaérosols que l'air extérieur (Jo et Seo, 2005 ; Lee et Jo, 2006 ; Lee *et al.*, 2006).

#### IV.2.A Variabilités dans les espaces clos

Dans les espaces clos, une seule étude a surveillé la charge et la diversité bactérienne en utilisant une approche indépendante de la culture dans huit bâtiments de confinement porcins. Dans cette étude, la concentration bactérienne totale était plus élevée en hiver qu'en été. Malgré cela, les profils DGGE et l'analyse phylogénétique ont montré une biodiversité semblable dans chaque bâtiment de confinement des porcs pendant les deux saisons. Ces résultats indiquent également que le lisier de porc est une source potentielle influençant la diversité des bioaérosols rencontrés dans ces lieux (Nehmé *et al.*, 2008).

Les approches culturales sont principalement utilisées lors de la surveillance des variations de concentration bactérienne ou fongique ou lors d'études de la diversité dans les espaces clos. Dans une salle d'hôpital, un suivi d'une année des concentrations bactériennes et fongiques a montré une variation significative par mois. Cette variation est beaucoup plus marquée pour les champignons que pour les bactéries avec un pic prédominant en Novembre et la valeur la plus basse observée au mois de Mai (Augustowska *et al.*, 2005). Les mêmes conclusions ont été données par Aygdodu *et al.* (2005). Ils ont mis en évidence une variation saisonnière dans les écoles primaires, avec des concentrations de champignons et de bactéries variant selon les mois. L'analyse statistique réalisée sur leurs données, a montré une corrélation positive entre les concentrations en bactéries et l'humidité de l'air et entre les concentrations en bactéries et l'année de construction de l'école. En 2006, Cho *et al.* mesurèrent des concentrations en champignons aéroportés significativement plus élevées dans cinq stations de métro de Séoul, lorsque le nombre de passagers et la fréquence des trains y étaient les plus élevés. Ils ont suggéré que la poussière déposée pouvait avoir été la principale source de champignons aéroportés et que les passagers et les trains pouvaient avoir joué un rôle dans la suspension des champignons présents dans cette poussière. L'étude de LeBouf *et al.* (2008) suggéra que les niveaux fongiques de l'air pouvaient être épisodiques ou influencés par plusieurs facteurs environnementaux. En effet, une variabilité entre différents jours et au sein d'un même jour a été déterminée avec des concentrations fongiques variant plus en hiver qu'en été. Wang *et al.* (2010) ont montré une concentration bactérienne plus haute en automne qu'en hiver dans des rames de trains. Des résultats différents ont été observés pour les concentrations fongiques avec des valeurs plus élevées au printemps et plus basses en hiver. Des mesures effectuées sur dix jours dans un musée chinois mettaient en évidence des variations quotidiennes avec une concentration plus élevée en bactéries et en champignons durant l'après-midi. L'étude a également lié ces résultats à une plus forte fréquentation humaine (Chen *et al.*, 2010a).

Les approches culturales peuvent également être utilisées afin d'évaluer des variations au sein des communautés bactériennes. Dans les écoles primaires, Aygdodu *et al.* (2005) ont observé la prédominance de certains genres bactériens tels que *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Bacillus* ainsi que de certains genres fongiques comme *Penicillium*, *Cladosporium* et *Alternaria*. Par ailleurs, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* et *Pseudomonas* ont été retrouvés tous les mois.

## IV.2.B Bactéries

### IV.2.B.a *Diversité*

Les publications, essentiellement basées sur la culture, mettent en évidence une majorité de bactéries à Gram positif dans les environnements intérieurs et notamment *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. et *Bacillus* spp. Cinquante-cinq genres bactériens différents ont été retrouvés dans 12 articles publiés entre 1980 et 2009 portant sur la diversité bactérienne cultivable dans les environnements intérieurs (Tableau 6).



**Tableau 6 : Genres bactériens retrouvés dans des échantillons d'air intérieur par culture (les espèces sont précisées lorsqu'elles sont connues).**

Phylum	Genre (espèces)	Références	
<b>Actinobacteria</b>	<i>Arthrobacter</i>	[1], [15]	
	<i>Brevibacterium</i> (dont <i>epidermidis</i> )	[11], [15], [24]	
	<i>Corynebacterium</i> (dont <i>aquaticum</i> , <i>amycolatum</i> , <i>pseudodiphtheriticum</i> , <i>propinquum</i> )	[1], [7], [11], [15], [17], [23]	
	<i>Dermacoccus</i> (dont <i>nishinomiyensis</i> )	[10]	
	<i>Kocuria</i> (dont <i>rosea</i> , <i>kristinae</i> , <i>lylae</i> , <i>varians</i> , <i>viridans</i> )	[7], [10], [15], [18]	
	<i>Kytococcus</i> (dont <i>sedentarius</i> )	[1]	
	<i>Micrococcus</i> (dont <i>cryophilus</i> , <i>kristinae</i> , <i>luteus</i> , <i>varians/roseus</i> )	[1], [2], [5], [7], [11], [15], [17], [18], [23], [24]	
	<i>Microbacterium</i>	[15]	
	<i>Mycobacterium</i>	[1]	
	<i>NoCARDIA</i>	[1], [2]	
	<i>Oerskovia</i>	[11]	
	<i>Propionibacterium</i>	[11], [23]	
	<i>Rothia</i>	[24]	
	<i>Rhodococcus</i>	[1], [15]	
	<i>Saccharopolyspora</i> (dont <i>rectivirgula</i> )	[1]	
	<i>Streptomyces</i>	[1], [5], [8]	
	<i>Stomatococcus</i> (dont <i>miciliginosus</i> )	[10], [11]	
	<b>Bacteroidetes</b>		
	<i>Chryseobacterium</i> (dont <i>indologenes</i> )	[10], [18]	
<i>Flavobacterium</i> (dont <i>breve</i> , <i>indologenes</i> , <i>aurum</i> , <i>odoratum</i> )	[1], [10]		
<i>Weeksella</i> (dont <i>zoohelcum</i> )	[1]		
<b>Firmicutes</b>			
<i>Aerococcus</i> (dont <i>viridans</i> )	[1], [7], [18]		
<i>Bacillus</i> (dont <i>alvei</i> , <i>amyloliqueficans</i> , <i>brevis</i> , <i>cereus</i> , <i>circulans</i> , <i>firmus</i> , <i>lentus</i> , <i>megaterium</i> , <i>pumilus</i> , <i>sphaericus</i> , <i>stearothermophilus subtilis</i> )	[1], [2], [5], [7], [11], [15], [17], [25], [24]		
<i>Enterococcus</i> (dont <i>durans</i> , <i>faecalis</i> )	[1], [7], [10], [11], [17], [23]		
<i>Erysipelothrix</i>	[11]		
<i>Kurtzia</i>	[11]		
<i>Lactobacillus</i>	[11], [23]		
<i>Listeria</i>			
<i>Staphylococcus</i> (dont <i>atletae</i> , <i>aureus</i> , <i>auricularis</i> , <i>capitis</i> , <i>caprae</i> , <i>chromogenes</i> , <i>cohnii</i> , <i>epidermidis</i> , <i>haemolyticus</i> , <i>hominis</i> , <i>kloosii</i> , <i>lentus</i> , <i>lugdunensis</i> , <i>saprophyticus</i> , <i>schleiferi</i> , <i>sciuri</i> , <i>simulans</i> , <i>warneri</i> , <i>xylosus</i> )	[1], [2], [5], [7], [10], [11], [14], [15], [17], [18], [20], [23], [24]		
<i>Streptococcus</i> (dont <i>adjacens</i> , <i>equinus</i> , <i>mitis</i> , <i>pneumoniae</i> , <i>viridans</i> )	[1], [5], [7], [11], [17], [20], [23]		
<i>Thermoactinomyces</i> (dont <i>vulgaris</i> )	[1]		

**Références :** [1] (Górny et Dutkiewicz, 2002) ; [2] (Górny et al., 1999) ; [3] (Jo et Seo, 2005) ; [4] (Meklin et al., 2002) ; [5] (Jaffal et al., 1997) ; [6] (Lee et Jo, 2006) ; [7] (Novikova et al., 2006) ; [8] (Grigorevski-Lima et al., 2006) ; [9] (Lee et al., 2006) ; [10] (Bouillard et al., 2005) ; [11] (Aydogdu et al., 2005) ; [12] (Bogomolova et Kirtsideli, 2009) ; [13] (Picco et Rodolfi, 2000) ; [14] (Awad, 2002) ; [15] (Pastuszka et al., 2005) ; [16] (Basilico et al., 2007) ; [17] (Kim et Kim, 2007) ; [18] (Seino et al., 2005) ; [19] (Lee et Jo, 2005) ; [20] (Szám et al., 1980) ; [21] (Ren et al., 2001) ; [22] (Ren et al., 1999) ; [23] (Sarica et al., 2002) ; [24] (Tsai et Liu, 2009). Toutes les études sont réalisées par culture sauf [7] qui associe en plus de la culture, un séquençage.

Si la diversité bactérienne cultivable dans les espaces clos est relativement bien documentée, le recours à des méthodes moléculaires est quant à lui rare. Récemment, les outils moléculaires ont été employés pour l'étude de la diversité bactérienne de l'air des espaces clos, mais également pour l'étude de la diversité en aérosols fongiques ou bien encore celle des archées (Angenent *et al.*, 2005 ; Nehmé *et al.*, 2008 ; Nieguitsila *et al.*, 2007 ; Osman *et al.*, 2008 ; Tringe *et al.*, 2008 ; Moletta-Denat *et al.*, 2009 ; Nehmé *et al.*, 2009 ; Kejun, 2011). L'utilisation de ces outils a mis en évidence une nouvelle image de la diversité microbienne de l'air des espaces clos ainsi que la présence de tous les domaines du vivant (*Bacteria*, *Eukarya* and *Archaea*).

Seulement trois études se sont intéressées à la diversité microbienne des environnements intérieurs depuis le premier inventaire de l'air effectué par Radosevich *et al.* en 2002. Il s'agit d'une étude sur l'air intérieur d'une piscine thérapeutique dans un contexte de crise sanitaire due à *Mycobacterium* (Angenent *et al.*, 2005), d'une étude sur l'air de plusieurs cabines d'avions lors de vols commerciaux longs et courts courriers (Osman *et al.*, 2008) et d'une étude réalisée sur l'air de deux centres commerciaux par une approche métagénomique (Tringe *et al.*, 2008). L'examen des différentes données fait apparaître une diversité bactérienne différente de celle observée par les méthodes de culture. La diversité bactérienne est faible (10 phyla en moyenne) et essentiellement dominée par les *Alpha-*, *Beta-* et *Gamma-proteobacteria*. Des similitudes existent sur les groupes préférentiellement retrouvés dans les divers environnements (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*...) et sur la présence de phyla non-cultivés tels que OP10 et TM7.

En effet, les deux centres commerciaux investigués sont dominés par *Brevundimonas* spp. avec plus de 58% des séquences. Ce genre cosmopolite a déjà été retrouvé dans presque tous les environnements : le sol, l'eau douce ou l'eau de mer, les boues ou bien encore le pétrole. En outre, *Brevundimonas* spp. a été retrouvé par culture dans des environnements supposés stériles, tels que la station spatiale MIR ou dans des espaces cliniques où cette bactérie a été impliquée dans des infections nosocomiales.

Les cabines d'avions étaient quant à elles dominées par *Psychrobacter* spp. et *Agrobacterium* spp. Ces bactéries Gram à négatif se rencontrent dans un large nombre d'environnement et notamment dans les environnements froids et salins dans le cas de *Psychrobacter* spp. et dans les sols en ce qui concerne *Agrobacterium* spp. Cette dernière bactérie est souvent impliquée lors d'effets pathogènes sur des plantes.

Du point de vue du risque sanitaire associé à la présence d'espèces pathogènes, ces études mettent en évidence la surreprésentation dans l'air d'un certain nombre d'espèces de pathogènes opportunistes tels que *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ou *Stenotrophomonas maltophilia*. Les espèces pathogènes trouvées dans l'air sont souvent associés à des infections nosocomiales (*Acinetobacter baumannii*, *Clostridium jeikeium*...) et à des infections respiratoires (*Mycobacterium* spp.). Aucun pathogène virulent tels que *Bacillus anthracis* ou *Legionella pneumophila*, par exemple, n'ont été rencontrés dans ces études.

Tableau 7 : Pourcentage d'abondance des principales espèces retrouvées dans 4 inventaires moléculaires.

	Piscine	Centre commercial 1	Centre commercial 2	Cabines d'avions	Présence dans des études basées sur la biologie moléculaire	Présence dans des études basées sur la culture
<i>Acinetobacter</i> spp.	1,91%	0%	12,11%	1,97%	75%	38%
<i>Agrococcus</i> spp.	0%	0,16%	0,88%	0%	50%	0%
<i>Bacillus</i> spp.	1,67%	0%	0,55%	2,82%	75%	69%
<i>Brevundimonas</i> spp.	0%	59,46%	49,45%	0%	50%	8%
<i>Corynebacterium</i> spp.	2,39%	0%	0%	1,41%	50%	46%
<i>Delftia</i> spp.	0%	1,66%	0,15%	0%	50%	0%
<i>Desemzia</i> spp.	0%	0,24%	0,70%	0%	50%	0%
<i>Devosia</i> spp.	0%	0,04%	0,07%	0%	50%	0%
<i>Janthinobacterium</i> spp.	0%	0,95%	0,48%	0,28%	75%	0%
<i>Massilia</i> spp.	2,39%	0%	1,73%	0,28%	75%	0%
<i>Methylobacterium</i> spp.	1,44%	0,16%	2,87%	9,32%	100%	0%
<i>Micrococcus</i> spp.	0,23%	0%	0%	0%	25%	77%
<i>Mycobacterium</i> spp.	44,26%	0%	0%	1,13%	50%	8%
<i>Paracoccus</i> spp.	0,24%	0,08%	0%	0,56%	75%	0%
<i>Phyllobacterium</i> spp.	0,24%	0,04%	0,15%	0%	75%	0%
<i>Pseudomonas</i> spp.	6,22%	0,71%	0,70%	3,10%	100%	38%
<i>Psychrobacter</i> spp.	0%	0%	0,66%	20,33%	50%	0%
<i>Rhodococcus</i> spp.	0,23%	0,08%	0,04%	0%	75%	15%
<i>Sphingobacterium</i> spp.	0%	0,51%	1,33%	0%	50%	0%
<i>Sphingobium</i> spp.	0,24%	0,04%	0%	0%	50%	0%
<i>Sphingomonas</i> spp.	0%	0,83%	1,28%	0,28%	75%	15%
<i>Staphylococcus</i> spp.	3,11%	0%	0%	7,06%	50%	100%
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0,24%	31,39%	11,19%	0%	75%	0%
<i>Streptococcus</i> spp.	1,46%	0%	0%	5,08%	50%	54%

Les observations basées sur les données de culture et les données moléculaires font apparaître des prédominances d'espèces différentes d'un environnement à un autre (Tableau 7).

La plupart des espèces retrouvées dans les quatre environnements intérieurs investigués par des méthodes moléculaires est sous représentée dans les études basées sur la culture (*Methylobacterium* spp. et *Pseudomonas* spp. par exemple). L'utilisation des outils moléculaires permet d'accéder à la mise en évidence d'espèces pouvant être masquées par culture par d'autres espèces aisément cultivables telles que *Staphylococcus* spp.

Il est également intéressant de noter que la plupart des séquences retrouvées dans les environnements intérieurs sont proches de séquences déjà retrouvées dans d'autres environnements (Tableau 8). L'air aurait-il un rôle majeur dans la dispersion des espèces ou alors existe-t-il un biais dû à la surreprésentation des séquences « humaines » dans les bases de données (la contamination humaine serait-elle prédominante dans les espaces clos) ?

**Tableau 8 : Récapitulatif de la proportion de séquences connues ou inconnues dans deux études sur l'air intérieur (Angenent *et al.*, 2005 ; Tringe *et al.*, 2008).**

<i>Environnements</i>	<i>Nombre de séquences 16S</i>	<i>Phylotypes</i>	<i>Connus</i>	<i>Inconnus</i>
<i>Centre Commercial 1</i>	2659	129	101 (78%)	28 (22%)
<i>Centre Commercial 2</i>	3063	108	98 (91%)	10 (9%)
<i>Piscine</i>	1300	628	541 (86%)	87 (14%)

## IV.2.B.b Principaux pathogènes bactériens de l'air

L'existence de bactéries aéroportées ayant un potentiel pathogène est bien connue et parfois associée à des crises sanitaires de grande ampleur (Tableau 9).

**Tableau 9 : Agents infectieux bactériens ayant une transmission en aérosols.**  
D'après Stetzenbach *et al.* (2004).

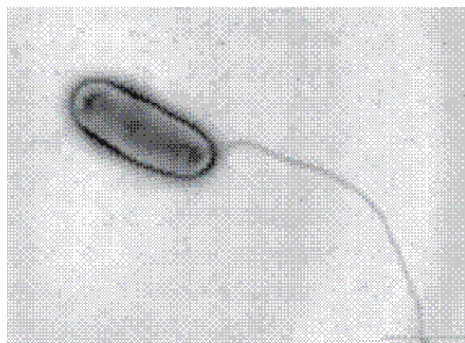
Organismes	Effets sanitaires	Exposition
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax, nécroses	Bioterrorisme, animaux contaminés, vétérinaires
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie, nécroses	Homme à homme par particules de salive
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie	Rongeurs contaminés, potentielle arme biologique
<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonie	Aérosols provenant de gouttellettes d'eau
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Personne à personne
<i>Yersinia pestis</i>	Peste	Potentielle arme biologique, puces

➤ *Legionella pneumophila*

Les *Legionella* sont des bactéries ubiquistes dans les milieux hydriques naturels où elles sont généralement inoffensives pour l'Homme. En revanche, dans les bâtiments ou les installations industrielles comme les tours aéroréfrigérantes, elles peuvent trouver des conditions favorables à leur prolifération. Lorsqu'elles se retrouvent aérosolisées dans l'air, elles peuvent être inhalées et être ainsi à l'origine de maladies de l'appareil respiratoire.

*Legionella pneumophila* provoquent deux types de maladie : l'une bénigne, la fièvre de Pontiac et l'autre plus grave, car elle entraîne le décès dans 10 à 30% des cas, la légionellose ou maladie du Légionnaire (Goh *et al.*, 2005).

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif de 0,3 à 0,9 µm de large et de 2 à 20 µm de long présentant en culture une forme allongée et parfois filamenteuse, qui appartient au phylum des *Gammaproteobacteria* (Figure 21) (Diederer, 2008).



**Figure 21 : Photo en microscopie électronique à balayage de *Legionella*.**

Dans l'environnement intérieur *Legionella* peut se développer à partir d'un grand nombre de sources hydriques telles que les fontaines, les spas, bains bouillonnants, les têtes de douche, les machines à glace, les humidificateurs (Baron et Willeke, 1986 ; Atlas, 1999 ; Deloge-Abarkan *et al.*, 2007).

La détection de *Legionella pneumophila* en aérosol a été rendue possible et accessible par la mise sur le marché de kits commerciaux se basant sur l'amplification de la séquence *mip* (*macrophage inhibitor potentiator*) spécifique de *Legionella pneumophila* (Atlas, 1999 ; Diederer, 2008). De plus, la réglementation alors exclusivement établie sur des méthodes de culture ou sérologiques, tend à intégrer ces nouveaux outils (Norme NF T90-471 relative à la quantification des *Legionella* dans les eaux).

➤ *Mycobacterium tuberculosis*

Cette Mycobactérie est l'agent responsable de la tuberculose qui contamine chaque année dans le monde des millions de personnes. En 2007, L'OMS estimait à 1,3 millions le nombre de décès imputables à ce microorganisme. L'apparition de bacilles multirésistants aux antibiotiques actuels et l'expansion de l'épidémie de SIDA contribuent fortement à aggraver l'impact de cette maladie. Contrairement aux idées reçues, la proportion d'individus contaminés n'est pas différente dans les pays en voie de développement ou industrialisés (Kochi, 1991).

Cette bactérie appartient au phylum des *Actinobacteria* et se présente sous forme de bâtonnets de 2 à 5 µm de longueur. L'Homme en est le réservoir ainsi que l'agent de transmission. Les malades porteurs de la bactérie vont participer à sa dissémination par l'intermédiaire d'aérosols (toux, parole ou éternuements). Une fois inhalée, *Mycobacterium tuberculosis* se loge dans le tract respiratoire et pénètre jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Beggs *et al.*, 2000).

Elle a plusieurs fois été détectée dans l'air d'établissements de soins ou de santé par PCR (Schafer *et al.*, 1998 ; Schafer *et al.*, 1999 ; Vadrot *et al.*, 2004 ; Wan *et al.*, 2004). A partir de filtration d'air et de la PCR, Mastorides *et al.* réussirent à détecter la bactérie dans les chambres de patients atteints ou non de tuberculose (Mastorides *et al.*, 1997 ; Mastorides *et al.*, 1999).

➤ *Bacillus anthracis*

Aussi appelé bacille du charbon, cette bactérie à Gram positif fait partie du phylum des *Firmicutes*. Ce bacille provoque la maladie du charbon ou *Anthrax* chez différentes espèces animales et parfois chez l'Homme. Bien que rare, la contamination peut avoir lieu par l'inhalation de spores de *Bacillus anthracis* ce qui provoque le développement d'une forme respiratoire de la maladie du charbon, fatale dans 90 à 100% des cas (Srikanth *et al.*, 2008). Depuis 2001, cette maladie est reliée à des cas de bioterrorismes, de ce fait sa détection par des outils moléculaires fait l'objet d'un intérêt grandissant (Jernigan *et al.*, 2001 ; Utrup et Frey, 2004).



➤ Cas des *Actinomycetes*

Les *Actinomycetes* sont des bactéries filamenteuses telles que les *Streptomyces* fréquemment retrouvées dans les environnements extérieurs comme intérieurs (Asan *et al.*, 2004 ; Grigorevski-Lima *et al.*, 2006). Ces bactéries sont souvent mises en cause lors de maladies respiratoires, d'allergies, de réactions inflammatoires et d'hypersensibilité pulmonaire. En 2006, Rintala et Nevalainen utilisèrent la PCR quantitative en temps réel pour la détection de *Streptomyces* dans les poussières d'un certain nombre de maisons. Ils démontrèrent ainsi l'efficacité, la spécificité, la reproductibilité et la rapidité vis-à-vis d'échantillons environnementaux de cette méthode analytique.

#### IV.2.A Eucaryotes

Le domaine des eucaryotes regroupe l'ensemble des organismes présents dans quatre grands règnes du monde vivant : les champignons, les animaux, les plantes et les protistes.

##### IV.2.A.a Les champignons

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes et sont des acteurs majeurs dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des organismes eucaryotes à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites jouent un rôle dans la dispersion des champignons, mais également dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994). Ces spores assurent donc aux champignons un grand potentiel de colonisation.

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002). Le concept d'espèces chez les champignons est une notion qui ne cesse d'alimenter les débats. Ces espèces peuvent être différenciées de façons diverses. Historiquement, les champignons étaient identifiés sur la base de leur morphologie selon le concept morphologique d'espèce (Taylor *et al.*, 2000). La grande majorité des espèces décrites à ce jour repose sur ce concept, par une analyse des traits phénotypiques (morphologiques et/ou biochimiques) (Taylor *et al.*, 2000 ; Guarro *et al.*, 1999). Les champignons peuvent être également décrits selon leurs habitats, leurs localisations géographiques, selon le concept écologique de l'espèce (Taylor *et al.*, 2000).

L'application récente du concept phylogénétique de l'espèce, qui décrit l'espèce comme un groupe monophylétique au sein duquel le taux d'homologie entre séquences est élevé, a été très largement favorisée par les progrès des techniques d'analyses moléculaires, et tend à être massivement employée en mycologie (Mischler et Brandon 1987). L'organisation des champignons en phyla est actuellement revisitée sur des bases phylogénétiques. Cinq phyla sont aujourd'hui acceptés selon une analyse phylogénétique reposant sur 6 gènes et plus de 200 organismes (James *et al.*, 2006) : les *Ascomycota*, les *Basidiomycota*, les *Glomeromycota*, les *Chytridiomycota* et les *Zygomycota*.

#### IV.2.A.b Diversité

A l'instar des bactéries, la diversité en eucaryotes de l'air intérieur a été documentée par de nombreuses études utilisant la culture comme principal outil analytique. L'analyse de 18 publications parues entre 1980 et 2009 portant sur la diversité fongique cultivable met en évidence la dominance des *Ascomycota* avec notamment les genres *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. (Tableau 10). En revanche, aucune donnée moléculaire sur l'air intérieur n'est actuellement publiée dans les bases de données.

#### IV.2.A.c Cas des moisissures

Une moisissure est un microorganisme porteur de spores, de diamètre compris entre 2 et 200  $\mu\text{m}$  (le plus souvent entre 2 et 20  $\mu\text{m}$ ), dépourvu de chlorophylle. Contrairement aux végétaux, elle est incapable de synthétiser la matière organique à partir du  $\text{CO}_2$  atmosphérique. Les moisissures appartiennent aux *Ascomycota*.

La moisissure est constituée de filaments longs, fins et ramifiés dénommés hyphes qui forment une masse emmêlée appelée mycélium ou thalle. Elle est capable de coloniser des supports de nature variées (bois, papier, tissus, produits alimentaires...) dans le cas où elle y trouverait suffisamment d'éléments nutritifs ainsi que des conditions d'humidité favorables. Elles peuvent libérer dans l'air des spores en grande quantité et/ou des substances odorantes (odeur de moisi) voire toxiques (mycotoxines, COV).

**Tableau 10 : Genres fongiques (champignons et levures) retrouvés dans des échantillons d'air intérieur (les espèces sont précisées lorsqu'elles sont connues). Voir la légende du Tableau 6 pour le détail des références.**

Phylum	Genre (espèces)	Références
<b>Ascomycetes</b>	<i>Acremonium</i> (dont <i>butyri</i> , <i>charticola</i> , <i>fusidioides</i> , <i>strictum</i> )	[1], [12], [16], [24] [1], [3], [5], [6], [11], [12], [13], [14], [16], [19], [21], [22], [23]
	<i>Alternaria</i> (dont <i>alternata</i> , <i>citri</i> , <i>fuscicula</i> , <i>longipes</i> , <i>tenuissima</i> )	[16], [19]
	<i>Arthrinium</i>	[16], [19]
	<i>Aspergillus</i> (dont <i>caespitosus</i> , <i>candidus</i> , <i>flavipes</i> , <i>flavus</i> , <i>fumigatus</i> , <i>nidulans</i> , <i>niger</i> , <i>ochraceus</i> , <i>ornatus</i> , <i>pseudoglaucus</i> , <i>repens</i> , <i>restrictus</i> , <i>ruber</i> , <i>sydowii</i> , <i>sparsus</i> , <i>spimulosustamaritii</i> , <i>terreus</i> , <i>thomii</i> , <i>versicolor</i> , <i>wentii</i> )	[1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [9], [11], [12], [13], [14], [16], [17], [19], [21], [22], [23], [24]
	<i>Aureobasidium</i>	[13], [16], [19]
	<i>Besipetozpora</i>	[16]
	<i>Beauveria</i> (dont <i>bassiana</i> )	[13], [16]
	<i>Botrytis</i>	[13], [14], [19], [21], [22]
	<i>Candida</i> (dont <i>lamata</i> , <i>lambica</i> , <i>lipotyca</i> , <i>lusitanae</i> , <i>maris</i> , <i>parapsilosis</i> , <i>zeylanoides</i> )	[1]
	<i>Cephalosporium</i> (dont <i>charticola</i> , <i>tericola</i> )	[1]
	<i>Chaetomium</i> (dont <i>globosum</i> )	[5], [12]
	<i>Chrysosporium</i> (dont <i>merdarium</i> )	[9], [12], [16]
<i>Cladosporium</i> (dont <i>acaticola</i> , <i>aecidicola</i> , <i>asterinae</i> , <i>atroseptrum</i> , <i>chlorocephalum</i> , <i>cladosporioides</i> , <i>cucumerinum</i> , <i>elatum</i> , <i>herbarum</i> , <i>macrocarpum</i> , <i>orchidacearum</i> , <i>oxysporum</i> , <i>sphaerospermum</i> , <i>spongiosum</i> , <i>tenuissimum</i> , <i>uredinicola</i> , <i>variabile</i> )	[1], [3], [4], [6], [9], [11], [12], [13], [14], [16], [17], [19], [21], [22], [23], [24]	
<i>Colletotrichum</i>	[13], [16]	
<i>Cryptococcus</i>	[1]	
<i>Curvularia</i> (dont <i>inaequalis</i> )	[11], [16], [21], [22]	
<i>Cyindrocycliella</i> (dont <i>parva</i> )	[12]	
<i>Drechslera</i> (dont <i>australensis</i> )	[11], [13], [16]	
<i>Epicoccum</i>	[13], [16], [21], [22]	
<i>Exophiala</i>	[12]	
<i>Fusarium</i> (dont <i>equiseti</i> , <i>gibbosum</i> , <i>moniliforme</i> , <i>solanii</i> )	[1], [11], [12], [13], [14], [16], [19], [21], [22], [24]	
<i>Geotrichum</i> (dont <i>candidum</i> , <i>flavo-brunneum</i> )	[1], [13], [16]	
<i>Gliocladium</i> (dont <i>roseum</i> )	[1], [11], [13]	
<i>Gliomastix</i> (dont <i>mucozum</i> )	[12]	
<i>Humicola</i> (dont <i>brevis</i> , <i>grisea</i> )	[1], [16]	
<i>Lecythophora</i> (dont <i>lignicola</i> )	[12]	
<i>Microascus</i> (dont <i>brevicaulis</i> )	[12]	
<i>Monilia</i>	[14]	
<i>Myrothecium</i>	[13]	
<i>Nigrospora</i>	[16]	
<b>Basidiomycetes</b>	<i>Oidiendron</i> (dont <i>citrinum</i> , <i>flavum</i> , <i>rhodogenum</i> , <i>tenuissimum</i> )	[1], [12]
	<i>Paeclomyces</i> (dont <i>farinosus</i> , <i>lilacinus</i> , <i>niveus</i> , <i>variotii</i> )	[11], [12], [16], [19], [23]
	<i>Penicillium</i> (dont <i>adametzioides</i> , <i>atro-sanguineum</i> , <i>aurantiogriseum</i> , <i>aurantio-violaceum</i> , <i>brasilianum</i> , <i>brevicompatum</i> , <i>canescens</i> , <i>chrysoeum</i> , <i>commune</i> , <i>crustosum</i> , <i>cyaneum</i> , <i>decumbens</i> , <i>digitatum</i> , <i>echinulatum</i> , <i>expansum</i> , <i>frequentans</i> , <i>funiculosum</i> , <i>fuscum</i> , <i>granulatum</i> , <i>griseofulvum</i> , <i>griseoosorum</i> , <i>goldweskii</i> , <i>implicatum</i> , <i>italicum</i> , <i>janczewskii</i> , <i>janthinellum</i> , <i>jensenii</i> , <i>kazachstanicum</i> , <i>lanosum</i> , <i>lollense</i> , <i>mellini</i> , <i>miczynskii</i> , <i>mirabile</i> , <i>onobense</i> , <i>ovalicum</i> , <i>phoeniceum</i> , <i>polonicum</i> , <i>restrictum</i> , <i>roqueforti</i> , <i>sclerotiorum</i> , <i>spinulosum</i> , <i>viridicatam</i> , <i>waksmanii</i> )	[1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [9], [11], [12], [13], [14], [16], [17], [19], [21], [22], [23], [24]
	<i>Periconia</i>	[16]
	<i>Pestalotia</i>	[19]
	<i>Pithomyces</i>	[13]
	<i>Phoma</i> (dont <i>glomerata</i> )	[12], [13], [16], [19]
	<i>Rhinocladium</i> (dont <i>sporotrichoides</i> )	[1]
	* <i>Saccharomyces</i> (dont <i>cerevisiae</i> )	[1]
	<i>Scopulariopsis</i> (dont <i>brumptii</i> , <i>flava</i> )	[12], [13], [16], [23]
	<i>Sporotrix</i>	[16]
	<i>Stachybotrys</i>	[16]
	<i>Stemphylium</i>	[13]
	<i>Trichoderma</i> (dont <i>album</i> , <i>lignorum</i> , <i>sympodiamum</i> )	[1], [5], [13]
	<i>Trichothecium</i> (dont <i>roseum</i> )	[11], [23]
	<i>Trichophyton</i>	[16]
	<i>Tritirachium</i>	[1]
	<i>Ulocladium</i> (dont <i>alternariae</i> , <i>botrytis</i> , <i>consortiale</i> )	[11], [12], [16], [21], [22]
	<i>Verticillium</i> (dont <i>chlamydosporium</i> , <i>lecanii</i> , <i>tenerum</i> )	[5], [11], [12]
	<i>Wardomyces</i> (dont <i>anomalus</i> )	[12]
	<i>Zygosporium</i>	[16]
	<b>Basidiomycetes</b>	
	<i>Rhodocorula</i> (dont <i>glutinis</i> , <i>rubra</i> , <i>muclaginosa</i> )	[1]
	<i>Sporotrichum</i> (dont <i>salmonicolor</i> )	[1], [14]
* <i>Trichosporon</i> (dont <i>cutaneum</i> )	[1]	
<i>Waldemia</i> (dont <i>sebi</i> )	[21], [22]	
<i>Absidia</i> (dont <i>corymbifera</i> )	[1]	
<i>Mucor</i> (dont <i>mucedo</i> )	[1], [5], [13], [16], [21], [24]	
<i>Rhizopus</i> (dont <i>stolonifer</i> )	[1], [11], [12], [13], [16], [19], [24]	
<i>Syncephalastrum</i>	[24]	
<b>Zygomycetes</b>		

## IV.2.A.d Effets sanitaires

D'un point de vue de santé publique, les moisissures préférentiellement citées lors de réactions allergiques ou d'infections respiratoires appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* et *Alternaria* (Tableau 11).

Outre la dégradation des matériaux colonisés, la présence d'une contamination fongique dans les environnements intérieurs n'est pas sans conséquences sanitaires. Les effets sanitaires induits par la présence de moisissures dans l'habitat sont généralement répartis en quatre catégories : les infections, les maladies immuno-allergiques, les toxi-infections, et les effets irritatifs. Des infections pulmonaires telles que l'Aspergillose invasive apparaissent essentiellement chez des personnes aux défenses immunitaires diminuées. Dans le cadre d'activités professionnelles (agriculture, fromagerie, compostage...), les moisissures peuvent dans certains cas être responsables de pneumopathies d'hypersensibilité, notamment lors de l'inhalation massives de spores.

**Tableau 11 : Agents fongiques mis en cause dans des cas d'allergies respiratoires. D'après Stetzenbach *et al.* (2004).**

Organismes	Effets sanitaires	Exposition
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allergie	Compost, matériaux de construction contaminés
<i>Aspergillus versicolor</i>	Allergie, Toxicose	Matériaux de construction contaminés
<i>Chaetomium species</i>	Toxicose	Matériaux de construction contaminés
<i>Penicillium species</i>	Allergie	Matériaux de construction contaminés
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Toxicose	Matériaux de construction contaminés
<i>Trichoderma species</i>	Allergie, Toxicose	Matériaux de construction contaminés

IV.2.A.e *Aspergillus*

Plusieurs espèces d'*Aspergillus* peuvent croître dans les environnements intérieurs et notamment *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*. De plus, les quantités d'*Aspergillus* spp. retrouvées dans les espaces clos sont généralement supérieures à celles observées à l'extérieur.

*Aspergillus fumigatus* est un champignon filamenteux appartenant au phylum des *Ascomycota*. L'exposition à ses spores peut induire des réponses allergiques, ainsi que des pathologies graves telles que l'aspergillose invasive ou des infections nosocomiales. De plus, en raison de leur diamètre, 70% des spores d'*Aspergillus fumigatus* sont capables de pénétrer jusqu'à la trachée et les bronches et moins de 1% jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Pieckova et Jesenska, 1999).

Différents auteurs ont développé des amorces spécifiques pour la détection et la quantification de cette espèce (Cruz-Perez *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2003). En 2004, McDevitt *et al.* mirent au point une méthode de détection et de quantification par PCRq des conidies d'*Aspergillus fumigatus* dans des échantillons environnementaux d'air.

#### IV.2.A.f Autres microorganismes eucaryotes

Certains microorganismes, tels les algues et les amibes, sont susceptibles d'être retrouvés en aérosols. Les résultats de Lawande en 1983, suggèrent l'existence d'un rôle des amibes en aérosols lors d'infections au Nigéria. Les amibes « libres », par exemple *Naegleria fowleri* et *Acanthamoeba spp.*, sont indigènes à des environnements tels que le sol ou l'eau. Elles peuvent être aérosolisées à partir de sources d'eau chaude artificielles présentes dans les espaces clos (les réseaux d'eau chaude sanitaire notamment). En outre, elles jouent un rôle dans la transmission et dans la multiplication des contaminations dues à *Legionella spp.* (Breiman *et al.*, 1990 ; Declerck *et al.*, 2007).

Les algues ainsi que les plantes inférieures libèrent tout comme les champignons des spores dans l'air. L'association d'algues à certains champignons dans des relations de symbiose aboutie à la formation de lichens qui peuvent également donner lieu à une libération de spores dans l'environnement. En outre, certaines associations d'algues en aérosol, telles que *Chlorococcus spp.* et *Chorella spp.* ou *Schizothrix* et *Anabaena* sont parfois mises en cause dans des cas de réactions allergiques (Burge et Rogers, 2000).

Enfin, les pollens et les fragments provenant de certains insectes sont autant de sources identifiées comme potentiellement allergisantes (Stetzenbach, 1997).

## IV.2.B Virus

Plusieurs virus sont identifiés comme ayant une transmission par voie aérienne, ce qui les rend particulièrement contagieux (Tableau 12). Tout comme les autres types de bioaérosols, les virus sont difficilement détectables en aérosols par les méthodes moléculaires. Néanmoins, la PCR est de plus en plus fréquemment utilisée en raison de sa sensibilité. Des systèmes de détection par PCR sont disponibles pour le virus de la Varicelle-Zona (Sawyer *et al.*, 1994), les Rhinovirus (Myatt *et al.*, 2004), le Cytomegalovirus Humain (CMV) (McCluskey *et al.*, 1996) ou encore le virus du SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) (Booth *et al.*, 2005).

**Tableau 12 : Principaux virus identifiés comme étant responsables d'infections touchant le tract respiratoire.**

Famille	Organismes	Effets sanitaires
Adenovirus	Adenovirus	Affections respiratoires
Coronavirus	HCoV-SARS	SRAS
	HCoV-NL63	Bronchiolite
	HCoV-OC43	Infection sévère du tract respiratoire
	HCoV-HKU1	Infection sévère du tract respiratoire
	HCoV-229E	Infection sévère du tract respiratoire
Orthomyxovirus	Influenza A et B	Grippe, bronchopneumonie, rhume, pharyngite, bronchite
Paramyxovirus	VRS A et B	Bronchite, bronchiolite, bronchopneumonie
	MPV de l'Homme	Affections respiratoires
	Parainfluenza (1 à 4)	Bronchopneumonie, rhume, pharyngite, bronchite, bronchiolite
Picornavirus	Rhinovirus	Rhume
	Enterovirus	Infection gastrointestinale
Poxvirus	Variola virus	Variole

#### IV.2.B.a *Le VRS*

Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) appartient à la famille des *Paramyxoviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN monocaténaire dont la taille varie entre 80 et 350 nm. La transmission ainsi que l'infection a lieu par contact (mains souillées), par le bais de sécrétions respiratoires mais également par la voie des aérosols émis lors d'éternuements ou de toux. Le VRS est l'une des causes les plus fréquentes d'infections chez l'enfant. Il est le principal responsable (plus de 7 cas sur 10) des épidémies saisonnières de bronchiolite qui affectent les jeunes enfants et les nourrissons (Aintablian *et al.*, 1998).

Des méthodes de détection moléculaires existent mais le plus souvent il s'agit d'identifier le virus au niveau des sécrétions rhinopharyngées du patient avec une rapidité, une sensibilité et une spécificité accrue (Paton *et al.*, 1992 ; Whiley *et al.*, 2002 ; Templeton *et al.*, 2004). En 1998, Aintablian *et al.* détectèrent le virus dans l'air des chambres de patients hospitalisés par une méthode de PCR nichée, mettant en évidence la présence de particules virales à une distance allant jusqu'à 7 m des enfants malades.

#### IV.2.B.b *Le virus Influenza*

Cet agent est responsable d'une des principales infections respiratoires : la grippe. Ce virus appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et comprend trois types (A, B ou C). Il s'agit d'un virus à ARN simple brin enveloppé. Son mode de transmission est sensiblement similaire à celui du VRS. Une étude publiée en 2008, suggère la présence de particules virales dans l'air expiré par des sujets infectés et notamment dans les particules fines émises (Fabian *et al.*, 2008).

En raison des crises sanitaires récentes, de nombreux systèmes de détection par Reverse Transcriptase-PCR quantitative (RT-PCRq) ont été mis au point afin d'améliorer la rapidité de détection des patients ou des animaux contaminés (Spackman *et al.*, 2003 ; Sidoti *et al.*, 2009). En 2009, le virus *Influenza* a été détecté dans l'air du service d'urgence d'un hôpital, au cours d'une étude menée par Blachere *et al.* (2009) De plus, 53% des aérosols viraux détectables, appartenaient à la fraction respirable des aérosols.



#### IV.2.C Les sources

Dans un espace clos, les microorganismes aéroportés sont issus de deux réservoirs : l'un exogène, correspondant le plus souvent à un transfert air extérieur/air intérieur et l'autre, endogène résultant d'une biocontamination spécifique ayant de multiples sources. Identifier les sources est une étape indispensable dans l'étude des aérosols microbiens, surtout lorsqu'il s'agit d'évaluer l'exposition des personnes.

##### IV.2.C.a Sources extérieures

Les mouvements d'air sont en majorité responsables de l'apport de microorganismes provenant de l'extérieur dans les environnements intérieurs. Les moisissures et autres champignons ont une origine environnementale. Leurs spores sont introduites dans les locaux par les ouvrants, les allées et venues des occupants, leurs vêtements et leurs chaussures, la poussière et les matériaux ou matières contaminés (Spengler et Sexton, 1983). Ces déplacements de l'extérieur vers l'intérieur vont contribuer à la dissémination d'un grand nombre de microorganismes dans les espaces fermés.

Certaines activités anthropiques sont citées dans la littérature comme favorisant la production de bioaérosols dans l'environnement, notamment l'agriculture, les élevages d'animaux et le traitement des déchets (Stations d'épuration, sites de compostage...) (Nielsen *et al.*, 1997 ; Rautiala *et al.*, 2003 ; Schlosser et Huyard, 2007). Les conditions météorologiques, la pluie, le vent et d'autres facteurs climatiques, peuvent conduire à la formation d'aérosols. Elles représentent autant de sources potentielles de contamination de l'air intérieur.

Les données bibliographiques montrent que si la microflore de l'air intérieur est le reflet de l'extérieur, elle est également directement influencée par les sources intérieures.

##### IV.2.C.b Sources intérieures

La plupart des études portant sur des espaces clos relient les environnements intérieurs à l'extérieur, et donc décrivent les deux simultanément. Quelques études avancent néanmoins l'hypothèse de sources intérieures majeures, notamment la présence d'occupants ou d'activités humaines pouvant influencer la qualité de l'air (Zuraimi and Tham, 1994 ; Kotzias *et al.*, 2009 ; Wichmann *et al.*, 2010). Les concentrations en particules mesurées suggèrent une adéquation entre un système de ventilation inadapté et une augmentation des concentrations en polluants dans les environnements intérieurs (Daisey *et al.*, 2003 ; Fromme *et al.*, 2007 ; Almeida *et al.*, 2011). De plus, des activités physiques (notamment dans les lieux de vie des enfants) conduiraient à une importante resuspension de particules sédimentées provenant de la poussière du sol (Fromme *et al.*, 2007 ; Fromme *et al.*, 2008 ; Almeida *et al.*, 2011). L'étude réalisée par Hospodsky *et al.* (2011), arrive à une conclusion similaire en suggérant que les populations bactériennes retrouvées dans l'air intérieur semblaient plus proche de populations provenant de la poussière du sol que des populations de l'air extérieur. Zuraimi and Tham (1994) montrèrent également que l'augmentation des niveaux bactériens liés à l'humain était associée à différents paramètres tels qu'une forte densité de personnes, des irrégularités du sol ou encore la fréquence de nettoyage des tables. Liu *et al.* (2000) évaluèrent les concentrations bactériennes dans l'air de 2 écoles élémentaires. Ils émirent l'hypothèse que les enfants et les professeurs pouvaient être la source principale de

l'aérocontamination d'origine bactérienne. Ils mirent également en évidence un certain nombre de bactéries cultivables opportunistes pouvant se révéler infectieuses pour les occupants sensibles. En outre, la comparaison des microorganismes de l'air de 2 centres commerciaux avec les autres environnements localisés à proximité (sol et eau notamment), met en lumière la présence d'une niche domestique à l'intérieur ainsi que l'absence de relation de transfert avec les environnements issus de l'extérieur (Tringe *et al.*, 2008). Ceci est en accord avec des études montrant que si la contamination fongique provient la plupart du temps d'une source environnementale externe, la dissémination de microorganismes bactériens est souvent imputable aux individus, l'Homme étant probablement la plus importante source de contamination des lieux clos (Pastuszka *et al.*, 2000). En effet son corps abrite un grand nombre de bactéries. On les trouve sur la peau, les muqueuses, dans le tract respiratoire, la bouche, le conduit nasal et dans le tract gastro-intestinal (Novikova *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2010b). En 2005, Jo et Seo montrent que l'augmentation du niveau de microorganismes dans les espaces clos est étroitement liée à une plus forte occupation humaine. Dans le cadre d'une étude plus ciblée, Favero *et al.* (1968), démontraient que dans les blocs opératoires des hôpitaux, la contamination par des bioaérosols, était principalement associée aux émissions humaines (peau, cheveux, et tract respiratoire).

Les sources hydriques (fontaines décoratives, douches, aquariums...) sont également mises en cause dans les environnements intérieurs lors de problèmes liés aux aérosols microbiens (Pastuszka *et al.*, 1996 ; Deloge-Abarkan *et al.*, 2007). Bien qu'il existe des espèces fongiques et bactériennes adaptées à la sécheresse, l'humidité favorise généralement la croissance de la plupart d'entre elles, notamment les moisissures. Les pièces humides (salle de bains...) et mal ventilées, tout comme le bas des murs mal isolés ou présentant des défauts d'étanchéité, sont autant de lieux propices aux développements microbiens (Spengler et Sexton, 1983).

Les poubelles (Nielsen *et al.*, 1997), les plantes d'intérieur ou les pots de fleurs, la poussière, les animaux et les textiles ou des activités domestiques courantes (prendre une douche, changer la poubelle, tirer la chasse d'eau...) peuvent occasionnellement mettre en suspension dans l'air une certaine quantité de microorganismes (Kalogerakis *et al.*, 2005 ; Brodie *et al.*, 2007).