

VLEP maléculaire échantillonnage Streptomyces actinomycètes épifluorescence reproductibilité pneumopathie reproductibilité thermocycleur INRS bioaérosol extraction real-time S.californicus biologie extraction gène échantillonnage PCR thermophiles gène échantillonnage actinomycètes PCR thermocycleur exposition S.californicus gène échantillonnage actinomycètes T.fusca T.alba culture extraction Prélèvement actinomycètes quantitative T.alba gène

~ Thèse en Sciences-Vie ~

2013

DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION
D'UNE MÉTHODE FONDÉE SUR LA PCR TEMPS RÉEL
POUR LA CARACTÉRISATION DES BIOAÉROSOLS :
APPLICATION AU GROUPE DES ACTINOMYCÈTES



Laetitia BETELLI

T.fusca quantitative VLEP aërobiocoantamination épifluorescence bioaérosol culture S.californicus compostage spécificité analyse culture PCR Thermobifida maturation T.fusca Streptomyces RDN pneumopathie oligonucléotides dénombrement sensibilité exposition Spore actinomycètes Thermobifida moléculaire exposition compostage T.fusca compostage

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
École Doctorale Environnements - Santé, Sciences de la vie

THÈSE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences Vie



par
Laetitia BETELLI

**Développement et évaluation d'une méthode fondée sur la PCR temps réel
pour la caractérisation des bioaérosols :
application au groupe des actinomycètes**

Directeur
Alain HARTMANN



Co-directrice
Évelyne GÉHIN



Encadrant
Philippe DUQUENNE



Thèse publique soutenue le 31 janvier 2013 devant un jury composé de :

ALAIN HARTMANN	Directeur de recherche, Pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire, INRA, Dijon	Directeur
ÉVELYNE GÉHIN	Professeur, Laboratoire de Physique des Aérosols, CERTES/Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Créteil	Co-directrice
PHILIPPE DUQUENNE	Chargé d'études, Laboratoire Métrologie des Aérosols, INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy	Encadrant
FRANÇOISE LUCAS	Maître de conférence, Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Créteil	Rapporteur
EDWARD TOPP	'Senior research scientist', Centre de recherches du Sud sur la phytoprotection et les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ontario	Rapporteur
JEAN-JACQUES GODON	Directeur de recherche, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA, Narbonne	Rapporteur
NATHALIE WÉRY	Chargée de recherche, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA, Narbonne	Examineur
FRÉDÉRIC GRENOUILLET	Praticien hospitalier, Laboratoire de Mycologie et de Parasitologie, CHRU Jean-Minjoz, Besançon	Examineur
LOÏC BOLLACHE	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur

*Dédicace à Maman, Mamie et mes museaux,
qui n'ont cessé de me soutenir durant ces 4 ans,
dans les bons comme dans les mauvais moments...
de véritables piliers !*

*Dédicace à ma famille du Rugby, aux Rouge & Noir, à *8*,
qui ont toujours été là pour me booster...
de véritables moteurs !*

À Papi...

Remerciements

Remerciements

Cette thèse, rattachée à l'École Doctorale Environnements-Santé (anciennement Environnement, Santé, STIC) de l'Université de Bourgogne, a été réalisée à l'INRS, l'Institut National de Recherche et de Sécurité de Vandoeuvre-lès-Nancy. Je tiens donc à remercier l'INRS, ses directeurs (directeur général et directeur du centre) de m'avoir ouvert leurs portes ainsi que Didier BAPTISTE (directeur scientifique), Jean-Paul SANDINO puis Benoît COURRIER (chefs de département) de m'avoir donné l'occasion de travailler sur cette thèse. Merci également à Pierre GÖRNER, responsable du laboratoire, de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe et pour son soutien.

Un immense merci à Philippe DUQUENNE, mon encadrant, qui a tout d'abord accepté de me confier ce sujet des plus intéressants, mais surtout pour tout l'investissement qu'il y a mis, tous les conseils qu'il m'a apportés et la patience dont il a fait preuve. Merci infiniment de m'avoir accompagné tout au long de ces 4 années et de cette précieuse aide de chaque instant.

Mes remerciements vont à Alain HARTMANN et Évelyne GEHIN d'avoir accepté respectivement de diriger et co-diriger ma thèse, de m'avoir prodigué leur enseignement chacun dans leur domaine et d'avoir apporté leur connaissance au sujet ; mais aussi d'avoir donné de leur temps pour toutes les corrections et les relectures.

Je tiens également à remercier les rapporteurs de la thèse : merci à Françoise LUCAS, Edward TOPP et Jean-Jacques GODON d'avoir répondu favorablement à notre demande et d'avoir bien voulu juger la pertinence et la cohérence de ce travail. Merci à Nathalie WERY, Loïc BOLLACHE et Frédéric GRENOUILLET d'avoir accepté de faire partie du jury de la thèse. Merci également à Émelyne SCHERER et Frédéric pour l'aide qu'ils m'ont amenée.

Un énorme merci à Xavier SIMON, sans qui, beaucoup de choses n'auraient pas été possible. Beaucoup de reconnaissance envers son aide inestimable et sa bonne humeur quotidienne.

Un énorme merci à Catherine COULAIS, devenue plus qu'une collègue, et Véronique KOEHLER pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée et tout le travail qu'elles ont fait pour faire avancer mes travaux. Une aide ô combien précieuse pour essayer de mener à bien tous les objectifs que l'on s'était fixés. Merci également à Laura WISSER dont le stage m'aura fait gagner beaucoup de temps.

Merci à tous ceux que je ne peux pas citer (la liste serait très longue) mais pour qui je garde de très bons souvenirs : Guylaine GREFF-MIRGUET, l'équipe des 'nanos' (Olivier, Sébastien, Richard, Bernard...), les stagiaires venus s'essayer à la Métrologie, mais aussi les personnes d'autres laboratoires de l'INRS voire d'autres entreprises, avec qui j'ai eu l'occasion d'intégrer. Merci pour votre accueil, les échanges que l'on a pu avoir, ces savoureuses conversations...

Enfin, merci à Mr Météo de m'avoir permis de découvrir qu'il pouvait y avoir un 'moins' devant une température et de re-découvrir la neige en couche si épaisse que j'ai pu largement amortir le prix de mes après-skis, jusqu'à lors utilisés pour une seule et unique classe de neige... j'étais en CM1 ! Merci à lui d'avoir ajouté un nouveau terme à mon vocabulaire avec le mot grésil (tant d'apprentissage m'a même fait tomber à la renverse) et d'apprendre que l'existence de l'Ours polaire en Lorraine n'est pas une légende urbaine (ironie, ironie... quand tu nous tiens !).

J'allais oublier... 'Gratias ago' *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida fusca* et *Sreptomyces californicus* (entre autres) de vous être laissés apprivoiser, même si parfois votre côté sauvage, hostile et têtu ressortait.

Bref... MERCI à tous !

« *Emporter de chez soi les accents familiers, c'est emporter un peu sa terre à ses souliers [...] L'accent ? C'est un peu le pays qui vous suit ! [...] Le parler de chez soi qu'on emporte en voyage ! [...] Avoir l'accent enfin, c'est, chaque fois qu'on cause, parler de son pays en parlant d'autre chose ! [...] »*

Miguel ZAMACOÏS, L'accent

Résumé / Abstract

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries ubiquitaires et certains sont reconnus comme potentiellement pathogènes pour l'Homme, dans l'air de certains lieux de travail. C'est notamment le cas dans l'air des plates-formes de compostage où les concentrations peuvent atteindre des valeurs relativement élevées. L'exposition des salariés à ce type de bioaérosols peut être la cause de pathologies diverses (notamment des pneumopathies d'hypersensibilité). Bien que le problème soit reconnu, la bibliographie démontre un manque de connaissances à propos de l'évaluation du risque : aucune méthode globale de prélèvement et d'analyse n'est, à l'heure actuelle, standardisée pour l'étude de ces bioaérosols, si bien qu'il n'existe aucune relation dose-effets pour la plupart de ces agents ni même de valeur limite d'exposition professionnelle. Les méthodes traditionnellement utilisées ne sont pas sans inconvénient (sous-estimation de la concentration réelle notamment) et le plus souvent non-spécifiques.

C'est pourquoi l'objectif de la thèse, ici décrite, est le développement et l'évaluation de la technique de biologie moléculaire qu'est la PCR temps réel pour la quantification de bactéries dans ces bioaérosols. La méthode a tout d'abord été développée et optimisée notamment par le dessin d'oligonucléotides, par la comparaison de protocoles d'extraction d'ADN et par la réalisation de gammes étalons. Elle a ensuite été comparée aux techniques plus traditionnelles, encore largement utilisées, que sont le dénombrement des bactéries cultivables par mise en culture et l'épifluorescence, à la fois sur des cultures de cellules et sur des bioaérosols expérimentaux. Ce n'est qu'après l'avoir caractérisé qu'elle a été appliquée sur des bioaérosols prélevés en conditions réelles d'exposition, sur des plates-formes de compostage.

La méthode développée, basée sur une extraction d'ADN et une PCR temps réel, permet la quantification de l'ADN de *Thermoactinomyces vulgaris* (basée sur l'amplification du gène GyrB), de *Thermobifida fusca* et *T. alba* (gène ecf) et des streptomycètes mésophiles (ARNr 23S). La PCR permet l'obtention de résultats fortement corrélés à ceux issus du dénombrement sur milieux gélosés mais offre de réels avantages par rapport à la culture. Comme ces quantifications prennent en compte n'importe quelle forme de la bactérie (cellules végétatives et spores), la PCR dépasse les inconvénients de sous-estimation liés aux méthodes traditionnelles. La technique a un réel avantage de spécificité, elle est répétable et sensible. Les campagnes de prélèvements effectuées sur 5 plates-formes de compostage en France ont permis de mesurer les concentrations en bactéries mésophiles et thermophiles par culture et d'établir celles en *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida* sp. et *Streptomyces* sp. par PCR. L'étude confirme que les activités de compostage sont génératrices de bioaérosols avec parfois des valeurs relativement élevées selon les points échantillonnés. Elle met également en exergue des informations comme la distribution granulométrique du bioaérosol ou l'adéquation entre le type de prélèvement effectué et l'analyse par PCR. Les travaux menés, du développement de la méthode qPCR appliquée au groupe des actinomycètes à son application sur des échantillons environnementaux, apportent de nombreuses données pour la quantification des actinomycètes aéroportés. Ils ont permis d'acquérir des éléments de validation concernant la méthode mise en place et ont livré les seules mesures de concentrations disponibles à l'heure actuelle, pour *T. vulgaris*, *Thermobifida* sp., et les streptomycètes mésophiles dans l'air des plates-formes de compostage.

Mots clés : bioaérosol, actinomycète, PCR temps réel, compostage, prélèvement, méthode analytique, exposition professionnelle.

Abstract

Actinomycetes are ubiquitous bacteria and some can be potentially pathogen for Humans in the air of some working areas. It's notably the case in composting plants where bacteria concentrations can reach high values. Workers exposure to these inhalable bioaerosols can be source of various diseases (hypersensitivity pneumonitis notably). Although this problem is admitted, bibliography reveals a lack of knowledge about risk assessment: currently, none global method for bioaerosols sampling and analysis is standardized. So much that neither dose-effects relationship for most of these bacteria, nor Threshold Limit Value exists. Traditional methods, that are used, have some drawbacks (concentrations underestimation notably) and most often, aren't specific.

It's the reason why the aim of the thesis, here described, is the development and the evaluation of the biomolecular technique of real time PCR for the quantification of bacteria in these bioaerosols. First, this method was developed and improved by oligonucleotides design, by comparison of many DNA extraction protocols and by the construction of standard ranges. Then, the method was compared to traditional widely used methods such as cultivable bacteria counting by cultures and epifluorescence microscopy, both on cells culture samples and experimental bioaerosols. After this characterization, the analytic method was applied on environmental bioaerosols sampled on real exposure conditions (composting plants).

The method that we have developed, based on DNA extraction and real-time PCR, allows the quantification of *Thermoactinomyces vulgaris* DNA (based on gyrB gene amplification), of *Thermobifida fusca* and *T. alba* (ecf gene) and of mesophilic streptomycetes (rDNA 23S). The results obtained by PCR are strongly correlated with those obtained by counting on agar but PCR method offers more advantages than cultures. As PCR quantifies any form of the bacteria (vegetative cells and spores), the method goes over the drawbacks of traditional methods, like underestimation. The method has a real advantage of specificity, it's also repeatable and sensitive. Sampling campaigns realized on 5 composting plants implanted in France have permitted measuring mesophilic and thermophilic bacteria concentrations by culture and establishing *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida* sp. and *Streptomyces* sp. ones by PCR. The study confirms that composting activities release bioaerosols. And according to the localization of the sampling, the values could be rather high. It also underlines some informations as particles size distribution of the bioaerosol or the adequacy between sampling apparatus and PCR analysis. The works carried out, from qPCR method development for actinomycetes group to its application on environmental samples, give a lot of datas concerning airborne actinomycetes quantification. It permit to validate the developed method and give the only currently available measures for *T. vulgaris*, *Thermobifida* sp., and mesophilic streptomycetes in the air of composting plants.

Key words : bioaerosol, actinomycete, real-time PCR, composting, sampling, analytic method, professional exposure

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations et des acronymes.....	25
Liste des Tableaux	29
Liste des Figures	33
Liste des Annexes.....	39

INTRODUCTION 45

CHAPITRE 1 - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE 49

1.1 LES BIOAÉROSOLS	49
1.1.1 ÉLÉMENTS DE DÉFINITION ET IMPORTANCE.....	49
1.1.2 LE PRÉLÈVEMENT DES BIOAÉROSOLS	52
1.1.2.1 Échantillonnage par impaction sur milieu solide	52
1.1.2.2 Échantillonnage par impaction sur milieu liquide ou 'impingement'	53
1.1.2.3 Échantillonnage par filtration.....	54
1.1.2.4 Autres méthodes.....	54
1.1.2.5 Efficacité et choix des biocollecteurs.....	55
1.1.3 L'ANALYSE DES BIOAÉROSOLS.....	55
1.1.3.1 Quelques méthodes de dosage	55
1.1.3.2 La cytométrie en flux.....	56
1.1.3.3 Méthodes culturales	56
1.1.3.4 Méthodes de microscopie	57
1.1.3.5 La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	58
1.1.3.6 Avantages et inconvénients liés aux techniques analytiques	62
1.2 LES ACTINOMYCÈTES	64
1.2.1 QUELQUES MOTS DE PHYLOGÉNIE.....	64
1.2.2 CARACTÈRES BIOLOGIQUES, ÉCOLOGIE ET PATHOGÉNICITÉ	65
1.2.3 QUELQUES EXEMPLES DE FAMILLES D'ACTINOMYCÈTES.....	66
1.2.3.1 La famille des <i>Thermoactinomycetaceae</i> et <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	66
1.2.3.2 La famille des <i>Nocardiopsaceae</i> et <i>Thermobifida fusca</i>	66
1.2.3.3 La famille des <i>Streptomyetaceae</i> et <i>Streptomyces californicus</i>	67
1.3 LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES DÉCHETS PAR COMPOSTAGE.....	69
1.3.1 LES DÉCHETS EN FRANCE	69
1.3.2 PRINCIPE DU COMPOSTAGE.....	70
1.3.3 FONCTIONNEMENT D'UNE PLATE-FORME DE COMPOSTAGE.....	71
1.3.3.1 Grandes étapes.....	71
1.3.3.2 Paramètres importants.....	73
1.4 OBJECTIFS ET ENJEUX DE LA THÈSE.....	73
1.4.1 L'AÉROBIOCONTAMINATION GÉNÉRALE EN PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE	73
1.4.2 L'AÉROBIOCONTAMINATION EN ACTINOMYCÈTES ASSOCIÉE AU COMPOSTAGE.....	80
1.5 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE	82
1.5.1 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET INTÉRÊTS ASSOCIÉS	82

Table des matières

1.5.2 ORGANISATION DES TRAVAUX	83
--------------------------------------	----

CHAPITRE 2 - DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE PCR TEMPS RÉEL..... 87

2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE	87
2.1.1 SOUCHES MICROBIENNES.....	87
2.1.1.1 Souches modèles de l'étude	87
2.1.1.2 Souches utilisées pour valider la spécificité des oligonucléotides.....	88
2.1.2 CHOIX DES CIBLES POUR LA PCR TEMPS RÉEL ET DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES.....	90
2.1.3 DÉTERMINATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES.....	90
2.1.4 RÉALISATION DE GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE.....	91
2.1.5 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE LA PCR	92
2.1.5.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation.....	92
2.1.5.2 Optimisation des concentrations des oligonucléotides.....	93
2.1.5.3 Optimisation des pré-mix PCR	94
2.1.6 CHOIX DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION D'ADN	94
2.1.6.1 Préparation des cultures cellulaires.....	94
2.1.6.2 Obtention des bioaérosols environnementaux	95
2.1.6.3 Protocoles d'extractions d'ADN comparés	95
2.2 RÉSULTATS	96
2.2.1 DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES	96
2.2.1.1 Quantification de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	96
2.2.1.2 Quantification de <i>Thermobifida fusca</i>	96
2.2.1.3 Quantification des streptomycètes mésophiles	96
2.2.2 SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES	97
2.2.2.1 Oligos Tvu F211-R285/S243 et Tvu F751-R824/S776	97
2.2.2.2 Oligos Tfu F374-R472/S419.....	101
2.2.2.3 Oligos SM fw8-rev9/p6	103
2.2.3 GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE	105
2.2.3.1 Limites de quantification et répétabilité	105
2.2.3.2 Reproductibilité des gammes.....	106
2.2.4 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR.....	107
2.2.4.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation	107
2.2.4.2 Optimisation des pré-mix PCR.....	109
2.2.4.3 Optimisation des concentrations des oligonucléotides	110
2.2.5 COMPARAISON DE PROTOCOLES D'EXTRACTION D'ADN	111
2.2.5.1 À partir de cultures liquides pures.....	111
2.2.5.2 À partir de bioaérosols environnementaux.....	112
2.3 DISCUSSION	117
2.3.1 DESSIN ET VALIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES	117
2.3.2 GAMMES ÉTALONS.....	119
2.3.3 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR.....	120
2.3.4 PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN.....	120

CHAPITRE 3 - MAÎTRISE DE LA GÉNÉRATION DE BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX...125

3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	125
3.1.1 PLAN D'EXPÉRIENCE GÉNÉRAL	125
3.1.2 PRÉPARATION DES CULTURES LIQUIDES DE CELLULES	126
3.1.2.1 Protocoles A et A' adaptés d'après les travaux de Kawamoto <i>et al.</i> , 1982	126
3.1.2.2 Protocoles B et B' adaptés d'après la norme AFNOR NF T 72-145 de 2006.....	127
3.1.2.3 Protocole C adapté des travaux d'Hoskisson <i>et al.</i> , 2000	128
3.1.2.4 Protocole D adapté des travaux de Gazenko <i>et al.</i> , 1998.....	129
3.1.3 GÉNÉRATION EN VOIE LIQUIDE PAR BULLAGE	129
3.1.4 ANALYSES DES CULTURES LIQUIDES ET CARACTÉRISATION DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS....	131
3.1.4.1 Analyses des cultures liquides de cellules.....	131
3.1.4.2 Caractérisation des bioaérosols générés.....	132
3.1.5 EXPLOITATION DES RÉSULTATS	133
3.1.5.1 Niveaux de concentrations des cultures et des bioaérosols	133
3.1.5.2 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Sioutas.....	133
3.1.5.3 Granulométries obtenues avec les COP Grimm et LAS.....	134
3.1.5.4 Statistiques	134
3.2 RÉSULTATS	134
3.2.1 STABILITÉ DES CULTURES CELLULAIRES LIQUIDES	134
3.2.2 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES CULTURES CELLULAIRES.....	135
3.2.3 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS	136
3.2.4 DISTRIBUTIONS GRANULOMÉTRIQUES DES BIOAÉROSOLS.....	138
3.2.4.1 Granulométries obtenues avec un Compteur Optique de Particules	138
3.2.4.2 Granulométries obtenues avec un impacteur en cascade.....	141
3.2.5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	143
3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de <i>Thermobifida fusca</i>	143
3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de <i>Streptomyces californicus</i>	144
3.3 DISCUSSION	145
3.3.1 CONDITIONS DE MISES EN CULTURE DES SOUCHES EN MILIEU GÉLOSÉ.....	145
3.3.2 COMPARAISON DES PROTOCOLES DE PRÉPARATION	145
3.3.2.1 Concentrations en microorganismes cultivables et en spores totales	146
3.3.2.2 Granulométries des bioaérosols et nature des cellules aérosolisées.....	147
3.3.2.3 Choix du protocole de préparation des cultures aptes à la génération d'actinomycètes	151

CHAPITRE 4 - CARACTÉRISATION DE LA MÉTHODE PCR EN CONDITIONS DE 'LABORATOIRE'.....155

4.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	155
4.1.1 ÉTUDE SUR CULTURES PURES DE CELLULES.....	155
4.1.1.1 Préparation des cultures pures de cellules.....	155
4.1.1.2 Analyses réalisées.....	155
4.1.2 ÉTUDE SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX.....	156
4.1.2.1 Préparation des cultures liquides et génération par bullage.....	156
4.1.3 ANALYSES RÉALISÉES	157

Table des matières

4.1.4 EXPLOITATION DES RÉSULTATS.....	158
4.2 RÉSULTATS	158
4.2.1 DÉNOMBREMENTS SUR CULTURES DE CELLULES DE <i>T. vulgaris</i>	158
4.2.2 DÉNOMBREMENTS SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX.....	159
4.2.2.1 Bioaérosols de <i>T. vulgaris</i>	159
4.2.2.2 Bioaérosols de <i>T. fusca</i>	161
4.2.2.3 Bioaérosols de <i>S. californicus</i>	162
4.3 DISCUSSION	163
4.3.1 GAMMES DE CONCENTRATIONS DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS ET PERTINENCE DES RÉGRESSIONS.....	163
4.3.2 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC LA MISE EN CULTURE SUR MILIEUX GÉLOSÉS	164
4.3.3 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC L'ÉPIFLUORESCENCE PAR COLORATION AU DAPI	166
4.4 CONCLUSION.....	168
CHAPITRE 5 - MESURES PAR qPCR DES ACTINOMYCÈTES DANS LES BIOAÉROSOLS COLLECTÉS EN CONDITIONS RÉELLES D'EXPOSITION.....	173

5.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	173
5.1.1 ORGANISATION GÉNÉRALE DE LA CAMPAGNE DE MESURES.....	173
5.1.2 PRÉSENTATION DES PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE.....	174
5.1.2.1 Plate-forme A (déchets verts et boues).....	174
5.1.2.2 Plate-forme B (déchets verts, biodéchets et ordures ménagères).....	177
5.1.2.3 Plate-forme C (déchets verts et boues)	179
5.1.2.4 Plate-forme D (déchets ménagers, refus de tri).....	181
5.1.2.5 Plate-forme E (déchets verts et biodéchets).....	183
5.1.3 STRATÉGIES DE MESURES DES BIOAÉROSOLS.....	185
5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°1	185
5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°2.....	185
5.1.3.2 Méthodes de prélèvement des bioaérosols	186
5.1.4 TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	187
5.1.5 MÉTHODES D'ANALYSES DES BIOAÉROSOLS	187
5.1.5.1 Mesure pondérale des poussières inhalables	187
5.1.5.2 Pré-traitement des échantillons	188
5.1.5.3 Dénombrement des bactéries cultivables par mise en culture sur géloses	188
5.1.5.4 Dénombrement des trois espèces/groupes ciblés d'actinomycètes par qPCR	188
5.1.6 EXPLOITATION DES RÉSULTATS.....	189
5.1.6.1 Concentrations en poussières inhalables	189
5.1.6.2 Concentrations en bactéries viables cultivables et en ADN	189
5.1.6.3 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Marple	189
5.1.6.4 Statistiques.....	189
5.2 RÉSULTATS	190
5.2.1 DÉROULEMENT DE LA CAMPAGNE DE PRÉLÈVEMENTS.....	190
5.2.2 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS D'ACTIVITÉS EN CASSETTES FERMÉES.....	191
5.2.3 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS DE RÉFÉRENCE EN CASSETTES FERMÉES.....	194

Table des matières

5.2.4 FACTEURS DE VARIATION DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min ⁻¹	195
5.2.5 COMPARAISON DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min ⁻¹ ET À 25 L.min ⁻¹	198
5.2.6 CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES MESURÉS	202
5.2.7 ÉTUDE DE L'AÉROSOL GÉNÉRÉ AU COURS DE LA FERMENTATION SUR LA PLATE-FORME E .	203
5.3 DISCUSSION	206
5.3.1 APPRÉCIATION DES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES CULTIVABLES.....	206
5.3.2 CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES MESURÉES PAR qPCR	206
5.3.3 PARAMÈTRES INFLUENÇANT LES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES	207
5.3.4 LES POINTS DE RÉFÉRENCE.....	208
5.3.5 INFLUENCE DE LA MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT SUR LES CONCENTRATIONS MESURÉES.....	210
5.3.6 DISTRIBUTION GRANULOMÉTRIQUE DES BIOAÉROSOLS ÉMIS LORS DE LA FERMENTATION .	211
5.3.7 LES INTERFÉRENCES.....	212
5.3.8 RISQUES LIÉS AUX CONCENTRATIONS MESURÉES	213
5.4 CONCLUSIONS	214
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	215
<i>Références bibliographiques</i>	<i>219</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>231</i>
<i>Annexe I. Réalisation des gammes étalons pour la quantification absolue.....</i>	<i>233</i>
<i>Annexe II. Dénombrement de la flore cultivable par mise en culture sur milieux gélosés.....</i>	<i>235</i>
<i>Annexe III. Dénombrement des cellules par microscopie à épifluorescence</i>	<i>239</i>
<i>Annexe IV. Quantification de l'ADN par PCR temps réel</i>	<i>241</i>
<i>Annexe V. Échantillonnage en cassettes de prélèvement</i>	<i>245</i>
<i>Annexe VI. Échantillonnage avec l'impacteur en cascade Sioutas</i>	<i>247</i>
<i>Annexe VII. Échantillonnage avec l'impacteur en cascade Marple</i>	<i>249</i>
<i>Annexe VIII. Échantillonnage avec le préleveur haut débit Coriolis</i>	<i>251</i>

*Liste des abréviations
et des acronymes*

Liste des abréviations et des acronymes

AAE : Alvéolite Allergique Extrinsèque	dGTP : désoxy-Guanine Tri-Phosphate
ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie	dNTP : désoxy-Nucléotides Tri-Phosphate
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	D_{opt} : Diamètre optique
AFA : Amphotéricine B, Fosfomycine, Aztréonam	DRBC : Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar
AFNOR : Agence Française de Normalisation	DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
AGI-30 : All Glass Impinger 30 (type d'échantillonneur d'aérosols)	dTTP : désoxy-Thymine Tri-Phosphate
ANOVA : ANalysis Of VAriance	ECD-MUG : <i>Escherichia coli</i> Direct MUG agar (MUG : 4-MethylUmbelliferyl-β-D-Glucuronide)
AO : Acridine Orange	ECF : Extra Cytoplasmic Function
ARN : Acide RiboNucléique	EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert	EMB : Eosin Methylene Blue agar
AT (%) : pourcentage en Adénine et Thymine	EMBL : European Molecular Biology Laboratory
ATCC : American Type Culture Collection	EN : European Norm
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	E-value : Expected value
BD BBL™ et BD DIFCO™ : marque déposée de milieux de culture, par la société BD Diagnostics	F : Fisher (test de Fisher)
BIBI : Bio Informatic Bacteria Identification	FAM : 6-carboxyfluoresceine (fluorophore)
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
BRS : Bio-Réacteur Stabilisateur	FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
C₂H₆O : éthanol	GC (%) : pourcentage en Guanine et Cytosine
CASO : CAsein-SOya agar	GSP : Gas Sample Probes (type d'échantillonneur d'aérosols)
CFX™ : marque déposée de thermocycleurs, par la société Bio-Rad	gyrB : gyrase B
CHU : Centre Hospitalier Universitaire	H_{liq} : Hauteur du film liquide
CIP : Collection de l'Institut Pasteur	IC : Intervalle de Confiance
CIP 10 : Capteur Individuel de Poussières	IHEM : collection de levures et moisissures de l'Institut Scientifique de Santé Publique
COP : Compteur Optique de Particules	INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
CT : Cycle Threshold	IOM : Institute of Occupational Medicine (type d'échantillonneur d'aérosols)
D_{ae} : Diamètre aérodynamique	ISO : International Organization for Standardization
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	JSCC : Japan Society for Culture Collection
dATP : désoxy-Adénine Tri-Phosphate	KCl : chlorure de potassium
dCTP : désoxy-Cytosine Tri-Phosphate	
DECOS : Dutch Expert Committee on Occupational Safety	
DG 18 : Dichloran (18 %) Glycerol agar	

Liste des abréviations et des acronymes

LAL : Lysat d'Amebocyte de Limule

LAS : Laser Aerosol Spectrometer

LGC Standards : entreprise privée britannique, fournisseur de produits chimiques, biologiques, biochimiques et biomoléculaires

M Air T : type d'échantillonneur d'aérosols

MAS 100 : Microbial Air monitoring System (type d'échantillonneur d'aérosols)

MD8 : type d'échantillonneur d'aérosols

MEA : Malt Extract Agar

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MMAD : Mass Median Aerodynamic Diameter

MW : Molecular Weight

Na₂HPO₄ : hydrogénophosphate de sodium

NaCl : chlorure de sodium

NaH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de sodium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NF : Norme Française

NPP : Nombre le Plus Probable

p : probabilité

PAS-6 : type d'échantillonneur d'aérosols

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHS : Pneumopathie d'HyperSensibilité

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PVC : PolyVinyl Chloride

Q_E : débit d'entraînement

Q_G : débit de génération

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

r : coefficient de corrélation

R8 : milieu de Amner pour la culture des actinomycètes thermophiles

RFU : Relative Fluorescence Unit

RH : Relative Humidity

RCS : Rotary Centrifugal air Sampler (type d'échantillonneur d'aérosols)

RNase : RiboNucléase

SAS : Surface Air System (type d'échantillonneur d'aérosols)

SKC : fournisseur spécialisé dans les technologies d'échantillonnage

SPS : Sulfite Polymyxin Sulfadiazine agar

SYBr green : SYnergy BRands green (fluorochrome)

Ta : annealing temperature

TAMRA : tétraméthyl-6-carboxyrhodamine (fluorophore)

TS : Tryptone Sel

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

TSI : entreprise spécialisée dans la conception et la production d'instruments de précision pour la mesure de la qualité de l'air, l'étude des aérosols...

UFC : Unité Formant Colonies

UMIP : Collection des Champignons de l'Institut Pasteur

VC-25 : type d'échantillonneur d'aérosols

VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

WT : Wild Type

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition d'un bioaérosol.	49
Tableau 2. Exemples de tailles de spores de quelques actinomycètes.	51
Tableau 3. Récapitulatif d'études traitant de l'aérobiocontamination générale en plates-formes de compostage.	74
Tableau 4. Récapitulatif d'études traitant de l'aérobiocontamination en actinomycètes en plates-formes de compostage.	81
Tableau 5. Liste des souches utilisées pour l'étude de spécificité des oligonucléotides.....	88
Tableau 6. Détails des oligonucléotides utilisés pour la recherche et la quantification d'actinomycètes par PCR temps réel.	97
Tableau 7. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tvu F211-R285/S243 testés sur 94 souches microbiennes.....	99
Tableau 8. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tvu F751-R824/S776 testés sur 94 souches microbiennes.....	100
Tableau 9. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tfu F374-R472/S419 testés sur 94 souches microbiennes.....	102
Tableau 10. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides SM fw8-rev9/p6 testés sur 94 souches microbiennes.....	104
Tableau 11. Caractéristiques des plates-formes échantillonnées.....	173
Tableau 12. Détails des prélèvements de bioaérosols effectués sur les 5 plates-formes de compostage étudiés.....	187
Tableau 13. Caractéristiques météorologiques observées lors des 3 journées de prélèvements sur les 5 plates-formes de compostage.	191
Tableau 14. Récapitulatif des corrélations obtenues lors des régressions effectuées sur les 5 paramètres biologiques étudiés (concentrations en cultivables et en ADN), pour les échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min ⁻¹ et en cassettes ouvertes à 25 L.min ⁻¹	202
Tableau 15. Récapitulatif des concentrations obtenues lors de l'étude de l'aérosol généré au cours de la fermentation sur la plate-forme E.	204

Liste des Figures

Liste des Figures

Figure 1. Représentation des différentes fractions des particules, comme décrites dans la norme NF X 43-276.....	50
Figure 2. Convention des différentes fractions de particules en suspension dans l'air.....	51
Figure 3. Exemples d'échantillonneurs par impaction sur milieu solide.....	53
Figure 4. Exemples d'échantillonneurs par impaction en milieu liquide.....	53
Figure 5. Exemples d'échantillonneurs basés sur la méthode de filtration.....	54
Figure 6. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'agents intercalants.....	60
Figure 7. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'une sonde Taqman.....	61
Figure 8. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'une sonde d'hybridation.....	61
Figure 9. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais du système FRET.....	62
Figure 10. Schématisation du cycle de développement de <i>Streptomyces</i> sp.....	68
Figure 11. Schématisation de la variation de température au cours des deux procédés biologiques du compostage.....	70
Figure 12. Schématisation des grandes étapes impliquées dans le processus de compostage.....	72
Figure 13. Photographie de la souche <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> ensemencée dans une flasque cellulaire sur gélose TSA, après 15 jours d'incubation à 50 °C.....	87
Figure 14. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation de la température d'hybridation-élongation.....	92
Figure 15. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation des concentrations en oligonucléotides.....	93
Figure 16. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation du pré-mix PCR.....	94
Figure 17. Gammes étalons mises en place pour la détection et l'amplification des portions de gène des actinomycètes recherchés.....	105
Figure 18. Gammes étalons moyennées respectivement à partir des valeurs de 54, 51 et 48 gammes réalisées au cours des travaux de la thèse sur la portion de la séquence <i>GyrB</i> de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , sur la portion de la séquence du facteur <i>ecf</i> de <i>Thermobifida fusca</i> et sur celle de la séquence de l'ARNr 23S de <i>Streptomyces californicus</i>	107
Figure 19. Efficacités PCR obtenues pour un gradient de 8 températures d'hybridation-élongation différentes, pour chacun des 3 modèles de l'étude.....	108
Figure 20. Efficacités PCR obtenues pour 8 différents pré-mix testés entrant dans la composition du mix PCR, pour chacun des 3 modèles de l'étude.....	110
Figure 21. Efficacités PCR obtenues pour un gradient de concentrations en oligonucléotides, pour chacun des 3 modèles de l'étude.....	111
Figure 22. Comparaison de 4 protocoles d'extraction d'ADN, sur 6 suspensions (S) liquides de cellules de <i>T. vulgaris</i>	112
Figure 23. Comparaison de 4 protocoles d'extraction d'ADN basée sur la quantification de <i>T. vulgaris</i> par qPCR, sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B _i) échantillonnés en plates-formes de compostage.....	113
Figure 24. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la quantification de <i>T. vulgaris</i> par qPCR, sur les bioaérosols environnementaux.....	114
Figure 25. Comparaison de 4 kits commercialisés d'extraction d'ADN basée sur la qPCR avec utilisation des oligos <i>Tfu</i> , sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B _i) échantillonnés en plates-formes de compostage.....	115
Figure 26. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la qPCR avec utilisation des oligos <i>Tfu</i> , sur les bioaérosols environnementaux.....	115
Figure 27. Comparaison de 4 kits commercialisés d'extraction d'ADN basée sur la qPCR avec utilisation des oligos SM, sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B _i) échantillonnés en plates-formes de compostage.....	116
Figure 28. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la qPCR avec utilisation des oligos SM, sur les échantillons de bioaérosols environnementaux.....	117
Figure 29. Schématisation du plan d'expérience général utilisé pour l'étude visant à maîtriser la génération de bioaérosols expérimentaux.....	125
Figure 30. Protocole A de préparation d'une culture liquide de cellules de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication de Kawamoto et al., 1982.....	127
Figure 31. Protocole B de préparation d'une culture liquide de cellules de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> à partir d'une culture gélosée et basé sur la norme AFNOR NF T 72-145 de 2006.....	128
Figure 32. Protocole C de préparation d'une culture liquide de cellules de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication d'Hoskisson et al., 2000.....	128
Figure 33. Protocole D de préparation d'une culture liquide de cellules de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication de Gazonko et al., 1998.....	129
Figure 34. Schématisation du fonctionnement du banc de génération ayant servi à la production des bioaérosols expérimentaux.....	130
Figure 35. Photo du dispositif de génération sous PSM.....	131
Figure 36. Appareils d'analyse et de prélèvement connectés en zone terminale de l'enceinte de prélèvement, pour la caractérisation des bioaérosols expérimentaux.....	132
Figure 37. Concentrations en spores totales et en bactéries cultivables des cultures cellulaires avant (t_0) et pendant (t_1 puis t_2) la génération, pour chacun des protocoles de préparation étudiés.....	135
Figure 38. Concentrations en microorganismes obtenues par mise en culture et épifluorescence des cultures cellulaires avant génération, pour les protocoles de préparation A, B, C et D.....	136
Figure 39. Concentrations en microorganismes obtenues par mise en culture et épifluorescence des bioaérosols obtenus après génération des cultures, pour les protocoles de préparation A, B, C et D.....	137

Liste des Figures

Figure 40. Concentrations en microorganismes obtenues par mise en culture et épifluorescence des bioaérosols obtenus après génération des cultures, pour les protocoles de préparation A, A', B et B'.....	138
Figure 41. Distributions granulométriques des cellules de <i>T. vulgaris</i> aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles A et A'.....	139
Figure 42. Distributions granulométriques des cellules de <i>T. vulgaris</i> aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles B et B'.....	140
Figure 43. Distributions granulométriques des cellules de <i>T. vulgaris</i> aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles B ou B'.....	141
Figure 44. Distributions granulométriques des cellules de <i>T. vulgaris</i> aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles A, A', C ou D.....	142
Figure 45. Distribution granulométrique des cellules de <i>T. fusca</i> aérosolisées à partir d'une culture préparée selon le protocole B'.....	143
Figure 46. Cellules (spores et mycélium) de <i>T. fusca</i> aérosolisées à partir d'une culture liquide préparée avec le protocole B' et observées au microscope à épifluorescence.....	143
Figure 47. Distribution granulométrique des cellules de <i>S. californicus</i> aérosolisées à partir d'une culture préparée selon le protocole B.....	144
Figure 48. Mise en relation des populations obtenues avec le COP Grimm et l'impacteur Sioutas avec les différents types de cellules de <i>T. vulgaris</i> observées par épifluorescence.....	150
Figure 49. Protocole de préparation d'une culture liquide de cellules d'actinomycètes à partir de cultures gélosées et basés sur la norme AFNOR NF T 72-145.....	156
Figure 50. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur cultures pures de <i>T. vulgaris</i> : concentration en bactéries cultivables C_C ou en spores totales C_S	159
Figure 51. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de <i>T. vulgaris</i> : concentration en bactéries cultivables C_C ou en spores totales C_S	160
Figure 52. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de <i>T. fusca</i> : concentration en bactéries cultivables C_C ou en spores totales C_S	161
Figure 53. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de <i>S. californicus</i> : concentration en bactéries cultivables C_C ou en spores totales C_S	162
Figure 54. Schématisation du plan d'expérience général utilisé pour l'étude visant à caractériser l'outil qPCR développé, en conditions réelles d'exposition.....	174
Figure 55. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage A.....	175
Figure 56. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage A.....	176
Figure 57. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage B.....	177
Figure 58. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage B.....	178
Figure 59. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage C.....	179
Figure 60. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage C.....	180
Figure 61. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage D.....	181
Figure 62. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage D.....	182
Figure 63. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage E.....	183
Figure 64. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage E.....	184
Figure 65. Concentrations en bactéries cultivables mésophiles et thermophiles retrouvées durant les tournées de prélèvements effectuées sur les 5 plates-formes de compostage (A à E).....	192
Figure 66. Concentrations en ADN amplifié avec les oligos <i>Tvu</i> F751-R824/S776, les oligos <i>Tfu</i> F374-R472/S419 et les oligos SM fw8-rev9/p6 retrouvées durant les tournées de prélèvements effectuées sur les 5 plates-formes.....	193
Figure 67. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM et celles en cultivables mésophiles en fonction de la plate-forme de compostage.....	195
Figure 68. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos <i>Tfu</i> et celles en cultivables thermophiles en fonction du type de déchets compostés.....	196
Figure 69. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM en fonction de l'étape de compostage.....	196
Figure 70. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos <i>Tfu</i> en fonction de l'état de confinement au point de prélèvement.....	197
Figure 71. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM et <i>Tfu</i> en fonction de l'activité au point de prélèvement.....	198
Figure 72. Quantités d'ADN, détectées par qPCR, des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min^{-1} et en cassettes fermées à 2 L.min^{-1}	199
Figure 73. Rapports des concentrations en ADN des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min^{-1} sur les concentrations en ADN de ceux prélevés en cassettes fermées à 2 L.min^{-1}	200
Figure 74. Relation entre la concentration en ADN des échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min^{-1} et celle de ces mêmes échantillons récoltés en cassettes ouvertes à 25 L.min^{-1}	200
Figure 75. Rapport des concentrations en cultivables des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min^{-1} sur les concentrations en cultivables de ceux prélevés en cassettes fermées à 2 L.min^{-1}	201
Figure 76. Relation entre la concentration en cultivable des échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min^{-1} et celle de ces mêmes échantillons récoltés en cassettes ouvertes à 25 L.min^{-1}	201

Liste des Figures

Figure 77. Distributions granulométriques d'un bioaérosol échantillonné sur la plate-forme de compostage E.....	205
Figure 78. Distributions granulométriques d'un bioaérosol échantillonné sur la plate-forme de compostage E.....	205
Figure 79. Photo d'une culture de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> sur gélose TSA après 3 jours d'incubation à 50 °C.....	235
Figure 80. Photo de spores de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> observées par microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI.	239
Figure 81. Exemple de courbes d'amplification qPCR et gamme étalon correspondante, obtenues ici pour 6 points de gamme, répliqués 3 fois.....	243
Figure 82. Présentation des différentes parties d'une cassette de prélèvement fermée, vue de la cassette montée et photo de la pompe permettant le prélèvement.	245
Figure 83. Photographie d'un prélèvement d'air effectué en plate-forme de compostage sur deux cassettes fermées.....	246
Figure 84. Présentation des différentes parties d'un impacteur en cascade Sioutas, vue de l'impacteur monté et photo de la pompe permettant le prélèvement.	247
Figure 85. Présentation de l'impacteur en cascade Marple et photo de la pompe permettant le prélèvement.	249
Figure 86. Photo du Coriolis m et zoom sur le cône contenant le liquide de collecte avec schématisation du processus d'échantillonnage de l'air.	251

Liste des Annexes

Liste des Annexes

<i>Annexe I. Réalisation des gammes étalons pour la quantification absolue.</i>	<i>233</i>
<i>Annexe II. Dénombrement de la flore cultivable par mise en culture sur milieux gélosés.</i>	<i>235</i>
<i>Annexe III. Dénombrement des cellules par microscopie à épifluorescence.</i>	<i>239</i>
<i>Annexe IV. Quantification de l'ADN par PCR temps réel.</i>	<i>241</i>
<i>Annexe V. Échantillonnage en cassettes de prélèvement.</i>	<i>245</i>
<i>Annexe VI. Échantillonnage avec l'impacteur en cascade Sioutas.</i>	<i>247</i>
<i>Annexe VII. Échantillonnage avec l'impacteur en cascade Sioutas.</i>	<i>249</i>
<i>Annexe VIII. Échantillonnage avec le préleveur haut débit Coriolis.</i>	<i>251</i>

Développement et évaluation
d'une méthode fondée
sur la PCR temps réel
pour la caractérisation
des bioaérosols :
application au groupe des
actinomycètes

Les microorganismes (bactéries, moisissures, virus) de même que leurs composés (métabolites, constituants pariétaux...) sont omniprésents dans l'air. Et ceci est d'autant plus vrai dans certains environnements de travail aussi diversifiés que ceux de la santé, l'agroalimentaire, la métallurgie, les biotechnologies, l'agriculture ou encore le traitement des déchets. L'air de ces lieux de travail, particulièrement exposés, peut présenter des concentrations relativement élevées en microorganismes, ce qui a pour conséquence d'entraîner une potentielle exposition pour les travailleurs. Et une telle exposition aux aérosols microbiens (bioaérosols) n'est pas sans conséquence, les risques associés pouvant être de nature infectieuse, toxinique, immuno-allergène voire même cancérigène et dans tous les cas, préjudiciables pour la santé des travailleurs. La santé au travail est donc une réelle problématique qui, à l'heure actuelle, demande à être étudiée tant les interrogations sont nombreuses.

Avec 770 millions de tonnes de déchets produits en 2009, la notion de gestion des déchets est fondamentale en France et leur valorisation prend une part grandissante dans cette politique de gestion. Le traitement biologique par compostage est une filière qui nous intéresse tout particulièrement dans la mesure où elle repose sur l'activité de nombreux microorganismes pour convertir la matière organique des déchets en un produit stable et valorisable, le compost. De nombreuses études ont démontré que les activités de compostage étaient génératrices de bioaérosols. Les actinomycètes font partie de ces microorganismes largement impliqués dans les processus de dégradation de la matière organique et donc, sont retrouvés dans les bioaérosols générés par ces activités (Lacey, 1997; Miyashita *et al.*, 1982; Strom, 1985). Ces bactéries, qui sont sporulantes, y sont récurrentes et peuvent atteindre des concentrations relativement élevées (Lacey, 1997; Le Goff *et al.*, 2010).

Il faut savoir qu'un peu plus de 91 % des particules en suspension dans l'air et de diamètre aérodynamique inférieur à 2 μm appartiennent à la fraction conventionnelle alvéolaire et donc, sont capables de pénétrer dans les voies respiratoires inférieures. Le pourcentage s'élève à 97,1 % pour les particules de diamètre aérodynamique inférieur à 1 μm (AFNOR, 1993; AFNOR, 1996a). Or le diamètre des spores d'actinomycètes est très petit. Il dépend de l'espèce bien évidemment mais à l'inverse de nombreux champignons microscopiques, il est inférieur à 2 μm . De plus, certaines espèces d'actinomycètes, espèces utilisées en compostage, sont reconnues comme potentiellement pathogènes pour l'Homme. Elles peuvent être responsables de pathologies diverses mais les plus répandues sont les pneumopathies d'hypersensibilité (Dalphin & Caillaud, 1999; Jamey, 2008; Kagen *et al.*, 1981; Kleyn *et al.*, 1981; Lacey & Dutkiewicz, 1994; Pepys *et al.*, 1990). Il s'agit d'inflammations diffuses du poumon, causées par l'inhalation répétée de particules porteuses d'antigènes sur leur paroi, ces particules étant le plus souvent les spores d'actinomycètes.

Il est donc normal de considérer comme un véritable et important problème de santé au travail l'exposition des salariés à ce type de bioaérosols. La caractérisation de cette exposition est donc primordiale pour l'évaluation du risque encouru par les personnes en contact avec ces atmosphères de travail. Or, à l'heure actuelle, l'évaluation de l'exposition réelle est encore très mal maîtrisée. Pour preuve, il n'existe à l'heure actuelle aucune relation dose-effet pour la plupart de ces agents et il n'existe pas de valeur limite d'exposition professionnelle. La quantité et l'identification des microorganismes entrant dans la composition du bioaérosol, ainsi que leurs modalités de mise en suspension dans l'air, sont les déterminants majeurs à considérer pour l'évaluation de l'exposition professionnelle aux

bioaérosols. L'essentiel des études existant sur ce sujet (étude des aérosols microbiologiques) ont été menées en faisant appel à des méthodes traditionnelles de dénombrement par mise en culture sur milieux gélosés. Même si elle fournit un indicateur indispensable, il n'en reste pas moins que cette technique a beaucoup d'inconvénients, le premier d'entre eux étant une grande sous-estimation du nombre réel de microorganismes. D'autres techniques existent également (NPP, cytométrie en flux, épifluorescence...) mais leur application au dénombrement des actinomycètes est parfois délicate, la méthode largement utilisée restant le dénombrement par culture (Jamey, 2008). Les techniques de microbiologie moléculaire constituent une alternative intéressante pour caractériser l'activité, la densité, la structure et la diversité des populations microbiennes (An *et al.*, 2006; Peccia & Hernandez, 2006; Zeng *et al.*, 2006). L'étude de la bibliographie démontre très clairement que la PCR quantitative (qPCR) est un outil de biologie moléculaire largement développé, utilisé dans de nombreux domaines. Il est ainsi possible de trouver de très nombreuses publications développant l'outil de PCR quantitative si les recherches portent sur des cultures pures (bactériennes, de levures, de moisissures...), des échantillons environnementaux (sol, eau...) ou encore des échantillons cliniques (sang, cellules, tissus...). Toutefois, au regard de la littérature, les applications de ces techniques à l'étude des pathogènes dans les bioaérosols sont encore peu nombreuses et des recherches sont nécessaires pour préciser leurs domaines d'application.

Dans le cadre de la thématique « Métrologie des Bioaérosols », l'Institut National de Recherche et de Sécurité de Vandoeuvre étudie les méthodes de prélèvement et d'analyse pour le dénombrement et l'identification des microorganismes et d'autres composés microbiens dans les bioaérosols (Duquenne & Greff-Mirguet, 2005). Le but de l'étude s'inscrit dans une démarche de standardisation d'une méthode. Il s'agit donc de remédier aux inconvénients liés aux techniques traditionnelles en caractérisant une méthode de mesure de l'exposition des salariés aux bioaérosols, basée sur la PCR temps réel. Ce travail s'est porté sur d'un groupe microbien bien particulier, les actinomycètes, et sur un environnement de travail défini, le compostage. Le travail s'est articulé autour de quatre grandes parties. Tout d'abord, un travail préalable a été réalisé afin de recréer en conditions maîtrisées de laboratoire des bioaérosols similaires à ceux obtenus en plates-formes de compostage. Ensuite, l'outil qPCR a été développé et optimisé dans une démarche de standardisation d'une technique, puis caractérisé en conditions dites « de laboratoire ». Pour finir, la technique développée a été appliquée en conditions réelles d'exposition sur des échantillons de bioaérosols prélevés en plates-formes de compostage.

1.1 LES BIOAÉROSOLS	49
1.1.1 ÉLÉMENTS DE DÉFINITION ET IMPORTANCE.....	49
1.1.2 LE PRÉLÈVEMENT DES BIOAÉROSOLS	52
1.1.2.1 Échantillonnage par impaction sur milieu solide	52
1.1.2.2 Échantillonnage par impaction sur milieu liquide ou 'impingement'	53
1.1.2.3 Échantillonnage par filtration.....	54
1.1.2.4 Autres méthodes.....	54
1.1.2.5 Efficacité et choix des biocollecteurs.....	55
1.1.3 L'ANALYSE DES BIOAÉROSOLS.....	55
1.1.3.1 Quelques méthodes de dosage	55
1.1.3.2 La cytométrie en flux.....	56
1.1.3.3 Méthodes culturales	56
1.1.3.4 Méthodes de microscopie	57
1.1.3.5 La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	58
1.1.3.6 Avantages et inconvénients liés aux techniques analytiques	62
1.2 LES ACTINOMYCÈTES	64
1.2.1 QUELQUES MOTS DE PHYLOGÉNIE.....	64
1.2.2 CARACTÈRES BIOLOGIQUES, ÉCOLOGIE ET PATHOGÉNICITÉ	65
1.2.3 QUELQUES EXEMPLES DE FAMILLES D'ACTINOMYCÈTES	66
1.2.3.1 La famille des <i>Thermoactinomycetaceae</i> et <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	66
1.2.3.2 La famille des <i>Nocardiopsaceae</i> et <i>Thermobifida fusca</i>	66
1.2.3.3 La famille des <i>Streptomycetaceae</i> et <i>Streptomyces californicus</i>	67
1.3 LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES DÉCHETS PAR COMPOSTAGE.....	69
1.3.1 LES DÉCHETS EN FRANCE	69
1.3.2 PRINCIPE DU COMPOSTAGE.....	70
1.3.3 FONCTIONNEMENT D'UNE PLATE-FORME DE COMPOSTAGE.....	71
1.3.3.1 Grandes étapes.....	71
1.3.3.2 Paramètres importants.....	73
1.4 OBJECTIFS ET ENJEUX DE LA THÈSE.....	73
1.4.1 L'AÉROBIOCONTAMINATION GÉNÉRALE EN PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE	73
1.4.2 L'AÉROBIOCONTAMINATION EN ACTINOMYCÈTES ASSOCIÉE AU COMPOSTAGE.....	80
1.5 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE.....	82
1.5.1 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET INTÉRÊTS ASSOCIÉS	82
1.5.2 ORGANISATION DES TRAVAUX	83

CHAPITRE 1 - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LES BIOAÉROSOLS

1.1.1 ÉLÉMENTS DE DÉFINITION ET IMPORTANCE

La norme AFNOR XP X 43-244 définit un aérosol comme étant un ensemble constitué par un milieu gazeux contenant des particules solides et/ou liquides en suspension dans ce milieu (AFNOR, 1998). Cette définition précise d'ailleurs qu'une particule est considérée en suspension si et seulement si sa vitesse maximale de chute ne va pas au delà des $0,25 \text{ m.s}^{-1}$ (valeur déterminée dans un air immobile, à 20°C et à $1\,013 \text{ hPa}$). Le bioaérosol est la partie biologique de l'aérosol. Il contient des particules d'origine non biologique mais il est essentiellement composé de particules d'origine biologique, c'est-à-dire d'origines végétales, animales ou microbiologiques, ainsi que les produits et composés de ces acteurs (métabolites, toxines, débris, composés pariétaux...). Les particules d'origine microbiologique (virus, protozoaires, levures, moisissures et bactéries), selon leur état, peuvent se retrouver sous forme d'organismes actifs ou inactifs, d'organismes morts ou vivants, viables cultivables ou encore viables non cultivables (Tableau 1).

Tableau 1. Composition d'un bioaérosol.

PARTICULES D'ORIGINE NON BIOLOGIQUE									
+									
PARTICULES D'ORIGINE BIOLOGIQUE									
Particules d'origine végétale	Particules d'origine animale	Particules d'origine microbiologique				Produits et composés de ces acteurs			
		virus	protozoaires	levures et moisissures	bactéries	métabolites synthétisés	toxines produites	déchets et débris rejetés	composés pariétaux relargués
				(organismes entiers, cellules végétatives ou spores)	(organismes entiers, cellules végétatives ou spores)				
		↓	↓	↓	↓				
		<i>actifs</i>	<i>vivants</i>	<i>organisme mort</i>	<i>organisme mort</i>				
		<i>inactifs</i>	<i>morts</i>	<i>organisme viable non cultivable</i>	<i>organisme viable non cultivable</i>				
				<i>organisme viable et cultivable</i>	<i>organisme viable et cultivable</i>				

Les particules qui composent un bioaérosol sont de tailles variables. Plus le diamètre d'une particule est petit et plus celle-ci, si elle est inhalée, peut s'enfoncer profondément dans le réseau pulmonaire. Les normes NF X 43-276 relative à l'atmosphère des lieux de travail (AFNOR, 1993) et NF X 43-100 pour la qualité de l'air (AFNOR, 1996a) définissent de manière bien précise un vocabulaire pour faire un lien

entre la taille des particules et leur possible acheminement au sein de l'appareil respiratoire de l'Homme (Figure 1). Ainsi, il y a :

- la fraction inhalable qui est la fraction des particules en suspension dans l'air qui est inhalée via le nez et la bouche
- la fraction extra-thoracique qui est la fraction inhalée ne pénétrant pas au-delà du larynx
- la fraction trachéo-bronchique qui est celle qui pénètre au-delà du larynx mais qui ne passe pas dans les zones non ciliées
- la fraction thoracique qui est celle qui passe au-delà du larynx
- et la fraction respirable ou alvéolaire, qui elle, pénètre dans les voies aériennes non ciliées, à savoir les bronchioles et alvéoles

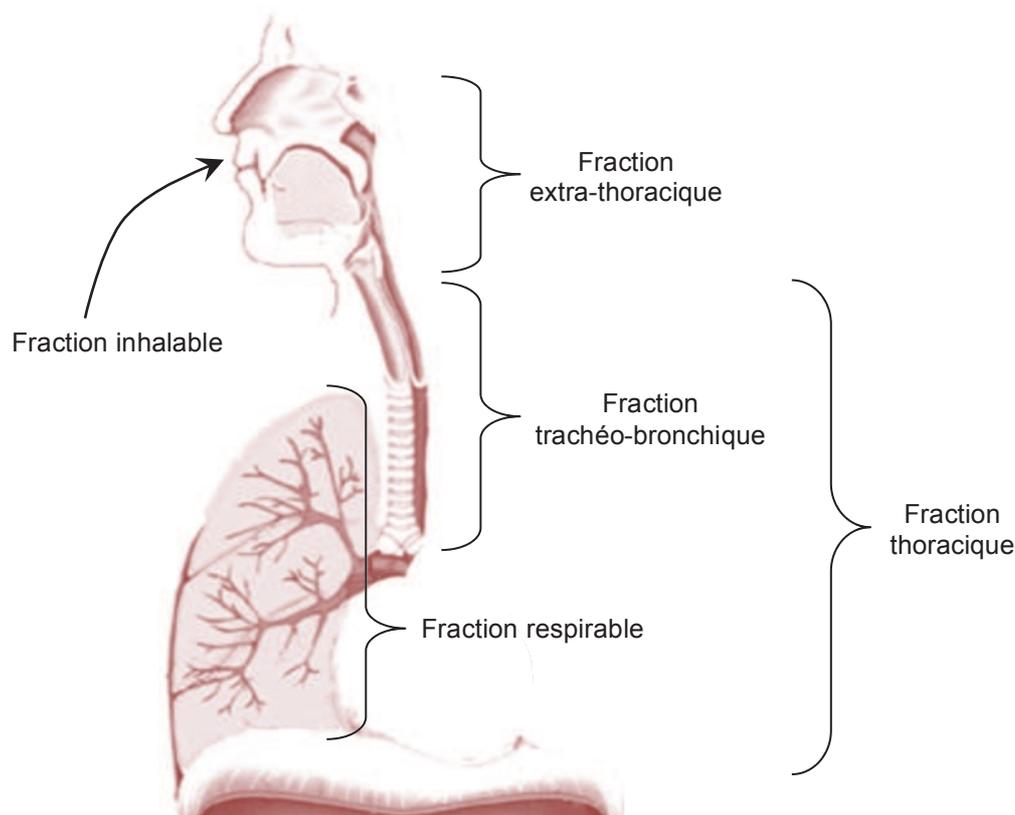


Figure 1. Représentation des différentes fractions des particules, comme décrites dans la norme NF X 43-276 [image extraite du site http://www.bioweb.lu/Anatomie/Respiration/App_resp.htm].

Moins de 50 % des particules en suspension ayant un diamètre aérodynamique de 4 μm ou plus appartiennent à la convention alvéolaire (Figure 2). Or, il existe de très nombreux agents biologiques dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 4 μm . C'est notamment le cas de nombreuses spores bactériennes ou fongiques. Par exemple, le diamètre des spores d'actinomycètes est en moyenne d'un micromètre, tout du moins, il est largement inférieur à 4 μm (Tableau 2). De ce fait, lorsque ces spores se retrouvent en suspension dans l'air, elles peuvent être à l'origine de diverses affections étant donné leur facilité à être inhalés et même respirés.

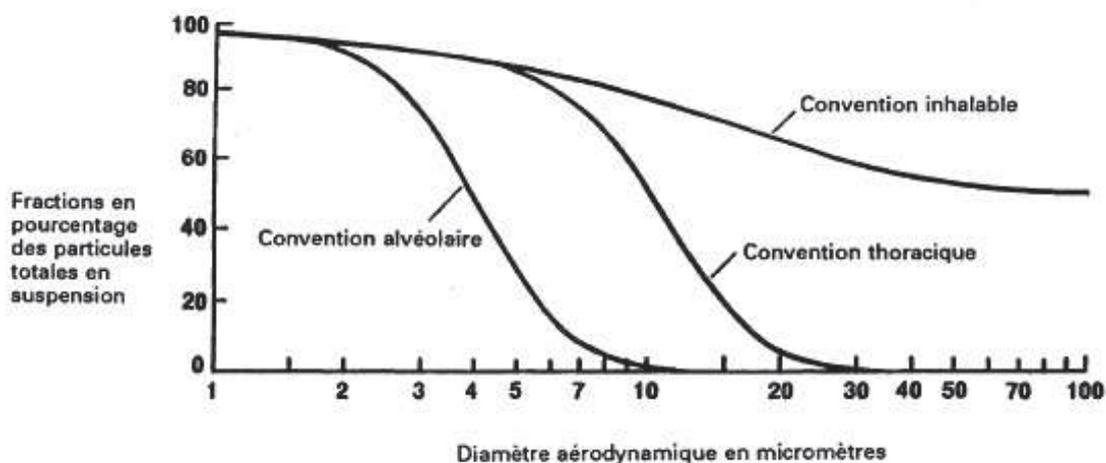


Figure 2. Convention des différentes fractions de particules en suspension dans l'air [graphique tiré de la norme AFNOR NF X 43-276].

Tableau 2. Exemples de tailles de spores de quelques actinomycètes.

Référence de l'étude	Genre ou espèce	Grandeur mesurée	Valeur
Madelin et Johnson, 1992	<i>Faenia rectivirgula</i> (= <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>)	diamètre aérodynamique	1,1 à 1,5 µm
		longueur x largeur	0,8 x 0,8 µm
	<i>Streptomyces albus</i>	diamètre aérodynamique	1,2 à 2,1 µm
		longueur x largeur	0,7-1 x 0,7 µm
Grinshpun et al., 1997	<i>Saccharomonospora viridis</i>	diamètre aérodynamique	1,2 à 1,5 µm
		longueur x largeur	0,9 x 0,7 µm
Reponen et al., 1998	<i>Streptomyces albus</i>	diamètre aérodynamique	0,98 µm
		longueur x largeur	1,28 µm
	<i>Micromonospora halophytica</i>	longueur x largeur	0,72 x 0,55 µm
Reponen et al., 1998 (d'après d'autres articles)	<i>Streptomyces albus</i>	diamètre aérodynamique	0,85 µm
		longueur x largeur	0,84 x 0,68 µm
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	diamètre aérodynamique	0,57 µm
		longueur x largeur	0,79 x 0,66 µm
Reponen et al., 1998 (d'après d'autres articles)	<i>Faenia rectivirgula</i> (= <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>)	longueur x largeur	1,5 x 0,7 µm
		<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	diamètre
	<i>Micromonospora halophytica</i>	diamètre	1,2 µm

De plus, l'inhalation de ces bioaérosols peut conduire à des affections diverses, allant de l'allergie à des pathologies beaucoup plus graves (cancers). Quatre types de risques résultant d'une exposition à des agents biologiques sont recensés : le risque infectieux, le risque immuno-allergiques, le risque toxique et le risque cancérigène (Balty et al., 2008). Le plus souvent, l'inhalation de telles particules conduit à des atteintes pulmonaires nommées pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) ou alvéolites allergiques extrinsèques (AAE). Il s'agit d'une inflammation des alvéoles pulmonaires causée par les agents pathogènes (surtout des actinomycètes et des moisissures) contenus dans les poussières inhalées. Une synthèse du Groupe d'Études et de Recherche sur les Maladies Orphelines Pulmonaires (Dalphin & Caillaud, 1999) recense près de 50 alvéolites allergiques extrinsèques en détaillant pour chacune son réservoir antigénique et les antigènes supposés comme impliqués. Cette étude révèle que de nombreuses PHS sont causées par des actinomycètes. Et ce sont plus spécifiquement les spores de ces bactéries, dont la paroi est constituée de nombreux déterminants antigéniques, qui induisent une réaction anticorps-antigène complexe. Les atteintes peuvent être diverses, la plus étudiée et la plus citée étant la maladie du poumon de fermier, forme de pneumopathie causée par *Saccharopolyspora*

rectivirgula et *Thermoactinomyces vulgaris* (Pepys *et al.*, 1990) essentiellement. Les actinomycètes sont également responsables d'autres affections (même s'il ne s'agit pas des spores mais de la bactérie elle-même) comme par exemple les actinomycoses qui se manifestent par une inflammation des tissus affectés, des lésions semblables à des tumeurs et la formation d'un abcès. Les actinomycètes sont aussi impliqués dans des pathologies chez les animaux (bétail essentiellement) et les plantes (Goodfellow & Williams, 1983).

L'agence européenne pour la sécurité et la santé au travail met en exergue le problème posé par les agents biologiques et les risques qu'ils peuvent entraîner. La Directive 2000/54/CE du Parlement européen, publiée dans le Journal officiel des communautés européennes, fixe les prescriptions minimales à respecter afin de veiller à la sécurité et à la santé des travailleurs vis-à-vis d'une exposition à des agents biologiques. Mais à l'heure actuelle, il n'y a pas de données caractérisant la relation dose-effet pour ces agents biologiques. Il n'existe aucune valeur limite d'exposition professionnelle concernant les microorganismes contenus dans l'air des environnements de travail, ni en France ni même ailleurs. Seules quelques valeurs existent pour certains composés produits par ces microorganismes. Des normes existent concernant la mesure des microorganismes ou de leurs composés dans l'air des lieux de travail, comme par exemple la norme NF X 43-247 (AFNOR, 2000). De nombreux appareils d'échantillonnage peuvent être employés et combinés avec différentes méthodes d'analyse. Malheureusement, ceux-ci ne sont pas caractérisés en détail et par conséquent, ne sont pas standardisés.

1.1.2 LE PRÉLÈVEMENT DES BIOAÉROSOLS

Les méthodes d'échantillonnage des microorganismes en suspension dans l'air sont nombreuses. Néanmoins, trois grandes catégories sont généralement distinguées, catégories qui sont fonction du principe de collecte de l'appareil : l'impaction sur milieu solide, l'impaction en milieu liquide ou 'impingement' et la filtration.

1.1.2.1 Échantillonnage par impaction sur milieu solide

L'impaction a pour but de séparer les particules du gaz dans lequel elles sont contenues, grâce aux propriétés d'inertie de ces mêmes particules mais aussi des caractéristiques physiques de l'impacteur employé. Dans cette configuration de prélèvement, l'air est aspiré à travers une grille (qui peut être constituée d'orifices ou encore de fentes) puis projeté directement sur un milieu gélosé. Les particules qui sont suffisamment résistantes à la variation de vitesse viennent alors s'impacter sur cette surface cible. Les particules de faible inertie sont rejetées par le flux d'air sortant. Le plus souvent, ce support de collecte est une gélose solide voire semi-solide contenue dans une boîte de Pétri mais d'autres surfaces peuvent lui être substituées suivant l'analyse envisagée, comme par exemple une lame pour une observation microscopique. La gélose utilisée dépend bien évidemment du ou des germes recherchés. On distingue généralement les impacteurs à orifices circulaires, ceux à fente et les impacteurs centrifuges. Ils peuvent être constitués d'un seul ou de plusieurs étages. Les impacteurs mono-étage, comme leur nom l'indique, sont formés d'un seul ensemble grille / support de collecte. Les impacteurs à plusieurs étages sont composés de plusieurs étages individualisés et superposés, les caractéristiques des grilles et des supports de collecte évoluant d'un étage à l'autre de manière à faire évoluer la vitesse d'impaction des particules. De ce fait, ce type de collecteur permet d'échantillonner un bioaérosol tout en le séparant en plusieurs classes de taille de particules, contrairement à un mono-étage. Quelques exemples d'appareils échantillonnant par impaction sur milieu solide sont présentés dans la Figure 3.

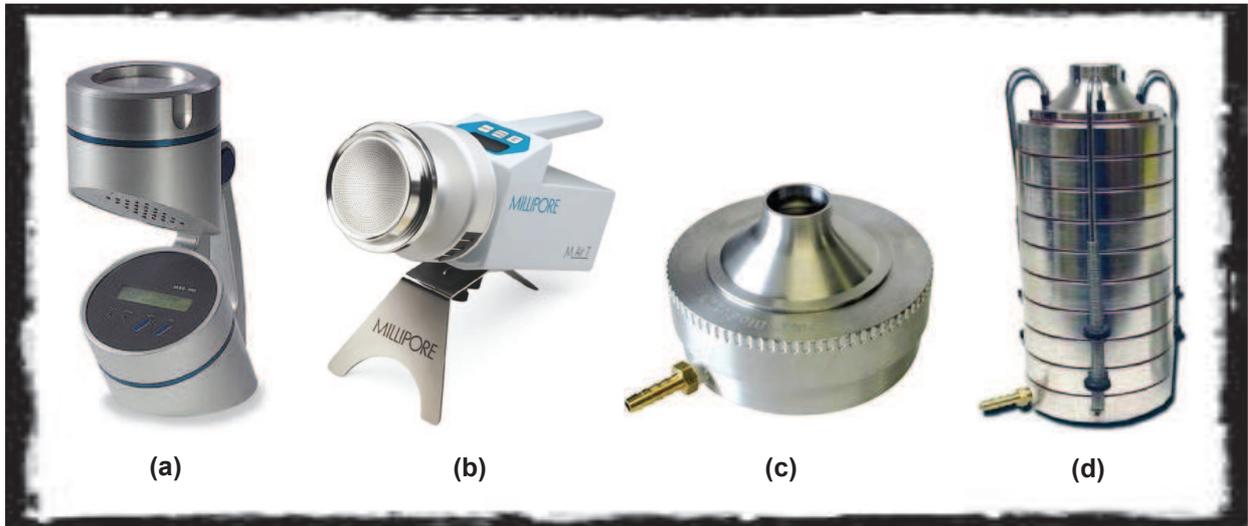


Figure 3. Exemples d'échantillonneurs par impaction sur milieu solide : impacteurs mono-étage MAS-100 (a), M Air T (b) et BioStage® (c) et impacteur en cascade Andersen (d) [Images extraites des sites www.sonomatesting.com, www.equiposylaboratorio.com, www.aesolutions.com et www.envcoglobal.com respectivement].

1.1.2.2 Échantillonnage par impaction sur milieu liquide ou 'impingement'

Lors d'un échantillonnage par 'impingement', l'air aspiré par un tube capillaire est propulsé dans un milieu liquide ou à sa surface. Les solutions servant de fluide de collecte sont diverses ; il peut s'agir uniquement d'eau stérile comme d'une solution physiologique additionnée d'agents destinés à protéger les microorganismes des diverses agressions subies par l'échantillonnage. Dans d'autres cas, il peut même s'agir de milieux nutritifs. La Figure 4 fournit trois exemples de tels échantillonneurs.

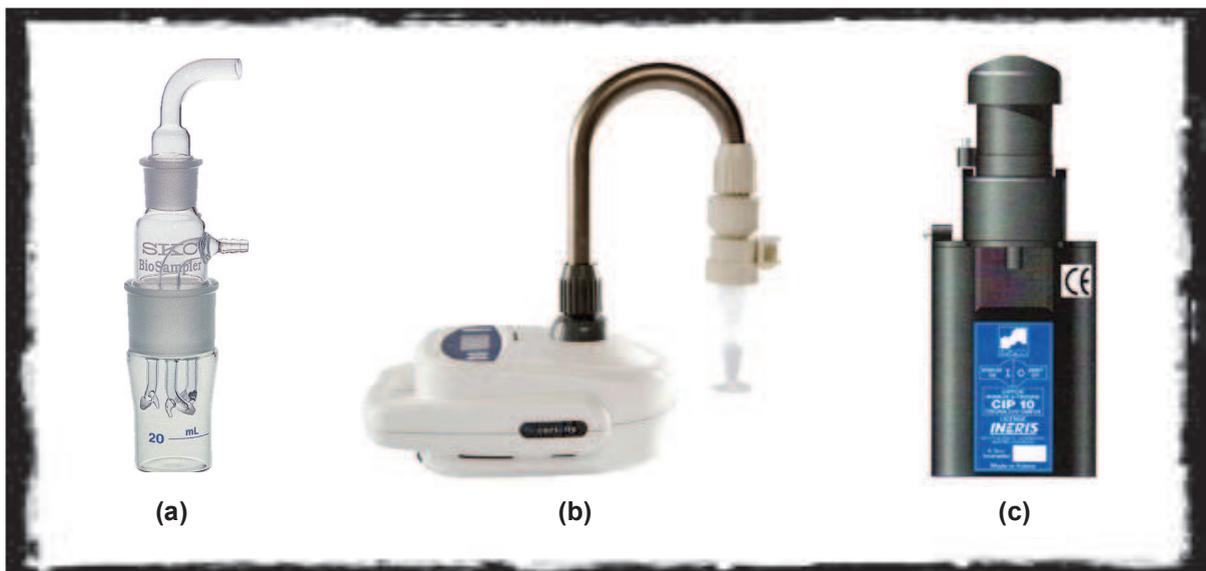


Figure 4. Exemples d'échantillonneurs par impaction en milieu liquide : SKC BioSampler® (a), échantillonneur haut débit Coriolis® μ (b) et CIP 10 (c) [images extraites des sites www.skcinc.com, www.bertin-corp.com et www.laprev.fr respectivement].

1.1.2.3 Échantillonnage par filtration

Ce prélèvement consiste à récolter les particules d'un aérosol grâce à une filtration de l'air à travers un média filtrant. Les particules peuvent alors être retenues en surface ou à l'intérieur de ce média qui peut être soit de type membraneux (membranes en polycarbonate, en ester de cellulose...) soit de type fibreux (filtre en fibres de verre). La membrane utilisée est aussi fonction de l'analyse à réaliser. Par exemple, pour une analyse de microscopie par épifluorescence, le choix se portera sur une membrane en polycarbonate noire alors qu'une membrane en fibres de verre sera utilisée pour un dosage des endotoxines. Par ailleurs, l'analyse peut être réalisée directement sur la membrane ou après que les microorganismes retenus par celle-ci en aient été décrochés. Des exemples d'appareils sont présentés dans la Figure 5.

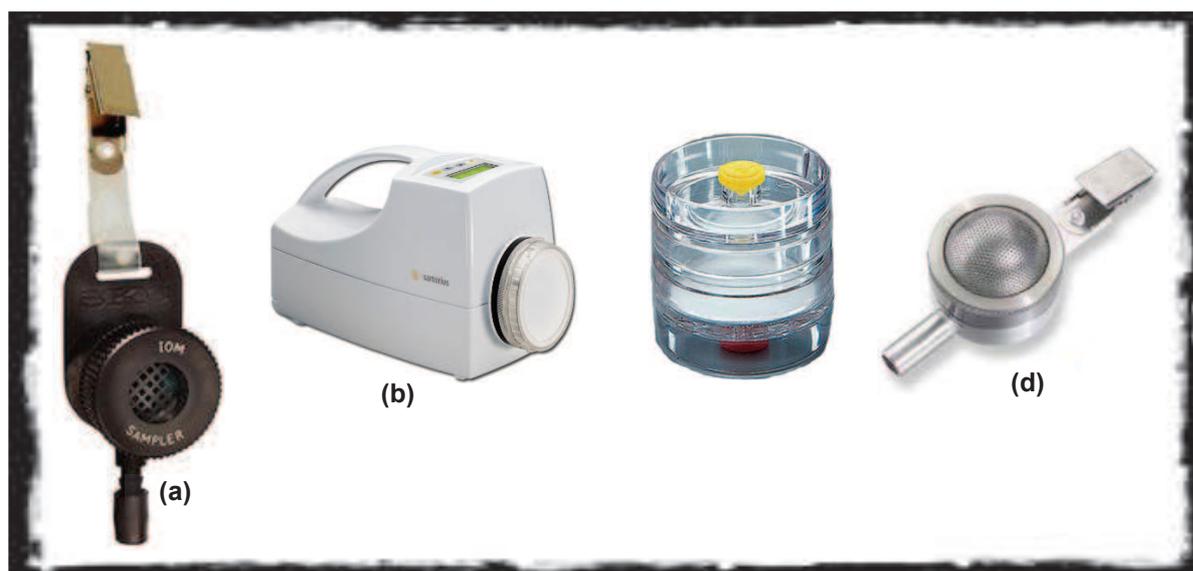


Figure 5. Exemples d'échantillonneurs basés sur la méthode de filtration : préleveurs Bouton (a), AirPort MD8 (b), cassette porte-filtre (c) et IOM (d) [images extraites des sites www.aesolutions.com, www.biocompare.com et www.medicalexpo.fr].

1.1.2.4 Autres méthodes

D'autres méthodes de prélèvement existent, bien que moins fréquemment utilisées. C'est le cas de la sédimentation, dont le mécanisme physique résulte de l'effet du champ de gravité sur la particule. La méthode de collecte consiste à exposer une gélose nutritive en boîte de Pétri à l'air ambiant et à attendre que les particules sédimentables s'y déposent. Il s'agit d'une méthode passive très simple à mettre en œuvre mais qui a pour inconvénient de ne pas permettre de ramener le nombre de microorganismes à une quantité d'air (Sahu *et al.*, 2005). Pour les particules possédant des charges électriques, une autre méthode consiste à ioniser l'aérosol à étudier afin de pouvoir le collecter sur une surface métallique de charge opposée ; il s'agit de la précipitation électrostatique (Mainelis *et al.*, 2002a; Mainelis *et al.*, 2002b). Enfin, la précipitation thermique est un autre exemple de méthode (Orr & Martin, 1958), dont le phénomène physique repose sur le principe que les aérosols se déplacent lorsqu'ils sont soumis à des gradients de températures (Ha, 2006). La méthode de collecte consiste soit à soumettre les particules à un corps chaud pour les repousser (thermophorèse), soit à les soumettre à un rayon lumineux afin

d'appliquer un différentiel de température sur la particule, responsable d'une force de déplacement (photophorèse).

1.1.2.5 Efficacité et choix des biocollecteurs

L'efficacité globale de collecte d'un préleveur est définie comme étant le produit de l'efficacité physique de l'appareil par son efficacité biologique (Henningson & Ahlberg, 1994). L'efficacité physique d'un appareil dépend de sa configuration, des propriétés du bioaérosol (diamètres aérodynamiques des particules notamment) mais aussi des paramètres d'écoulement de l'air (vitesse, direction...). L'efficacité biologique d'un échantillonneur détermine sa capacité à ne pas modifier la viabilité des microorganismes en les soumettant à quelconques stress (dessiccation, force centrifuge élevée...). Ainsi, cette efficacité globale correspond à la probabilité qu'une particule présente dans le bioaérosol soit effectivement échantillonnée et puisse être analysée.

Comme il n'existe pas de normes faisant état de protocoles standardisés pour la mesure de l'aérobiocontamination, seules des publications dont l'étude porte sur une comparaison d'appareils permettent d'apporter des éléments de réflexion sur le choix (Chen & Li, 2005b; Jensen *et al.*, 1992; Nevalainen *et al.*, 1992; Thorne *et al.*, 1992). De ce fait, le choix du biocollecteur reste à l'appréciation de chacun, en fonction du type de prélèvement désiré. De toutes ces méthodes qui ont été décrites, certaines ne sont adaptées que pour effectuer des prélèvements de l'air ambiant à poste fixe (SKC BioSampler®), contrairement à d'autres qui peuvent également être utilisées pour des prélèvements individuels sur l'opérateur (cassette porte-filtre). Ceci est donc un premier élément conditionnant le choix de l'appareil de prélèvement. Celui-ci dépend également de l'analyse effectuée pour étudier le bioaérosol. La méthode de prélèvement choisie ne sera pas la même si l'étude porte sur la fraction viable cultivable du bioaérosol, sur les microorganismes à l'état de spores par exemple, sur les composés issus de ces microorganismes (endotoxines) ou encore sur leur ADN.

1.1.3 L'ANALYSE DES BIOAÉROSOLS

L'analyse d'un bioaérosol peut-être qualitative et/ou quantitative. Dans le premier cas, il s'agit le plus souvent d'une identification des microorganismes du dit bioaérosol. Il peut également s'agir d'une caractérisation du bioaérosol par représentation de la distribution granulométrique des particules qui le composent. Dans le second cas, l'analyse doit permettre une quantification d'une espèce ou d'un groupe de microorganismes, de composés bien précis... amenant à une concentration dans l'air. Par choix, seules des techniques quantitatives sont présentées ci-dessous.

1.1.3.1 Quelques méthodes de dosage

Les dosages comme méthodes de détection reposent sur la recherche de composés stables et plus ou moins spécifiques selon les microorganismes ciblés. De nombreux composés peuvent être recherchés. Ainsi, les mycotoxines (toxines produites par de nombreuses moisissures) et l'ergostérol (composé de la paroi des moisissures) sont deux exemples de marqueurs utilisés pour l'évaluation de la contamination fongique. Le dosage de l'acide muramique (constituant de la paroi des Bactéries) permet de réaliser une mesure de la biomasse. D'autres composés peuvent être recherchés. Nous en détaillerons deux plus particulièrement.

✦ Recherche des endotoxines

Les endotoxines sont des molécules complexes, et plus particulièrement des lipopolysaccharides, contenus dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (Greff-Mirguet, 2002) et dont la partie lipidique est responsable des activités toxiques du lipopolysaccharide. Cette toxine est libérée lors de la lyse de la bactérie ; et si elle se retrouve en forte quantité dans un organisme, elle est responsable de la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation pouvant causer de la fièvre, des atteintes vasculaires... voire même un choc toxique (Géhin & Le Bacle, 2011). De nombreuses méthodes ont été développées afin de mesurer la concentration en endotoxines mais à l'heure actuelle, une méthode prédomine largement : la méthode au lysat d'amœbocytes de limule (LAL), à la fois chromogénique et cinétique. De manière simplifiée, les endotoxines sont capables de catalyser l'activation d'une proenzyme contenue dans le LAL ; cette enzyme, alors activée, va à son tour dégrader un substrat peptidique, relarguant ainsi un composé de couleur jaune mesuré en continu (activité cinétique) grâce à une cellule photoélectrique (activité chromogénique).

✦ L'ATPmétrie

L'adénosine triphosphate (ATP), est une molécule essentielle à tous les organismes vivants puisqu'il s'agit de la principale molécule de transport et de stockage de l'énergie dans les cellules. Elle permet donc de fournir l'énergie nécessaire à toute réaction du métabolisme. Le principe de cette méthode réside sur une réaction enzymatique, basée sur la bioluminescence et faisant intervenir la luciférase. En présence d'ATP (ainsi que d'oxygène et de magnésium), cette enzyme va oxyder la luciférine (son substrat) en oxyluciférine notamment, avec production de lumière alors mesurée avec un luminomètre. Cette quantité de lumière émise lors de la réaction est proportionnelle à la quantité d'ATP qui est elle-même proportionnelle à la quantité d'organismes vivants ; à titre indicatif, il est considéré qu'une bactérie a une teneur moyenne en ATP de 1 femtogramme. Mesurer l'ATP dans un échantillon permet donc d'avoir une estimation de la biomasse totale contenue dans cet échantillon.

1.1.3.2 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de biologie cellulaire permettant l'analyse individuelle, d'un seul ou de plusieurs paramètres, de toutes cellules contenues dans une suspension liquide. Le principe consiste à faire passer à grande vitesse les particules d'un échantillon dans un faisceau laser de manière à pouvoir les compter (analyse quantitative) et les caractériser grâce aux signaux recueillis (analyse qualitative). La lumière absorbée par une particule passant à travers le faisceau laser renseigne sur son diamètre et la lumière renvoyée donne une information sur sa morphologie et sa structure. Moyennant l'ajout de fluorochromes (l'autofluorescence ne se produit que dans de rares cas), il est également possible de trier les cellules selon certaines fonctions cellulaires (couplage du fluorochrome à un anticorps spécifique, à une protéine, à l'ADN...).

1.1.3.3 Méthodes culturales

Il s'agit d'une technique permettant la croissance et le dénombrement des microorganismes viables cultivables, par ensemencement sur des milieux de cultures et incubation à une température donnée durant un temps défini. Ces milieux peuvent être liquides (bouillon), semi-solides mais le plus souvent, il s'agit de géloses solides. Le panel de géloses qui existent est très large, allant du milieu minimum

contenant les seuls éléments indispensables à la croissance de microorganismes n'ayant pas d'exigence particulière, au milieu de culture enrichi pour les germes dits exigeants (gélose au sang frais, gélose Baird Parker...). Il existe également des milieux de culture qualifiés de sélectifs, pour la croissance d'uniquement certains genres de microorganismes (exemple de la gélose Sabouraud qui permet l'isolement sélectif des champignons).

✦ Culture en milieux solides ou semi-solides

Cette technique peut être utilisée avec les trois grandes techniques de prélèvement détaillées précédemment : l'impaction, l'impingement et la filtration. Dans le cas d'un prélèvement par impaction, le milieu gélosé est directement placé sur l'appareil de prélèvement et une fois l'échantillonnage terminé, il est placé en incubateur afin que les microorganismes impactés sur la gélose puissent se développer. Dans le cas d'un prélèvement par impingement, la suspension obtenue, contenant les microorganismes récoltés, est inoculée sur géloses (avec ou sans dilutions préalables) qui seront ensuite mises à incuber. Et pour finir, si la méthode de prélèvement précédant la mise en culture est la filtration, les microorganismes retenus sur la membrane devront préalablement en être décrochés. Plusieurs protocoles d'extraction des microorganismes du média filtrant existent mais le plus souvent, il s'agit de réaliser un vortexage de la membrane dans ce que l'on appelle une solution d'extraction. La suspension récupérée est ainsi prête à être inoculée sur géloses.

Une fois inocuées, les géloses sont mises à incuber à une température convenant au groupe microbien recherché ; ainsi les microorganismes mésophiles sont mis à incuber entre 25 °C et 28 °C, les thermophiles entre 45 °C et 56 °C généralement et les microorganismes totaux aux alentours de 37 °C. Les microorganismes se développant sur la gélose apparaissent comme des colonies de forme et de taille variant en fonction des espèces. En général, le dénombrement de ces colonies est réalisé quotidiennement durant 3 à 5 jours pour permettre le calcul de la concentration en microorganismes, exprimée en Unités Formant Colonies par millilitre de suspension analysée (UFC.mL⁻¹) puis ramenée à une concentration dans l'air (UFC.m⁻³).

✦ Culture en milieux liquides

La technique utilisée dans ce cas-là est basée sur la méthode du nombre le plus probable (NPP) permettant d'évaluer la densité de microorganismes viables dans un échantillon par le biais d'une estimation statistique. Elle consiste à ensemercer quelques réplicats de plusieurs dilutions d'un échantillon donné dans des tubes contenant un bouillon d'enrichissement et voir combien d'entre eux présentent une croissance. Celle-ci peut se caractériser par une modification de la turbidité, un dégagement de gaz... Une table statistique permet alors de déterminer la concentration de l'échantillon. Une telle technique n'est bien évidemment pas applicable aux échantillons prélevés par impaction sur milieux solides ou semi-solides.

1.1.3.4 Méthodes de microscopie

Les méthodes de microscopie sont nombreuses, le comptage pouvant être direct ou s'effectuer après que les cellules aient subi un marquage.

✦ Comptage direct à l'hématimètre

Dans le cas d'un comptage direct, les cellules sont dénombrées au microscope par le biais d'un hématimètre. Il s'agit d'une lame en verre, quadrillée spécifiquement de manière à compter le nombre de cellules en suspension dans un volume connu de solution à analyser. Plusieurs types d'hématimètres existent, en fonction du type de quadrillage et du volume d'échantillon acceptable. La cellule de Malassez et la cellule de Thoma sont peut-être les plus connues et utilisées mais il existe également la cellule de Neubauer, la cellule de Nageotte ou encore celle de Lemaur.

✦ Épifluorescence

Mais il peut s'agir également d'un comptage indirect où les microorganismes sont préalablement marqués par des molécules appelées fluorophores ou fluorochromes. Il s'agit de molécules capables d'émettre de la lumière lorsqu'elles sont excitées à une longueur d'onde donnée. Il s'agit de la méthode de microscopie à fluorescence ou épifluorescence. Il existe de nombreux fluorochromes dépendant de leur fixation dans la cellule (membrane, mitochondrie...) mais le plus utilisé reste à l'heure actuelle le DAPI. Il s'agit d'un marqueur nucléaire, capable de passer à travers la membrane d'un microorganisme et de se fixer à l'ADN de toutes les cellules, mortes ou vivantes. Le DAPI, de par sa configuration, se fixe par des liaisons hydrogènes sur les régions riches en adénine et thymine de l'ADN. Lorsqu'elle est fixée à l'ADN double brin et une fois excitée dans l'ultraviolet, la molécule fluoresce en bleu (Kapuscinski, 1995).

✦ L'hybridation fluorescente *in situ*

À mi-chemin entre une technique de microscopie et une technique de biologie moléculaire, l'hybridation fluorescente *in situ* (technique FISH) consiste à rechercher une séquence de nucléotides avec une sonde d'oligonucléotides qui lui soit complémentaire et qui soit marquée d'un produit fluorescent, ceci afin de la visualiser en microscopie. La séquence recherchée peut-être spécifique d'un groupe de microorganismes, d'un genre ou même d'une espèce donnée. Cette technique nécessite une perméabilisation préalable de la paroi des microorganismes. Ce processus est relativement délicat dans la mesure où il doit être assez fort pour permettre la formation de pores qui laisseront passer les sondes d'oligonucléotides dans la cellule mais pas trop agressif pour ne pas endommager la paroi et détruire toute ou partie du contenu cellulaire (Filion, 2008).

1.1.3.5 La Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction en chaîne par polymérisation, inventée en 1985 par Kary Mullis, est un outil de biologie moléculaire de réplique génique ciblée, *in vitro*. Elle permet la production d'un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN, même à partir d'une très faible quantité de matrice initiale, c'est-à-dire d'acides nucléiques dans un échantillon donné.

✦ Extraction d'ADN

La méthode étant basée sur de l'amplification d'ADN, elle nécessite une étape préalable d'extraction de l'ADN contenu dans les cellules. De très nombreux protocoles existent, pouvant être ou non basés sur des kits commercialisés. Le protocole ne sera pas le même si l'extraction s'effectue sur un échantillon de sol ou sur une culture bactérienne pure par exemple. Même si elles varient en fonction du protocole choisi, l'extraction d'ADN comporte généralement 3 étapes : une lyse des cellules pour libérer l'ADN, une purification pour le débarrasser de tout artéfact et enfin, une précipitation de l'ADN.

La lyse des cellules peut être réalisée de manière chimique grâce à l'action d'enzymes (le lysozyme pour les parois bactériennes, la chitinase pour les parois fongiques) qui vont créer des brèches dans les parois et de détergents (Triton X100, laurylsulfate de sodium...) pour désorganiser les membranes par dissolution des lipides membranaires. Cette lyse peut également être réalisée de manière mécanique (broyage, choc thermique, ultra-sons...) et peut aussi combiner action chimique et action mécanique conjointement. Le but est bien évidemment de détruire la paroi cellulaire de manière à libérer l'ADN qu'elle renferme.

La seconde étape consiste en une élimination des protéines et des autres acides nucléiques (ARN...). La déprotéinisation peut être réalisée par l'ajout d'une enzyme (la protéinase K étant la plus utilisée) en présence de détergent ou par l'action d'un agent dit chaotrope (sels par exemple). L'élimination des ARN se fait le plus souvent grâce à l'enzyme thermostable RNase. Cette étape se fait par passages successifs de l'échantillon sur une colonne de purification qui va avoir pour propriété de retenir l'ADN mais de laisser passer tous les composés éliminés au fur et à mesure (protéines, peptides, ARN...).

L'ADN sera ensuite élué de cette colonne grâce à un tampon spécifique afin de pouvoir réaliser la dernière étape qui consiste à précipiter l'ADN par addition d'un alcool (éthanol ou isopropanol généralement). L'ADN étant insoluble dans ces alcools, il va s'agréger pour donner un culot après centrifugation.

✦ Amplification de l'ADN

La réaction en chaîne par polymérisation est une technique basée sur la répétition de cycles de différentes températures, faisant intervenir plusieurs acteurs moléculaires (polymérase, oligonucléotides...). Cette succession d'étapes est réalisée *in vitro* dans un thermocycleur. Pour un échantillon donné d'ADN, la première étape de l'amplification est sa dénaturation initiale, qui consiste en un chauffage (généralement à 95 °C) permettant la dénaturation et donc la dés hybridation des deux brins complémentaires d'ADN par rupture des liaisons ainsi que l'activation des polymérases (premiers acteurs de la réaction). La seconde étape est celle d'hybridation où des séquences oligonucléiques appelées amorces (amorces sens et antisens) vont pouvoir reconnaître la séquence d'ADN auxquelles elles sont spécifiques et s'y hybrider à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Vient ensuite une étape d'élongation : une fois les amorces fixées sur l'ADN, l'amplification va pouvoir se faire grâce à l'action de la Taq polymérase et à partir des dNTPs libres (désoxyribonucléotides que sont les dATP, dCTP, dGTP et dTTP) du milieu réactionnel. Le brin nouvellement synthétisé est alors appelé amplicon. Et ces fragments d'ADN nouvellement synthétisés peuvent alors être révélés par électrophorèse en gel d'agarose afin de visualiser la taille des amplicons.

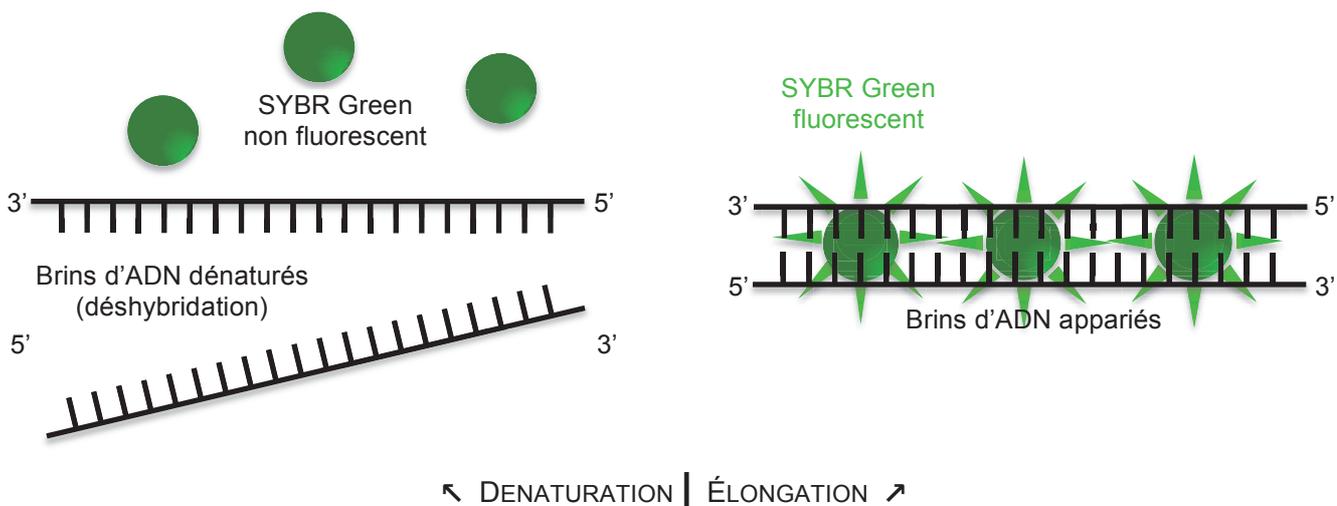
Il faudra attendre 1992 pour que la technique connaisse une très grande avancée, lorsque Russell Higuchi proposa de mesurer la quantité d'amplicons formés à la fin de chaque cycle et donc, en temps réel (sans nécessité de passer par une électrophorèse en gel). À l'heure actuelle, de nombreuses applications de cette technique existent, notamment dans le domaine médical et diagnostique.

✦ La détection en temps réel

Les systèmes de détection de ces amplicons sont de deux types : les sondes non spécifiques (agents intercalants) par opposition aux sondes spécifiques (la liste présentée ci-dessous n'étant pas exhaustive).

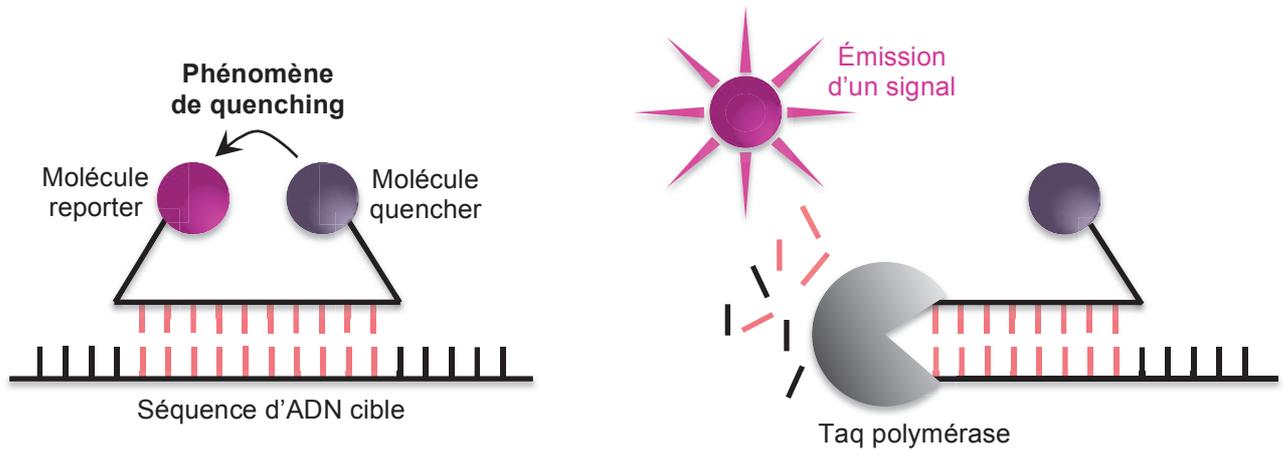
Les agents intercalants sont des sondes se fixant dans la double hélice d'ADN néosynthétisée et fluoresçant uniquement lorsqu'ils sont intercalés et excités à une longueur d'onde donnée (

Figure 6). Ces agents intercalants comme par exemple le SybrGreen™ ne sont pas spécifiques d'une séquence d'ADN donnée, contrairement aux sondes spécifiques que sont les sondes Taqman, Beacon, Scorpions ou FRET.



| Figure 6. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'agents intercalants (ici, le SYBR Green).

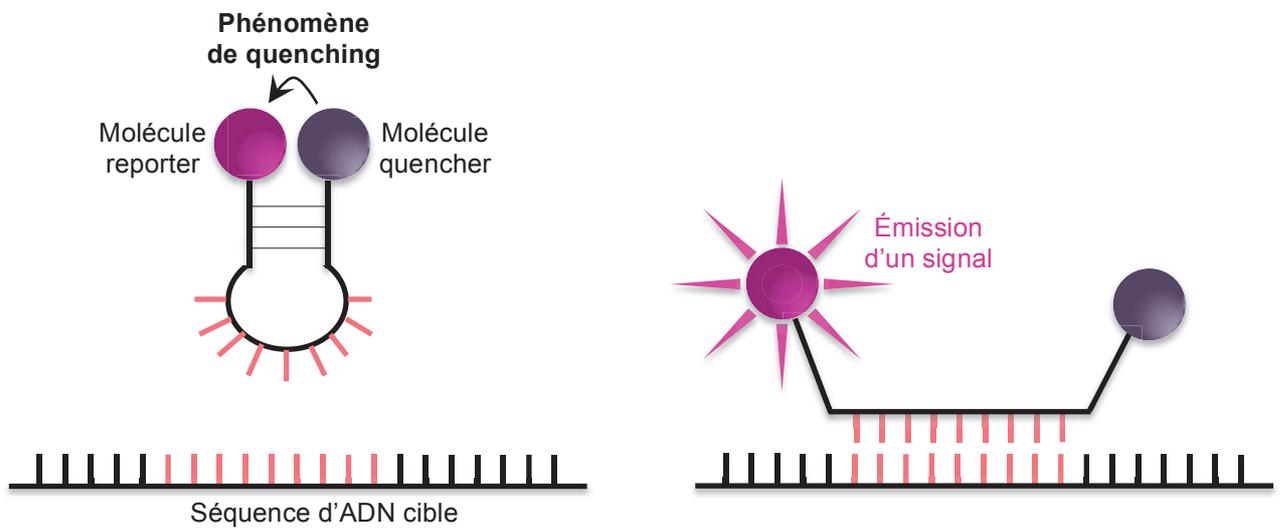
Une sonde d'hydrolyse Taqman est une sonde marquée à une de ses extrémités d'une molécule reporter et à l'autre, d'une molécule quencher. Lorsque le reporter et le quencher sont fixés à la sonde, ils sont assez proches (de par la faible taille de la sonde) pour que le quencher, de par ses propriétés, inhibe toute fluorescence émise par le reporter. La sonde s'apparie à la séquence d'intérêt durant l'étape d'hybridation, sans générer de fluorescence (phénomène de quenching). Cette méthode utilise ensuite la propriété 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase qui va permettre le clivage de la sonde au cours de son activité durant l'étape d'élongation. La molécule reporter ainsi libérée de toute proximité avec la molécule quencher, va alors pouvoir émettre un signal détectable dans sa longueur d'onde et mesuré cycle après cycle (Figure 7).



↖ HYBRIDATION | ÉLONGATION ↗

Figure 7. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'une sonde Taqman.

Une sonde d'hybridation (comme les sondes Beacon ou Scorpion) est également marquée des molécules reporter et quencher. A l'état libre, la conformation de la sonde est telle que les deux molécules sont proches et que le quencher inhibe la fluorescence du reporter. Lorsque la sonde se lie à la séquence d'intérêt, cela entraîne un changement de conformation qui est tel que les deux molécules sont séparées, le reporter pouvant induire une fluorescence (Figure 8).



↖ DENATURATION | HYBRIDATION ↗

Figure 8. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais d'une sonde d'hybridation (ici, une sonde Beacon).

Enfin, le système FRET (Transfert d'Énergie par Résonance Fluorescente) requiert l'action et la fixation de deux sondes par amplicon : la sonde A marquée d'une molécule donneuse 1 et la sonde B marquée d'une molécule receveuse 2. La sonde A, couplée à la molécule donneuse 1, une fois fixée au brin d'ADN amplifié va être excitée par une source lumineuse externe (diode électroluminescente qui émet un rayonnement quand elle est traversée par un courant). Et comme les séquences choisies sont telles que les sondes A et B sont très proches l'une de l'autre, l'énergie véhiculée par la molécule 1 va passer dans la molécule 2 via une interaction dipôle-dipôle (Figure 9). Grâce à ce transfert d'énergie, elle se retrouve à l'état excitée et va alors émettre de la fluorescence mesurable. Ce choix de sondes permet l'émission de signaux lumineux lorsqu'il y a amplification et donc, lorsqu'elles se sont fixées (et non celles qui sont libres en solution).

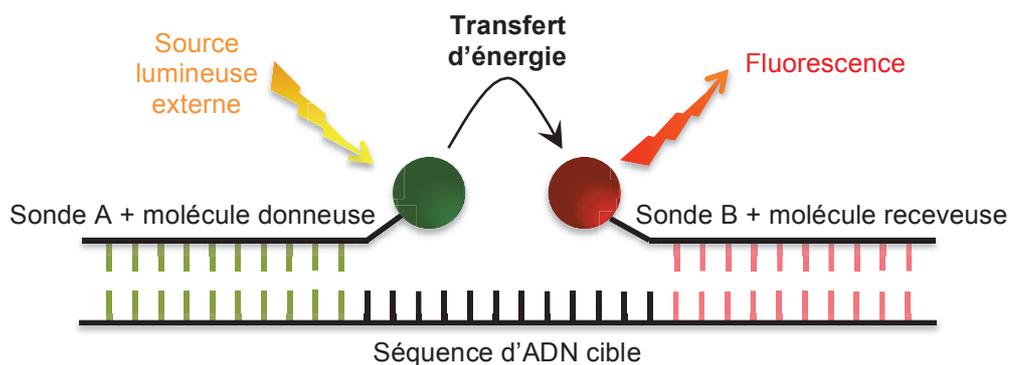


Figure 9. Schéma du processus de détection en temps réel par le biais du système FRET.

De manière générale, quelque soit le type de sondes utilisées, immédiatement après l'étape d'élongation, il y a analyse de l'amplification, grâce au fluorimètre du thermocycleur qui va lire la fluorescence émise par les sondes et présenter les résultats sous forme de courbes (retranscrites sur un ordinateur directement relié au thermocycleur). L'analyse de ces courbes, la caractérisation d'une droite étalon ou encore la détermination d'un cycle seuil sont autant de paramètres qui permettront de fournir la concentration en microorganismes de l'échantillon de départ.

1.1.3.6 Avantages et inconvénients liés aux techniques analytiques

Les techniques analytiques que nous venons de voir présentent toutes de réels avantages pour la quantification des microorganismes présents dans les bioaérosols. Néanmoins, elles ne sont pas sans inconvénient.

Prenons l'exemple de la méthode de dosage de l'ATP. Certes, elle permet une estimation de la biomasse totale d'un échantillon. En aucun cas elle ne permet de différencier l'ATP provenant des bactéries de celui provenant d'autres organismes vivants. Une différenciation de genres ou d'espèces est impossible. Des interférences avec des sources d'ATP non microbiennes ou la présence de métaux ou d'agents chimiques peuvent également être responsables d'échantillons faux positifs ou faux négatifs (Trudil *et al.*, 2000)

Autre exemple, malgré la précision et la puissance de la technique de cytométrie en flux par rapport au nombre très important de cellules pouvant être analysées (Porter *et al.*, 1997), elle n'échappe pas au problème des particules abiotiques. Si ces dernières sont du même ordre de grandeur que les microorganismes, elles peuvent être comptabilisées. L'agrégation des cellules microbiennes (et notamment les spores entre elles) est aussi un problème entraînant une sous-estimation du résultat. De ce fait, la technique n'est pas la plus indiquée pour des échantillons complexes et concentrés tels que ceux de sol, de plates-formes de compostage...

La technique de dénombrement par mise en culture n'est pas non plus sans défaut. L'inconvénient majeur qui lui est associé provient du fait que 10 % seulement (voire moins) des microorganismes présents dans un bioaérosol sont cultivables (Cartwright *et al.*, 2009; Heidelberg *et al.*, 1997). En ne permettant que le dénombrement des entités viables cultivables, cette technique analytique sous-estime grandement la concentration de microorganismes réellement présente dans le bioaérosol. De plus, trouver le milieu et les conditions de culture spécifiques à une espèce donnée ou à un groupe de germes n'est pas chose simple. Cela nécessite de connaître le groupe microbien étudié et ses spécificités de croissance. Un autre inconvénient de la mise en culture lorsqu'on travaille sur des échantillons environnementaux provient de l'effet d'envahissement de la gélose par certaines espèces de microorganismes, rendant tout comptage de colonies impossible (Chang *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998; Taha *et al.*, 2007b). Pour pallier le fait que de nombreuses espèces de champignons (notamment les moisissures) ont la particularité de pousser très rapidement sur géloses nutritives, il est recommandé d'ajouter des inhibiteurs de certains genres microbiens, tels que des antibiotiques. Enfin, cette technique analytique, et c'est d'autant plus vrai lorsque l'échantillonnage est réalisé par impaction sur milieux gélosés, nécessite de connaître l'état de contamination de l'environnement étudié. Au-delà de 300 colonies sur une gélose, il n'est plus possible d'intégrer le résultat du comptage dans le calcul de la concentration en microorganismes (AFNOR, 1996b). Pour le dénombrement réalisé à partir d'échantillonnages par filtration ou par impingement, ce problème se pose moins dans la mesure où des dilutions de l'échantillon sont réalisées ; il est juste nécessaire de bien les cibler ou, à défaut, d'intégrer un plus grand nombre de dilutions dans l'analyse. En revanche, pour le dénombrement réalisé à partir d'un prélèvement par impaction sur une gélose solide, il est impératif de juger l'état d'empoussièrément et de contamination de l'environnement de travail, avant d'effectuer l'échantillonnage.

Les conditions de croissance employées avec la méthode de mise en culture basée sur le nombre le plus probable sont moins stressantes pour les microorganismes du fait que l'ensemencement se fait en milieu liquide (Cartwright *et al.*, 2009). Néanmoins, tout comme la mise en culture sur géloses solides, seuls les microorganismes viables cultivables sont dénombrés, ce qui représente une faible proportion en rapport au nombre total de microorganismes réellement présents dans l'échantillon.

Contrairement à la mise en culture, le comptage en épifluorescence permet de dénombrer toutes entités cellulaires : les microorganismes morts, vivants, cultivables, non cultivables... La technique s'affranchit donc d'une sous-estimation liée à la non-détection d'une large population de microorganismes. C'est le choix du ou des fluorochromes qui conditionne le type cellulaire détecté. Mais tout comme pour le dénombrement par mise en culture, cette technique a des limites lorsqu'il s'agit d'échantillons environnementaux. En plus de se fixer aux cellules, les fluorochromes peuvent également se fixer à des particules abiotiques. Et comme celles-ci sont présentes en grande quantité dans les aérosols issus de plates-formes de compostage, cela entraîne un biais dans l'analyse des résultats (Cartwright *et al.*, 2009). De ce fait, si l'échantillon étudié contient trop de cellules et de particules abiotiques, ce qui est très vite le cas avec les échantillons environnementaux, l'échantillon coloré n'apparaît que comme une vaste masse de couleur au microscope où il est impossible d'individualiser et

donc de dénombrer la moindre cellule. Ces limites associées à la technique peuvent être à l'origine d'erreurs de comptage relativement importantes (Eduard *et al.*, 2001).

Enfin, toutes ces méthodes de dosages, épifluorescence ou mises en cultures ont un inconvénient majeur en commun : ces techniques ne sont pas spécifiques. Elles ne permettent pas une quantification spécifique d'un germe ou d'un groupe de germes bien ciblés. Et si malgré tout c'est le cas (comme par exemple avec la recherche d'*Aspergillus fumigatus* par dénombrement sur milieux gélosés), soit les analyses ne sont fondées que sur une reconnaissance visuelle des colonies (parfois approximative), soit l'analyse nécessite des identifications par séquençage, procédé relativement coûteux.

La technique de PCR temps réel connaît également quelques inconvénients. Il s'agit d'une méthode qui a un coût et bon nombre d'inhibiteurs de la PCR sont recensés de par son extrême sensibilité (Al-Soud *et al.*, 2000; Lantz *et al.*, 1997; Watson & Blackwell, 2000). En revanche, elle semblerait pallier bon nombre d'inconvénients. Méthode extrêmement sensible, elle est également rapide à réaliser (contrairement à la culture), relativement facile d'utilisation (contrairement à l'épifluorescence) et offre le réel avantage d'être spécifique.

1.2 LES ACTINOMYCÈTES

1.2.1 QUELQUES MOTS DE PHYLOGÉNIE

La taxonomie microbienne est une branche complexe de la biologie. Il est acquis que le vivant se divise en trois domaines principaux et bien distincts : celui des *Archae*, celui des *Bacteria* et celui des *Eucarya*. Cette division du vivant s'appuie sur les travaux de comparaison de séquences ARNr de Carl Woese (Woese, 1987). Parmi le groupe des *Bacteria*, il existe un groupe de microorganismes appelé actinomycètes, qui sont les bactéries aérobies, Gram positif filamenteuses (formant des hyphes ramifiés) à haut taux en G+C. Notion très importante, elles ont la propriété de former des spores asexuées (Prescott *et al.*, 2007). Néanmoins, d'un point de vue phylogénétique, le taxon des actinomycètes n'est pas monophylétique, il ne regroupe pas qu'un seul embranchement bien défini : il comprend le phylum complet des *Actinobacteria* qui sont les bactéries Gram positif à haut taux en G+C, mais aussi quelques genres supplémentaires appartenant aux bactéries Gram positif pauvres en G+C. Cela a d'ailleurs toujours été sujet à débat (Stackebrandt & Woese, 1981). L'exemple représentatif de cette difficulté de classification du vivant est le changement opéré dans le Bergey's manual of systematic bacteriology, entre la première et la seconde édition. En effet, initialement considéré comme un groupe à part entière (Bergey, 1989), les représentants des actinomycètes se retrouvent à présent dispersés au sein des *Bacteria*, avec les *Actinobacteria* (bactéries Gram positif riches en G+C) et des genres appartenant aux bactéries Gram positif pauvres en G+C (Bergey, 2009; Bergey, 2011; Prescott *et al.*, 2007). Citons par exemple le genre *Thermoactinomyces* qui, même s'il appartient à l'embranchement des Firmicutes et par conséquent possède un pourcentage en G+C plus faible que les *Actinobacteria*, est néanmoins considéré comme un actinomycète. Tout du moins, nous pouvons nous en apercevoir dans certaines études précédemment menées où il est acquis pour les auteurs que ce genre fait partie des actinomycètes (Athalye *et al.*, 1981; Gazenko *et al.*, 1998; Lacey, 1997; Tendler & Burkholder, 1961; Treuhaft & Arden Jones, 1982). La phylogénie exacte des actinomycètes n'est pas encore correctement définie et sera sujette à changements dans les années à venir, surtout que des critères comme la faculté à former des hyphes ramifiés et des spores pour une bactérie n'est pas un critère d'appartenance aux actinomycètes, l'inverse étant vrai également (Goodfellow & Williams, 1983).

Le point avéré reste cependant que les actinomycètes sont des bactéries Gram positif, malgré les points communs qu'elles peuvent avoir avec les Champignons. Leur taxonomie en apportant la preuve, les actinomycètes forment un groupe très diversifié (Prescott *et al.*, 2003), de par de nombreux critères morphologiques (couleur et caractéristiques des mycéliums aérien et végétatif, morphologie des spores...), génétiques (pourcentage en G+C, séquences de l'ARNr 16S...) mais aussi biochimiques (utilisation des sucres, composition de la paroi...). En revanche, ils partagent quand même des points communs, le premier venant de cette formation d'hyphes ramifiées à l'origine de spores asexuées.

1.2.2 CARACTÈRES BIOLOGIQUES, ÉCOLOGIE ET PATHOGÉNICITÉ

L'intérêt d'un tel groupe pour notre étude est double, de par l'extrême développement de ces bactéries à un très large panel de niches écologiques et de par la pathogénicité de certaines espèces et donc, le risque qu'elles représentent. En effet, même si la majorité des actinomycètes sont saprophytes non pathogènes, il existe néanmoins des espèces pathogènes pour l'Homme, les animaux et les plantes (McNeil & Brown, 1994).

Les actinomycètes sont un groupe particulier de bactéries, morphologiquement varié, ayant su coloniser un nombre incroyable de niches écologiques toutes aussi variées les unes que les autres, grâce à leur mode de vie, de développement et de reproduction (Goodfellow & Williams, 1983). Ainsi, des espèces ont été trouvées dans le sol, les environnements aquatiques (eaux douces, environnements marins...), l'air, le compost et autres substrats semblables (fourrage, paille ou foin humides et mal conservés...) ainsi que les installations qui leurs sont associées... La majorité de ces espèces se trouvent dans le sol et ce, en très grande quantité (jusqu'à plus de 10^6 UFC/g de sol d'après Goodfellow & Williams en 1983), où elles jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matière organique (surtout les streptomycètes) et plus spécifiquement de composés assez complexes qui sont dans la litière comme la lignine, la cellulose, la lignocellulose, la kératine, la chitine ou encore la pectine. C'est pourquoi ces bactéries sont extrêmement importantes dans le processus de compostage. Essentiellement contrôlées par les conditions nutritives du milieu (présence ou non de nutriments), ces espèces peuvent être soumises à divers stress de par le biais des facteurs environnementaux que sont la température, le pH, les concentrations en O_2 et CO_2 ainsi que d'autres paramètres un peu moins étudiés comme la présence de certains métaux.

En réponse à la pression de sélection, les actinomycètes ont su s'adapter et mettre en place des stratégies reproductives efficaces et variées ; ainsi, en présence de conditions favorables (tout du moins en l'absence de facteurs préjudiciables), leur développement passe par la croissance d'hyphes ramifiés produisant des spores asexuées, de différents types en fonction des genres (Kalakoutskii & Agre, 1976). Ces spores peuvent être classées en trois grandes catégories, elles-mêmes subdivisées :

- les spores endogènes ou endospores qui sont des spores uniques formées sur les mycéliums végétatif et aérien
- les spores d'origine hyphale qui peuvent être soit des aleuriospores (bourgeonnement d'un hyphe végétatif ou aérien) soit des arthrospores (septation de l'hyphe aérien pour donner une chaîne de spores) ou encore des spores formées par fragmentation du mycélium entier en éléments coccoïdes ou bacillaires
- et enfin, les spores, le plus souvent motiles, contenues dans une vésicule ou sporange qui se forment en surface du substrat donc, à l'extrémité de certains hyphes végétatifs ; le nombre de spores contenues dans un seul sporangiophore varie fortement en fonction des genres.

La formation de ces spores est donc très diversifiée (Cross, 1970; Locci, 2006) tout comme leur morphologie (forme, surface et type de flagelle) et ce, d'une espèce à une autre (sachant toutefois que certaines espèces peuvent produire deux types de spores). De plus, la résistance des spores à l'extérieur (pH, température, dessiccation...), leur métabolisme (métabolisme ralenti ou vraie dormance) ainsi que leur germination, sont trois paramètres qui varient également en fonction des genres (Ensign, 1978; Kalakoutskii & Agre, 1976).

1.2.3 QUELQUES EXEMPLES DE FAMILLES D'ACTINOMYCÈTES

Les actinomycètes représentent un taxon ubiquiste, avec un mode de reproduction particulier et dont certains représentants s'avèrent être des espèces pathogènes pour l'Homme. Dès lors, de telles espèces deviennent des cibles d'étude particulièrement intéressantes et c'est notamment le cas des trois familles qui suivent et sur lesquelles nous avons mis l'accent.

1.2.3.1 La famille des *Thermoactinomycetaceae* et *Thermoactinomyces vulgaris*

Premièrement étudié à la fin du 19^{ème} siècle, notamment par Tsilinsky en 1899, le genre des *Thermoactinomyces* comprenant notamment l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*, est un groupe un peu à part (phylogénétiquement parlant) dans le sens où il n'appartient pas aux Actinobactéries. Il s'agit, en effet, de Firmicutes de la classe des *Bacilli* qui possède donc un contenu en G+C plus faible (52 à 55 % selon (Prescott *et al.*, 2003). Thermophiles, ils se développent à des températures comprises entre 45 et 60 °C et leur cycle de développement aboutit à la formation de vraies endospores bactériennes aussi bien vis-à-vis de la formation, de la chimie, de la physiologie...). Les spores se développent à la fois sur le mycélium végétatif et sur le mycélium aérien et les espèces donnent lieu à des spores arrondies, uniques et thermorésistantes (Cross, 1970; Prescott *et al.*, 2003). La paroi de ces spores est formée à partir d'une nouvelle couche de paroi, produite au sein de l'hyphe parent mais la paroi de ce dernier ne contribue pas à la formation de la paroi de la spore. Un septum se forme alors pour séparer la double membrane ainsi que le matériel cytoplasmique et nucléaire. De plus, il a été mis en évidence depuis longtemps que les endospores de *Thermoactinomyces* avaient une extrême longévité (Unsworth *et al.*, 1977). Le diamètre aérodynamique de ces spores peut varier selon les études de 0,5 à 1,5 µm (Reponen *et al.*, 1998). D'après cette même étude, Reponen a mis en évidence que la moyenne était de 0,57 µm avec une longueur moyenne de 0,79 µm pour une largeur moyenne de 0,66 µm.

Il est aussi à noter que, du fait de leur habitat (foin humide, silos de stockages, compost...) qui sont des biotopes à températures élevées (Lacey, 1997), les *Thermoactinomyces* sont des agents impliqués dans de nombreuses pathologies comme la maladie du poumon de fermier, la maladie des champignonnistes, la bagasosse, la maladie du poumon du compost domestique ou encore des affections en rapport avec des systèmes de climatisation ou d'humidification contaminés (Dalphin & Caillaud, 1999). Et *Thermoactinomyces vulgaris* fait partie d'un des trois modèles d'actinomycètes du fait de cette longévité des endospores et de cette pathogénicité de l'espèce.

1.2.3.2 La famille des *Nocardiopsaceae* et *Thermobifida fusca*

La famille des *Nocardiopsaceae* a été créée par Rainey (Rainey *et al.*, 1996) même si certaines espèces avaient déjà fait l'objet d'études antérieures à 1996 (McCarthy & Cross, 1984a; Meyer, 1976). L'espèce *Thermobifida fusca*, anciennement connue sous le nom de *Thermomonospora fusca*, a été

décrite bien plus tôt, en 1957 puis en 1984 (Henssen, 1957; McCarthy & Cross, 1984a). C'est d'ailleurs en 1984 que sa dénomination est définitivement validée (McCarthy & Cross, 1984b) et en 1998 que des travaux permettent de l'intégrer aux *Nocardiopsaceae* (Zhang *et al.*, 1998).

Productrice de nombreuses enzymes extracellulaires thermostables, *Thermobifida fusca* est une espèce extrêmement cellulolytique et hémicellulolytique (Crawford & Gonda, 1977). De plus, sa température optimale de croissance est généralement comprise entre 50 et 55 °C (Kroppenstedt & Evtushenko, 2006; McCarthy *et al.*, 1985). Par conséquent, elle est tout naturellement retrouvée dans les environnements comprenant de la matière organique en décomposition tels que le compost, le foin stocké... (Kroppenstedt & Evtushenko, 2006). Il s'agit même d'une espèce prédominante dans le processus de compostage (Singh *et al.*, 1990). Or, la croissance de cet actinomycète entraîne la formation de spores d'origine hyphale, ce développement de type thalique concernant la majorité des genres d'actinomycètes. *Thermobifida fusca* produit des aleuriospores (Crawford & Gonda, 1977; Locci, 2006). Ces spores se forment en amas, par bourgeonnement d'un hyphe végétatif à l'apex ou sur le côté de celui-ci, formant alors ce que l'on appelle un sporophore. Cette formation de spores individualisés (et non en chaîne) se fait généralement sur le mycélium aérien, beaucoup plus rarement sur les deux mycéliums à la fois (végétatif et aérien). Leur libération est dite passive, soit par lyse de l'hyphe qui les supporte, soit par rupture au niveau de la jonction de la paroi de la spore (Cross, 1970). Et ces spores sont reconnues comme impliquées dans des alvéolites allergiques et notamment l'affection appelée maladie des champignonnistes (Dalphin & Caillaud, 1999; Singh *et al.*, 1990; Van den Bogart *et al.*, 1993).

1.2.3.3 La famille des *Streptomycetaceae* et *Streptomyces californicus*

La famille des *Streptomycetaceae* a été créée en 1943 par Waksman et Henrici, même si par la suite, elle a été réarrangée (Stackebrandt *et al.*, 1997; Wellington *et al.*, 1992; Witt & Stackebrandt, 1990). L'espèce *Streptomyces albus*, elle, a été découverte bien plus tôt et depuis, a subi de nombreuses modifications (Pridham & Lyons, 1961). Les *Streptomycetaceae* se différencient des autres actinomycètes tout d'abord par la formation d'un vrai mycélium (contrairement à d'autres taxons où il est rudimentaire voire absent) et ensuite par le fait que le mycélium végétatif n'est pas à l'origine de la formation de spores (Waksman & Henrici, 1943). Les membres de cette famille ont un mycélium ramifié relativement fin et la formation des spores se fait sur le mycélium aérien. Le genre le plus important de cette famille forme les *Streptomyces*, dont la particularité provient de leur contenu en G+C puisqu'avec un pourcentage moyen de près de 73 % (variant de 69 à 78 % selon les espèces), ce genre possède le plus haut taux du vivant (Prescott *et al.*, 2003).

Le cycle de développement de *Streptomyces* sp. passe par 4 grandes étapes que sont la germination des spores, le développement du mycélium végétatif puis du mycélium aérien et enfin la sporulation (Figure 10). Une colonie jeune va donc être constituée d'un réseau de mycélium relativement uniforme et essentiellement végétatif alors que la colonie mature rassemble les hyphes végétatifs pour la plupart lysés, les hyphes aériens n'ayant pas encore sporulés et les chaînes de spores. En effet, si l'on part des spores libres, il y a germination après une dizaine d'heures puis création de la structure filamenteuse (réplication de l'ADN sans division cellulaire) correspondant au stade de croissance végétative. À partir d'un jour et demi, c'est le mycélium aérien qui commence à se développer jusqu'à ce que chaque hyphe aérien (portant également le nom de sporophore) se septe sur un seul plan et à intervalles réguliers pour donner une chaîne de 5 à plus de 50 spores, non mobiles, mais de morphologie variée (Cross, 1970; Locci, 2006; Prescott *et al.*, 2003). Ces spores sont des conidies ou conidiospores

(car produites en extrémité d'un hyphes) et sont appelées arthrospores. Il peut s'écouler entre 4 et 10 jours pour que le cycle entier se soit réalisé.

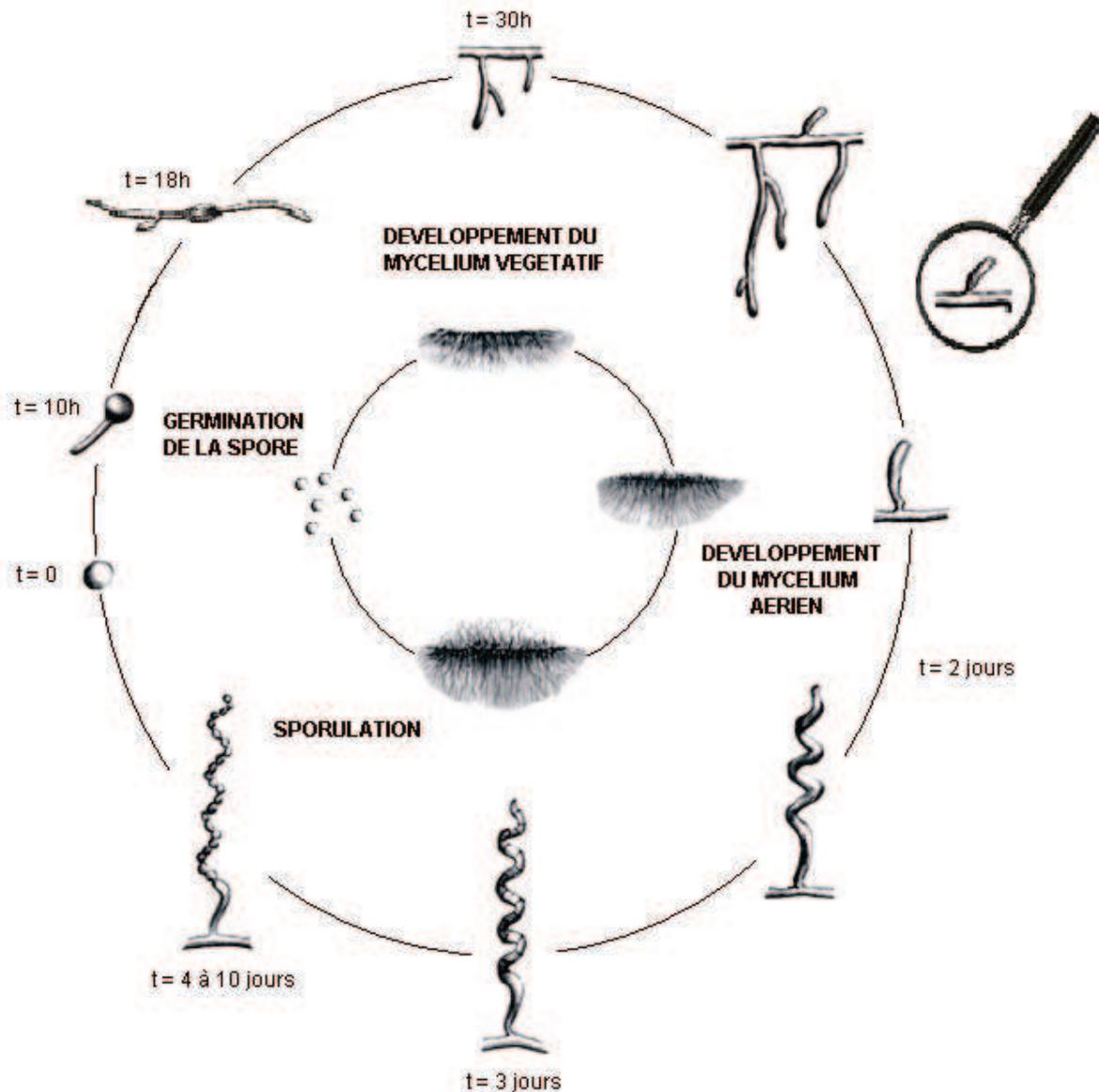


Figure 10. Schématisation du cycle de développement de *Streptomyces* sp. [cycle basé sur les schémas de Markus Hempel et les travaux de Flårdh *et al.* (Flårdh *et al.*, 1999; Flårdh & Buttner, 2009)].

Ces actinomycètes regroupent un très grand nombre d'espèces (Pridham *et al.*, 1958) et se trouvent essentiellement dans le sol où ils peuvent constituer jusqu'à 20% de la flore microbienne de ce biotope ; de plus, la distinction des espèces entre elles passent par plusieurs caractéristiques morphologiques (des mycéliums aérien et végétatif et des spores) et biochimiques. Ces bactéries possèdent également un métabolisme assez complexe, puisque par la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, elles sont capables de métaboliser de nombreux sucres, acides aminés, alcools et composés aromatiques. Ils produisent aussi une grande variété de composés de grands intérêts dans l'industrie pharmaceutique (plus de la moitié des antibiotiques connus sont produits par les *Streptomyces*) mais aussi l'agriculture.

Des recherches sur leur génome ont mis en évidence de très nombreux facteurs de transcription à l'origine de réponses spécifiques vis-à-vis de leur environnement.

Néanmoins, même si les *Streptomyces* sont considérés comme saprophytes non pathogènes, il n'en reste pas moins que certaines espèces se sont avérées être pathogènes de plantes, d'animaux et de l'Homme (McNeil & Brown, 1994; Prescott *et al.*, 2003). Et c'est notamment le cas de l'espèce *Streptomyces albus*, qui, au fil des années et des études, est passée d'une espèce non pathogène à une espèce responsable de plusieurs maladies (Lacey & Dutkiewicz, 1994; McNeil & Brown, 1994) ; en effet, tout d'abord, cette espèce a été mise en évidence sur un cas avéré de pneumopathie d'hypersensibilité (Kagen *et al.*, 1981; Lacey & Dutkiewicz, 1994) mais aussi d'actinomycétomes (Avram, 1970; Martin *et al.*, 2004). De plus, il s'avère que les spores de *Streptomyces albus* sont des contaminants très importants de l'air, les spores étant relarguées à partir de différents substrats comme le foin (Athalye *et al.*, 1981), la paille (Athalye *et al.*, 1981) où leur fréquence d'isolement atteint les 67 % (Lacey, 1997) mais aussi et surtout le compost. Lacey, en 1997, a démontré que la concentration de cette espèce passait de $0,78 \times 10^4$ à $22,4 \times 10^4$ unités formant colonies par mètre cube d'air, représentant par ailleurs une des espèces majoritairement présente. Des publications ont montré que ces spores sont de forme légèrement ellipsoïde et mesurent entre 0,7 et 1,0 μm de long pour 0,7 de large (Madelin & Johnson, 1992) ou avec plus de précision, $0,68 \pm 0,13 \mu\text{m}$ de long pour $0,84 \pm 0,17 \mu\text{m}$ de large (Reponen *et al.*, 1998).

Il n'en reste pas moins que, malgré ces différences, le problème majeur commun à tous les genres d'actinomycètes vient du fait que beaucoup se retrouvent aussi dans l'air et l'environnement toujours à l'état de spores, capables d'être disséminées à grande échelle et en grande quantité. C'est le cas des environnements tels que la paille, le foin et le fourrage, mal conservés et donc constamment humides (Corbaz *et al.*, 1963; Gregory & Lacey, 1963; Lacey & Dutkiewicz, 1976), lorsque ceux-ci sont remués ou travaillés. Et c'est surtout vrai dans les environnements de compost où les spores peuvent être relarguées en grande quantité (Lacey, 1997).

1.3 LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES DÉCHETS PAR COMPOSTAGE

1.3.1 LES DÉCHETS EN FRANCE

La France, c'est 345 millions de tonnes de déchets en 2008 dont 30 millions produits par les ménages. Trente millions qui équivalent à pas moins de 472 kg par habitant (données ADEME). Avec de tels chiffres, la notion de gestion des déchets est fondamentale. Plusieurs moyens peuvent alors être employés pour le traitement de ces déchets : l'enfouissement (dépôt en décharge), le recyclage, l'incinération ou encore le traitement biologique (compostage ou méthanisation). Et qui dit traitement biologique dit exploitation des activités de nombreux microorganismes, filière qui nous intéresse tout particulièrement.

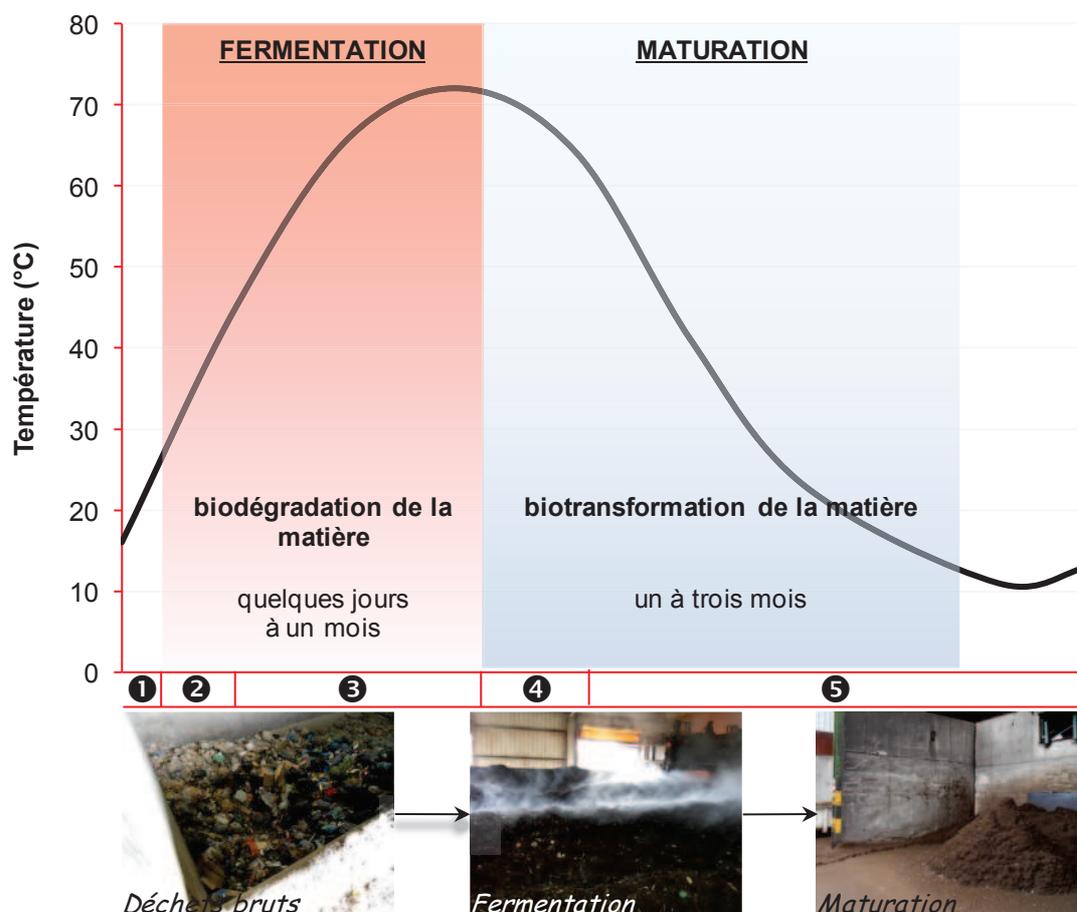
La France, c'est donc 518 unités de compostage en fonctionnement à la même année (données ADEME), de différentes capacités de traitement (de 1 000 à 100 000 tonnes de déchets traités par an selon l'unité). Les principaux déchets concernés par le compostage font partie de deux grandes catégories (Bayard & Gourdon, 2010) :

- les déchets agricoles (notamment d'origine animale avec le lisier et le fumier) et agroalimentaires
- et les déchets ménagers et assimilés, cette catégorie rassemblant les ordures ménagères ainsi que les biodéchets ou déchets fermentescibles que sont les déchets verts (feuilles, tonte de gazon...) et les

résidus d'assainissement (boues de station d'épuration, boues industrielles...) mais aussi les refus de traitement et dans une moindre mesure les encombrants.

1.3.2 PRINCIPE DU COMPOSTAGE

Le compostage, activité en plein essor, est un traitement biologique des déchets, entraînant une conversion des matières organiques en compost, produit stabilisé, riche en composés humiques et donc, valorisable. En tant que procédé biologique, le compostage repose sur l'utilisation de nombreux microorganismes très diversifiés pour dégrader la matière et en retirer l'énergie nécessaire à leur métabolisme et ce, en conditions contrôlées. Ce procédé comporte deux étapes biologiques majoritaires, la fermentation et la maturation, auxquelles il convient d'ajouter des étapes de pré- et de post-traitement.



- ① respiration endogène de cellules vivantes contenues dans les déchets
- ② respiration des microorganismes mésophiles aérobies > ↗ T°C (40-45 °C)
- ③ consommation des composés les plus dégradables (sucre, amidon...) > ↗ T°C (60-70 °C) > mésophiles remplacés par thermophiles
- ④ respiration > ↘ O₂ > développement des germes anaérobies > ↘ T°C > ↘ matière facilement utilisable > disparition des thermophiles > ↘ T°C
- ⑤ apparition d'espèces mésophiles, dont champignons > biosynthèse de composés humiques

Figure 11. Schématisation de la variation de température au cours des deux procédés biologiques du compostage [cycle basé sur les travaux de Mustin (Mustin, 1999) ; photos © Laetitia Betelli / INRS].

La première de ces deux étapes, la fermentation, est une étape de dégradation aérobie de la matière organique dont le but est double : stabiliser le déchet et réduire sa masse. Les microorganismes aérobies vont alors oxyder la partie la plus facilement biodégradable du déchet en consommant de l'oxygène et en libérant de la chaleur notamment. La fermentation se déroule donc à température élevée, entre 40 et 70 °C (Figure 11) et peut durer de quelques semaines à plusieurs mois selon la nature du déchet mais aussi selon les installations et les conditions qui en découlent. Cette étape conduit donc à un compost frais que la seconde étape de maturation va transformer en un compost mûr, riche en humus et sans pathogène. Cette étape se déroule à températures plus basses que l'étape de fermentation, à savoir entre 35 et 45 °C (Figure 11), ceci pour une biosynthèse des composés humiques par les champignons. Les thermophiles disparaissent progressivement pour laisser place à des espèces mésophiles. La température baisse au fur et à mesure pour se stabiliser finalement à température ambiante sachant que cette étape s'étend généralement de 1 à 3 mois.

1.3.3 FONCTIONNEMENT D'UNE PLATE-FORME DE COMPOSTAGE

1.3.3.1 Grandes étapes

De manière générale, les déchets sont réceptionnés sur la plate-forme où ils peuvent subir d'éventuels prétraitements. Il peut s'agir de broyage pour les déchets verts, de mélange avec un agent structurant si le déchet est trop humide, d'un premier criblage pour éliminer les refus les plus grossiers, d'un déferrailage magnétique afin de récupérer les métaux en vue d'une autre valorisation...

Une fois les prétraitements effectués, la fraction est alors mise à fermenter. Cette étape de dégradation aérobie de la matière organique, sous l'action de bactéries, suit 3 phases :

- une montée de la température à 40-45 °C sous l'effet de la respiration des bactéries mésophiles aérobies ; ce sont alors les composés les plus dégradables (comme les sucres) qui seront dégradés en premier.
- une phase intermédiaire, plus ou moins décrite dans la littérature, qui présente une très légère augmentation de la température suite à une courte période de latence.
- l'activité de respiration augmentant progressivement, la température augmente également jusqu'à 60-70 °C ce qui conduit à l'activité des microorganismes thermophiles et thermo-tolérants à la place des mésophiles ; l'oxygène du milieu s'épuise ce qui permet aux germes anaérobies de se développer et à la température du milieu de baisser puisque le métabolisme de ces microorganismes est moins producteur de chaleur ; ces conditions entraînent également la libération de composés volatils nauséabonds comme le méthane et c'est pourquoi il est nécessaire de revenir à des conditions aérobies.

Cette étape peut être réalisée dans un Bio-Réacteur Stabilisateur (BRS) qui nécessite généralement un tri en amont afin de limiter les refus. Il s'agit d'un cylindre long de 40 à 50 m et de 4 à 5 m de diamètre, en constante rotation. Et grâce à l'action des microorganismes, au contrôle constant de paramètres (ventilation et humidification) ainsi qu'à un brassage régulier (rotation permanente), les déchets organiques vont y subir une dégradation accélérée durant quelques jours par fermentation aérobie à température élevée. La fermentation en BRS n'est pas systématique. Elle peut également avoir lieu sous bâtiment ou en casiers équipés au sol et en toiture de systèmes d'aspiration ou d'insufflation de l'air et dont les retournements peuvent être effectués par des ponts mobiles montés de vis inclinées. La fermentation peut aussi s'effectuer en andains à l'air libre (avec ou sans toiture), ce qui nécessite un temps de traitement beaucoup plus long que les deux systèmes précédents (généralement de 3 à 6 mois selon le produit final désiré et la fréquence des retournements). Ces andains sont souvent équipés de

systèmes au sol (insufflation/aspiration d'air) et les retournements se font par déplacement de la matière d'un andain à un autre.

Des traitements, de criblage notamment, peuvent être mis en place entre les étapes de fermentation et de maturation voire en fin de maturation. Il s'agit de criblages via des cribleuses mobiles ou fixes (trommels, tables de tri balistique...) et de déferrailages grâce à des tapis aimantés dont le seul but est de séparer les éléments en fonction de leur nature et de leur taille. Les déchets plastiques, les déchets ferreux et les déchets lourds et inertes (porcelaine, verre, cailloux, piles, bouchons...), non organiques donc non compostables, sont éliminés de cette chaîne de traitement pour être redirigés vers d'autres centres appropriés.

L'étape de maturation est une stabilisation du produit fermenté visant à modifier les propriétés de la matière organique afin qu'elle ait les caractéristiques de la matière humique et qu'elle soit dépourvue de pathogènes. Cette étape se déroule à températures plus basses que l'étape de fermentation, entre 35 et 45 °C, ceci pour une biosynthèse des composés humiques par les champignons. Les thermophiles disparaissent progressivement pour laisser place à des espèces mésophiles. La température baisse au fur et à mesure pour se stabiliser finalement à température ambiante. Un compost est considéré comme mûr lorsqu'il est stabilisé (il ne s'échauffe pas s'il subit des retournements et il ne repart pas dans un cycle d'anaérobiose une fois stocké), lorsqu'il a atteint la même biodégradabilité que le sol (il n'immobilisera pas d'azote une fois incorporé au sol) et lorsqu'il n'est plus phytotoxique (il ne présente aucun effet inhibiteur pour les plantes). Le temps nécessaire pour que le compost présente ces caractéristiques est variable.

Le processus de compostage permet donc de passer de la matière organique issue des déchets et résidus à un compost stable, sans pathogènes (hygiénisé), pouvant être répandu sur le sol afin d'en augmenter la qualité (Figure 12).

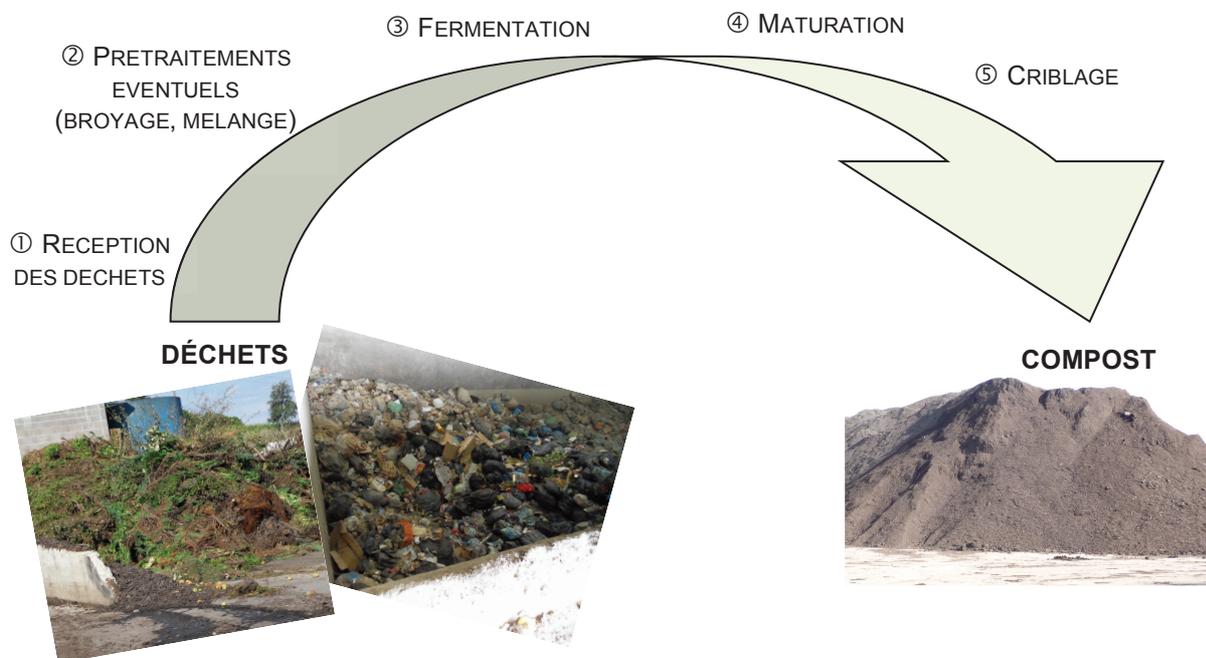


Figure 12. Schématisation des grandes étapes impliquées dans le processus de compostage [© Laetitia Betelli / INRS].

1.3.3.2 Paramètres importants

De nombreux paramètres peuvent venir influencer sur les différentes étapes du processus. Certains, non modifiables, permettent uniquement d'avoir une vue sur l'évolution du déchet là où d'autres, ajustables, permettent de contrôler le processus. Parmi les premiers, on retrouve par exemple le cas du pH, l'activité des microorganismes s'effectuant à des pH compris entre 6 et 7,5 (autrement dit à la neutralité). Il y a également la biodégradabilité du déchet directement lié à la granulométrie de la matière. Un autre paramètre permettant d'apprécier l'évolution du processus est le rapport C/N/P (carbone/azote/phosphate) synonyme de « valeur nutritive » du déchet. Parmi les paramètres modifiables, nous pouvons retrouver la teneur en oxygène (le déchet devant être aéré), la température (reflétant le type de germes en présence) et la teneur en eau teneur (généralement comprise entre 60 et 80 % de la masse brute de la matrice). Entièrement dépendants les uns des autres, leur ajustement permet de contrôler le processus de compostage.

1.4 OBJECTIFS ET ENJEUX DE LA THÈSE

1.4.1 L'AÉROBIOCONTAMINATION GÉNÉRALE EN PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE

Bon nombre d'études existent sur l'aérobiocontamination générale en plates-formes de compostage, comme en témoigne le Tableau 3. Les références bibliographiques qui y sont présentées recensent des études dans le monde entier avec des installations très variées, pouvant traiter tous types de déchets (déchets ménagers, déchets verts, boues de stations d'épuration...). Les concentrations relevées, le plus souvent par le biais de l'analyse de mise en culture, varient grandement d'une étude à l'autre et même au sein d'une étude (en fonction du lieu d'échantillonnage, de l'échantillonneur utilisé...) et les concentrations en microorganismes peuvent être relativement élevées, avec jusqu'à plus de 10^9 UFC.m⁻³ (Danneberg *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2008; Schlosser *et al.*, 2009). L'étude bibliographique démontre très clairement que les bioaérosols posent un véritable problème de santé au travail, d'autant plus qu'il s'agit d'un fait avéré pour lequel il n'existe pas de réglementation.

Tableau 3. Récapitulatif d'études traitant de l'aérobiocontamination générale en plates-formes de compostage (pour le type de déchets compostés, DMR, BD, DV et B signifient respectivement déchets ménagers résiduels, biodéchets, déchets verts et boues ; LQ est l'abréviation pour limite de quantification).

Référence de l'étude	Nombre de sites - (localisation) - types de déchets	Stratégie de prélèvement / fraction ciblée	Méthode de prélèvement (milieu ou support de collecte)	Volume d'air prélevé (L)	Conditions d'analyse (unités de mesure)	Paramètre mesuré	Concentrations (* indique une moyenne)
Duquenne et al., 2012	1 (France) DV, BD	ambiance / inhalable	cassettes porte-filtre (membrane en fibres de verre pour les endotoxines et en polycarbonate pour les autres paramètres)	de 172 à 326 de 60 à 720	dosage LAL (UE.m ⁻³) épi-fluorescence - DAPI (particules.m ⁻³) culture sur TSA + cycloheximide, 25 °C, 5 J (UFC.m ⁻³) culture sur TSA, 56 °C, 3 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA, 25 °C, 5 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA, 47 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	endotoxines bactéries totales bactéries mésophiles bactéries thermophiles moisissures mésophiles moisissures thermophiles	de 5,0x10 ² à 5,4x10 ³ de 7,8x10 ⁶ à 1,1x10 ⁷ de 3,0x10 ⁴ à 7,5x10 ⁵ de 5,5x10 ⁴ à 6,2x10 ⁵ de 2,0x10 ³ à 1,0x10 ⁵ de 3,5x10 ² à 3,5x10 ⁵
Schlosser et al., 2012	4 (France ?) DV, B	ambiance / inhalable	CJP-10 M (coupelle rotative contenant de l'eau apyrogène et du Tween 20)	de 250 à 370	dosage LAL (EU.m ⁻³) culture sur TSA, 22 °C, 3 J (UFC.m ⁻³) culture sur Rose-Bengal + chloramphénicol, 22 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	endotoxines bactéries mésophiles moisissures mésophiles	de < 13,0 à 3,3x10 ⁵ de 7,5x10 ² à 9,0x10 ⁷ de < 33,0 à 5,7x10 ⁵
Sykes et al., 2011	4 (Royaume-Uni) BD, DV	individuel (I) et ambiance (A) / inhalable	échantillonneur IOM (membrane en fibres de verre)	480	pesée (mg.m ⁻³) dosage LAL (UE.m ⁻³) dosage LAL (ng.m ⁻³)	poussières inhalables endotoxines (1,3)-β-D-glucanes	de 0,07 à 17,8 (I) et de 0,06 à 6,7 (A) de 0,75 à 2,2x10 ⁴ (I) et de 0,79 à 4,7x10 ² (A) de < 0,01 à 2,7x10 ² (I) et de < 0,01 à 14,8 (A)
Liu et al., 2011	2 (Angleterre) DV	ambiance / nr	échantillonnage par filtration (membrane en polycarbonate, pores 0,8 μm)	60	dosage LAL (EU.m ⁻³)	endotoxines	* de 2,2 à 3,7x10 ³
Pankhurst et al., 2011b	2 (Royaume-Uni) DV	ambiance / inhalable	échantillonneur IOM (membrane en polycarbonate, pores 0,8 μm)	66	dosage LAL (UE.m ⁻³) culture sur Mac Conkey, 37 °C, 3 à 4 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA + chloramphénicol, 37 °C, 3 à 4 J (UFC.m ⁻³)	endotoxines bacilles Gram négatif <i>Aspergillus fumigatus</i>	* de 2,3 à 1,7x10 ² * de 1,6x10 ⁴ à 7,8x10 ⁵ * de 6,2x10 ³ à 9,3x10 ³
Poirot et al., 2010	10 (France) DMR, BD, DV, B	ambiance / inhalable	cassettes porte-filtre (capsule ACCU-CAP et membrane en PVC)	de 840 à 960	pesée (mg.m ⁻³)	poussières inhalables	* de 0,2 à 6,8

Persoons et al., 2010	1 (France) DV, BD	ambiance / non conventionnelle	de 120 à 240	dosage LAL (UE.m ³)	endotoxines	de < LQ à 2,8x10 ⁴
			cassettes porte-filtre (membrane en fibres de verre)	culture sur TSA + cycloheximide, 25 °C, 5 J (UFC.m ³)	bactéries mésophiles	de < LQ à 6,6x10 ⁶
Schlosser et al., 2009	6 (France, Royaume-Uni, Espagne) BD, DV, B	individuel (I) et ambiance (A) / inhalable	de 120 à 240	culture sur TSA, 56 °C, 3 J (UFC.m ³)	bactéries thermophiles	de < LQ à 8,2x10 ⁷
			culture sur MEA, 25 °C, 5 J (UFC.m ³)	moisissures mésophiles	de < LQ à 5,0x10 ⁶	
			culture sur MEA, 47 °C, 3 J (UFC.m ³)	moisissures thermophiles	de < LQ à 3,4x10 ⁷	
			culture sur TSA, 30 °C, 5-8 J (UFC.m ³)	bactéries mésophiles	* de 2,7x10 ³ à 3,8x10 ⁴	
Bru-Adan et al., 2009	1 (France) DV	ambiance / inhalable	14,2 et 28,3	culture sur Drigalski, 30 °C, 5-8 J (UFC.m ³)	bactéries Gram négatif	* de 11,0 à 2,8x10 ³
			culture sur MEA + chloramphénicol, 30 °C, 5 J (UFC.m ³)	moisissures mésophiles	* de 1,3x10 ³ à 1,1x10 ⁵	
			culture sur MEA + chloramphénicol, 37 °C, 5 J (UFC.m ³)	<i>Aspergillus</i> spp.	* de 8,9x10 ² à 6,6x10 ⁴	
			pesée (mg.m ³)	poussières	de 0,1 à 1,0x10 ² (I) et de < 0,1 à 2,3x10 ² (A)	
Fisher et al., 2008	9 (Allemagne)	ambiance / non conventionnelle	de 200 à 300 (I) et de 300 à 600 (A)	dosage LAL (UE.m ³)	endotoxines	de < 20,0 à 1,3x10 ⁷ (I) et de 2,1x10 ² à 3,2x10 ⁶ (A)
			CIP-10 M (mousse polyuréthane pour les poussières et coupelle rotative contenant de l'eau apyrogène et du Tween 20 pour tous les autres paramètres)	culture sur TSA, 22 °C, 72 h + test Bacident® (UFC.m ³)	bactéries mésophiles	de < 20,0 à 4,8x10 ⁹ (I) et de 1,7x10 ³ à 5,5x10 ⁹ (A)
			culture sur Rose-Bengale + chloramphénicol, 22 °C, 7 J (UFC.m ³)	bactéries mésophiles Gram négatif	de < 12,0 à 4,3x10 ⁹ (I) et de 10,0 à 5,5x10 ⁹ (A)	
			culture sur Rose-Bengale + chloramphénicol, 37 °C, 7 J (UFC.m ³)	moisissures mésophiles	de 44,0 à 5,0x10 ⁸ (I) et de 4,9x10 ² à 7,1x10 ⁶ (A)	
Deacon et al., 2009	1 (Angleterre) DV	ambiance / inhalable	300	épi-fluorescence - DAPI (particules.m ³)	cellules totales	de 1,0x10 ⁵ à 1,2x10 ⁶
			dosage LAL (UE.m ³)	bactéries totales	de 0,5x10 ³ à 3,0x10 ⁴	
Fisher et al., 2008	9 (Allemagne)	ambiance / non conventionnelle	75	culture sur malt agar + chloramphénicol, 30 °C, 5 J (UFC.m ³)	moisissures mésophiles	de < 2,6x10 ² à 2,0x10 ³
			échantillonneur IOM (membrane en polycarbonate, pores 0,8 µm)	dosage LAL (UE.m ³)	endotoxines	* jusqu'à 2,3
Fisher et al., 2008	9 (Allemagne)	ambiance / non conventionnelle	60	culture sur MEA + chloramphénicol, 44 °C, 3 à 7 J (UFC.m ³)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	* jusqu'à 6,0x10 ³
			AirPort MD8 (membrane de culture)	culture sur gélose CASO, 36 °C, 7 J (UFC.m ³)	bactéries	* jusqu'à ~ 1,0x10 ⁹

DMR, BD, DV	gélatine, pores de 3 µm) ou impinger AGI 30 (nr)			culture sur DG-18 + chloramphénicol, 25 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	moisissures mésophiles	* jusqu'à ~ 5,0x10 ⁶
	AirPort MD8 (membrane de gélatine, pores de 3 µm)			culture sur MEA, 45 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	moisissures thermotolérantes	* jusqu'à ~ 5,0x10 ⁵
Albrecht et al., 2007	1 (Allemagne) BD, DV	ambiance / non conventionnelle	1000	culture sur TSA + cycloheximide, 36 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	* de < 10 ⁴ à 5,0x10 ⁶
	impinger AGI 30 (solution saline stérile 0,9 % NaCl)		127	culture sur TSA + cycloheximide, 36 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	* de 5,0x10 ⁴ à 9,0x10 ⁷
				épi-fluorescence - DAPI (particules.m ⁻³)	cellules totales	* de 2,0x10 ⁶ à 1,0x10 ⁹
				épi-fluorescence - AO (particules.m ⁻³)	cellules totales	* de < 10 ⁴ à 8,0x10 ⁸
Bünger et al., 2007	6 (Allemagne) BD	individuel / nr	nr	pesée (mg.m ⁻³)	poussières inhalables	jusqu'à 1,0
	selon les préconisations germaniques			dosage LAL (ng.m ⁻³)	endotoxines	de 0,8 à 34,0 (* 16,0)
				nr (UFC.m ⁻³)	moisissures	de 2,0x10 ³ à 1,1x10 ⁷
Fracchia et al., 2006	2 (Italie) DMR, BD, DV	ambiance / non conventionnelle	60	culture sur PCA + cycloheximide, 37 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	* de 39,0 à 1,9x10 ⁴
	impacteur mono-étage SAS (gélose en boîte de Pétri)			culture sur PCA + cycloheximide, 22 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries mésophiles	* de 33,0 à > 4,0x10 ⁴
				culture sur PCA + cycloheximide, 48 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries thermophiles	* de 61,0 à > 4,0x10 ⁴
				culture sur Mac Conkey + cycloheximide, 37 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries Gram négatif	* < LQ à 2,1x10 ³
				culture sur ECD-MUG + cycloheximide, 37 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries coliformes	* < LQ à 9,6x10 ³
				culture sur SPS + cycloheximide, 42 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	bactéries sulfito-réductrices	* < LQ à > 4,0x10 ⁴
				culture sur ECD-MUG + cycloheximide, 37 °C, 3 J (UFC.m ⁻³)	<i>Escherichia coli</i>	* < LQ à 4,0x10 ²
Lavoie et al., 2006	5 (Canada) DMR, BD, DV	ambiance / inhalable	de 40 à 60	culture sur TSA, 37,5 °C, 5-7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	de 4,8x10 ³ à 8,9x10 ⁴
	cassettes porte-filtre (membrane en polycarbonate, pores 0,8 µm)			culture sur Sabouraud dextrose, 25 °C, 5-7 J (UFC.m ⁻³)	moisissures totales	de 4,8x10 ³ à 1,0x10 ⁵
Taha et al., 2006	1 (Angleterre) DV	ambiance / inhalable	de 14 à 28	culture sur MEA + chloramphénicol, 37 °C, 3 à 14 J (UFC.m ⁻³)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	de 1,0x10 ⁴ à 3,7x10 ⁷
	échantillonneur IOM (membrane en polycarbonate, pores 0,8 µm)					
	échantillonnage par filtration (membrane en acétate de cellulose, pores de 0,8 µm)		300 ou 400	pesée (mg.m ⁻³)	poussières	de > LQ à 2.68
Tolvanen et al., 2005	1 (Finlande) BD	ambiance / nr	200 ou 240	dosage LAL (UE.m ⁻³)	endotoxines	de 0,2 à 1,8x10 ⁴
	échantillonnage par filtration (membrane en fibres de verre,					

pores de 0,8 µm)									
	échantillonnage par filtration (membrane en polycarbonate)	120	épi fluorescence - AO (particules.m ⁻³)	microorganismes totaux	de 9,0x10 ⁵ à 1,9x10 ⁸				
	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélöse en boîte de Pétri)	de 28,3 à 283	culture sur PCA, 25 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	bactéries mésophiles	de 1,0x10 ² à 5,6x10 ⁴				
	ambiance / non conventionnelle	de 900 à 1020 (pour les poussières) ou de 1575 à 1785 (pour les autres paramètres)	culture sur DRBC MEA, 25 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	moisissures mésophiles	de 1,3x10 ² à 3,6x10 ⁵				
Wouters et al., 2005	14 (Hollande) BD, DV	filtration avec PAS-6 ou avec GSP (membrane en fibres de verre)	pesée (mg.m ⁻³)	poussières inhalables	de < 0,30 à 1,3x10 ²				
Sanchez-Monedero et al., 2005	1 (Angleterre) DV	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélöse en boîte de Pétri)	culture sur gélose nutritive + cycloheximide, 37 °C, 2 J (UFC.m ⁻³)	bactéries mésophiles	* de < 1,0x10 ² à 2,6x10 ⁵				
Reinthalier et al., 2004	1 (Autriche) BD, DV	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélöse en boîte de Pétri)	culture sur MEA + streptomycine + novobiocine, 40 °C, 2 J (UFC.m ⁻³)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	* de < 1,0x10 ² à > 2,1x10 ⁵				
	ambiance / non conventionnelle		culture sur TSA + cycloheximide, 37 °C, 2 J (UFC.m ⁻³)	bactéries mésophiles (totales ?)	de 1,1x10 ² à 5,1x10 ⁵				
	ambiance / non conventionnelle		culture sur TSA + cycloheximide, 50 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	bacilles thermophiles	de 3,5x10 ¹ à 5,1x10 ⁵				
			culture sur MEA + streptomycine + penicilline, 25 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	moisissures mésophiles	de 1,2x10 ² à 3,0x10 ⁵				
			culture sur gélose au sang, 37 °C, 2 J (UFC.m ⁻³)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	de < LQ à 1,8x10 ⁵				
Chiang et al., 2003	1 (États-Unis) B (+ bois)	impacteur Andersen, 2 étages (gélöse en boîte de Pétri)	culture sur TSA + cycloheximide, 35 °C, 1 à 2 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	de 4,2x10 ³ à 5,0x10 ⁴ (* 1,5x10 ⁴)				
	ambiance / non conventionnelle		culture sur Oxygall + penicillin + chlorotetracycline, 25 °C, 4 J (UFC.m ⁻³)	moisissures mésophiles	de 1,8x10 ² à 9,5x10 ³ (* 2,1x10 ³)				
			culture sur Oxygall + penicillin + chlorotetracycline, 45 °C, 4 J (UFC.m ⁻³)	moisissures thermophiles	de 1,4x10 ² à 3,6x10 ³ (* 1,2x10 ³)				
			culture sur Oxygall + penicillin + chlorotetracycline, 45 °C, 4 J (UFC.m ⁻³)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	de 21,0 à 3,6x10 ³ (* 5,7x10 ²)				
Hryhorczuk et al., 2001	1 (États-Unis) DV	échantillonneur haut débit (membrane en fibres de quartz)	pesée (mg.m ⁻³)	poussières inhalables	de 47 à 1,8x10 ³				
	ambiance / non conventionnelle		dosage LAL (ng.m ⁻³)	endotoxines	de 0,12 à 6,06				
			dosage LAL (ng.m ⁻³)	(1,3)-β-D-glucanes	de 0,12 à 14,45				
			culture sur soy-casein media, 25 °C, 3 à 5 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales	de 4,8x10 ² à 7,9x10 ⁴				

et al., 1997	(Allemagne) DMR, BD	conventionnelle	VC 25 (filtres de quartz) pour les endotoxines et AirPort MD8 (membrane de gélatine) pour tous les autres paramètres	VC 25 et 1000 pour le MD8	culture sur géloses nutritives CaSo, 37 °C, 2 J (UFC.m ⁻³) culture sur MacConkey, 37 °C, 2 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA, 22 °C, 7 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA, 30 °C, 7 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA, 45 °C, 2 J (UFC.m ⁻³) culture sur DG-18 + chloramphénicol, 22 °C, 7 J (UFC.m ⁻³) culture sur DG-18 + chloramphénicol, 30 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales bactéries Gram négatif levures et moisissures à 22 °C levures et moisissures à 30 °C <i>Aspergillus fumigatus</i> moisissures xérophiles à 22 °C moisissures xérophiles à 30 °C	* de 3,3x10 ¹ à 7,7x10 ⁴ * de 3,3x10 ¹ à 9,7x10 ² * de 1,4x10 ³ à 2,7x10 ³ * de 8,3x10 ² à 2,8x10 ³ * de 6,0x10 ² à 9,7x10 ² * de 5,7x10 ² à 7,3x10 ² * de 9,3x10 ² à 3,6x10 ³
		individuel / inhalable	PAS-6 (nr)	nr	pesée (mg.m ⁻³) dosage LAL (EU.m ⁻³) culture sur TSA, nr, nr (UFC.m ⁻³) culture sur TSA + cristal violet, nr, nr (UFC.m ⁻³) culture sur DG-18, nr, nr (UFC.m ⁻³)	poussières inhalables endotoxines bactéries totales bactéries Gram négatif moisissures	* de 0,4 à 3,1 * de 50,0 à 1,0x10 ³ * jusqu'à 1,0x10 ³ * jusqu'à 1,0x10 ⁴ * jusqu'à 1,0x10 ⁶
Douwes et al., 1997	¹ (Pays-Bas) DMR	ambiance / non conventionnelle	impacteur mono-étage Andersen (gélose en boîte de Pétri)	28,3	culture sur TSA + cristal violet, nr, nr (UFC.m ⁻³) culture sur DG-18, nr, nr (UFC.m ⁻³)	bactéries totales bactéries Gram négatif	* jusqu'à 1,0x10 ⁴ * jusqu'à 1,0x10 ⁶
Reinthal et al., 1997	³ (Autriche) BD, DV	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélose en boîte de Pétri)	de 4,75 à 114	culture sur gélose au sang + cycloheximide, 37 °C, 3 J (UFC.m ⁻³) culture sur MEA + streptomycine + pénicilline, 25 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales moisissures mésophiles	* de 2,5x10 ² à > 5,0x10 ⁵ * de 2,1x10 ² à 1,1x10 ⁵
Marchand et al., 1995	¹ (Canada) DMR, BD	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélose en boîte de Pétri)	14 56	culture sur TSA, 37 °C, 2-3 J (UFC.m ⁻³) culture sur MacConkey, 37 °C, 5-7 J (UFC.m ⁻³) culture sur Sabouraud dextrose, 25 °C, 5-7 J (UFC.m ⁻³)	bactéries totales bactéries Gram négatif moisissures totales	* de 8,7x10 ³ à 5,3x10 ⁵ * de 1,0x10 ² à 7,9x10 ³ * de 7,0x10 ² à 7,2x10 ³
Heida et al., 1995	¹ (Hollande) DV, BD	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 2 étages (gélose en boîte de Pétri)	28,3	culture sur PCA, 37 °C, 24 h (UFC.m ⁻³) dosage LAL (µg.m ⁻³)	bactéries totales endotoxines	> 2,8x10 ⁴ * de 0,001 à 0,042
		ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélose en boîte de Pétri)	de 14,2 à 113,2	culture sur gélose Conrad-Drigalski, 35 °C, 48 h (UFC.m ⁻³) culture sur gélose Czapek-Dox modifiée, 45 °C, 48 h (UFC.m ⁻³)	bactéries Gram négatif <i>Aspergillus fumigatus</i>	de 0,4x10 ² à 3,7x10 ⁵ de 0,4x10 ² à 6,0x10 ⁶

1.4.2 L'AÉROBIOCONTAMINATION EN ACTINOMYCÈTES ASSOCIÉE AU COMPOSTAGE

L'aérosolisation d'actinomycètes lors des opérations de compostage représente un exemple significatif de cette problématique. Et pourtant, les références concernant l'aérobiocontamination en actinomycètes sont beaucoup moins nombreuses, comme le laisse paraître le Tableau 4. Les études sont très hétérogènes pour, au final, ne converger que vers une quantification des actinomycètes mésophiles et/ou thermophiles par mise en culture sur milieux gélosés. De même que précédemment, les concentrations peuvent être extrêmement différentes selon les modalités d'étude. Mais quel que soit le cas, le problème de non spécificité de l'analyse est récurrent. Avoir une concentration en actinomycètes mésophiles ou thermophiles est une donnée importante mais ne renseigne en aucun cas sur l'aspect pathogénique du bioaérosol. La concentration peut être relativement élevée sans pour autant que le bioaérosol contienne d'espèces pathogènes pour l'Homme et inversement.

Tableau 4. Récapitulatif d'études traitant de l'aérobiocontamination en actinomycètes en plates-formes de compostage (pour le type de déchets compostés, DMR, BD, DV et B signifient respectivement déchets ménagers résiduels, biodéchets, biodéchets, déchets verts et boues).

Référence de l'étude	Nombre de sites - (localisation) - déchets	Stratégie de prélèvement / fraction ciblée	Méthode de prélèvement (milieu ou support de collecte)	Volume d'air prélevé (L)	Conditions d'analyse (unités de mesure)	Paramètre mesuré	Concentrations (* indique une moyenne)
Pankhurst <i>et al.</i> , 2011b	2 (Royaume-Uni) DV	ambiance / inhalable	échantillonneur IOM (membrane en polycarbonate, pores 0,8 µm)	66	culture sur compost agar + cycloheximide, 44 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	* de 5,5x10 ⁴ à 3,2x10 ⁶
Persoons <i>et al.</i> , 2010	1 (France) DV, BD	ambiance / non conventionnelle	impacteur mono-étage Andersen (gélose en boîte de Pétri)	14,2 et 28,3	culture sur TSA, 52 °C, 5-8 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	* de 70 à 6,9x10 ³
Schlosser <i>et al.</i> , 2009	6 (France, Royaume-Uni, Espagne) BD, DV, B	individuel (I) et ambiance (A) / inhalable	CIP-10 M (coupelle rotative contenant de l'eau apyrogène et du Tween 20)	de 200 à 300 (I) et de 300 à 600 (A)	culture sur TSA + cycloheximide, 55 °C, 7 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	de 3,5x10 ² à 5,3x10 ⁷ (I) et de 3,4x10 ³ à 2,0x10 ⁸ (A)
Bru-Adan <i>et al.</i> , 2009	1 (France) DV	ambiance / inhalable	échantillonnage par filtration (membrane en ester de cellulose, pores 0,2 µm)	75	culture sur Bennet agar, 45 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	de < 2,5x10 ² à 1,5x10 ⁴
Fisher <i>et al.</i> , 2008	9 (Allemagne) DMR, BD, DV	ambiance / non conventionnelle	AirPort MD8 (membrane de gélatine, pores de 3 µm) ou impinger AGI 30 (nr)	nr	culture sur glycerin-arginin agar + cycloheximide, 50 °C, 14 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	* jusqu'à ~ 1,0x10 ⁷
Bünger <i>et al.</i> , 2007	6 (Allemagne) BD	individuel / nr	selon les préconisations germaniques	nr	nr	actinomycètes	de 4x10 ³ à 3,5x10 ⁶
Taha <i>et al.</i> , 2006	1 (Angleterre) DV	ambiance / inhalable	échantillonneur IOM (membrane en ester de cellulose, pores 0,8 µm)	de 14 à 28	culture sur gélose nutritive semi-solide + cycloheximide et sur sol compost agar + cycloheximide, 44 °C, 3-14 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	de 2,0x10 ⁴ à 3,6x10 ⁷
Fracchia <i>et al.</i> , 2006	2 (Italie) DMR, BD, DV	ambiance / non conventionnelle	impacteur mono-étage SAS (gélose en boîte de Pétri)	60	culture sur starch casein agar + cycloheximide, 28 °C, 5 J (UFC.m ⁻³) culture sur starch casein agar + cycloheximide, 48 °C, 5 J (UFC.m ⁻³) culture sur starch casein agar + cycloheximide, 28 °C, 5 J (UFC.m ⁻³) culture sur starch casein agar + cycloheximide, 48 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes mésophiles actinomycètes thermophiles streptomycètes mésophiles streptomycètes thermophiles	* de 6 à > 4x10 ⁴ * de 6 à > 4x10 ⁴ * de 6 à 6,15x10 ³ * de < LQ à 2,8x10 ³
Toivanen <i>et al.</i> , 2005	1 (Finlande) BD	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélose en boîte de Pétri)	de 28,3 à 283	culture sur PCA, 25 °C, 14 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes mésophiles	de < LQ à 2,1x10 ⁴
Reinthal <i>et al.</i> , 2004	1 (Autriche) BD, DV	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 6 étages (gélose en boîte de Pétri)	14,2	culture sur TSA + cycloheximide, 50 °C, 5 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	de < LQ à 5,1x10 ⁵
Hryhorczuk <i>et al.</i> , 2001	1 (États-Unis) DV	ambiance / non conventionnelle	impacteur mono-étage Andersen (gélose en boîte de Pétri)	25,7	culture sur soy-casein media, 25 °C, 3-5 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes mésophiles	de < LQ à 1,5x10 ³
Recer <i>et al.</i> , 2001	1 (États-Unis) DV	ambiance / non conventionnelle	biocollecteur centrifuge RCS (bandes gélosées)	de 100 à 500	culture sur TSA, 52 °C, 2-3 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	jusqu'à 5,5x10 ³ (* 6,1x10 ²)
Folmsbee & Strevett, 1999	1 (États-Unis) DV	ambiance / non conventionnelle	impacteur en cascade Andersen, 2 étages (gélose en boîte de Pétri)	de 28,3 à 169,8	culture sur starch casein agar + cycloheximide, 45 °C, 4 J (UFC.m ⁻³)	actinomycètes thermophiles	jusqu'à 1,2x10 ⁴

C'est un fait, il existe de très nombreux moyens d'échantillonner les bioaérosols, tout comme de les analyser. Mais du fait des nombreux inconvénients liés à ces techniques analytiques, il n'existe encore aucune méthode standardisée qui permettrait de collecter des données en conditions réelles d'exposition, à grande échelle. De plus, avec de telles méthodes, établir des liens entre une quantité de bioaérosols inhalés et d'éventuels impacts sur la santé est très difficile. Au vu de ces éléments, l'objectif de la thèse est donc de développer une méthode pour la mesure de l'exposition des salariés aux bioaérosols, s'affranchissant des inconvénients des techniques traditionnellement utilisées. Il s'agit donc de caractériser et de standardiser une méthode d'analyse basée sur l'outil de biologie moléculaire qu'est la PCR temps réel, afin d'évaluer qualitativement et quantitativement une ou plusieurs populations de microorganismes aéroportés qui auraient un intérêt en hygiène du travail (omniprésence et pathogénicité). Cette population concerne certains actinomycètes du compostage, présents en grande quantité dans de tels environnements et potentiellement responsables de pneumopathies d'hypersensibilité chez l'Homme.

1.5 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

1.5.1 CHOIX EXPÉRIMENTAUX ET INTÉRÊTS ASSOCIÉS

Les études menées à l'heure actuelle démontrent très clairement que la PCR quantitative est un outil de biologie moléculaire largement développé, utilisé dans de nombreux domaines, comme la recherche d'un nombre considérable d'organismes et ce, sur des échantillons relativement variés. Des protocoles existent pour de nombreux types d'échantillons. Que les recherches portent sur des cultures pures (bactériennes, de levures, de moisissures...), des échantillons environnementaux (sol, eau...) ou encore des échantillons cliniques (sang, cellules, tissus...), il est possible de trouver de très nombreuses publications développant cet outil technique (protocoles détaillés) qu'est la PCR quantitative. En revanche, les publications sont relativement moins nombreuses lorsqu'il s'agit de travailler sur les aérosols, ce sujet étant en pleine émergence. De plus, au regard des publications traitant des bioaérosols, les microorganismes les plus recherchés sont les champignons. Ainsi, les études portent souvent sur des champignons filamenteux de types moisissures telles que *Aspergillus* sp. (Haugland *et al.*, 2002; Lignell *et al.*, 2008; McDevitt *et al.*, 2004; Pietarinen *et al.*, 2008), *Cladosporium* sp. (Lignell *et al.*, 2008; Pietarinen *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2006), *Stachybotrys* sp. (Haugland *et al.*, 2002; Lignell *et al.*, 2008; Pietarinen *et al.*, 2008), *Trichoderma* sp., *Wallemia* sp. et *Acremonium* sp. (Lignell *et al.*, 2008; Pietarinen *et al.*, 2008). Ainsi que de nombreuses autres espèces telles que *Candida albicans* (champignon de type levure) et *Geotrichum candidum* (Haugland *et al.*, 2002), *Fusarium circinatum* (Schweigkofler *et al.*, 2004) ou encore *Penicillium* sp. (Lignell *et al.*, 2008), d'autres moisissures. Les publications existant sur les bactéries portent essentiellement sur les plus infectieuses comme *Mycobacterium tuberculosis* (Chen & Li, 2005a) et *Legionella pneumophila* (Sirigul *et al.*, 2006), agents responsables respectivement de la tuberculose et de la légionellose et sur des bactéries utilisées en bioterrorisme (Fykse *et al.*, 2008; Makino & Cheun, 2003) avec entre autres les germes *Bacillus anthracis*, *Brucella* sp. ou encore *Yersinia pestis*. A côté de ces deux groupes, des études ont également été menées sur *Escherichia coli* (An *et al.*, 2006) mais aussi *Staphylococcus* sp. plus récemment (Oppliger *et al.*, 2008) qui sont des bactéries dites « modèles » en microbiologie. En revanche, il n'existe que très peu de publications sur les actinomycètes présents dans les bioaérosols, qui plus est dans les bioaérosols de plate-forme de compostage et il y en a encore moins sur leur détection par PCR, d'où l'aspect très novateur en terme de recherche et développement de technique analytique. Se focaliser sur des espèces appartenant au groupe des actinomycètes constitue un réel intérêt en hygiène du travail

puisque'il s'agit d'un groupe largement représenté, dont certaines espèces sont pathogènes pour l'Homme. De plus, certaines de leurs caractéristiques (production de spores facilement disséminables notamment) accroissent le risque de contamination. Le choix des deux espèces *Thermoactinomyces vulgaris* et *Thermobifida fusca* ainsi que le groupe des streptomycètes mésophiles, comme bactéries cibles de nos travaux, a été motivé à la lecture de la bibliographie sur ce sujet. Il s'agit de bactéries connues comme étant impliquées dans des pneumopathies d'hypersensibilité et toutes retrouvées (à fréquences inégales) dans un environnement bien particulier où le personnel peut souvent se retrouver exposé. Cet environnement est celui des plates-formes de compostage où les actinomycètes y sont des acteurs majeurs de la biodégradation.

1.5.2 ORGANISATION DES TRAVAUX

Ce travail s'est organisé autour de 4 grandes parties. La première d'entre elles a consisté en la mise au point et l'optimisation de la technique PCR temps réel dans sa globalité. Après une recherche bibliographique des oligos existant dans la littérature et les publications ne faisant pas état d'oligonucléotides développés pour la quantification des espèces *Thermoactinomyces vulgaris* et *Thermobifida fusca* par PCR temps réel, nous avons dessiné ces amorces et sondes. Nous nous sommes servis d'oligos déjà étudiés dans la littérature pour le groupe des streptomycètes mésophiles. Pour ces trois modèles, les oligos ont été validés de manière théorique, puis de manière expérimentale, sur souches microbiennes. Ensuite, pour chacun des modèles étudiés, 3 paramètres ont été optimisés : la température d'hybridation-élongation, le pré-mix PCR et la concentration en oligonucléotides. Le clonage moléculaire des 3 séquences d'intérêt (de chacun des 3 modèles) a permis la mise en place, pour chacune des 3 cibles, d'une gamme étalon de quantification absolue pouvant s'étendre de 10^8 à 1 copie du gène par microlitre de solution. Le développement de la méthode a également consisté à faire le choix d'une méthode d'extraction de l'ADN par comparaison de plusieurs kits commercialisés, cette étape étant fondamentale pour l'analyse par PCR.

Une fois développée, nous avons cherché à comparer cette méthode qPCR aux deux techniques plus traditionnellement utilisées : le dénombrement par mise en culture sur milieux gélosés et la microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI. Cette étape a été réalisée en conditions dites de laboratoire, c'est à dire sur cultures pures et sur bioaérosols expérimentaux. L'obtention de ces bioaérosols expérimentaux a nécessité un travail préalable de préparation de suspensions sporales aptes à être aérosolisées via un générateur de type bulleur développé à l'INRS (Simon *et al.*, 2009a; Simon *et al.*, 2009b) et basé sur le Liquid Sparging Aerosolizer (Mainelis *et al.*, 2005). Un important travail sur le choix d'un protocole de préparation et sur l'ajustement des paramètres de génération nous a permis l'obtention de bioaérosols reproductibles, répétables et avec des niveaux de concentrations de l'ordre de ce qui est retrouvé en conditions réelles d'exposition. Ce travail préalable fait l'objet du deuxième chapitre.

La troisième partie concerne donc la comparaison des techniques analytiques (culture, épifluorescence et PCR) en conditions maîtrisées, sur cultures pures de cellules et sur bioaérosols expérimentaux. Même si ces outils ne dénombrent pas le même type de cellules, le but est de voir si des corrélations existent entre ces méthodes, afin de juger de la pertinence de l'utilisation de la PCR pour l'étude des bioaérosol. Mais l'étape en laboratoire ne suffit pas pour juger si la PCR est un bon outil de quantification pour les modèles ciblés.

La dernière partie concerne l'application de cette technique en conditions réelles d'exposition, sur des bioaérosols environnementaux échantillonnés en plates-formes de compostage. Dans cette partie là, tous les échantillons provenant des campagnes de prélèvements mises en place et ce, quels que soient les types de prélèvements (cassettes fermées, cassettes ouvertes...) ont été analysés par la méthode de qPCR développée et la mise en culture sur milieux gélosés (l'épifluorescence ne s'appliquant pas à de tels échantillons). Les différences observées, les niveaux de concentrations, le lien entre ces concentrations et les activités de la plate-forme correspondantes... sont autant de paramètres qui ont amené à de nombreuses conclusions et discussions autour de la technique développée.

2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	87
2.1.1 SOUCHES MICROBIENNES	87
2.1.1.1 Souches modèles de l'étude	87
2.1.1.2 Souches utilisées pour valider la spécificité des oligonucléotides	88
2.1.2 CHOIX DES CIBLES POUR LA PCR TEMPS RÉEL ET DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES	90
2.1.3 DÉTERMINATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES	90
2.1.4 RÉALISATION DE GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE	91
2.1.5 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE LA PCR.....	92
2.1.5.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation.....	92
2.1.5.2 Optimisation des concentrations des oligonucléotides	93
2.1.5.3 Optimisation des pré-mix PCR.....	94
2.1.6 CHOIX DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION D'ADN.....	94
2.1.6.1 Préparation des cultures cellulaires	94
2.1.6.2 Obtention des bioaérosols environnementaux.....	95
2.1.6.3 Protocoles d'extractions d'ADN comparés.....	95
2.2 RÉSULTATS	96
2.2.1 DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES	96
2.2.1.1 Quantification de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	96
2.2.1.2 Quantification de <i>Thermobifida fusca</i>	96
2.2.1.3 Quantification des streptomycètes mésophiles	96
2.2.2 SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES	97
2.2.2.1 Oligos Tvu F211-R285/S243 et Tvu F751-R824/S776.....	97
2.2.2.2 Oligos Tfu F374-R472/S419	101
2.2.2.3 Oligos SM fw8-rev9/p6.....	103
2.2.3 GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE.....	105
2.2.3.1 Limites de quantification et répétabilité.....	105
2.2.3.2 Reproductibilité des gammes	106
2.2.4 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR	107
2.2.4.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation.....	107
2.2.4.2 Optimisation des pré-mix PCR	109
2.2.4.3 Optimisation des concentrations des oligonucléotides.....	110
2.2.5 COMPARAISON DE PROTOCOLES D'EXTRACTION D'ADN.....	111
2.2.5.1 À partir de cultures liquides pures.....	111
2.2.5.2 À partir de bioaérosols environnementaux	112
2.3 DISCUSSION	117
2.3.1 DESSIN ET VALIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES.....	117
2.3.2 GAMMES ÉTALONS	119
2.3.3 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR	120

CHAPITRE 2 - DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE PCR TEMPS RÉEL

Ce chapitre traite du développement et de l'optimisation de la technique de biologie moléculaire qu'est la PCR temps réel, appliquée à la recherche et la quantification de certaines espèces ciblées d'actinomycètes.

2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1.1 SOUCHES MICROBIENNES

2.1.1.1 Souches modèles de l'étude

Concernant le premier modèle, *Thermoactinomyces vulgaris*, la souche modèle choisie est une souche type de *T. vulgaris* provenant de l'American Type Culture Collection et désignée par le numéro de collection ATCC™ 43649. La culture stock se prépare par ensemencement de la souche en flasques de culture cellulaire de 75 cm² contenant chacune 90 mL de BBL™ Trypticase™ Soy Agar TSA (Becton Dickinson) et incubation 15 jours à 50 °C, sous forte humidité relative de l'air (Figure 13).

Concernant le deuxième modèle, *Thermobifida fusca*, la souche retenue comme modèle pour l'étude provient elle aussi de l'American Type Culture Collection et est désignée par le numéro de collection ATCC™ BAA-629. Il ne s'agit pas d'une souche type mais d'une souche isolée d'un tas de compost dans les années 70. La culture stock se prépare exactement de la même manière que celle de *T. vulgaris* : même milieu (gélose TSA), même durée (15 jours) et même température (50 °C) d'incubation.



Figure 13. Photographie de la souche *Thermoactinomyces vulgaris* ensemencée dans une flasque cellulaire sur gélose TSA, après 15 jours d'incubation à 50 °C [© Laetitia Betelli / INRS].

Enfin, concernant le groupe des streptomycètes mésophiles, la souche modèle retenue comme représentante du groupe pour cette étude est la souche type ATCC™ 3312 *Streptomyces californicus*. La culture stock se prépare par ensemencement de la souche en flasques de culture cellulaire de 75 cm² contenant chacune 90 mL de BBL™ Trypticase™ Soy Agar TSA (Becton Dickinson) et incubation 15 jours à 28 °C.

2.1.1.2 Souches utilisées pour valider la spécificité des oligonucléotides

Les souches utilisées pour tester la spécificité des oligonucléotides dessinés sont listées dans le Tableau 5. Il s'agit de souches de collection mais aussi de souches environnementales (notées WT). Au total, 94 ont servi à la validation des oligonucléotides.

Tableau 5. Liste des souches utilisées pour l'étude de spécificité des oligonucléotides.

ESPÈCES	SOUCHES DE COLLECTION		SOUCHES ENVIRONNEMENTALES	
	provenant de centres agréés		de foins	de plates-formes de compostage
<i>Aspergillus niger</i>	UMIP 1431.83			
<i>Bacillus atropheus</i>	CIP 107159			
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSMZ 13			
<i>Bacillus pumilus</i>	DSMZ 27			
<i>Brevibacillus borstelensis</i>				WT 01
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 58.55			
<i>Escherichia coli</i>	CIP 53.126			
<i>Laceyella putida</i>	DSMZ 44608			
<i>Laceyella sacchari</i>			WT 02 à 09	
<i>Marinactinospora thermotolerans</i>				WT 01 à 04
<i>Micromonospora halophytica</i>	ATCC 27596			
<i>Nocardia carnea</i>				WT 01
<i>Nocardioopsis alba</i>	DSMZ 43377 et DSMZ 44552			WT 01 à 08
<i>Nocardioopsis composta</i>	DSMZ 44551			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 82.118			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CIP 69.13			
<i>Saccharomonospora azurea</i>	DSMZ 44631			WT 01 à 04
<i>Saccharomonospora caesia</i>	DSMZ 43068			
<i>Saccharomonospora cyanea</i>	DSMZ 44106			
<i>Saccharomonospora glauca</i>	DSMZ 43769 et DSMZ 43770			WT 01 à 05
<i>Saccharomonospora viridis</i>	DSMZ 43017			WT 01
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	DSMZ 43747			
<i>Saccharopolyspora</i> sp.				WT 01
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	CIP 4.83			
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	ATCC 3004 et DSMZ 40313			
<i>Streptomyces californicus</i>	ATCC 3312			
<i>Streptomyces cellulosae</i>				WT 01 et WT 02
<i>Streptomyces coelicolor</i>	DSMZ 40233			
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	IHEM 14577			
<i>Streptomyces</i> sp.				WT 01 à 15
<i>Streptomyces thermoatroviridis</i>				WT 01
<i>Thermoactinomyces intermedius</i>	DSMZ 43846			
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	ATCC 43649		WT 01 à 09 et WT 11	
<i>Thermobifida alba</i>	DSMZ 43795			WT 01 et WT 02
<i>Thermobifida fusca</i>	DSMZ 43792 et ATCC BAA-629			

Les souches de collection sont des souches DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), CIP ou UMIP (Collection de l'Institut Pasteur), IHEM (Biomedical Collection of the Scientific Institute of Public Health) ou encore ATCC (collection d'un centre de ressources biologiques) qui proviennent donc de centres agréés. Elles sont reçues sous forme de lyophilisat et sont reconstituées

selon un protocole spécifique préconisé par le fournisseur. Au total, 31 souches de collection provenant de centres agréés ont été utilisées pour l'étude de spécificité des oligonucléotides.

Les 63 autres souches proviennent de l'environnement : 18 d'entre elles sont des souches isolées à partir de foin et qui ont été fournies par le CHU de Besançon (Jamey, 2008). Les 45 autres sont issues de bioaérosols collectés en plates-formes de compostage. Pour ce faire, des campagnes de prélèvements en plates-formes de compostages ont été organisées afin d'y collecter de nombreux échantillons. Le prélèvement des bioaérosols a été effectué par filtration de l'air sur des cassettes porte-filtre positionnées à l'aide de trépieds à hauteur des voies respiratoires (environ 1,70 m du sol). Ces prélèvements d'ambiance ont été réalisés à proximité de zones stratégiques, à différentes zones d'activités de la plate-forme (fermentation, criblage, maturation...), le but étant de balayer la majeure partie de la chaîne de traitement des déchets et de récolter la plus large gamme de microorganismes possible. Chaque cassette est constituée de 3 pièces en polypropylène de 37 mm de diamètre (Millipore®) entre lesquelles sont insérés un préfiltre en cellulose ou « absorbent pad » (Millipore®) et une membrane Nuclepore™ en polycarbonate de 37 mm de diamètre et de pores 0,8 µm (Whatman®). Pour le prélèvement, les cassettes sont connectées à une pompe individuelle Gilian® GilAir-3 ou GilAir-5 (Sensidyne®) de débit nominal 2 L.min⁻¹ et le prélèvement se fait sur des durées allant de 1 h à 2 h. La flore échantillonnée est extraite afin de récupérer les microorganismes récoltés sur la membrane enchâssée dans la cassette en vue de les isoler et les identifier. Pour ce faire, 10 mL d'une solution d'extraction à 0,1 g/L de Tween 80® (Merck) et 1 g/L de peptone (Oxoid), sont introduits dans chaque cassette. Elles sont mises à agiter 20 min à 2 000 rpm au Multi-Reax® (Heidolph®). Les suspensions issues des extractions de la flore à partir des cassettes de prélèvement sont ensuite ensemencées sur gélose R8 à 52 °C et sur gélose d'isolement des actinomycètes Difco™ (Becton Dickinson) additionné d'un antifongique (l'amphotéricine B) et de deux antibiotiques (l'aztréonam et la fosfomycine), milieu nommé AFA, à 30 °C. Les compositions et efficacités de ces milieux ont été décrites par Caroline Jamey dans sa thèse (Jamey, 2008). La suite du travail consiste en une identification de ces souches environnementales par amplification et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Pour ce faire, les cultures ont ensuite été soumises à une extraction d'ADN par la méthode à la résine Chelex® 100 préalablement étudiée (de Lamballerie *et al.*, 1992) puis modifiée (Provost *et al.*, 1997). L'amplification de l'ADN s'est fait par utilisation des amorces fD1 (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') et rD1 (5' - AAG GAG GTG ATC CAG CC - 3'), amorces universelles pour l'amplification d'un fragment d'environ 1,5 kb de l'ARNr 16S des bactéries (Weisburg *et al.*, 1991) et dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 5 min à 95 °C, suivie de 36 cycles de 30 s à 95 °C, de 30 s à 55 °C et de 2 min à 72 °C pour finir par une extension finale de 7 min à 72 °C. Les amplicons sont ensuite purifiés avec le High pure PCR product purification kit® (Roche Applied Sciences, Allemagne) avant d'être séquencé avec le BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, États-Unis) sur le séquenceur 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems) selon le protocole de Chun & Goodfellow (1995). C'est l'amorce p782r (5' - ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT - 3') qui a été retenue pour l'analyse, les séquences obtenues étant ensuite comparées à celles déposées dans les bases internationales via deux programmes, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et BIBI (Bio Informatic Bacteria Identification). Un microorganisme est alors identifié au niveau de l'espèce si et seulement si il existe une homologie supérieure à 99 % à une seule espèce pour un fragment d'au moins 500 bases. Pour une homologie inférieure (entre 97 et 99 %, voire moins), l'identification ne va pas au-delà du genre (Janda & Abbott, 2007). Il est à noter que toute cette partie, de l'extraction de la flore des cassettes à l'identification par séquençage, a été réalisée par le CHU de Besançon, en lien avec la plate-forme de séquençage de l'Université de Franche-Comté (Institut Fédératif de Recherche 133). Au final, ce sont 50 cassettes de prélèvements issues de 5 plates-formes de compostage différentes qui ont permis l'obtention de 45 souches environnementales appartenant à 8 genres bactériens distincts.

2.1.2 CHOIX DES CIBLES POUR LA PCR TEMPS RÉEL ET DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES

Les espèces ou groupes d'actinomycètes d'intérêt ayant été discutés et déterminés, une recherche bibliographique des outils de PCR quantitative existants dans la littérature a alors été réalisée. Les publications étudiées ne faisant pas état d'oligonucléotides développés ni pour la quantification de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris* ni pour celle de *Thermobifida fusca* par PCR temps réel, nous avons dessinés ces amorces et sonde. Ce n'est, en revanche, pas le cas pour le groupe des streptomycètes mésophiles pour lequel des travaux de PCR temps réel dans la littérature ont pu être trouvés.

Tout d'abord, en ce qui concerne les deux modèles *Thermoactinomyces vulgaris* et *Thermobifida fusca*, le gène de l'ARNr 16S posant souvent des problèmes de spécificité et celui de l'ARNr 23S ne comptant pas beaucoup de séquences dans les banques de données, il a paru judicieux de s'intéresser à d'autres gènes. Une recherche des séquences d'intérêt via la base de données GenBank® qui regroupe toutes les séquences nucléotidiques disponibles nous a amené à travailler sur le gène *gyrB* pour *T. vulgaris* et sur le gène *ecf* pour *T. fusca*. Après, alignement des séquences *gyrB* ou *ecf* de plusieurs espèces d'actinomycètes via le portail d'analyses bioinformatiques Mobyle (de l'Institut Pasteur) et réalisation de BLAST de chacune des séquences grâce au programme du même nom développé au National Center for Biotechnology Information (NCBI), un dessin des oligonucléotides a pu être réalisé sur le logiciel Primer Express® (Applied Biosystems). Après avoir éliminé les couples non judicieux et réalisé une autre série de BLAST des séquences potentiellement amplifiables pour vérification, deux couples amorces/sonde ont été retenus pour l'amplification spécifique de l'espèce *T. vulgaris* (rien, si ce n'est une validation expérimentale, ne pouvant permettre le choix de l'un ou l'autre des deux couples d'oligonucléotides). Ils ont respectivement été nommés Tvu F211-R285/S243 (couple ①) et Tvu F751-R824/S776 (couple ②). En revanche, un seul et unique couple nommé Tfu F374-R472/S419 a été dessiné pour *T. fusca*.

Enfin, concernant le groupe des streptomycètes mésophiles, nous nous sommes basés sur un travail déjà réalisé. En effet, dans leur publication, Rintala & Nevalainen (2006) ont développé une méthode basée sur la PCR temps réel pour la quantification des streptomycètes issus des poussières domestiques. Après avoir extrait plusieurs séquences d'intérêt de la base de données de l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL) et les avoir alignées via le programme Align X (logiciel Vector NTI Suite), les auteurs ont dessiné les oligonucléotides grâce au logiciel Primer Express™ (Applied Biosystems™, États-Unis). Ils les ont ensuite testés via la base de données GenBank® et par PCR conventionnelles sur de nombreuses souches, pour finalement valider le couple amorces/sonde qu'ils ont nommé SM fw8-rev9/p6.

2.1.3 DÉTERMINATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES

La spécificité de ces oligonucléotides dessinés ou issus de la littérature est ensuite étudiée de deux manières : une première validation dite théorique (*in silico*) et une seconde validation dite expérimentale.

La validation *in silico* est réalisée par alignement des séquences dans la base de données GenBank®. Il s'agit de la réalisation d'un BLAST nucléotidique afin de vérifier que la séquence recherchée est bien amplifiable et voir également quelles séquences de quelles autres espèces parmi toutes celles recensées peuvent également être potentiellement amplifiées.

La validation expérimentale est réalisée par la mise en place de PCR temps réel sur l'ADN extrait de nombreuses souches microbiennes, pour la plupart bactériennes (actinomycètes et non actinomycètes). Pour ce faire, des suspensions concentrées de chacun des microorganismes testés (Tableau 5) ont été réalisées en solution d'extraction (Tween 80® à 0,1 g/L et peptone à 1 g/L). Une extraction d'ADN a été réalisée sur 500 µL avec le FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals) et les extraits ont été dosés par spectrophotométrie par le biais du BioPhotometer plus (Eppendorf) combiné à l'utilisation de la cuve TrayCell (Hellma®). Les extraits ont été ramenés dans des gammes de concentrations équivalentes (comprises entre 1,5 et 9,7 ng d'ADN.µL⁻¹ ou entre 10,0 et 18,0 ng d'ADN.µL⁻¹) par dilutions avec de l'eau ultrapure stérile. Les réactions PCR se composaient de : 12,5 µL d' iQ™ supermix (Bio-Rad®) à 1 X final, 1 µL de chaque amorce à 300 nM final, 1 µL de sonde à 200 nM final, 7,5 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire et 2 µL d'échantillon ADN. Les cycles PCR ont été réalisés sur le système de détection PCR temps réel CFX96™ (Bio-Rad®) selon le protocole suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles d'une dénaturation de 15 sec à 95 °C et d'une étape hybridation-élongation de 1 min à 60 °C. Les résultats exprimés en unités de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR sont analysés grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 1.0.1035.131 (Bio-Rad®). L'interprétation relève d'une quantification relative, c'est-à-dire d'une analyse des résultats par comparaison des 'threshold cycles' (C_T).

2.1.4 RÉALISATION DE GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE

Nous avons décidé de réaliser une quantification absolue par PCR temps réel grâce à la réalisation de gammes étalons. Le but est de pouvoir relier, pour chaque échantillon étudié, le C_T ('Threshold Cycle') avec la concentration en ADN. Pour ce faire, nous avons cloné le fragment de PCR pour chaque gène cible dans un vecteur de clonage pour les 3 espèces modèles préalablement définies : *Thermoactinomyces vulgaris* ATCC™ 43649 (portion codant le gène de la sous unité B de l'ADN gyrase), *Thermobifida fusca* ATCC™ BAA-629 (portion codant le gène du facteur *ecf*) et *Streptomyces californicus* ATCC™ 3312 (portion sur le 23S).

À partir d'une culture en milieu liquide de ces trois espèces, une extraction d'ADN puis une PCR classique ont été réalisées afin d'obtenir les produits PCR. Ces fragments sont ensuite ligués dans le vecteur pGEMt easy ou le plasmide pCR-II TOPO et ces produits de ligation ont ensuite été transformés dans des cellules bactériennes compétentes (*Escherichia coli* TOP 10). Après mise en culture de ces cellules transformées, les clones recombinants ont été sélectionnés après vérification de l'intégration des plasmides et ces derniers ont été purifiés par le kit Qiagen plasmid midi kit. Les plasmides sont enfin digérés par une enzyme de restriction (pour la linéarisation du plasmide) et dosés, de manière à calculer le nombre de copies du gène cible dans les échantillons. Au final, trois gammes étalons (une par espèce) ont été réalisées pour la quantification des échantillons en PCR temps réel. Le protocole détaillé de la réalisation de ces gammes est présenté dans l'Annexe I.

La concentration des extraits plasmidiques ayant été déterminée par spectrophotométrie et connaissant la taille du vecteur, la taille des inserts et leur poids moléculaire par utilisation du freeware OligoCalc (Kibbe, 2007), il est alors possible de calculer le nombre de copies du gène de l'échantillon. En effet, la rentrée des séquences du vecteur pCR-II TOPO à 3 973 bp et de l'insert dans le logiciel OligoCalc permet un calcul du poids moléculaire MW en g/mole. Connaissant la concentration C en ng/µL relevée dans l'extrait plasmidique par dosage spectrophotométrique, il est alors possible de calculer la molarité M, exprimée en mole/µL, de l'échantillon par la formule : $M = (C/MW) \times 10^{-9}$ (Équation 1). Grâce à la constante d'Avogadro N_A représentant le nombre de molécules contenues dans une mole de produit et sachant que 1 mole équivaut à 6,02x10²³ molécules, il est alors possible de connaître le nombre de

copies du fragment d'intérêt X pour 1 μL d'échantillon : $X = M \times 6,02 \times 10^{23}$ copies/ μL (Équation 2). La gamme étalon peut être réalisée à partir de cet échantillon non digéré même s'il est beaucoup mieux de la réaliser à partir du volume digéré, auquel cas il est nécessaire de tenir compte du volume de dilution (la digestion s'étant faite par introduction de 5 μL de plasmide dans 50 μL de mix réactionnel). Une fois cette concentration connue, il suffit ensuite de diluer un volume de plasmide digéré dans du tampon Tris-EDTA-NaCl (Tris pH 8 à 2 mM, EDTA pH 8 à 0,1 mM et NaCl à 5 mM), ces deux volumes étant calculés en fonction de la gamme PCR que l'on désire mettre en place. À partir de là, des dilutions en cascade dans de l'eau ultrapure stérile permettent l'obtention de la gamme.

2.1.5 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE LA PCR

En vue de l'optimisation de l'outil qPCR, trois paramètres ont été étudiés : la température d'hybridation-élongation par mise en place d'un gradient de 8 températures, le pré-mix par étude de 8 pré-mix commercialisés différents et les concentrations en oligonucléotides (amorces et sonde) par le biais d'un gradient de 8 concentrations. Ces optimisations ont toutes les trois été réalisées sur chacun des 3 modèles. Et comme les résultats sont analysés en termes d'efficacités PCR, les optimisations ont été réalisées avec les gammes étalons précédemment réalisées (2.1.4). Les échantillons de base utilisés pour ces optimisations en vue de la quantification de chacun des trois modèles sont les extraits plasmidiques purifiés et digérés issus des clonages moléculaires et successivement dilués au dixième de manière à obtenir des gammes pouvant s'étendre de 10^8 copies à 1 copie du gène par microlitre de solution.

2.1.5.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation

Pour n'importe lequel des trois modèles, les essais d'optimisation ont toujours été réalisés de la même manière. La gamme étalon étudiée, comprenant ici 9 points de gamme, est soumise, en triplicat, à un gradient de 8 températures comme indiqué sur la Figure 14.

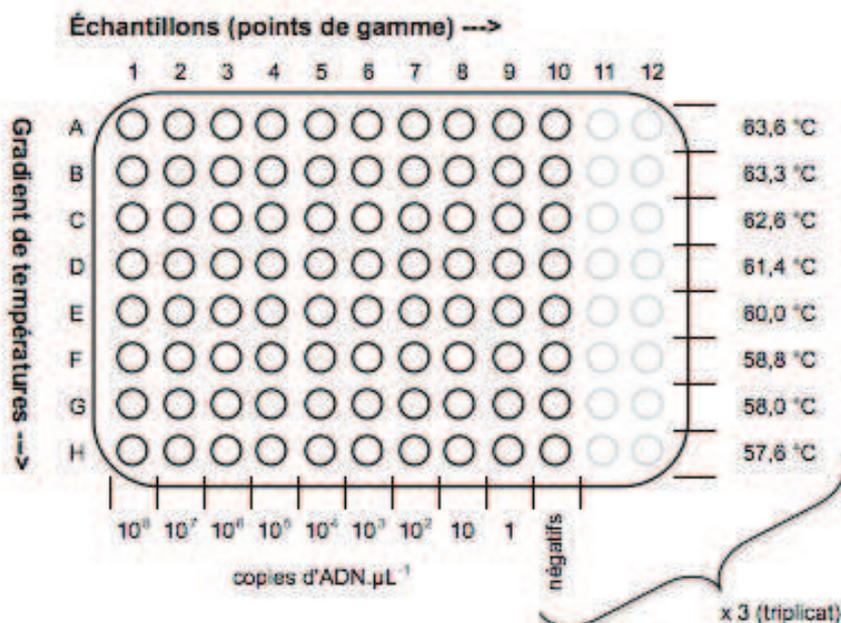


Figure 14. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation de la température d'hybridation-élongation.

Seuls les oligonucléotides sont spécifiques du modèle étudié (Tvu F751-R824/S776 si la gamme concerne le fragment du gène *GyrB* de *T. vulgaris*, Tfu F374-R472/S419 si elle concerne la portion du gène *ecf* de *T. fusca* et SM fw8-rev9/p6 s'il s'agit d'une portion du 23S de *S. californicus*).

Toutes les réactions se composent de : 12,5 µL d' iQ™ supermix (Bio-Rad®) à 1 X final, 1 µL de chaque amorce à 300 nM final, 1 µL de sonde à 200 nM final, 7,5 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire et 2 µL d'extrait ADN. Les cycles PCR ont été réalisés sur le CFX96™ (Bio-Rad®) selon le protocole suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles d'une dénaturation de 15 sec à 95 °C et d'une étape hybridation-élongation d'1 min suivant un gradient allant de 57,6 °C à 63,6 °C (Figure 14). Les résultats sont analysés grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 1.0.1035.131 (Bio-Rad®).

2.1.5.2 Optimisation des concentrations des oligonucléotides

La méthode est la même que pour le chapitre précédent hormis quelques différences. La gamme étudiée ne comprend plus que trois concentrations et les réplicats ne sont plus sur trois plaques différentes, ils sont sur la même plaque. De plus, il n'y a plus de gradient de températures : les qPCR spécifiques à *T. vulgaris* et *S. californicus* sont réalisées à une température d'hybridation-élongation de 58,0 °C et celles spécifiques à *T. fusca* à 63,3 °C. Le paramètre variant est la concentration des oligonucléotides comme décrit sur la Figure 15, où le but a été de faire varier le rapport de la concentration de la sonde sur la concentration des amorces et pour un même rapport (le plus communément retrouvé dans la littérature), de faire varier ces concentrations de 100 nM à 500 nM. Au total, 8 duos de concentrations ont été testés.

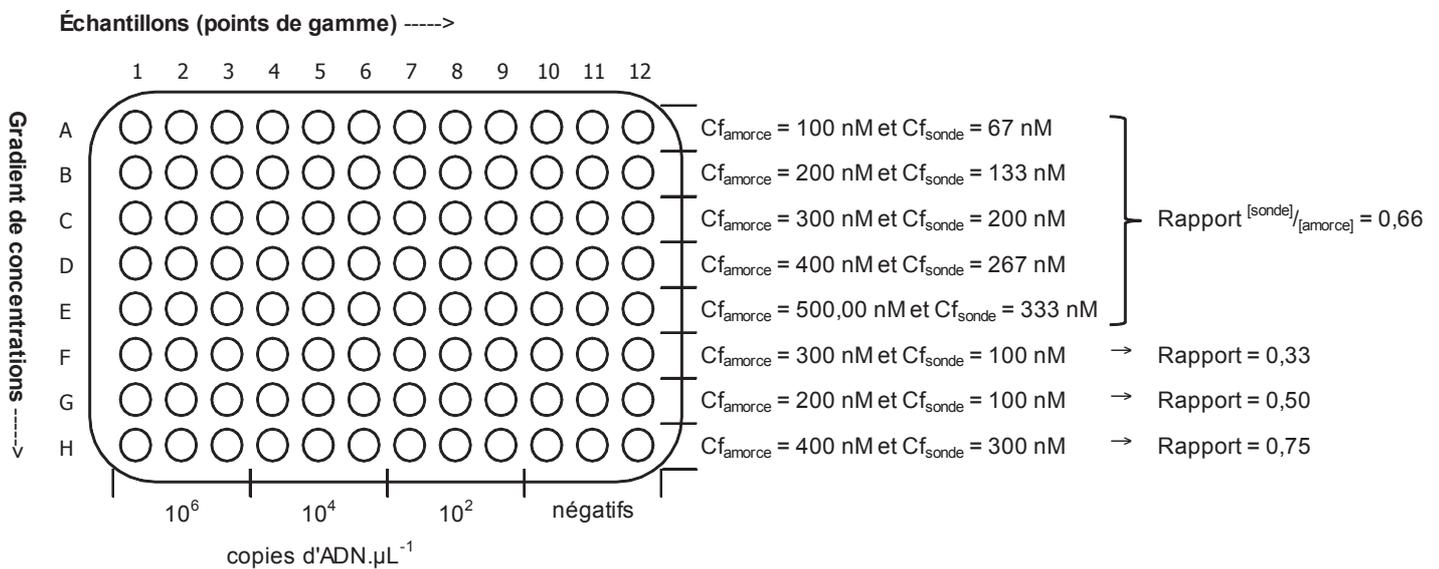


Figure 15. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation des concentrations en oligonucléotides (Cf signifie 'concentration finale').

2.1.5.3 Optimisation des pré-mix PCR

Pour cette dernière optimisation, la méthodologie reste la même que pour le paragraphe précédent, hormis le fait que la concentration en amorces est fixée à 300 nM et celle en sonde à 200 nM. En revanche, le paramètre optimisé est ici celui du pré-mix PCR, 8 au total ayant été testés (Figure 16).

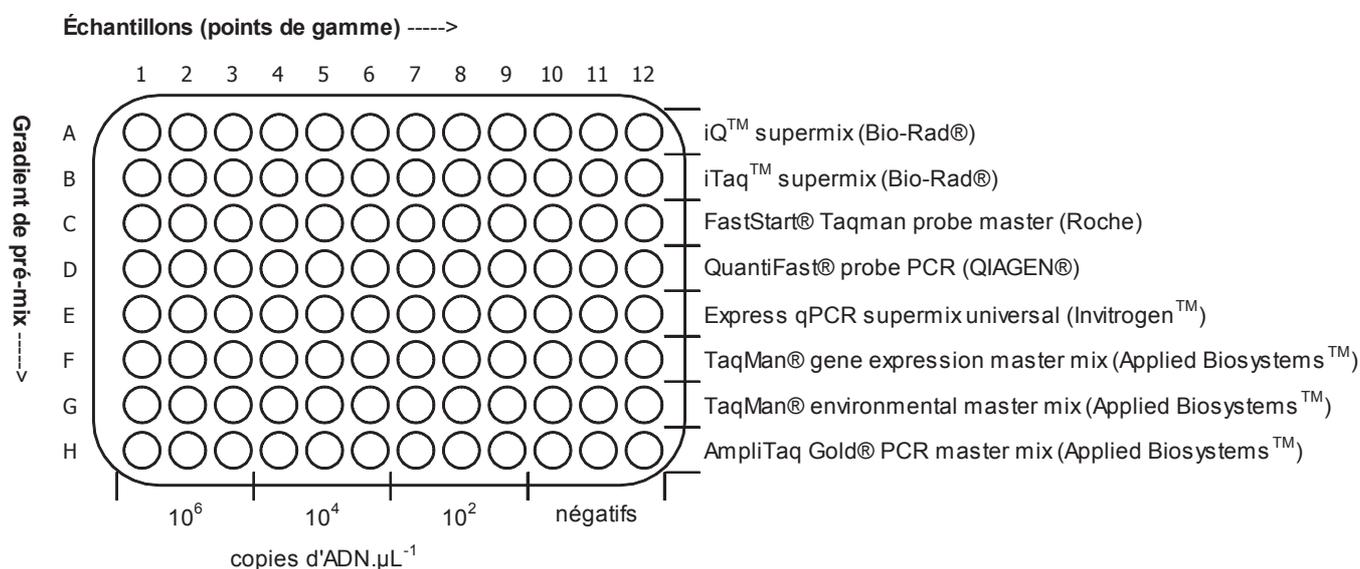


Figure 16. Schéma du plan de plaque général mis en place pour l'optimisation du pré-mix PCR.

2.1.6 CHOIX DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION D'ADN

Quatre protocoles issus de 3 kits commercialisés ont été testés et comparés vis-à-vis de leur efficacité d'extraction de l'ADN. Cette comparaison a été réalisée sur deux types d'échantillons : des cultures cellulaires pures de *Thermoactinomyces vulgaris* pour la quantification de cette espèce ainsi que des bioaérosols environnementaux pour la quantification de chacun des 3 modèles.

2.1.6.1 Préparation des cultures cellulaires

La souche *T. vulgaris* (ATCC™ 43649) est mise à incuber sur 5 flasques de culture cellulaire comme déjà décrit. Les cellules (spores et mycélium) sont récupérées des flasques par grattage à l'oëse dans 40 mL d'une solution de Tween 80 à 0,05 %. Une gamme est réalisée par 5 dilutions successives au dixième de cette suspension mère toujours dans une solution de Tween® 80 à 0,05 % et chacune des 6 suspensions de la gamme est divisée en 3 réplicats. L'ADN de ces 18 suspensions est alors extrait selon 4 protocoles d'extraction différents (2.1.6.3).

2.1.6.2 Obtention des bioaérosols environnementaux

Pour ce faire, des campagnes de prélèvements en plates-formes de compostages ont été organisées afin d'y collecter de nombreux échantillons. Le prélèvement des bioaérosols a été effectué par filtration de l'air sur des cassettes porte-filtre positionnées à l'aide de trépieds à hauteur des voies respiratoires (environ 1,70 m du sol). Ces prélèvements d'ambiance ont été réalisés à proximité de zones stratégiques, à différentes zones d'activités de la plate-forme (fermentation, criblage, maturation...), le but étant de balayer la majeure partie de la chaîne de traitement des déchets. Chaque cassette est constituée de 3 pièces en polypropylène de 37 mm de diamètre (Millipore®) entre lesquelles sont insérés un préfiltre en cellulose ou « absorbent pad » (Millipore®) et une membrane Nuclepore™ en polycarbonate de 37 mm de diamètre et de pores 0,8 µm (Whatman®). Pour le prélèvement, les cassettes sont connectées à une pompe individuelle de débit nominal 25 L.min⁻¹ (General Electrics, modèles 1531-176A-G445-X and -G629-X) avec une durée moyenne de prélèvement d'environ 4h. Les échantillons sont analysés le lendemain du prélèvement par une première étape d'extraction de la flore des cassettes. Comme précédemment (2.1.1.2), elle est réalisée par introduction de 10 mL d'une solution d'extraction à 0,1 g/L de Tween 80® (Merck) et 1 g/L de peptone (Oxoïd) dans chaque cassette, agitation 20 min à 2000 rpm au Multi-Reax® (Heidolph®) et récupération de la solution avec une seringue. Les échantillons sont également soumis aux extractions d'ADN selon 4 protocoles différents.

2.1.6.3 Protocoles d'extractions d'ADN comparés

Le premier protocole (A) repose sur l'utilisation du FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals). Les extractions d'ADN sont réalisées à partir de 500 µL d'échantillon grâce à un kit développé pour l'extraction et la purification d'ADN à partir d'échantillons de sol notamment et basé sur l'utilisation d'un broyeur à cellules, le FastPrep automated homogenizer (MP Biomedicals). L'ADN est extrait et purifié avec les Lysing Matrix E, selon les instructions du fournisseur. Pour chaque échantillon, 100 µL d'extrait d'ADN sont obtenus après élution finale, à partir de 500 µL de suspension initiale. Le second protocole (B) est issu de l'UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories). Ce kit combine lyse chimique et lyse physique pour l'extraction d'ADN à partir de cultures microbiennes, spores bactériennes et fongiques incluses. L'ADN est extrait et purifié selon les instructions du fournisseur et pour chaque échantillon, 100 µL d'extrait d'ADN sont obtenus après élution finale, à partir de 1,8 mL de suspension initiale. Les deux autres protocoles testés reposent sur l'utilisation d'un seul et même kit, le Dneasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen®), développé dans le but d'extraire et de purifier l'ADN à partir de sang et de tissus d'animaux, de cellules, bactéries, levures et virus. L'ADN est extrait selon les préconisations du fournisseur, soit selon le protocole spécifique aux bactéries Gram négatif (C), soit selon celui spécifique aux bactéries Gram positif (D) qui nécessite une étape de lyse enzymatique supplémentaire. Pour l'un comme pour l'autre des protocoles, 400 µL d'extrait d'ADN sont récupérés à partir d'1 mL d'échantillon.

Tous ces extraits d'ADN sont analysés par PCR temps réel, chacune des réactions se composant de : 12,5 µL d' iQ™ supermix (Bio-Rad®) à 1 X final, 1 µL de chaque amorce à 300 nM final, 1 µL de sonde à 200 nM final, 7,5 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire et 2 µL d'extrait ADN. Les cycles PCR ont été réalisés sur le système de détection PCR temps réel CFX96™ (Bio-Rad®) selon le protocole suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles d'une dénaturation de 15 sec à 95 °C et d'une étape hybridation-élongation de 1 min à 58 °C (pour la quantification des *T. vulgaris* ou des streptomycètes mésophiles) ou de 1 min à 63,3 °C (pour *T. fusca*). Pour chaque run PCR et ce pour chacune des espèces, trois gammes étalons (triplicat) avec un minimum de 5 points de gamme sont ajoutées. Les résultats exprimés en unités de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR sont analysés grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 1.0.1035.131 (Bio-Rad®).

2.2 RÉSULTATS

2.2.1 DESSIN DES OLIGONUCLÉOTIDES

2.2.1.1 Quantification de *Thermoactinomyces vulgaris*

Les oligonucléotides dessinés pour la quantification de l'espèce thermophile *Thermoactinomyces vulgaris* permettent l'amplification spécifique d'une portion du gène codant la sous-unité B de l'ADN gyrase de cette espèce (numéro d'accèsion AB242203.01). Le premier couple amorces/sonde se compose de l'amorce sens (ou forward primer) Tvuf211 de séquence 5' – TTC ACG GAA ACC ACC GAG TT – 3', de l'amorce antisens (ou reverse primer) Tvur285 de séquence 5' – GCC GCC GTT TAA GAA AGC A – 3' et de la sonde (probe) FAM/TAMRA Tvus243 de séquence 5' – FAM – TTT GCA AAA CCG TCT GCG CGA AC – TAMRA – 3'. Ce couple amplifie une séquence de 75 paires de bases, les oligos étant respectivement positionnés aux nucléotides 211-230, 285-303 et 243-265 du gène. Le deuxième couple se compose de l'amorce sens Tvuf751 de séquence 5' – GCC GAT CAT TTC CAA ACC TAT TT – 3', de l'amorce antisens Tvur824 de séquence 5' – GCC ATC ACG GCT TTG TTA ATA ATC – 3' et de la sonde Tvus776 de séquence 5' – FAM – ACG AGC ATC CCG CGG AAG CG – TAMRA – 3'. La séquence amplifiée est de 74 paires de bases, les oligos étant placés aux nucléotides 751-773, 824-847 et 776-795 du même gène (Tableau 6).

2.2.1.2 Quantification de *Thermobifida fusca*

Exactement de la même manière que pour l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*, nous avons dessiné un couple amorces/sonde pour l'espèce *Thermobifida fusca*, pour l'amplification spécifique d'une portion du gène codant le facteur ecf (numéro d'accèsion CP000088.1). L'amorce sens est TfuF374 de séquence 5' – AAC GCG TCC TGT ACG ACT TCT T – 3'. L'amorce antisens TfuR472 a pour séquence 5' – GAC ACA GCT CTA CTC GGA CCA CTA C – 3'. Enfin la sonde TfuS419 est flanquée d'une molécule FAM à son extrémité 5' et d'une molécule TAMRA à l'extrémité 3'. Elle a 5' – FAM – AGG AGG GCA GCG AGT CGC ACC – TAMRA – 3' pour séquence (Tableau 6). La séquence amplifiée est de 99 paires de bases, les oligos étant placés aux nucléotides 374-395, 472-496 et 419-439 du gène.

2.2.1.3 Quantification des streptomycètes mésophiles

Ces oligonucléotides permettent l'amplification d'une portion de 71 paires de bases du gène codant l'ARNr23S (Rintala & Nevalainen, 2006). L'amorce sens est SMfw8, de séquence 5' – GCC GAT TGT GGT GAA GTG GA – 3'. L'amorce antisens Smrev9 a pour séquence 5' – GTA CGG GCC GCC ATG AAA – 3'. Enfin la sonde FAM/TAMRA est SMP6. Elle a 5' – FAM – ATC CTA TGC TGT CGA GAA AAG CCT CTA GCG – TAMRA – 3' pour séquence (Tableau 6).

Tableau 6. Détails des oligonucléotides (amorces et sondes) utilisés pour la recherche et la quantification d'actinomycètes par PCR temps réel.

NOM	SÉQUENCE (5' → 3')	TAILLE (paire de bases)	GÈNE AMPLIFIÉ
amorce sens Tvu-F211	TTC ACG GAA ACC ACC GAG TT	20	portion de 75 bp de <i>gyrB</i> de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
amorce anti-sens Tvu-R285	GCC GCC GTT TAA GAA AGC A	19	
sonde Tvu-S243	TTT GCA AAA CCG TCT GCG CGA AC	23	
amorce sens Tvu-F751	GCC GAT CAT TTC CAA ACC TAT TT	23	portion de 74 bp de <i>gyrB</i> de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
amorce anti-sens Tvu-R824	GCC ATC ACG GCT TTG TTA ATA ATC	24	
sonde Tvu-S776	ACG AGC ATC CCG CGG AAG CG	20	
amorce sens Tfu-F374	AAC GCG TCC TGT ACG ACT TCT T	22	portion de 99 bp du facteur <i>ecf</i> de <i>Thermobifida fusca</i>
amorce anti-sens Tfu-R472	GAC ACA GCT CTA CTC GGA CCA CTA C	25	
sonde Tfu-S419	AGG AGG GCA GCG AGT CGC ACC	21	
amorce sens SMfw8	GCC GAT TGT GGT GAA GTG GA	20	portion de 71 bp de l'ARNr 23S des streptomycètes mésophiles
amorce anti-sens SMrev9	GTA CGG GCC GCC ATG AAA	18	
sonde SMP6	ATC CTA TGC TGT CGA GAA AAG CCT CTA GCG	30	

2.2.2 SPÉCIFICITÉ DES OLIGONUCLÉOTIDES

Suite au dessin ou au choix des oligonucléotides et même si pour deux des modèles il n'y a qu'un couple amorces/sonde, nous avons évalué leur spécificité de deux manières différentes : de manière théorique (BLAST) et de manière expérimentale (qPCR à quantification absolue sur 94 souches microbiennes).

2.2.2.1 Oligos Tvu F211-R285/S243 et Tvu F751-R824/S776

Tout d'abord, vis-à-vis de la validation théorique, concernant le premier couple étudié Tvu F211-R285/S243 et nommé ① (nucléotides 211-230, 285-303 et 243-265 du gène *gyrB* de *Thermoactinomyces vulgaris*), le BLAST montre que le couple est totalement spécifique de la séquence d'intérêt du modèle (recouvrement de 100 %, E-value de $3,0 \times 10^{-4}$), mais aussi d'une espèce proche phylogénétiquement, *Thermoactinomyces intermedius*. Avec seulement deux nucléotides différents, le taux de recouvrement est de 98 % et la E-value associée est de 0,15. Dix-sept autres séquences résultent également de ce BLAST mais les alignements ne sont pas significatifs et ne peuvent être considérés au vu des pourcentages de recouvrement (< 50 %) et des E-value (> 1,8) notamment. Les résultats du BLAST pour le deuxième couple Tvu F751-R824/S776 nommé ② (nucléotides 751-773, 824-847 et 776-795 du même gène que ci-dessus) sont différents. Comme pour le couple ①, les oligos sont totalement spécifiques de la séquence d'intérêt de *T. vulgaris* (recouvrement de 100 %, E-value de $1,0 \times 10^{-9}$). En revanche, aucune autre séquence ne semble être amplifiée avec ces oligos. Celle potentiellement amplifiée avec le couple ① ne le serait plus avec celui-ci, le pourcentage de recouvrement n'étant que de 64 %. En regardant l'alignement des séquences, il est alors possible de constater que c'est l'amorce anti-sens qui ne peut nullement s'accrocher, la séquence de l'amorce n'ayant aucun nucléotide en commun avec la séquence de l'espèce, sur les 24 alignés.

Vis-à-vis de la validation expérimentale, toutes concentrations confondues (Tableau 7 et Tableau 8), le couple ① permet l'amplification des 11 souches de *T. vulgaris* avec un C_T inférieur à 25 cycles alors

que le nombre est de 10 avec le couple ②, la onzième souche sortant à un cycle de 39,46. Mais à côté de cela, le couple ① a permis l'amplification de 15 souches autres que *T. vulgaris* : 11 avec un C_T supérieur à 35 cycles, 3 où il est compris entre 30 et 35 cycles et 1 où il est de 25,71 cycles, cette dernière souche étant *Thermoactinomyces intermedius*, la même qui avait été détectée par BLAST. En revanche, le nombre ne s'élève plus qu'à 8 pour le couple ②, sachant que pour ces 8, tous les C_T sont supérieurs à 35 cycles. À noter que le découpage du nombre de cycles dans le tableau des résultats (< 25, 30 < < 35 et > 35) est ici un critère de classification et non de validation (la validité sera analysée en discussion).

Tableau 7. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tvu F211-R285/S243 testés sur 94 souches microbiennes. Les souches DSMZ, CIP, UMIP, ATCC et IHEM sont les souches de collection, les WT sont les souches environnementales. Les résultats sont comparés sur la base du C_T ('Threshold Cycle') et ND (non détectée) signifie que l'amplification est supérieure à 40 cycles. Les échantillons ont une concentration en ADN comprise entre 1,5 et 9,7 µg.mL⁻¹ (*) ou entre 10,0 et 18,0 µg.mL⁻¹ (**). Les souches écrites en gras sont celles supposées être amplifiées par les oligonucléotides testés.

ESPÈCES	C _T
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [ATCC 43649 et WT 01]* / [WT 02 à 09 et 11]**	< 25
<i>Thermoactinomyces intermedius</i> [DSMZ 43846]*	< 25
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 02]*	30 < < 35
<i>Saccharomonospora azurea</i> [WT 01]**	30 < < 35
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 11]**	30 < < 35
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 03, 07 et 09]**	> 35
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 02]*	> 35
<i>Nocardioopsis composta</i> [DSMZ 44551]*	> 35
<i>Pseudomonas fluorescens</i> [CIP 69.13]*	> 35
<i>Streptomyces californicus</i> [ATCC 3312]*	> 35
<i>Thermobifida alba</i> [DSMZ 43795]* / [WT 01]**	> 35
<i>Thermobifida fusca</i> [DSMZ 43792]* / [ATCC BAA-629]**	> 35
<i>Aspergillus niger</i> [UMIP 1431.83]**	ND
<i>Bacillus atropheus</i> [CIP 107159]**	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> [DSMZ 13]*	ND
<i>Bacillus pumilus</i> [DSMZ 27]*	ND
<i>Brevibacillus borstelensis</i> [WT 01]**	ND
<i>Enterococcus hirae</i> [CIP 58.55]**	ND
<i>Escherichia coli</i> [CIP 53.126]*	ND
<i>Laceyella putida</i> [DSMZ 44608]*	ND
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 06]* / [WT 04, 05 et 08]**	ND
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 01, 03 et 04]**	ND
<i>Micromonospora halophytica</i> [ATCC 27596]*	ND
<i>Nocardia carnea</i> [WT 01]**	ND
<i>Nocardioopsis alba</i> [DSMZ 43377, DSMZ 44552 et WT 06]* / [WT 01 à 05, 07 et 08]**	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [CIP 82.118]**	ND
<i>Saccharomonospora azurea</i> [DSMZ 44631]* / [WT 02 à 04]**	ND
<i>Saccharomonospora caesia</i> [DSMZ 43068]*	ND
<i>Saccharomonospora cyanea</i> [DSMZ 44106]*	ND
<i>Saccharomonospora glauca</i> [DSMZ 43769, DSMZ 43770 et WT 03 et 05]* / [WT 01, 02 et 04]**	ND
<i>Saccharomonospora viridis</i> [DSMZ 43017]*	ND
<i>Saccharomonospora viridis</i> [WT 01]**	ND
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> [DSMZ 43747]*	ND
<i>Saccharopolyspora</i> sp. [WT 01]**	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> [CIP 4.83]**	ND
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> [ATCC 3004 et DSMZ 40313]*	ND
<i>Streptomyces cellulosae</i> [WT 01 et 02]**	ND
<i>Streptomyces coelicolor</i> [DSMZ 40233]*	ND
<i>Streptomyces griseoflavus</i> [IHEM 14577]*	ND
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 03 et 05]* / [WT 01, 02, 04 à 09 et 12 à 15]**	ND
<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> [WT 01]**	ND
<i>Thermobifida alba</i> [WT 02]**	ND

Tableau 8. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tvu F751-R824/S776 testés sur 94 souches microbiennes. DSMZ, CIP, UMIP, ATCC et IHEM : souches de collection ; WT : souches sauvages ; ND (non détectée) : amplification supérieure à 40 cycles ; concentration en ADN comprise entre 1,5 et 9,7 µg.mL⁻¹ (*) ou entre 10,0 et 18,0 µg.mL⁻¹ (**); en gras : souches supposées être amplifiées.

ESPÈCES	C _T
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [ATCC 43649 et WT 01]* / [WT 02 à 05, 07 à 09 et 11]**	< 25
<i>Brevibacillus borstelensis</i> [WT 01]**	> 35
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 02]* / [WT 07 et 09]**	> 35
<i>Saccharomonospora azurea</i> [WT 01]**	> 35
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 05]**	> 35
<i>Thermobifida fusca</i> [ATCC BAA-629]**	> 35
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [WT 06]**	> 35
<i>Aspergillus niger</i> [UMIP 1431.83]**	ND
<i>Bacillus atropheus</i> [CIP 107159]**	ND
<i>Bacillus licheniformis</i> [DSMZ 13]*	ND
<i>Bacillus pumilus</i> [DSMZ 27]*	ND
<i>Enterococcus hirae</i> [CIP 58.55]**	ND
<i>Escherichia coli</i> [CIP 53.126]*	ND
<i>Laceyella putida</i> [DSMZ 44608]*	ND
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 06]* / [WT 03 à 05 et 08]**	ND
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 02]* / [WT 01, 03 et 04]**	ND
<i>Micromonospora halophytica</i> [ATCC 27596]*	ND
<i>Nocardiosis alba</i> [DSMZ 43377, DSMZ 44552 et WT 06]* / [WT 01 à 05, 07 et 08]**	ND
<i>Nocardiosis carnea</i> [WT 01]**	ND
<i>Nocardiosis composta</i> [DSMZ 44551]*	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [CIP 82.118]**	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> [CIP 69.13]*	ND
<i>Saccharomonospora azurea</i> [DSMZ 44631]* / [WT 02 à 04]**	ND
<i>Saccharomonospora caesia</i> [DSMZ 43068]*	ND
<i>Saccharomonospora cyanea</i> [DSMZ 44106]*	ND
<i>Saccharomonospora glauca</i> [DSMZ 43769, DSMZ 43770 et WT 03 et 05]* / [WT 01, 02 et 04]**	ND
<i>Saccharomonospora viridis</i> [DSMZ 43017]* / [WT 01]**	ND
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> [DSMZ 43747]*	ND
<i>Saccharopolyspora</i> sp. [WT 01]**	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> [CIP 4.83]**	ND
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> [DSMZ 40313 et ATCC 3004]*	ND
<i>Streptomyces californicus</i> [ATCC 3312]*	ND
<i>Streptomyces cellulosa</i> [WT 01 et 02]**	ND
<i>Streptomyces coelicolor</i> [DSMZ 40233]*	ND
<i>Streptomyces griseoflavus</i> [IHEM 14577]*	ND
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 03 et 10]* / [WT 01, 02, 04, 06 à 09 et 11 à 15]**	ND
<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> [WT 01]**	ND
<i>Thermoactinomyces intermedius</i> [DSMZ 43846]*	ND
<i>Thermobifida alba</i> [DSMZ 43795]* / [WT 01 et 02]**	ND
<i>Thermobifida fusca</i> [DSMZ 43792]*	ND

2.2.2.2 Oligos Tfu F374-R472/S419

Concernant la validation théorique du couple Tfu F374-R472/S419, correspondant respectivement aux nucléotides 374-395, 472-496 et 419-439 du gène codant *ecf* de *Thermobifida fusca*, l'alignement de séquences a démontré une spécificité totale pour cette espèce et uniquement elle. En effet, le BLAST a permis de trouver 3 séquences nucléotidiques de 3 microorganismes différents potentiellement amplifiables avec les oligos dessinés. La première est bien évidemment la séquence du gène *ecf* à partir de laquelle le dessin des oligos a été effectué, avec un pourcentage de recouvrement de 100 % associé à un score total élevé (126,0) et une faible E-value ($1,5 \times 10^{-2}$). Les deux autres espèces sont *Cleistogenes songorica* (plante spermatophyte) et *Streptosporangium roseum* (actinobactérie) mais les E-value associées (respectivement $2,2 \times 10^0$ et $7,6 \times 10^0$) sont trop élevées pour que l'alignement soit fiable et les pourcentages de recouvrement sont extrêmement bas (respectivement 30 % et 29 %).

Vis-à-vis de la validation expérimentale, les résultats démontrent que deux espèces sont amplifiées : le modèle choisi *Thermobifida fusca* mais aussi *Thermobifida alba*. Dans le Tableau 9, que ce soit à concentrations faibles ou élevées, les deux espèces sortent à un C_T inférieur à 25 cycles. Si l'on regarde les souches à concentrations basses (*), la souche *Thermobifida fusca* (DSMZ 47792) avec une concentration en ADN de $8,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sort à un C_T de 14,89 cycles ; avec une concentration de $7,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$, l'espèce *Thermobifida alba* (DSMZ 43795) sort à 21,89 cycles. Pour les 31 autres espèces testées ayant le même ordre de concentration, 10 sortent avec un C_T supérieur à 35 cycles et les 22 autres avec un C_T supérieur à 40 cycles (ND). Si l'on regarde les souches à concentrations plus élevées (**), la souche *Thermobifida fusca* (ATCC™ BAA-629) de concentration $13,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sort à 17,38 cycles. Les souches environnementales *Thermobifida alba* (arbitrairement nommées WT 01 et WT 02) à $12,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $13,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sortent respectivement à 23,15 et 21,29 cycles. Pour les 57 autres espèces testées ayant le même ordre de concentration, 10 sortent avec un C_T supérieur à 35 cycles, les autres ayant un C_T supérieur à 40 cycles.

Tableau 9. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides Tfu F374-R472/S419 testés sur 94 souches microbiennes. DSMZ, CIP, UMIP, ATCC et IHEM : souches de collection ; WT : souches sauvages ; ND (non détectée) : amplification supérieure à 40 cycles ; concentration en ADN comprise entre 1,5 et 9,7 µg.mL⁻¹ (*) ou entre 10,0 et 18,0 µg.mL⁻¹ (**); en gras : souches supposées être amplifiées.

ESPÈCES	C _T
<i>Thermobifida fusca</i> [DSMZ 43792]*/ [ATCC BAA-629]**	< 25
<i>Thermobifida alba</i> [DSMZ 43795]* / [WT 01 et 02]**	< 25
<i>Bacillus atropheus</i> [CIP 107159]**	30 < < 35
<i>Aspergillus niger</i> [UMIP 1431.83]**	> 35
<i>Bacillus licheniformis</i> [DSMZ 13]*	> 35
<i>Bacillus pumilus</i> [DSMZ 27]*	> 35
<i>Enterococcus hirae</i> [CIP 58.55]**	> 35
<i>Escherichia coli</i> [CIP 53.126]*	> 35
<i>Laceyella putida</i> [DSMZ 44608]*	> 35
<i>Nocardiosis composta</i> [DSMZ 44551]*	> 35
<i>Saccharomonospora cyanea</i> [DSMZ 44106]*	> 35
<i>Saccharomonospora glauca</i> [DSMZ 43769 et DSMZ 43770]*	> 35
<i>Saccharomonospora viridis</i> [WT 01]**	> 35
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> [DSMZ 40313]*	> 35
<i>Streptomyces cellulosae</i> [WT 02]**	> 35
<i>Streptomyces griseoflavus</i> [IHEM 14577]*	> 35
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 07 et 11]**	> 35
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [WT 03 et 05]**	> 35
<i>Brevibacillus borstelensis</i> [WT 01]**	ND
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 02 et 06]* / [WT 03 à 05 et 07 à 09]**	ND
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 02]* / [WT 01, 03 et 04]**	ND
<i>Micromonospora halophytica</i> [ATCC 27596]	ND
<i>Nocardiosis alba</i> [DSMZ 43377, DSMZ 44552 et WT 06]* / [WT 01 à 05, 07 et 08]**	ND
<i>Nocardia carnea</i> [WT 01]**	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [CIP 82.118]**	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> [CIP 69.13]	ND
<i>Saccharomonospora azurea</i> [DSMZ 44631]* / [WT 01 à 04]**	ND
<i>Saccharomonospora caesia</i> [DSMZ 43068]*	ND
<i>Saccharomonospora glauca</i> [WT 03 et 05]* / [WT 01, 02 et 04]**	ND
<i>Saccharomonospora viridis</i> [DSMZ 43017]*	ND
<i>Saccharopolyspora reactivirgula</i> [DSMZ 43747]*	ND
<i>Saccharopolyspora</i> sp. [WT 01]**	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> [CIP 4.83]**	ND
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> [ATCC 3004]*	ND
<i>Streptomyces californicus</i> [ATCC 3312]*	ND
<i>Streptomyces cellulosae</i> [WT 01]**	ND
<i>Streptomyces coelicolor</i> [DSMZ 40233]*	ND
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 03 et 10]* / [WT 01, 02, 04 à 06, 08, 09 et 12 à 15]**	ND
<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> [WT 01]**	ND
<i>Thermoactinomyces intermedius</i> [DSMZ 43846]*	ND
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [ATCC 43649 et WT 01]* / [WT 02, 04, 06, 07, 08, 09 et 11]**	ND

2.2.2.3 Oligos SM fw8-rev9/p6

Tout d'abord concernant la validation théorique des oligos, le fait de travailler sur des oligos spécifiques d'un groupe et non plus d'une espèce et qui plus est sur le gène de l'ARNr23S rend plus difficile la conclusion de l'alignement des séquences par BLAST. En effet, de très nombreuses espèces mésophiles de streptomycètes semblent être amplifiées par ces oligos ; les E-values sont très faibles (donc les alignements sont fiables) mais les pourcentages de recouvrement sont plus faibles que ceux rencontrés précédemment (de l'ordre de 70 %). Néanmoins, s'il y a de nombreux streptomycètes mésophiles, les alignements font aussi apparaître bon nombre d'autres espèces telles que *Streptacidiphilus* sp. (actinobactérie appartenant à la famille des *Streptomycetaceae*, tout comme les *Streptomyces*), *Kitasatospora* sp. (*Streptomycetaceae*) ou encore *Frankia* sp. (également une *Actinobacteria*) pour ne citer qu'elles.

C'est pourquoi les conclusions porteront essentiellement sur l'étude de spécificité sur souches environnementales dont les conclusions restent toutefois mitigées. D'après le Tableau 10, nous pouvons voir que 18 espèces de streptomycètes mésophiles ont été testées (*Streptomyces* sp. WT 03, WT 06, WT 08, WT 11 et WT 14 étant des espèces thermophiles). Sur ces 18 espèces, 13 sont amplifiées avec un C_T inférieur à 25 cycles, 3 avec un C_T compris entre 30 et 35 cycles et les deux dernières sont détectées avec un C_T supérieur à 35 cycles. Et inversement, 2 streptomycètes thermophiles sont détectés à des cycles inférieurs à 25, 10 souches appartenant à un autre genre ainsi qu'un autre streptomycète thermophile sont détectées à des cycles compris entre 30 et 35 et avec une importance moindre, 32 espèces sortent avec un cycle supérieur à 35 (dont seules 2 sont des *Streptomyces*). Les résultats sont donc à interpréter avec précaution.

Tableau 10. Résultats de l'étude de spécificité des oligonucléotides SM fw8-rev9/p6 testés sur 94 souches microbiennes. DSMZ, CIP, UMIP, ATCC et IHEM : souches de collection ; WT : souches sauvages ; ND (non détectée) : amplification supérieure à 40 cycles ; concentration en ADN comprise entre 1,5 et 9,7 µg.mL⁻¹ (*) ou entre 10,0 et 18,0 µg.mL⁻¹ (**); en gras : souches supposées être amplifiées.

ESPÈCES	C _T
<i>Streptomyces californicus</i> [ATCC 3312]*	< 25
<i>Streptomyces cellulosa</i> [WT 01]**	< 25
<i>Streptomyces coelicolor</i> [DSMZ 40233]*	< 25
<i>Streptomyces griseoflavus</i> [IHEM 14577]*	< 25
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 01, 02, 04, 05, 07, 09, 13 et 15, WT 06 et WT 14]**	< 25
<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> [WT 01]**	< 25
<i>Bacillus pumilus</i> [DSMZ 27]*	30 < < 35
<i>Brevibacillus borstelensis</i> [WT 01]**	30 < < 35
<i>Laceyella putida</i> [DSMZ 44608]*	30 < < 35
<i>Saccharomonospora azurea</i> [WT 04]**	30 < < 35
<i>Saccharomonospora caesia</i> [DSMZ 43068]*	30 < < 35
<i>Saccharomonospora viridis</i> [WT 01]**	30 < < 35
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> [ATCC 3004 et DSMZ 40313]*	30 < < 35
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 08 et WT 12]**	30 < < 35
<i>Thermoactinomyces intermedius</i> [DSMZ 43846]*	30 < < 35
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [ATCC 43649]*	30 < < 35
<i>Thermobifida alba</i> [DSMZ 43795]* / [WT 01]**	30 < < 35
<i>Aspergillus niger</i> [UMIP 1431.83]**	> 35
<i>Bacillus atropheus</i> [CIP 107159]**	> 35
<i>Bacillus licheniformis</i> [DSMZ 13]*	> 35
<i>Enterococcus hirae</i> [CIP 58.55]**	> 35
<i>Escherichia coli</i> [CIP 53.126]*	> 35
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 02]*	> 35
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 03 et 04]**	> 35
<i>Micromonospora halophytica</i> [ATCC 27596]*	> 35
<i>Nocardiopsis alba</i> [DSMZ 43377 et DSMZ 44552]* / [WT 04, 07 et 08]**	> 35
<i>Nocardiopsis composta</i> [DSMZ 44551]*	> 35
<i>Saccharomonospora azurea</i> [DSMZ 44631]* / [WT 01 et 02]**	> 35
<i>Saccharomonospora glauca</i> [DSMZ 43769 et WT 03 et 05]* / [WT 02 et 04]**	> 35
<i>Saccharomonospora viridis</i> [DSMZ 43017]*	> 35
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> [DSMZ 43747]*	> 35
<i>Saccharopolyspora</i> sp. [WT 01]**	> 35
<i>Streptomyces cellulosa</i> [WT 02]**	> 35
<i>Streptomyces</i> sp. [WT 03 et WT 10]* / [WT 11]**	> 35
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [WT 01]	> 35
<i>Thermobifida alba</i> [WT 02]**	> 35
<i>Thermobifida fusca</i> [DSMZ 43792]* / [ATCC BAA-629]**	> 35
<i>Laceyella sacchari</i> [WT 06]* / [WT 03 à 05 et 07 à 09]**	ND
<i>Marinactinospora thermotolerans</i> [WT 02]* / [WT 01]**	ND
<i>Nocardiopsis alba</i> [WT 06]* / [WT 01 à 03 et 05]**	ND
<i>Nocardia carnea</i> [WT 01]**	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [CIP 82.118]**	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> [CIP 69.13]*	ND
<i>Saccharomonospora azurea</i> [WT 03]**	ND
<i>Saccharomonospora cyanea</i> [DSMZ 44106]*	ND
<i>Saccharomonospora glauca</i> [DSMZ 43770]* / [WT 01]**	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> [CIP 4.83]**	ND
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> [WT 02 à 09 et 11]**	ND

2.2.3 GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE

Le clonage moléculaire des séquences d'intérêt a permis l'obtention de gammes étalons de concentrations variant de 1 à 10^8 copies de gènes par microlitre de solution, permettant d'envisager un minimum de 5 points par droite étalon. Un dosage spectrophotométrique préalable a permis de vérifier la pureté des extraits plasmidiques à l'origine de ces gammes et de juger ceux-ci comme relativement purs.

2.2.3.1 Limites de quantification et répétabilité

Afin de déterminer la limite de quantification associée à la technique de PCR temps réel, nous avons réalisé une gamme étalon pour chacune des 3 espèces ou groupe d'espèces recherchées, à 8 points de gamme et 10 répétitions par point (Figure 17).

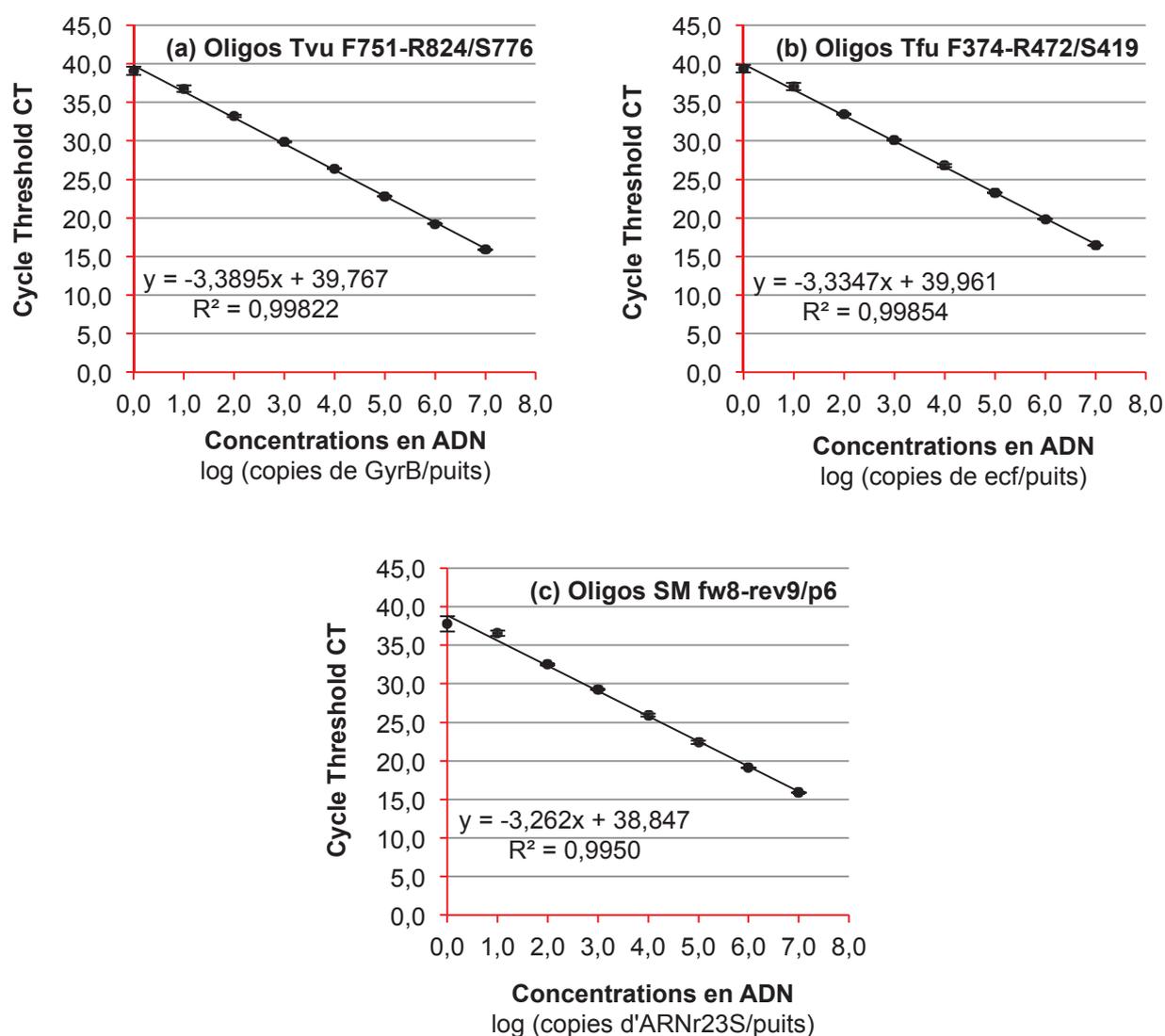


Figure 17. Gammes étalons mises en place pour la détection et l'amplification des portions de gène des actinomycètes recherchés : portion de la séquence *GyrB* de *Thermoactinomyces vulgaris* (a), portion de la séquence du facteur *ecf* de *Thermobifida fusca* (b) et portion de la séquence de l'ARNr 23S de *Streptomyces californicus* (c). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % associés aux valeurs.

Pour la gamme Tvu, seuls les échantillons du dernier point de gamme (correspondant à la concentration la plus faible) n'ont pas été correctement détectés avec seulement 4 échantillons présentant une amplification sur les 10. Pour tous les autres échantillons, une concentration en ADN a été détectée. De plus, une régression entre les variables « log de la concentration en ADN » et « threshold cycle » permet de mettre en évidence une relation statistiquement significative et forte ($n = 8$; $r = -0,9991$; $p = 0,0000$) entre les deux grandeurs (Figure 17a). Enfin, les intervalles de confiance associés aux valeurs sont extrêmement faibles ce qui démontre la répétabilité des points constituant la gamme étalon.

Les résultats observés sont similaires pour la gamme Tfu (Figure 17b) : tous les échantillons sont détectés en qPCR hormis 4 échantillons du dernier point de gamme (plus basse concentration). Une régression entre les deux variables met en évidence une relation statistiquement significative et forte ($n = 8$; $r = -0,9993$; $p = 0,0000$) entre les deux grandeurs. Ici aussi, les intervalles de confiance associés aux valeurs sont extrêmement faibles et démontrent la répétabilité des points de la gamme étalon.

Pour la gamme SM, seuls 3 échantillons sur les 10 du dernier point de gamme (1 copie du gène par puits) présentent une amplification. De plus, aucune quantité d'ADN n'a été détectée pour 2 autres échantillons (un des 10 réplicats du point de gamme à 10^4 copies par puits et un des réplicats à 10^5 copies par puits). Hormis ces points, tous les autres présentent une amplification. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse d'une erreur de manipulation pour ces deux derniers échantillons. La régression entre les deux variables formant la gamme permet de mettre en évidence une relation statistiquement significative et forte ($n = 8$; $r = 0,9975$; $p = 0,0000$) entre les deux grandeurs (Figure 17c). Les intervalles de confiance associés aux valeurs sont tout aussi faibles que pour les deux précédents modèles démontrant ainsi toute la répétabilité associée à la gamme.

Les résultats obtenus, par le biais des corrélations linéaires observées, démontrent donc que les limites de quantification sont très basses dans les 3 cas, avec une limite à 10 copies du gène par puits de réaction soit 5 copies du gène par microlitre d'extrait d'ADN. Les espèces d'intérêt pourront donc être détectées dans un échantillon même si elles sont présentes en très faible quantité. En plus d'avoir pu associer la technique à une limite de quantification et conclure à une grande sensibilité de la méthode, nous avons également pu conclure à une très bonne répétabilité des résultats (intervalles de confiance très faibles).

2.2.3.2 Reproductibilité des gammes

Afin de déterminer la reproductibilité des gammes étalons au cours du temps, nous avons moyenné les C_T des points de toutes les gammes obtenues au cours des travaux de la thèse, soit 54 gammes Tvu, 51 gammes Tfu et 48 gammes Sca (Figure 18). Les barres d'erreurs (intervalles de confiance à 95 %) associées aux moyennes obtenues sont extrêmement faibles et ce, quelque soit la gamme moyennée parmi les 3 réalisées. Toutes gammes confondues, l'intervalle de confiance le plus élevé ne dépasse pas 0,92, ce qui équivaut à un écart-type de 3,35. Les extraits d'ADN utilisés pour la réalisation des gammes étalons de chaque microplaque PCR sont donc stables dans le temps (ici une période de 2 ans), ce qui signifie que les gammes étalons utilisées sont très reproductibles d'une PCR à l'autre.

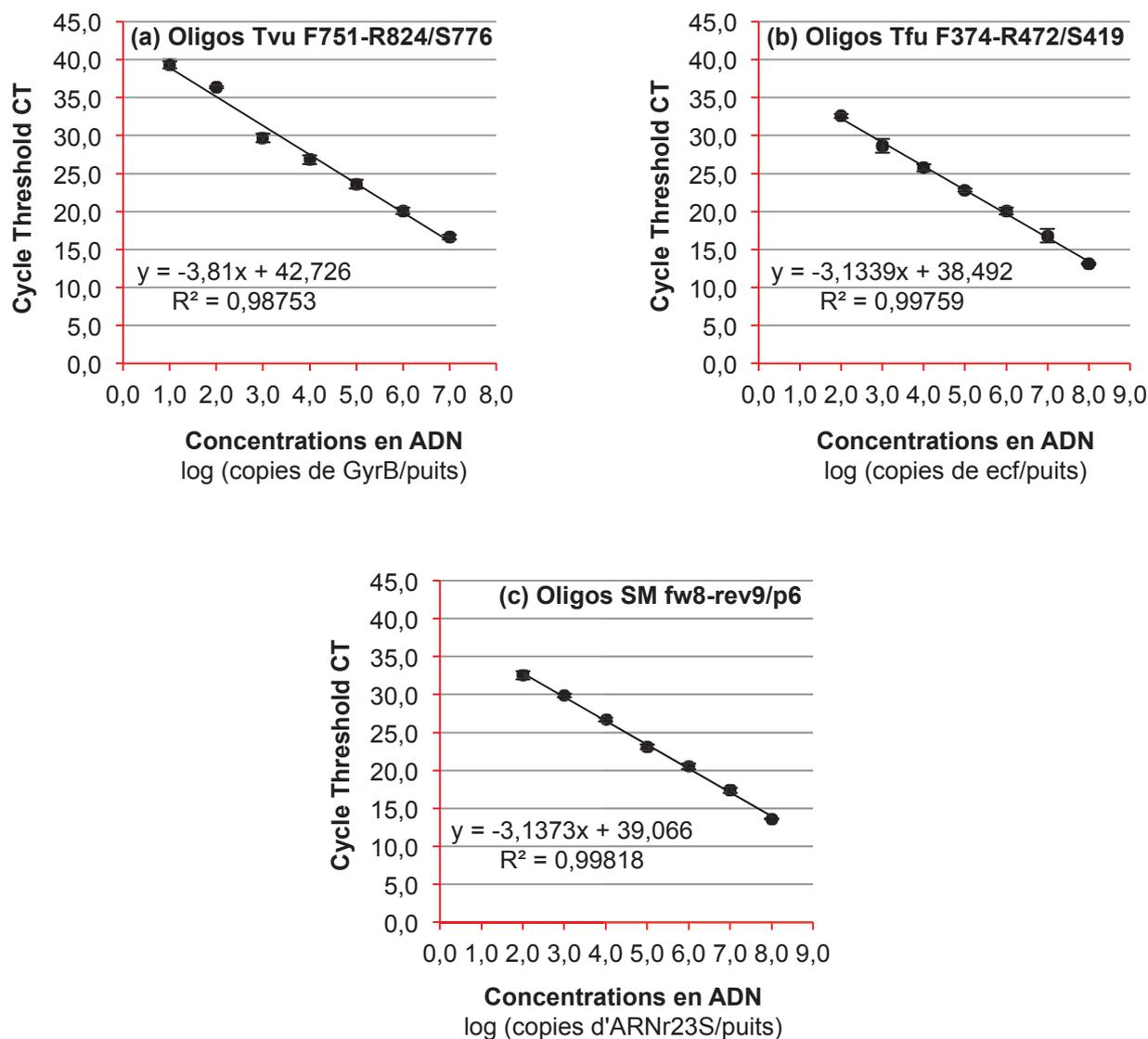


Figure 18. Gammes étalons moyennées respectivement à partir des valeurs de 54, 51 et 48 gammes réalisées au cours des travaux de la thèse sur la portion de la séquence *GyrB* de *Thermoactinomyces vulgaris* (a), sur la portion de la séquence du facteur *ecf* de *Thermobifida fusca* (b) et sur celle de la séquence de l'ARNr 23S de *Streptomyces californicus* (c). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % associés aux valeurs.

2.2.4 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR

2.2.4.1 Optimisation de la température d'hybridation-élongation

Pour chacun des modèles étudiés, un gradient de 8 températures d'hybridation-élongation comprises entre 57,6 °C et 63,3 °C a été testé afin de voir quelle température permet l'obtention des meilleures efficacités et donc par extension, permet d'optimiser les PCR.

Concernant les oligos Tvu, les efficacités moyennes relevées sont toutes valides puisque comprises entre 80 % et 120 %, qui sont respectivement les limites inférieure et supérieure d'efficacité à ne pas dépasser. Il s'agit en effet d'une des 3 conditions de validation d'une PCR. Ces efficacités s'étendent ici entre 106,3 ($\pm 15,2$) % et 114,7 ($\pm 15,2$) % (Figure 19, résultats de gauche). Néanmoins, une analyse de la variance sur ces résultats démontre qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des

efficacités obtenues en fonction des températures utilisées, le test prenant en compte les trois réplicats réalisés. La probabilité p pour ce test F ($F = 0,18$) étant de 0,9855, nous aurions 98,5 % de risques de nous tromper en affirmant qu'il y a une différence entre les efficacités moyennes. Les oligonucléotides Tvu F751-R824/S776 ont été dessinés de manière à fonctionner à une température d'hybridation de 58 °C. Cette donnée est fournie par le logiciel Primer Express® d'Applied Biosystems ayant servi au dessin des oligonucléotides. Le même calcul avec le thermocycleur CFX96 de Biorad (sur lequel les PCR temps réel sont réalisées) fournit la valeur de 58,6 °C. De ce fait, les efficacités n'étant pas significativement différentes, la température retenue est la température d'hybridation (T_a pour annealing temperature) du couple amorces/sonde fourni par le logiciel qui nous a permis de les dessiner, à savoir 58 °C.

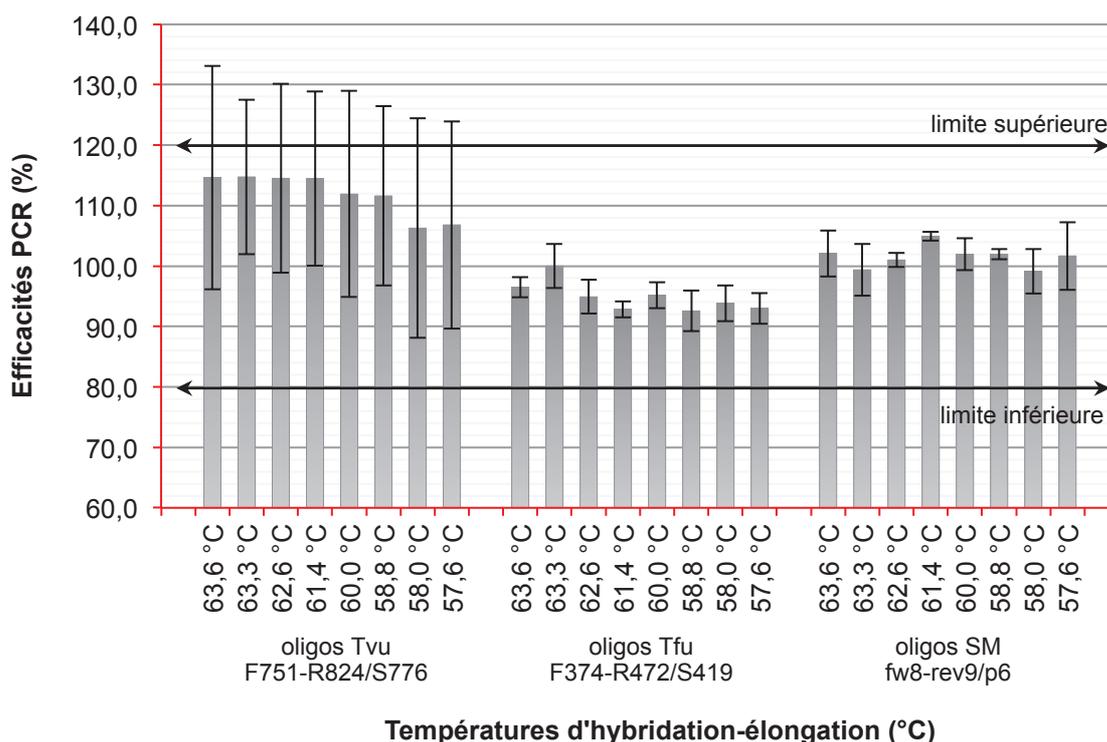


Figure 19. Efficacités PCR obtenues pour un gradient de 8 températures d'hybridation-élongation différentes, pour chacun des 3 modèles de l'étude. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 3 répétitions. Les limites représentent les efficacités minimale et maximale pour lesquelles une PCR est validée.

La même étude sur les oligos Tfu fournit en revanche des résultats différents. De la même façon que précédemment, toutes les efficacités relevées sont comprises entre 80 % et 120 %. Elles s'étendent entre 92,6 ($\pm 2,9$) % et 100,0 ($\pm 3,2$) % (Figure 19, résultats centraux), les écarts-types et intervalles de confiance étant beaucoup plus faibles que ceux relevés pour l'espèce *T. vulgaris*. En revanche, l'analyse de la variance et le test des étendues multiples réalisés sur ces valeurs montrent qu'il y a une différence entre les moyennes des efficacités obtenues en fonction des températures utilisées ($F = 3,35$; $p = 0,0215$). Les efficacités obtenues à la température de 63,3 °C sont significativement plus élevées que chacune des 7 autres. Donc, malgré le fait que le logiciel de dessin des oligos Tfu 374-R472/S419 fournisse un T_a à hauteur de 62 °C, c'est la température 63,3 °C qui est retenue comme température d'hybridation-élongation, dans le cadre de la quantification de *T. fusca* par PCR temps réel.

Pour finir, en ce qui concerne les oligos SM, au vu du graphique des résultats (Figure 19, résultats de droite), la température 61,4 °C semblerait allier une très bonne efficacité (la plus élevée par rapport aux autres obtenues) à un écart-type très faible avec 104,7 (\pm 0,7) %. Néanmoins, l'ANOVA réalisée sur les efficacités moyennes (toutes comprises entre 80 % et 120 % et associés à de faibles intervalles de confiance) démontre qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs ($F = 1,15$; $p = 0,3812$). Pour ce groupe, les oligos n'ont pas été dessinés, ils proviennent d'un travail de design et validation préalablement effectué par Rintala & Nevalainen (2006) ; la température alors utilisée par les auteurs était de 58 °C. Comme nos essais ne mettent pas en avant une température préférentielle, c'est donc la température de 58 °C qui est retenue pour la quantification des streptomycètes mésophiles par PCR temps réel.

2.2.4.2 Optimisation des pré-mix PCR

Comme pour l'optimisation de la température d'hybridation-élongation pour chacun des modèles étudiés, 8 différents pré-mix utilisés dans les mix réactionnels de PCR ont été testés afin de voir si la différence de composition de ces mix pouvait avoir ou non une influence sur les efficacités PCR (concentrations en MgCl₂, concentrations en KCl, présence ou absence de référence interne...).

Avant quelque analyse des résultats, nous pouvons voir sur la Figure 20 que le mix n°8 amène à des efficacités PCR non validables car trop faibles (inférieures à 80 %) et associées à des intervalles de confiance beaucoup trop élevés (résultats non répétables). C'est pourquoi ce mix est exclu avant même l'analyse statistique des résultats.

Concernant les résultats du modèle *T. vulgaris* (Figure 20, résultats de gauche), une ANOVA associée à un test des étendues multiples démontre qu'il y a une différence statistiquement significative ($F = 6,28$; $p = 0,0023$) entre les moyennes des efficacités obtenues en fonction des pré-mix utilisés. Le test révèle qu'avec les mix 1 et 4, les efficacités sont en moyenne plus faibles qu'avec les mix 3, 5, 6 et 7 et qu'avec le mix 2, elles sont plus faibles qu'avec utilisation des mix 3, 5 et 7. Néanmoins, les autres mix sont équivalents en termes d'efficacité PCR. Vis-à-vis des résultats associés au modèle *T. fusca* (Figure 20, résultats au centre), les analyses montrent que le mix 6 permet l'obtention d'efficacités plus élevées qu'avec les mix 1, 2, 3, 4 et 7 ($F = 3,03$; $p = 0,0412$). Par contre, il est à noter la barre d'erreur (intervalle de confiance) associée à cette moyenne qui paraît un peu élevée. Enfin, concernant le dernier modèle des streptomycètes, les intervalles de confiance liés aux efficacités moyennes sont trop élevés pour que l'analyse de la variance puisse conclure à une quelconque différence statistique entre les valeurs ($F = 1,09$; $p = 0,4130$).

En conclusion, au vu des résultats obtenus (que ce soit en termes d'efficacités moyennes mais aussi de répétabilité de la mesure) et ne jugeant pas judicieux l'utilisation de 3 pré-mix différents en fonction des espèces ciblées, nous avons décidé d'utiliser le pré-mix n°1, qui est l'iQTM supermix (Bio-Rad®, USA).

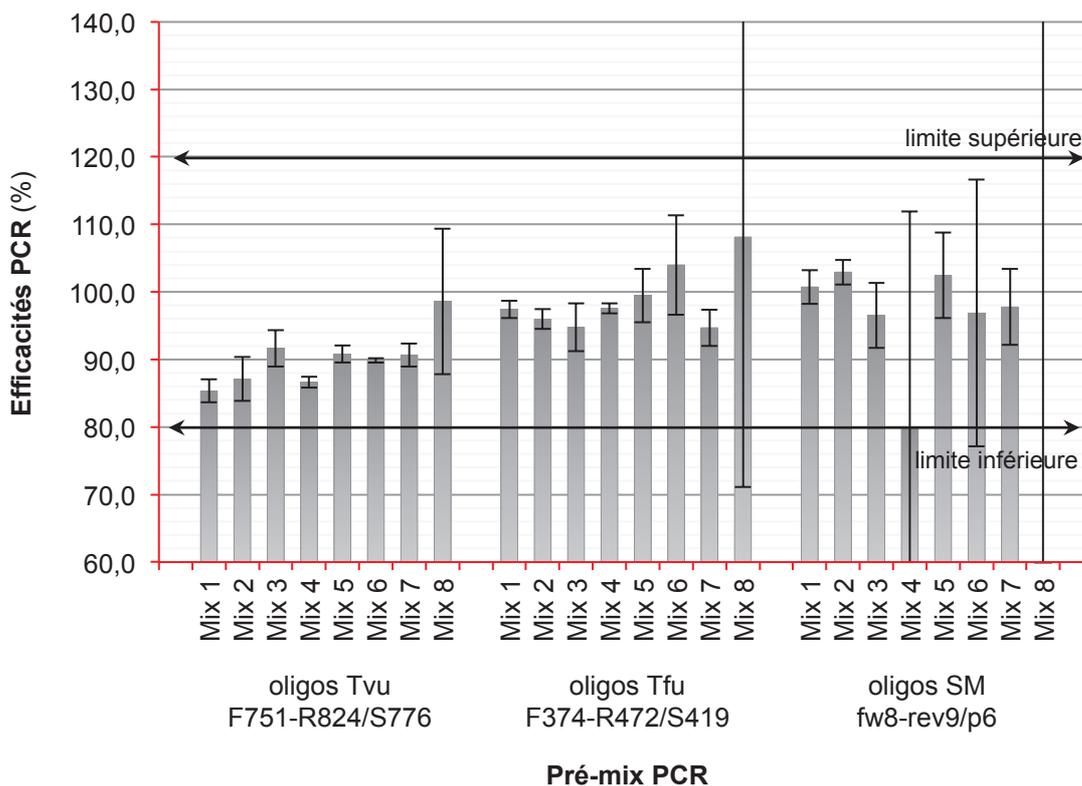


Figure 20. Efficacités PCR obtenues pour 8 différents pré-mix testés entrant dans la composition du mix PCR, pour chacun des 3 modèles de l'étude. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 3 répétitions. Les limites représentent les efficacités minimale et maximale pour lesquelles une PCR est validée. Par souci de commodité, les mix sont représentés par des numéros ; chacun est détaillé dans le paragraphe Matériel et méthode (2.1.5.3).

2.2.4.3 Optimisation des concentrations des oligonucléotides

De la même manière que pour optimiser la température d'hybridation-élongation pour chacun des modèles étudiés, une gamme de 8 concentrations en oligonucléotides dans le mix réactionnel de PCR a été testée afin de voir quelles concentrations permettent l'obtention des meilleures efficacités PCR.

Toutes les efficacités moyennes obtenues sont valides puisqu'elles sont comprises entre 80 % et 120 %, que ce soit pour le modèle *Thermoactinomyces vulgaris* où elles varient de 90,9 ($\pm 1,1$) % à 97,4 ($\pm 2,9$) % (Figure 21, résultats de gauche), pour les oligos Tfu où elles s'étalent de 96,6 ($\pm 1,6$) % à 101,5 ($\pm 1,8$) % (Figure 21, résultats du centre) ou pour les oligos SM où elles sont comprises entre 85,6 ($\pm 2,5$) % et 92,7 ($\pm 19,1$) % (Figure 21, résultats de droite). Les analyses de la variance réalisées permettent de conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des efficacités obtenues en fonction des concentrations en amorces et sonde testées, que ce soit pour Tvu ($F = 1,40$; $p = 0,2716$), Tfu ($F = 1,02$; $p = 0,4540$) ou SM ($F = 0,35$; $p = 0,9203$). De ce fait, il a été décidé que les concentrations retenues pour la réalisation du mélange réactionnel de PCR seraient celles préconisées par le fournisseur de l'essentiel du matériel utilisé pour les PCR (pré-mix, thermocycleur...), à savoir une concentration en amorces de 300 nM et une concentration en sonde de 200 nM.

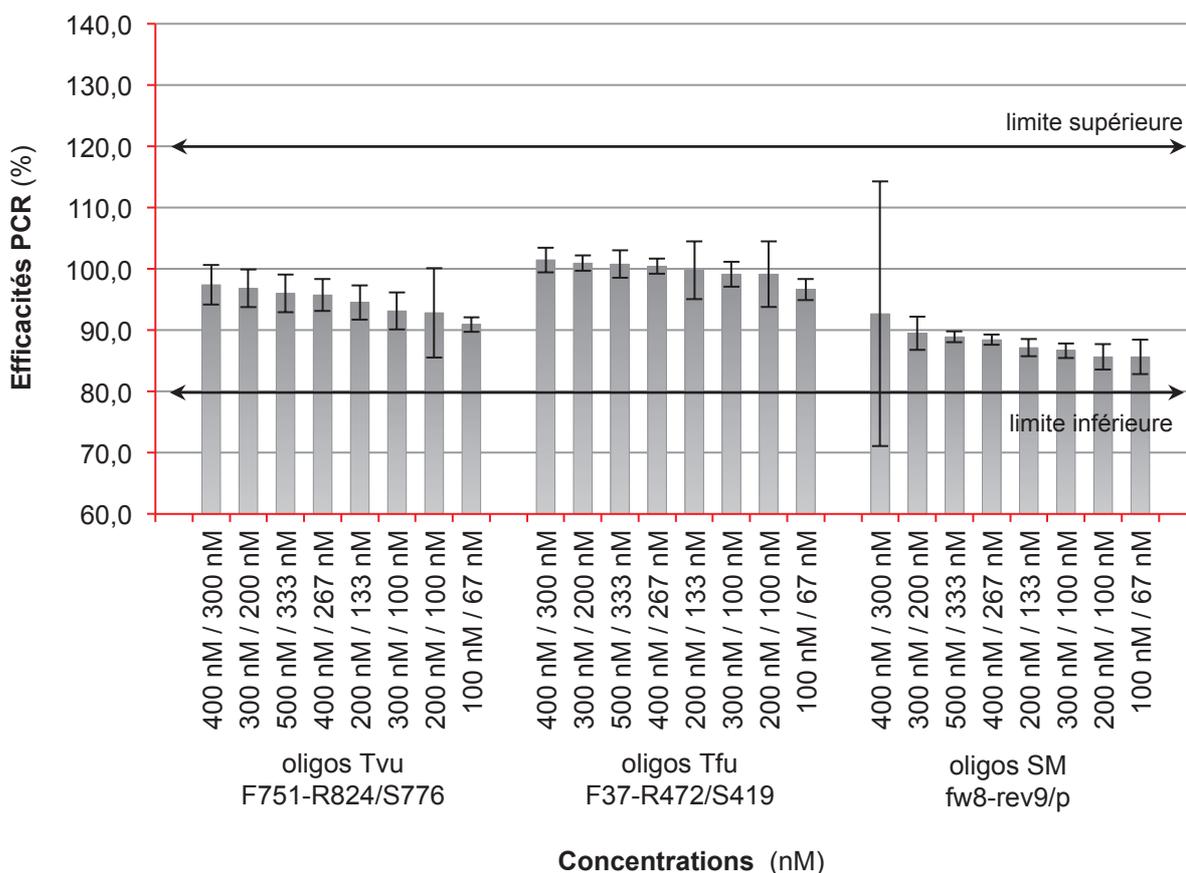


Figure 21. Efficacités PCR obtenues pour un gradient de concentrations en oligonucléotides, pour chacun des 3 modèles de l'étude. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 3 répétitions. Les limites représentent les efficacités minimale et maximale pour lesquelles une PCR est validée. La première concentration est celle des amorces, la seconde celle de la sonde.

2.2.5 COMPARAISON DE PROTOCOLES D'EXTRACTION D'ADN

Dans ce chapitre, la comparaison de 4 différents protocoles d'extraction d'ADN (basés sur l'utilisation de kits commercialisés), s'est faite à deux niveaux. Elle a tout d'abord été réalisée sur suspensions liquides pures de cellules de *T. vulgaris*, avant de passer à l'étude d'échantillons plus complexes, à savoir des bioaérosols environnementaux échantillonnés en plates-formes de compostage. Quelle que soit la matrice, les 4 protocoles ont été évalués sur la base des 3 critères que sont le taux de réponse, l'efficacité d'extraction et la répétabilité des mesures.

2.2.5.1 À partir de cultures liquides pures

Tout d'abord, au regard des résultats sur suspensions liquides (Figure 22), les 4 protocoles permettent l'obtention d'une réponse en concentrations d'ADN pour chacun des 3 réplicats des 6 suspensions. Le taux de réponse sur ces suspensions cellulaires ne nous apporte donc aucune information dans la mesure où il est de 100 % pour tous les échantillons testés. Ensuite, d'un point de vue efficacité d'extraction, l'utilisation du protocole B fournit des concentrations statistiquement plus faibles qu'avec les autres protocoles et ce, pour les suspensions S^0 ($p = 0,0000$), S^{-1} ($p = 0,0036$), S^{-2}

($p = 0,0032$), S^{-3} ($p = 0,0000$), S^{-4} ($p = 0,0000$) ou S^{-5} ($p = 0,0024$). Et, excepté pour la suspension S^0 où les concentrations obtenues sont statistiquement plus élevées ($p = 0,0000$) avec le protocole A, il n'y a aucune différence statistique entre les concentrations obtenues avec les protocoles C et D et le protocole A. Enfin, cette absence de différence significative s'explique aussi par les écarts-types et coefficients de variation associés aux résultats avec les protocoles C et D, qui sont relativement élevés. Sur ces essais là, les résultats issus de l'extraction avec le protocole A sont les plus répétables. De ce fait, la comparaison des protocoles d'extraction sur suspensions cellulaires basée sur les paramètres « taux de réponse », « efficacité d'extraction » et « répétabilité de la méthode », ne permet pas le choix de l'un ou l'autre des 4 protocoles, même si a priori le protocole B (kit MO BIO) ne semblerait pas être retenu. C'est pourquoi la comparaison n'a pas été poursuivie sur les cultures cellulaires des autres modèles mais directement sur bioaérosols environnementaux.

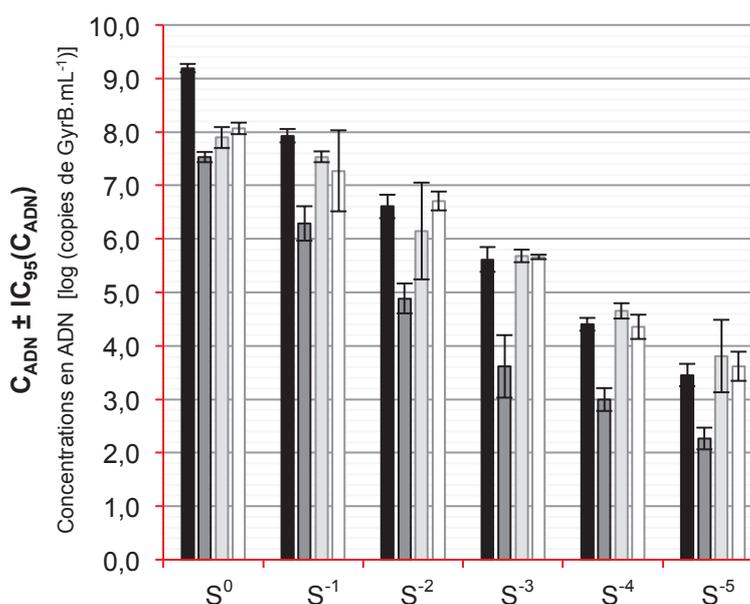


Figure 22. Comparaison de 4 protocoles d'extraction d'ADN, sur 6 suspensions (S) liquides de cellules de *T. vulgaris*. ■ Protocole A (MP Biomedicals), ■ Protocole B (MOBIO), ■ Protocole C (Qiagen pour bactéries Gram négatif) et □ Protocole D (Qiagen pour bactéries Gram positif). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 3 répétitions.

2.2.5.2 À partir de bioaérosols environnementaux

✦ Utilisation des oligos Tvu

En revanche, la même comparaison sur des échantillons de bioaérosols environnementaux (Figure 23) permet une toute autre conclusion. Tout d'abord, au regard des taux de réponse, nous pouvons voir que l'on obtient une concentration en ADN non nulle pour tous les échantillons extraits selon le protocole A (taux de réponse de 100 %). Ce taux de réponse n'est plus que de 70,6 % avec le protocole B puisque les échantillons B_2 , B_3 et B_7 à B_9 ne présentent pas de concentrations. Il tombe à 41,2 % avec les protocoles C et D puisque seulement 7 des 17 échantillons fournissent une réponse en concentrations en ADN (B_2 , B_7 à B_9 , B_{11} , B_{13} et B_{14} avec le protocole C ; B_7 à B_9 , B_{11} , et B_{13} à B_{15} avec le protocole D). Cela signifie qu'en conditions réelles d'exposition, extraire l'ADN d'un échantillon avec l'un des deux protocoles C ou D revient à ne pas retrouver le microorganisme recherché dans 58,8 % des cas, même si

celui-ci est présent. Le taux de réponse étant un paramètre fondamental pour la suite de l'analyse, il est impossible d'envisager de travailler avec des protocoles menant à de tels résultats. C'est pourquoi, avant même de conclure quant à leur spécificité d'extraction ou leur répétabilité de la mesure, ces deux protocoles seront exclus. Ensuite, si l'on compare les deux protocoles restants (A et B) sur la base de leur efficacité d'extraction de l'ADN (Figure 24), il est possible de voir d'après l'organisation des échantillons autour de la droite $y = x$ que les concentrations obtenues avec le protocole A sont toujours supérieures à celle obtenues avec le B. Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur associée à un test des étendues multiples permet de vérifier statistiquement que les concentrations obtenues avec le protocole B sont significativement plus faibles ($F = 91,18$; $p = 0,0000$) que celles obtenues avec le protocole A et ce, pour tous les 12 échantillons présentant une réponse ($0,0000 < p < 0,0370$). De plus, les rapports entre la concentration obtenue avec le protocole A et celle obtenue avec le protocole B varient selon les échantillons. Le protocole A peut permettre d'extraire de 18,1 à 1426,5 fois plus d'ADN que le protocole B. Pour finir, malgré le fait que les résultats soient représentés en valeurs logarithmiques, les barres d'erreur associées aux valeurs obtenues avec le protocole A sont négligeables comparé à celles obtenues avec les 3 autres protocoles. Les résultats sont donc très répétables.

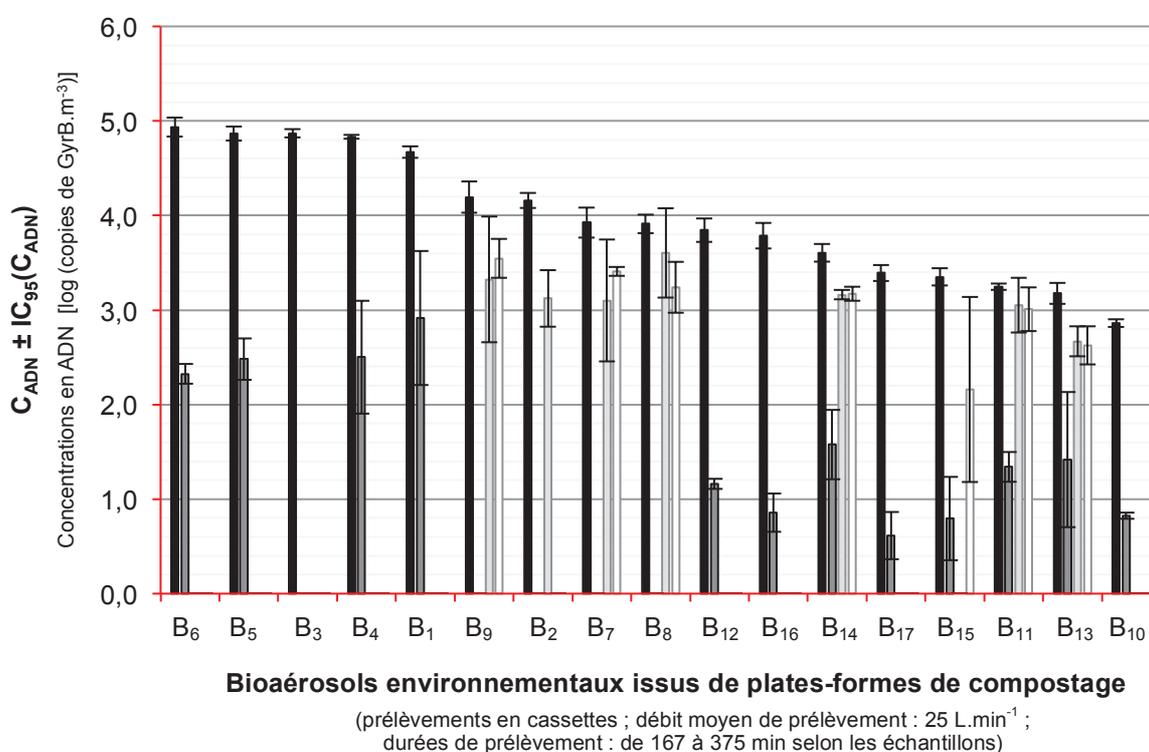


Figure 23. Comparaison de 4 protocoles d'extraction d'ADN basée sur la quantification de *T. vulgaris* par qPCR, sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B_i) échantillonnés en plates-formes de compostage. ■ Protocole A (MP Biomedicals), ■ Protocole B (MOBIO), ■ Protocole C (Qiagen pour bactéries Gram négatif) et □ Protocole D (Qiagen pour bactéries Gram positif). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 2 ou 3 répétitions.

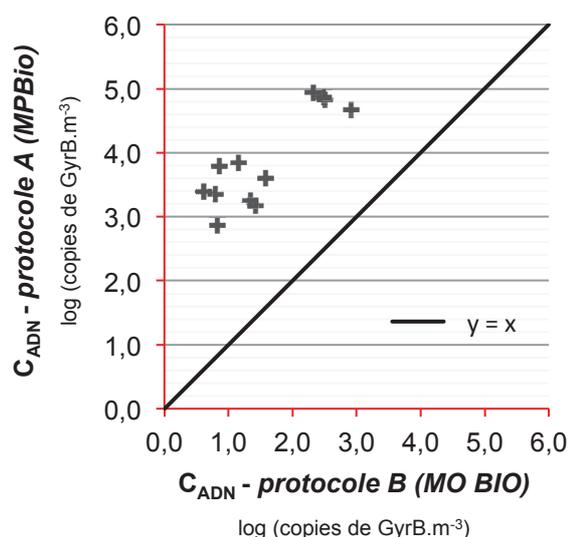


Figure 24. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la quantification de *T. vulgaris* par qPCR, sur les bioaérosols environnementaux (n = 12).

De ce fait, la comparaison des 4 protocoles d'extraction d'ADN n'a pu faire l'objet de conclusions précises que grâce à l'étude des échantillons de bioaérosols environnementaux (l'étude sur suspensions cellulaires n'ayant pas apporté de réelles conclusions). Lorsqu'il s'agit de quantifier *Thermoactinomyces vulgaris* par qPCR, le protocole A basé sur l'utilisation du kit MPBio est celui qui présente le meilleur taux de réponse (100 %). Il permet l'obtention d'extraits d'ADN significativement plus concentrés qu'avec les trois autres protocoles. De plus, ce kit est celui qui permet l'obtention de la meilleure répétabilité, les barres d'erreur (intervalles de confiance à 95 %) associées aux concentrations étant extrêmement faibles.

✦ Utilisation des oligos Tfu

Ce chapitre là reflète en tout point l'étude précédente (mêmes protocoles testés, mêmes échantillons utilisés...), hormis le fait que les oligos utilisés pour la PCR temps réel sont les oligos Tfu. Ayant mis en évidence ci-dessus que la comparaison des protocoles n'avait pu être déterminée que sur l'étude des bioaérosols environnementaux, nous ne l'avons pas réitéré sur des suspensions liquides de cellules de *Thermobifida fusca*.

Les résultats ci-dessous (Figure 25) permettent d'établir une première conclusion vis-à-vis des taux de réponses. De la même manière que précédemment, une concentration en ADN non nulle est obtenue pour tous les échantillons extraits selon le protocole A (taux de réponse de 100 %). Ce taux est de 94,1 % avec le protocole B (soit 16 échantillons sur 17), de 41,2 % avec le protocole C (7 échantillons sur 17) et de 47,1 avec le protocole D (8 échantillons sur 17). Les protocoles C et D sont donc d'ores et déjà écartés de l'analyse de par leur taux de réponse beaucoup trop faibles. Ensuite, la comparaison des deux protocoles A et B restants vis-à-vis de leur spécificité d'extraction de l'ADN (Figure 26) donne la même conclusion que pour l'analyse basée sur la quantification de *T. vulgaris* : les concentrations obtenues avec le protocole A sont significativement plus élevées ($F = 152,35$; $p = 0,0000$) que celles obtenues avec le protocole B et ce, pour l'ensemble des 16 échantillons présentant une réponse ($0,0000 < p < 0,0038$). De plus, là aussi les rapports entre la concentration obtenue avec le protocole A et

celle obtenue avec le protocole B varie selon les échantillons. Le protocole A peut permettre d'extraire de 30,1 à 1986,6 fois plus d'ADN que le protocole B. Et pour finir, les barres d'erreur (intervalles de confiance) associées aux valeurs obtenues avec le protocole A sont extrêmement faibles, notamment au regard des autres protocoles, d'où une bonne répétabilité liée à ce protocole.

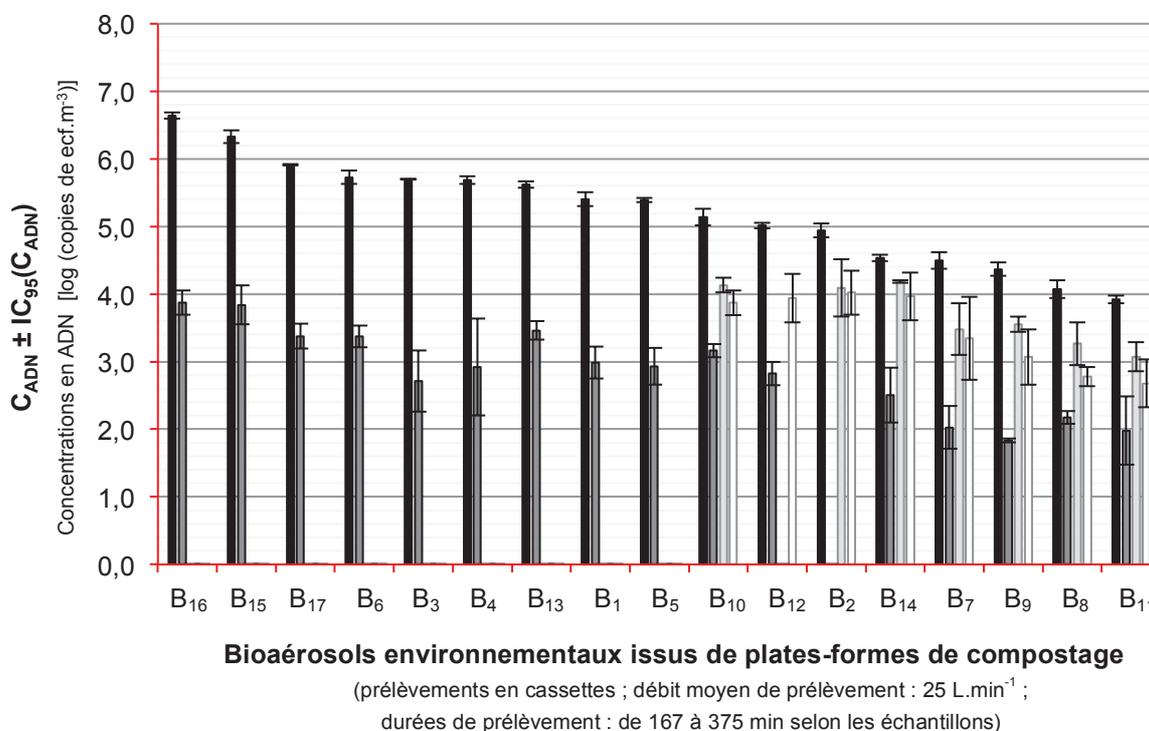


Figure 25. Comparaison de 4 kits commercialisés d'extraction d'ADN basée sur la qPCR avec utilisation des oligos Tfu, sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B_i) échantillonnés en plates-formes de compostage. ■ Protocole A (MP Biomedicals), ■ Protocole B (MOBIO), ■ Protocole C (Qiagen pour bactéries Gram négatif) et □ Protocole D (Qiagen pour bactéries Gram positif). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 2 ou 3 répétitions.

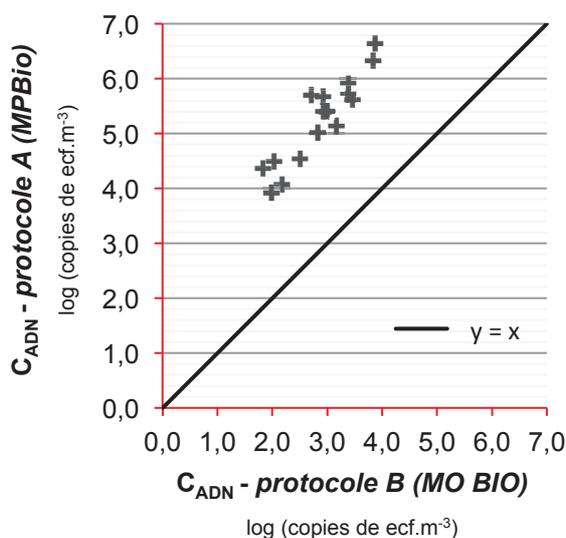


Figure 26. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la qPCR avec utilisation des oligos Tfu, sur les bioaérosols environnementaux (n = 16).

La conclusion concernant la comparaison des 4 protocoles d'extraction pour la quantification des *Thermobifida fusca* (et *Thermobifida alba*) par qPCR reste en tout point la même que précédemment : le protocole A (basé sur l'utilisation du kit MPBio) est celui qui présente le meilleur taux de réponse (100 %). Il est également celui qui fournit la meilleure efficacité d'extraction, associée à une très bonne répétabilité.

✦ Utilisation des oligos SM

La dernière comparaison a été réalisée, ici aussi, uniquement à partir de bioaérosols environnementaux, analysés par PCR temps réel avec utilisation des oligos SM. Les résultats présentés (Figure 27) permettent à nouveau d'éliminer les deux protocoles C et D de l'analyse au vu de leur taux de réponse. En effet, si les protocoles A et B permettent d'obtenir une concentration d'ADN pour les 17 échantillons (soit un taux de réponse de 100 %), le taux n'est que de 52,9 % pour le protocole C et de 58,8 pour le protocole D avec respectivement 9 et 10 échantillons présentant une concentration en ADN non nulle.

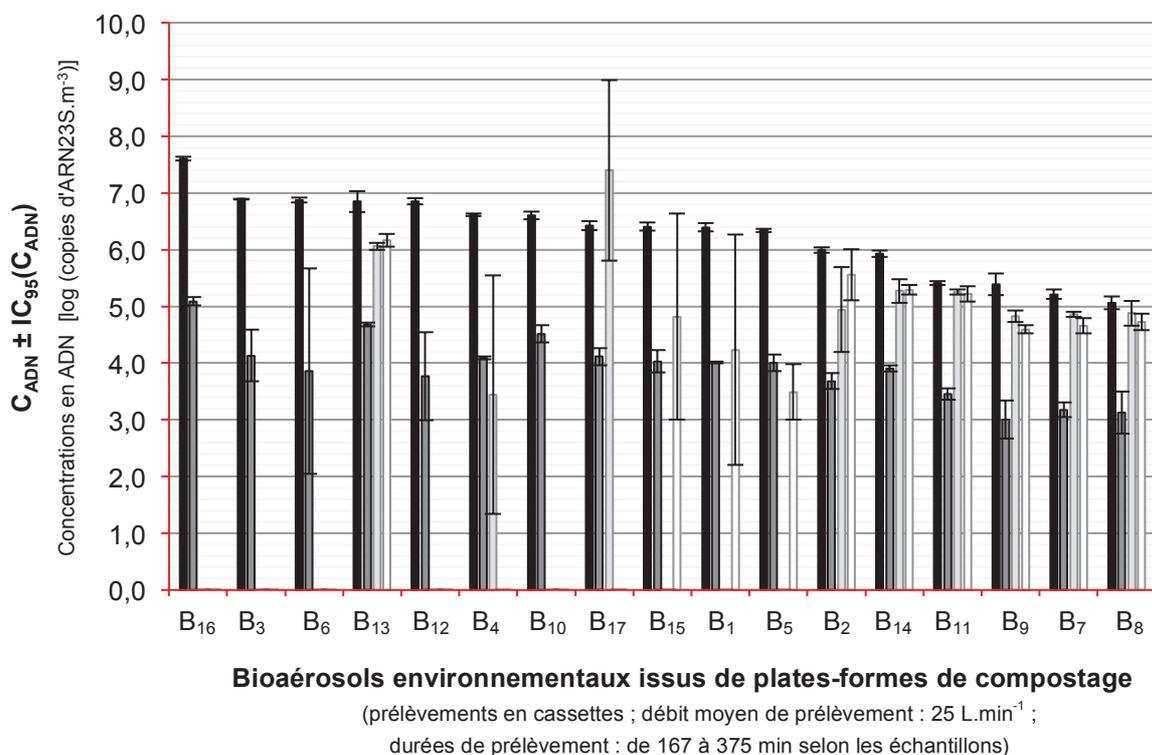


Figure 27. Comparaison de 4 kits commercialisés d'extraction d'ADN basée sur la qPCR avec utilisation des oligos SM, sur 17 échantillons de bioaérosols environnementaux (B_i) échantillonnés en plates-formes de compostage. ■ Protocole A (MP Biomedicals), ■ Protocole B (MOBIO), ■ Protocole C (Qiagen pour bactéries Gram négatif) et □ Protocole D (Qiagen pour bactéries Gram positif). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % de 2 ou 3 répétitions.

Ensuite, la comparaison graphique (Figure 28) et statistique des deux protocoles A et B restants, vis-à-vis de leur spécificité d'extraction de l'ADN, montre à nouveau que les concentrations obtenues avec le protocole A sont significativement plus élevées ($F = 50,40$; $p = 0,0000$) que celles obtenues avec le protocole B et ce, pour l'ensemble des 17 échantillons étudiés ($0,0000 < p < 0,0307$). Les rapports entre

la concentration obtenue avec le protocole A et celle obtenue avec le protocole B varient selon les échantillons, le protocole A pouvant permettre d'extraire de 31,2 à 65 176,3 fois plus d'ADN que le protocole B. Et pour finir, les résultats issus de l'extraction d'ADN par le protocole A sont extrêmement répétables (intervalles de confiance très faibles).

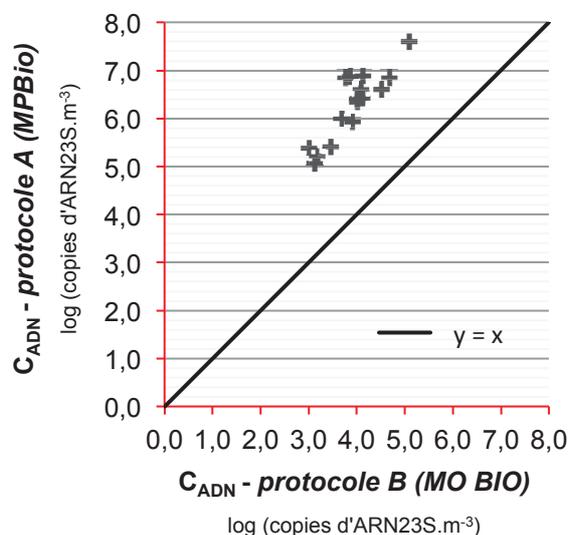


Figure 28. Comparaison de l'efficacité d'extraction de l'ADN des protocoles A et B, basée sur la qPCR avec utilisation des oligos SM, sur les échantillons de bioaérosols environnementaux (n = 17).

En conclusion générale de ce chapitre 2.2.5 concernant la comparaison de protocoles d'extraction d'ADN, le meilleur protocole parmi les 4 étudiés est le A, basé sur l'utilisation du kit FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals, USA) et ce, quelque soit le ou les microorganismes recherchés par qPCR. Son taux de réponse est de 100 % quelque soit le germe recherché, il est celui qui offre l'efficacité d'extraction la plus élevée, allée à une excellente répétabilité de la mesure.

2.3 DISCUSSION

Extraction de l'ADN, développement et validation des oligonucléotides, clonage moléculaire et optimisation des paramètres PCR sont autant d'étapes de développement, d'optimisation et de mise au point de la méthode PCR temps réel.

2.3.1 DESSIN ET VALIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES

Tout d'abord concernant les oligonucléotides dessinés pour la quantification de la seule espèce *Thermoactinomyces vulgaris*, le travail bibliographique effectué nous a permis de nous orienter sur le gène codant la sous-unité B de l'ADN gyrase (*gyrB*). Conservée au sein de l'espèce *T. vulgaris* mais pas au niveau du groupe, il s'agit d'une enzyme de la famille des topoisomérases (enzymes contrôlant la structure topologique de l'ADN), essentielle à la réplication du chromosome circulaire. Protéine spécifique des bactéries, elle permet de créer un surenroulement négatif d'une molécule d'ADN (circulaire, fermée et relâchée) nécessaire tout au long des 3 phases de la réplication. En plus de cette spécificité qu'il est

très difficile d'obtenir en travaillant sur le 16S ou le 23S par exemple, ce gène, de plus en plus utilisé à l'heure actuelle (Kasai *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2005), est à priori présent en une seule et unique copie au sein du génome de *T. vulgaris*. Le travail de dessin des oligonucléotides nous a amené à travailler sur deux portions de ce gène qui semblaient toutes deux parfaitement convenir. Mais la première validation théorique par BLAST, entièrement confirmée par la seconde validation expérimentale sur souches microbiennes a permis l'élimination d'un des deux couples du fait qu'il permettait l'amplification de *T. vulgaris* mais aussi celle de *T. intermedius*, espèce déjà retrouvée dans le compost (Song *et al.*, 2001). Les résultats vis-à-vis du couple retenu pourraient toutefois être discutés puisque certaines souches autres que *Thermoactinomyces vulgaris* sont amplifiées à des cycles supérieurs à 35. Malgré le fait que ces souches là (*Laceyella sacchari*, *Saccharomonospora azurea*, *Streptomyces* sp.) ont déjà été retrouvées dans les environnements de composts (Lacey, 1997; Ryckeboer *et al.*, 2003), les amplifications à plus de 35 cycles ne sont pas significatives. Mettre en place des PCR à 40 cycles est traditionnellement réalisé quand il n'y a pas ou peu d'inhibiteurs dans les échantillons alors que 30 à 35 cycles sont généralement utilisés pour les échantillons environnementaux. Plus le nombre de cycles employés est élevé, plus le risque d'avoir des faux positifs est grand (Rintala & Nevalainen, 2006). De plus, le travail a ici été réalisé à des concentrations relativement élevées qui ne sont pas du tout celles retrouvées en conditions réelles d'exposition ; ce qui signifie qu'il faudrait que ces espèces soient extrêmement concentrées au moment de l'échantillonnage pour être potentiellement détectées avec ces oligonucléotides.

Ensuite, concernant l'espèce *Thermobifida fusca*, le travail bibliographique nous a amené à travailler sur le gène codant le facteur ecf. Les facteurs sigma de type ECF (Extra Cytoplasmic Function) sont de petites protéines de régulation intervenant dans diverses fonctions extra-cytoplasmiques, notamment en réponse à des conditions de stress. Comme précédemment, travailler sur ce genre de gène, plutôt que le 16S par exemple, offre le double avantage de spécificité et de copie unique dans le génome. *In silico*, les oligos dessinés pour l'amplification de la portion de gène ciblé ne répondent qu'à la seule espèce *Thermobifida fusca*. Expérimentalement, il s'avère que ces oligos amplifient également une seconde espèce phylogénétiquement proche (Zhang *et al.*, 1998), *Thermobifida alba* aussi appelée *Thermomonospora alba*. Le fait que cette dernière espèce ne soit pas ressortie au BLAST peut s'expliquer par son absence probable de la base de données, la séquence cible n'ayant pas encore été séquencée. Certes, si les deux espèces sont ramenées à des concentrations similaires, *Thermobifida alba* sort un peu plus tard que *Thermobifida fusca* mais les cycles restent néanmoins inférieurs à 25. Cette deuxième espèce ne peut donc pas être négligée, d'autant plus qu'il s'agit d'une espèce fréquemment identifiée en plate-forme de compostage (Hu *et al.*, 2010; Lacey, 1997; McCarthy & Cross, 1984a; Van den Bogart *et al.*, 1993) et potentiellement pathogène car impliquée dans des pneumopathies d'hypersensibilité (Deloraine *et al.*, 2002; Kurup, 1979; Van den Bogart *et al.*, 1993). Reste à se demander si d'autres espèces de *Thermobifida* sont potentiellement amplifiables. Seules *T. fusca* et *T. alba* ont ici été testées mais il existe d'autres souches appartenant à ce genre et isolées de composts, comme *T. chromogena* (Kleyn & Wetzler, 1981), *T. curvata* ou *T. mesophila* (McCarthy & Broda, 1984; McCarthy & Cross, 1984a). Il est donc légitime de se demander si de telles espèces auraient également été détectées si elles avaient fait l'objet de l'étude de spécificité.

Enfin, vis-vis du groupe des streptomycètes, les études bibliographiques nous ont amené à travailler sur des oligonucléotides déjà dessinés et validés pour la quantification des streptomycètes issus de poussières domestiques (Rintala & Nevalainen, 2006). La portion du gène ciblé est une portion du gène codant l'ARNr 23S qui forme, avec l'ARNr 5S et 34 protéines, la grande sous unité du ribosome servant à décoder l'information contenue dans l'ARN messenger. Néanmoins, le dessin de ces oligonucléotides et leur test sur 24 différentes souches de *Streptomyces* et d'espèces non-streptomycètes avaient amené leurs auteurs à conclure à une très grande spécificité pour les streptomycètes mésophiles, hormis

l'espèce *Streptomyces albus*. La conclusion que nous avons mise en évidence est quelque peu différente. *Streptomyces albus* n'est effectivement pas amplifié avec ces oligonucléotides mais c'est aussi le cas d'autres *Streptomyces* qui demanderaient à être identifiés. Inversement, la validation réalisée sur les 94 souches de notre étude montre que ces oligos amplifient également d'autres souches retrouvées en plates-formes de compostage, comme par exemple des *Saccharomonospora*, des *Thermoactinomyces* ou encore *Laceyella putida*. À noter néanmoins, que ces espèces sortent plus tardivement, et les cycles étant supérieurs à 30, ces espèces devront être présentes en concentrations élevées pour pouvoir être détectées. D'un point de vue global, ces oligos ne sont pas strictement spécifiques des streptomycètes mésophiles, néanmoins, les utiliser peut se justifier de deux manières : la première vient du fait que c'est un groupe de microorganismes qui est ciblé et non plus une espèce, ce qui oblige à travailler sur des gènes moins spécifiques, comme ici l'ARNr 23S ; la deuxième vient du fait que les espèces secondairement amplifiées représentent aussi un intérêt en hygiène du travail puisqu'elles sont retrouvées dans l'air des plates-formes de compostage et également impliquées dans des pneumopathies d'hypersensibilité. Ce dernier point a préalablement été démontré pour les espèces *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoactinomyces intermedius* et *Thermobifida alba* mais c'est aussi le cas de *Saccharomonospora* sp. (Amner *et al.*, 1989). Par contre, un des inconvénients du 23S est que ce gène est présent en multiples copies dans le génome, contrairement aux deux autres gènes précédemment ciblés qui sont en copie unique. Cet élément sera rediscuté ultérieurement.

Il pourrait être envisagé (pour des résultats complémentaires) de tester toutes les souches sorties des analyses par BLAST afin de confirmer la spécificité des oligonucléotides. Néanmoins, cette étude a démontré que les données théoriques ne sont pas toujours vérifiées expérimentalement, le contraire étant aussi vrai, d'où l'importance de constamment vérifier les résultats obtenus par plusieurs approches. Néanmoins, l'étude portant sur le dessin et la validation des oligonucléotides a permis, au final, d'avoir :

- un couple d'oligos (Tvu F751-R824/S776) spécifique de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*, pour l'amplification ciblée d'une portion du gène codant la sous-unité B de l'ADN gyrase de cette espèce
- un couple d'oligos (Tfu F374-R472/S419) spécifique des deux espèces *Thermobifida fusca* et *Thermobifida alba* (voire des *Thermobifida* sp. plus généralement) pour l'amplification d'une portion du gène codant le facteur *ecf* de ces espèces
- un couple d'oligos (SM fw8-rev9/p6) pour la quantification préférentielle des streptomycètes mésophiles basée sur la détection d'une portion du 23S ; ces oligos peuvent potentiellement amplifier d'autres espèces d'intérêt, *Saccharomonospora* sp. par exemple.

Afin d'éviter tout amalgame ou confusions des espèces, nous parlerons de « qPCR Tvu », « qPCR Tfu » ou « qPCR SM » en rapport avec les oligonucléotides qui seront utilisés plutôt que de parler de la quantification d'une ou plusieurs espèces. La qPCR Tvu fera référence à la quantification des *Thermoactinomyces vulgaris*, la qPCR Tfu à celle des *Thermobifida* sp. et la qPCR SM à un groupe de microorganismes préférentiellement composés de streptomycètes mésophiles, mais pas uniquement.

2.3.2 GAMMES ÉTALONS

Concernant les gammes étalons mises en place suite au clonage moléculaire des 3 fragments de gène d'intérêt, les trois conclusions principales mises en exergue proviennent de la sensibilité, de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode. Quel que soit le modèle, la limite de quantification de la technique permet de détecter les cibles à partir de la concentration de 5 copies du gène par microlitre d'extrait d'ADN avec qui plus est, des résultats extrêmement répétables. Ceci atteste d'une très bonne

sensibilité de la méthode sur une vaste gamme de concentrations, associée à une grande répétabilité des résultats et une excellente reproductibilité de ces gammes dans le temps. Ces trois conclusions s'ajoutent à celles premièrement établies concernant les extraits plasmidiques, à savoir leur pureté et leur reproductibilité.

2.3.3 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES PCR

Trois conditions sont nécessaires afin qu'une PCR soit validée : l'efficacité PCR doit être bornée entre deux pourcentages (minimal et maximal) déterminés, le coefficient de corrélation R^2 de la droite standard doit être supérieur à 0,98 et les réplicats (de la gamme et des échantillons) doivent donner des C_T similaires. Si les deux derniers paramètres sont constants et appliqués dans le domaine de la PCR temps réel, les pourcentages d'efficacité varient en revanche selon les expérimentateurs. Au vu des nombreuses PCR réalisées pour cette étude et avec un recul nécessaire, nous avons décidé de borner les efficacités PCR entre 80 % et 120 %. Et pour que ces conditions soient le plus souvent obtenues, un préalable est l'optimisation des paramètres PCR propres à chaque espèce ou groupe d'espèces recherchées. Quel que soit le paramètre optimisé, l'analyse des résultats s'est faite sur les efficacités PCR (paramètre fondamental pour valider les PCR) plutôt que sur les 'threshold cycles'. Et l'analyse expérimentale prévalant sur la théorie, nous avons décidé de choisir les paramètres pour lesquels l'efficacité PCR était statistiquement la meilleure.

Ainsi, concernant les températures, les PCR Tvu et SM seront réalisées à une température d'hybridation-élongation de 58,0°C alors que la température sera de 63,3°C pour les PCR. Cette dernière température peut paraître élevée, néanmoins, les statistiques confirment ce résultat sans oublier que le logiciel de dessin des oligos fournissait un T_a à hauteur de 62,0 °C. Vis-à-vis du pré-mix, l'iQ™ supermix de Bio-Rad® sera utilisé par la suite dans toutes les expérimentations de PCR en temps réel. Il s'agit du pré-mix du même fournisseur que le thermocycleur utilisé pour faire les PCR. Il est spécifiquement développé pour la PCR temps réel basée sur l'utilisation de sondes moléculaires (type Taqman dans notre cas) et ne contient pas de fluorochrome de type ROX (référence passive) puisque travailler sur le CFX96 ne nécessite pas l'ajout d'une référence passive. En revanche, il serait judicieux pour la suite de tester un autre paramètre important lié à ce pré-mix, à savoir la concentration en sel Na^+ , par le biais d'une gamme de concentrations. Enfin, concernant les concentrations en oligonucléotides, n'ayant pas obtenu de différence significative entre les différents duos de concentrations, ce sont les concentrations préconisées par le fournisseur de l'essentiel du matériel utilisé pour les PCR qui ont été choisies (300 nM pour les amorces et 200 nM pour la sonde). Se référer à des publications traitant de la PCR temps réel pour le choix des concentrations aurait été difficile tant la diversité de concentrations utilisées est grande.

2.3.4 PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN

De nombreux protocoles d'extraction d'ADN existent, basés ou non sur l'utilisation de kits commercialisés. Nous avons décidé d'en comparer trois, reconnus pour leur efficacité sur des échantillons bactériens (cultures bactériennes ou communautés microbiennes environnementales). La comparaison a tout d'abord été faite en conditions dites de laboratoire sur des cultures de cellules de *T. vulgaris* ; les résultats obtenus étant comparables pour les 4 protocoles A, B, C ou D testés, les comparaisons ont été poursuivies directement sur des échantillons prélevés en conditions réelles d'exposition.

Comparés sur les trois paramètres que sont le taux de réponse, l'efficacité d'extraction et la répétabilité des résultats, les protocoles C et D ont été éliminés à cause de leur taux de réponse beaucoup trop faible (compris entre 41 et 59 %) quels que soient les modèles recherchés et ce, avant même de conclure quant à leur efficacité d'extraction ou leur répétabilité. Détecter un microorganisme dans 1 cas sur 2 à peine n'est pas concevable, surtout si les deux autres protocoles ont des taux de réponse qui ne descendent pas en dessous de 70 % (le taux étant de 100 % pour le protocole A, pour n'importe quel modèle recherché). Ces deux protocoles reposaient sur l'utilisation du kit DNeasy® Blood and Tissue Kit de Qiagen®. Ce kit a été développé pour une purification rapide de l'ADN total de divers types d'échantillons (tissus, cellules, sang, levures, bactéries...), avec pour résultat un ADN sans aucun contaminant ni inhibiteur, ce qui est grandement profitable pour la PCR. Qiagen est un fournisseur reconnu dans le domaine de la purification de l'ADN et de l'ARN et le kit testé (que ce soit avec le protocole spécifique aux bactéries Gram positif ou celui spécifique aux bactéries Gram négatif) semblait le plus approprié à nos échantillons, tout du moins plus approprié que les kits développés pour les plantes ou pour les échantillons vétérinaires. Ces deux protocoles ne font intervenir que des lyses chimiques. Au vu des taux de réponse relativement bas qui y sont associés, il est possible d'envisager que l'extraction est plus efficace lorsqu'il y a une action conjuguée de lyses chimiques et physiques comme c'est le cas avec les protocoles A et B. Le protocole B, basé sur l'UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) a été développé pour l'extraction de l'ADN génomique d'une très grande variété de microorganismes y compris les spores de bactéries et de champignons. Malgré cela, les tests statistiques ont permis de mettre en évidence que les efficacités d'extraction obtenues avec ce kit étaient significativement plus basses que celles obtenues avec le protocole A. Ce dernier est basé sur l'utilisation du FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals) et a été testé car il permet l'extraction de l'ADN génomique de bactéries, de spores fongiques, d'algues, de plantes, de tissus d'origine animale... directement à partir d'échantillons de sol. Le processus de compostage étant caractérisé par de nombreux changements de températures, la succession de communautés microbiennes qui en découle (Cooper *et al.*, 2002) fait du compost un écosystème aussi complexe que celui du sol. Le kit, et donc le protocole et les tampons de lyse qu'il contient (même si la composition exacte n'est pas connue), doivent être adaptés à cette matrice (échantillons renfermant une population complexe de microorganismes ainsi qu'une grande quantité d'inhibiteurs). En plus de ces tampons de lyse chimique, le protocole fait intervenir une lyse physique par utilisation d'un broyeur à cellules, l'action conjuguée de ces deux lyses étant probablement à l'origine du choix de ce protocole : en plus d'un taux de réponse de 100 %, il allie la meilleure efficacité d'extraction à une très bonne répétabilité des résultats.

Cette comparaison de 4 protocoles d'extraction d'ADN démontre que, dans le cas de notre étude, l'extraction d'ADN avec le FastDNA® SPIN kit for soil de MP Biomedicals conduit à un taux de réponse de 100 %, à la meilleure efficacité d'extraction et à une très bonne reproductibilité des résultats, et ce, quel que soit le modèle recherché.

3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	125
3.1.1 PLAN D'EXPÉRIENCE GÉNÉRAL	125
3.1.2 PRÉPARATION DES CULTURES LIQUIDES DE CELLULES	126
3.1.2.1 Protocoles A et A' adaptés d'après les travaux de Kawamoto <i>et al.</i> , 1982	126
3.1.2.2 Protocoles B et B' adaptés d'après la norme AFNOR NF T 72-145 de 2006.....	127
3.1.2.3 Protocole C adapté des travaux d'Hoskisson <i>et al.</i> , 2000	128
3.1.2.4 Protocole D adapté des travaux de Gizenko <i>et al.</i> , 1998.....	129
3.1.3 GÉNÉRATION EN VOIE LIQUIDE PAR BULLAGE.....	129
3.1.4 ANALYSES DES CULTURES LIQUIDES ET CARACTÉRISATION DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS....	131
3.1.4.1 Analyses des cultures liquides de cellules.....	131
3.1.4.2 Caractérisation des bioaérosols générés.....	132
3.1.5 EXPLOITATION DES RÉSULTATS	133
3.1.5.1 Niveaux de concentrations des cultures et des bioaérosols	133
3.1.5.2 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Sioutas.....	133
3.1.5.3 Granulométries obtenues avec les COP Grimm et LAS.....	134
3.1.5.4 Statistiques	134
3.2 RÉSULTATS	134
3.2.1 STABILITÉ DES CULTURES CELLULAIRES LIQUIDES	134
3.2.2 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES CULTURES CELLULAIRES.....	135
3.2.3 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS	136
3.2.4 DISTRIBUTIONS GRANULOMÉTRIQUES DES BIOAÉROSOLS.....	138
3.2.4.1 Granulométries obtenues avec un Compteur Optique de Particules	138
3.2.4.2 Granulométries obtenues avec un impacteur en cascade.....	141
3.2.5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	143
3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de <i>Thermobifida fusca</i>	143
3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de <i>Streptomyces californicus</i>	144
3.3 DISCUSSION	145
3.3.1 CONDITIONS DE MISES EN CULTURE DES SOUCHES EN MILIEU GÉLOSÉ.....	145
3.3.2 COMPARAISON DES PROTOCOLES DE PRÉPARATION	145
3.3.2.1 Concentrations en microorganismes cultivables et en spores totales	146
3.3.2.2 Granulométries des bioaérosols et nature des cellules aérosolisées	147
3.3.2.3 Choix du protocole de préparation des cultures aptes à la génération d'actinomycètes	151

CHAPITRE 3 - MAÎTRISE DE LA GÉNÉRATION DE BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX

3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Ce chapitre traite de la faisabilité et de la maîtrise de la génération de bioaérosols expérimentaux de cellules d'actinomycètes. La génération se faisant en voie liquide, nous avons étudié et comparé 6 protocoles de préparation d'une culture liquide de cellules d'actinomycètes afin de déterminer lequel est le plus favorable à la génération de bioaérosols expérimentaux. En effet, les conditions de mise en suspension des spores d'actinomycètes, à partir d'une culture sur milieu gélosé, détermine la qualité de cette suspension (nombre de spores, absence ou présence de grands fragments de mycélium et de débris de gélose...).

3.1.1 PLAN D'EXPÉRIENCE GÉNÉRAL

L'essentiel des essais a été réalisé sur la souche *T. vulgaris* et un travail plus restreint a également été réalisé sur *T. fusca* et *S. californicus*. L'approche utilisée est présentée en Figure 29.

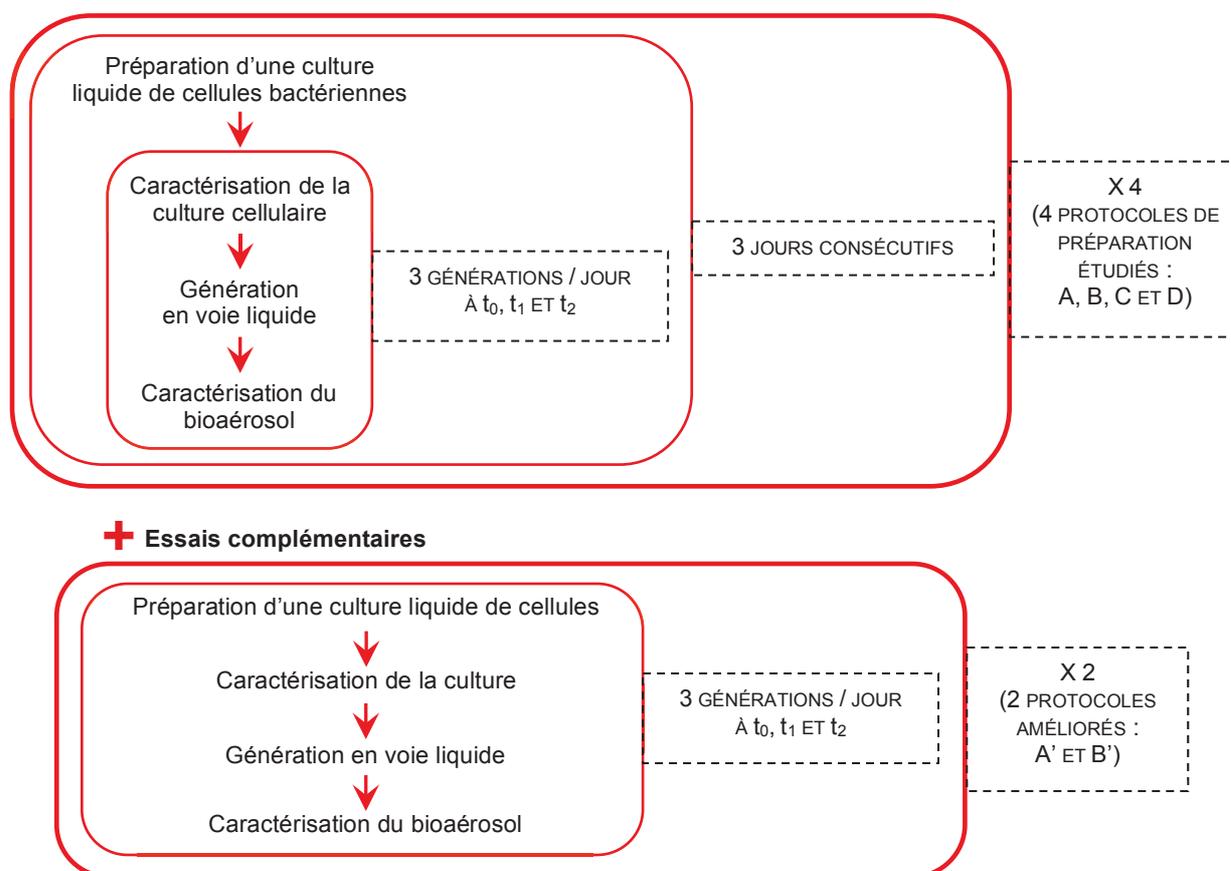


Figure 29. Schématisation du plan d'expérience général utilisé pour l'étude visant à maîtriser la génération de bioaérosols expérimentaux.

La culture cellulaire, une fois préparée selon l'un des 4 protocoles étudiés et détaillés ci-dessous (3.1.2), est tout d'abord analysée avant d'être générée au temps t_0 , le bioaérosol alors produit étant à son tour étudié. Au total, cette même suspension (préparée le matin) est générée consécutivement à trois reprises dans la même journée, aux temps t_0 , t_1 et t_2 et à chaque fois, avant chaque génération, une analyse de la culture est effectuée. Les analyses des cultures ont consisté en un dénombrement des microorganismes cultivables par mise en culture sur géloses et des spores totales par épifluorescence après marquage au DAPI. Le bioaérosol expérimental est, lui, caractérisé et analysé à l'aide de plusieurs outils (compteur optique de particules, impacteur en cascade, cassettes de prélèvements...). Toutes ces étapes (préparation d'une culture analysée 3 fois avant chacune des trois générations consécutives) sont répétées 3 fois au total (3 jours consécutifs). Et enfin, ces analyses ont été répétées pour chacun des 4 protocoles A, B, C et D comparés, alors caractérisés pour 9 générations (3 journées distinctes comprenant chacune 3 générations). Cette approche a ainsi permis d'évaluer la stabilité et la reproductibilité des suspensions ainsi que la répétabilité des essais.

Des études complémentaires ont également été réalisées par le biais de modifications apportées à deux de ces quatre protocoles en vue de les améliorer. Les analyses sont les mêmes que pour les 4 protocoles précédents bien que ces essais soient allégés par rapport aux précédents ; ils ne se font plus sur 3 cultures cellulaires mais une seule, générée 3 fois.

3.1.2 PRÉPARATION DES CULTURES LIQUIDES DE CELLULES

La préparation d'une culture liquide de cellules d'actinomycètes (essentiellement composée de spores) est réalisée à partir d'une culture en milieu gélosé. En s'appuyant sur les données de la littérature et en ajustant quelques paramètres à notre population bactérienne, 4 protocoles différents ont été testés. Chacun de ces protocoles décrits ci-dessous comportent 2 phases : une première phase de décrochage des spores (plus largement des cellules) de la surface de la gélose et une seconde de purification de la suspension, visant à purifier les spores par élimination de tout artéfact de préparation (fragments de gélose, mycélium de grande taille...). Le but est d'obtenir une culture liquide contenant des cellules aptes à être aérosolisées (principalement des spores) sur le banc de génération et ce, à partir d'une culture sur gélose solide. Les mises en culture des trois souches se font de la même manière que décrite dans le chapitre précédent (2.1.1.1). Les protocoles ci-dessous sont décrits pour une flasque de culture, le travail ayant été réalisé sur 6 flasques, ceci afin d'obtenir un volume final de suspension plus élevé.

3.1.2.1 Protocoles A et A' adaptés d'après les travaux de Kawamoto *et al.*, 1982

Environ 400 billes de verre de diamètre 1,5 mm ainsi que 15 mL d'une solution de tampon phosphate (à pH = 7 et de molarité 1/15 M) sont introduits dans une flasque contenant la culture d'actinomycètes. La solution de tampon phosphate est préparée par mélange d'une solution de phosphate de sodium dibasique Na_2HPO_4 à 1/15 M et d'une solution de phosphate de sodium monobasique NaH_2PO_4 à la même concentration (Sorensen, 1909). Après agitation horizontale de la flasque, la solution et les billes de verre sont récupérées dans un tube en verre qui est soumis aux ultrasons (bain à ultrasons Branson, modèle 1210) 20 min à 47 KHz, dans un bain de glace. La solution est récupérée dans un tube à centrifuger et une première centrifugation de 15 min à 5 000 xg et à 4 °C est réalisée. Le surnageant est alors retiré et jeté, alors que le culot contenant les cellules d'intérêt est repris dans 15 mL de tampon phosphate. La solution est centrifugée de la même manière une seconde fois et le culot est à nouveau

repris dans 15 mL de tampon phosphate. Après agitation au vortex, la culture liquide A est prête à être utilisée (Figure 30).

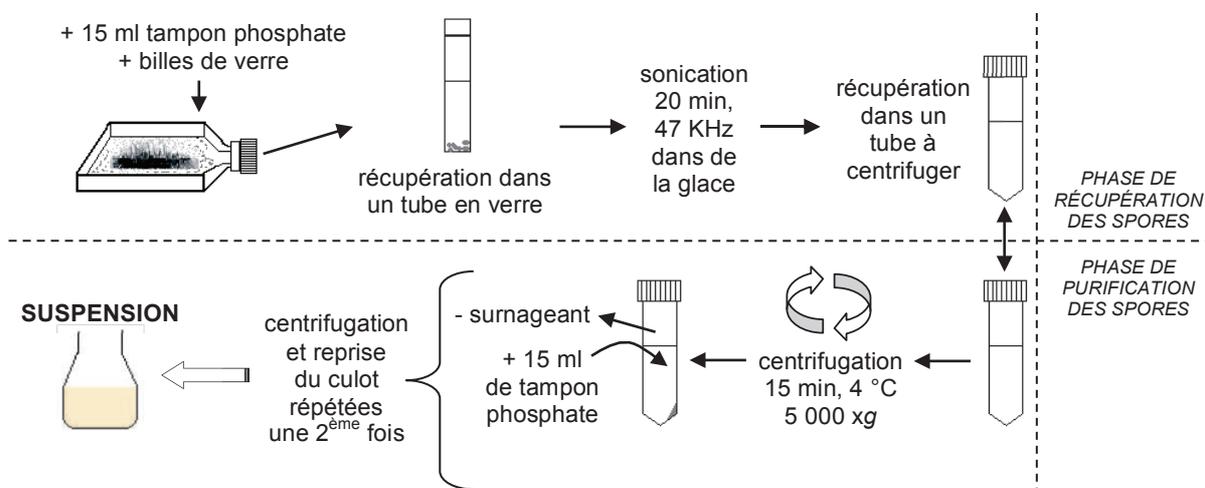


Figure 30. Protocole A de préparation d'une culture liquide de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication de Kawamoto *et al.*, 1982.

Une version modifiée de ce protocole a également été testée. La seule modification apportée provient du fait que le tampon phosphate dans lequel est re-suspendu le culot (à deux reprises) est remplacé par de l'eau ultrapure stérile. Ce protocole est nommé A'.

3.1.2.2 Protocoles B et B' adaptés d'après la norme AFNOR NF T 72-145 de 2006

Environ 400 billes de verre de 1,5 mm de diamètre ainsi que 15 mL d'une solution de Tween 80 à 0,05 % sont introduits dans une flasque contenant la culture d'actinomycètes. Après agitation horizontale de la flasque pendant environ 1 min, la solution est filtrée à travers un fritté de porosité 3 (pores de 16 à 40 µm de diamètre), monté sur une unité de filtration individuelle. La filtration peut être réalisée à l'aide d'une pompe de filtration mais le débit doit être réglé de telle manière qu'un flux goutte à goutte soit obtenu. La solution est récupérée dans un tube à centrifuger et une centrifugation de 7 min à 7 000 rpm et à 4 °C est réalisée. Le surnageant est alors retiré et jeté, alors que le culot contenant les cellules d'intérêt est repris dans 15 mL d'eau ultrapure stérile. Après agitation au vortex, la culture B est prête à être utilisée (Figure 31).

Une version modifiée de ce protocole a également été testée. Le seul changement provient du fait que, dans la phase de purification des spores, le fritté utilisé pour la filtration n'est plus un fritté de porosité 3 (pores de 16 à 40 µm) mais de porosité 4 (pores de 10 à 16 µm). Ce protocole est nommé B'.

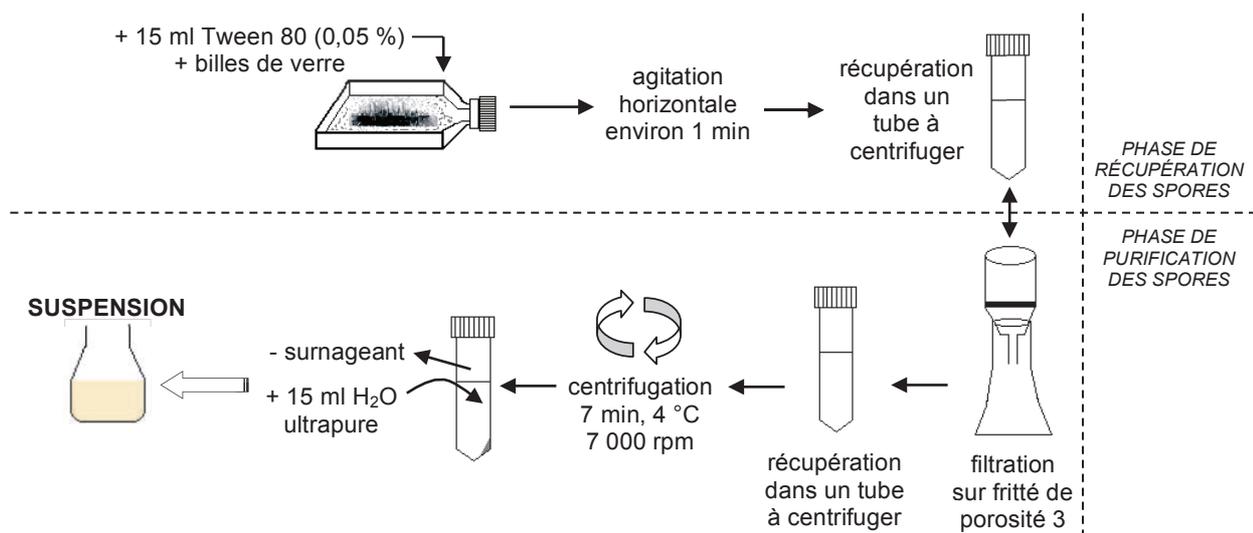


Figure 31. Protocole B de préparation d'une culture liquide de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* à partir d'une culture gélosée et basé sur la norme AFNOR NF T 72-145 de 2006.

3.1.2.3 Protocole C adapté des travaux d'Hoskisson *et al.*, 2000

Un volume de 15 mL d'eau ultrapure stérile est introduit dans une flasque contenant la culture d'actinomycètes (volume suffisant pour recouvrir la surface de la gélose). Après 10 min d'attente et une légère agitation avec un râteau stérile, la solution est récupérée et centrifugée 10 min à 3 000 *xg* et à 4 °C. Le surnageant est retiré, alors que le culot contenant les cellules d'intérêt est repris dans 15 mL d'eau ultrapure stérile. Après agitation au vortex, la culture liquide C est prête à être utilisée (Figure 32).

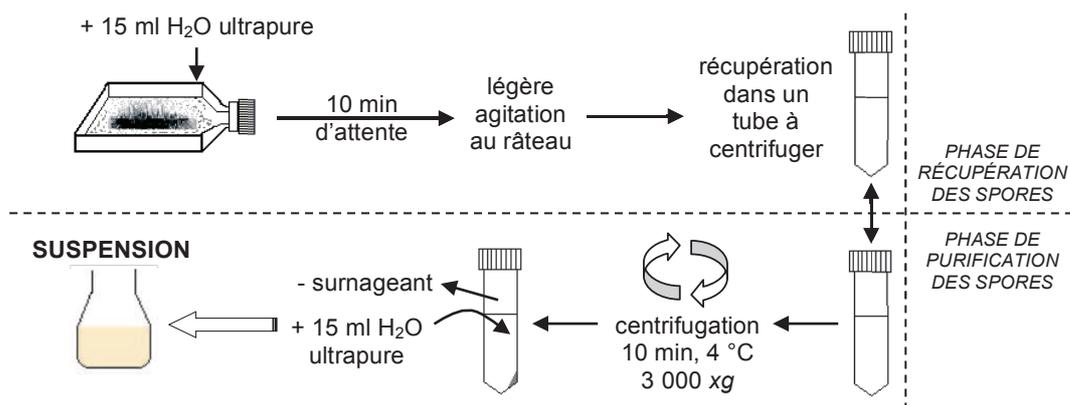


Figure 32. Protocole C de préparation d'une culture liquide de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication d'Hoskisson *et al.*, 2000.

3.1.2.4 Protocole D adapté des travaux de Gazenko *et al.*, 1998

Un volume de 15 mL d'une solution de Tween 80 à 0,01 % est introduit dans une flasque contenant la culture d'actinomycètes. Après agitation horizontale de la flasque pendant environ 1 min, la solution est filtrée à travers une membrane blanche en cellulose de diamètre 45 mm et de pores 0,45 µm. Un volume de 5 mL d'éthanol C₂H₆O à 30 % est ajouté sur la membrane, toujours montée dans l'unité de filtration. Après 1 min de mise en contact, l'éthanol est filtré et la membrane est ensuite récupérée dans une boîte de Pétri contenant 20 mL de solution de lavage. Cette solution se compose à 80 % d'une solution de chlorure de sodium NaCl à 9 g/L et à 20 % de solution nutritive, à savoir du bouillon trypto-caséine soja ou TSB (AES Chemunex). La membrane est lavée pendant 10 min dans cette solution, avec agitations régulières, la solution D récupérée étant prête à être utilisée (Figure 33).

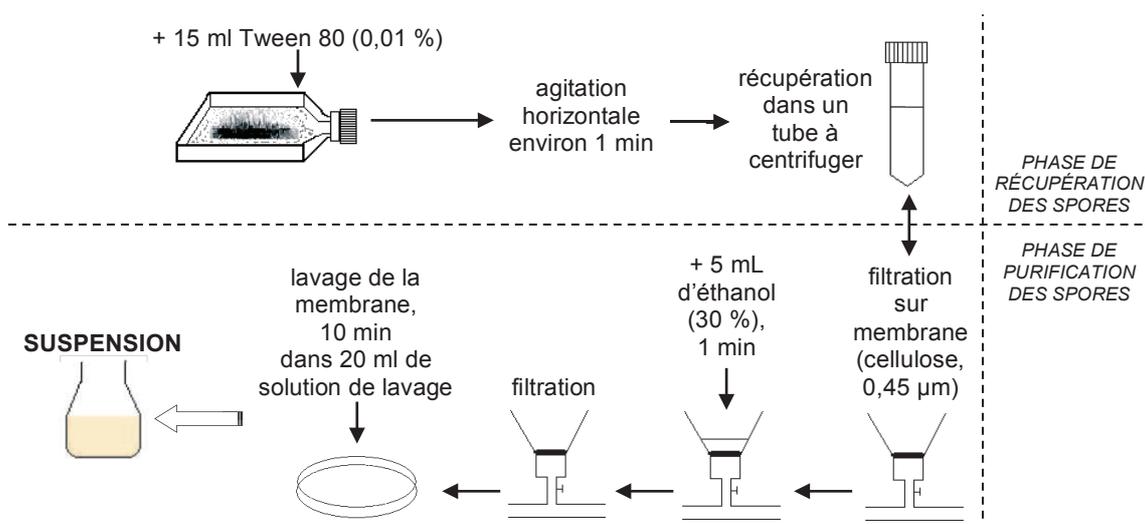


Figure 33. Protocole D de préparation d'une culture liquide de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* à partir d'une culture gélosée et basé sur la publication de Gazenko *et al.*, 1998.

3.1.3 GÉNÉRATION EN VOIE LIQUIDE PAR BULLAGE

Le banc de génération ayant servi à la production de tous les bioaérosols expérimentaux nécessaires aux travaux est constitué d'un générateur de type bulleur relié à une enceinte de prélèvement. Ce système de génération, conçu par Simon *et al.* (2011), est une version modifiée du Liquid Sparging Aerosolizer initialement développé par Mainelis *et al.* (2005). Le schéma de ce dispositif est décrit en Figure 34 et une photo est présentée en Figure 35. De manière générale, il s'agit d'une aérosolisation de microorganismes par bullage d'air comprimé à travers une suspension liquide bactérienne. Tous les éléments du banc de génération sont confinés dans un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de classe 2 afin de travailler sous atmosphère stérile. L'utilisation d'un PSM de classe 2 permet d'assurer la protection de l'opérateur et de prévenir toute contamination des essais.

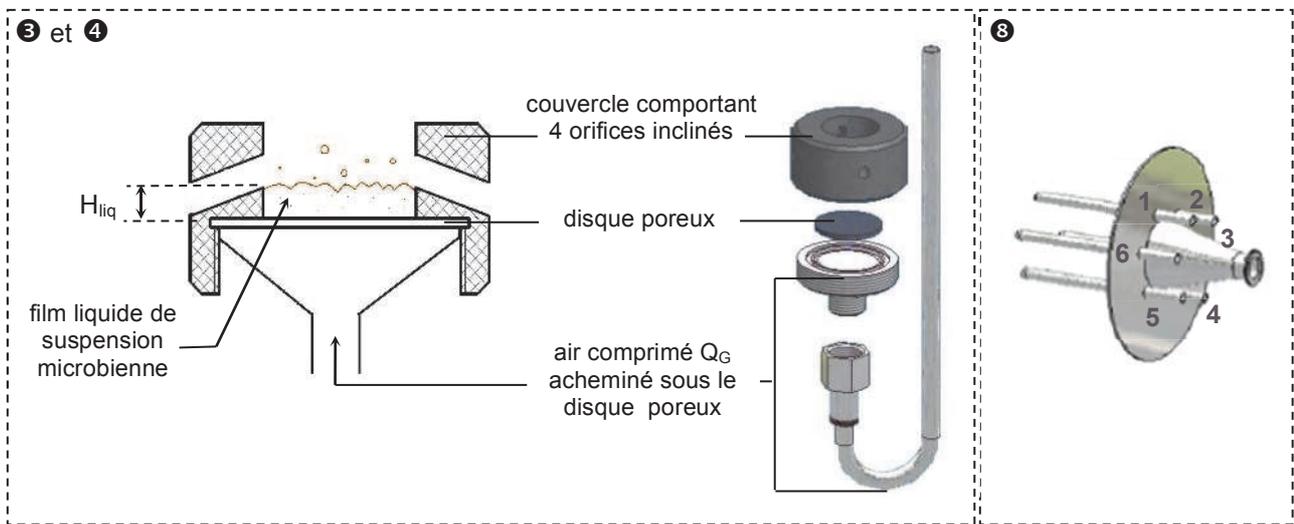
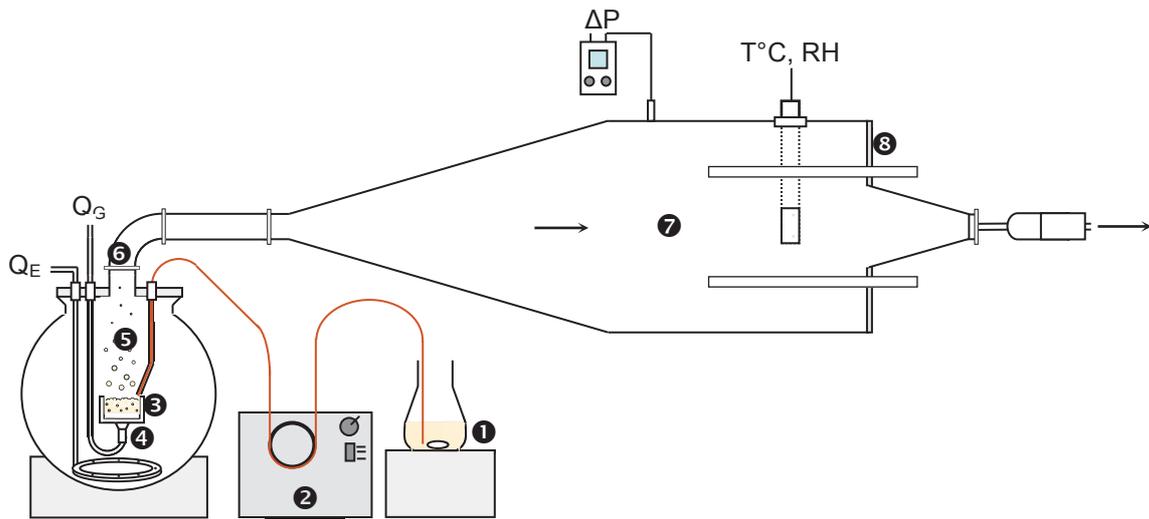
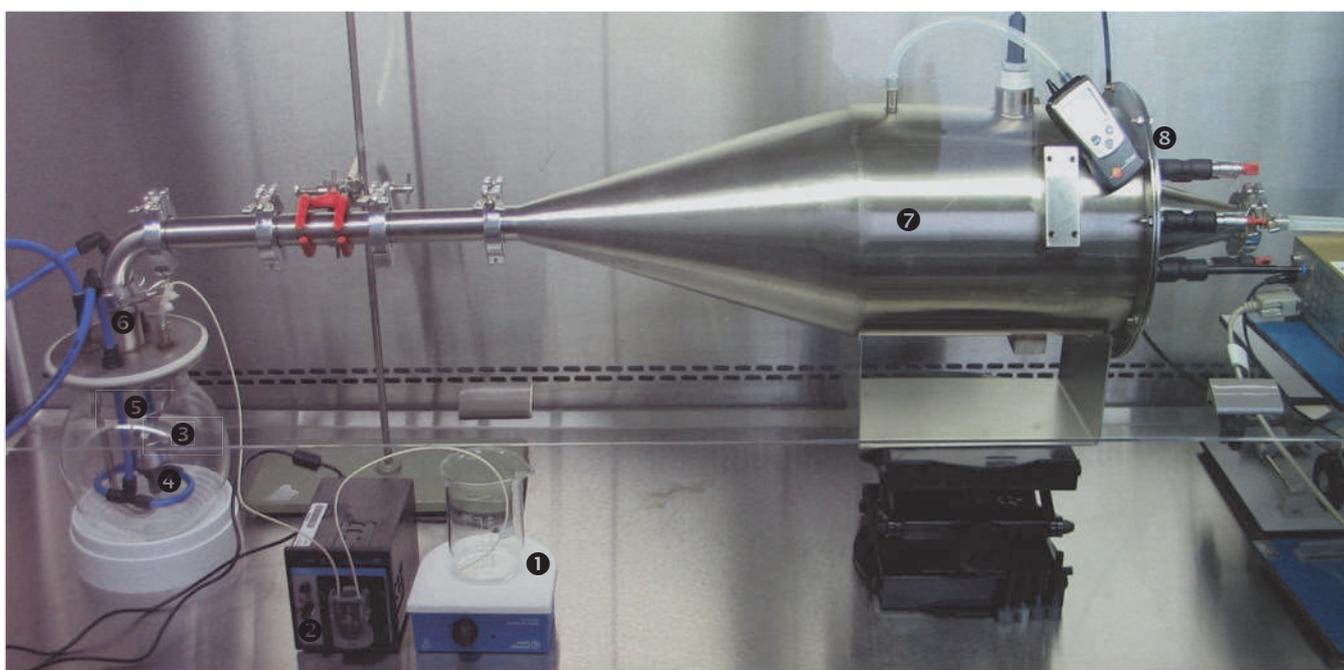


Figure 34. Schématisation du fonctionnement du banc de génération ayant servi à la production des bioaérosols expérimentaux (Simon *et al.*, 2009a; Simon *et al.*, 2011).

La culture liquide (1), préparée selon l'un des 6 protocoles (A, A', B, B', C ou D) présentés précédemment, est amenée au générateur via une pompe péristaltique (2) permettant ainsi la formation en continu d'un film liquide contenant les cellules bactériennes, au dessus d'un disque poreux (3). La suspension liquide est alors aérosolisée par insufflation d'un air sec dit de génération Q_G à travers ce disque poreux (4) qui permet la formation de bulles qui, lorsqu'elles éclatent, produisent des gouttelettes chargées en particules biologiques (5). Ce flux d'air ascendant mais aussi l'ajout d'un air complémentaire d'entraînement Q_E et le fait que la sortie d'air soit juste au dessus du fritté favorisent le transport des particules en sortie de l'enceinte de génération (6). L'air d'entraînement, injecté en partie basse de l'enceinte, est composé d'un mélange d'air sec et d'air humide (contrairement à l'air de génération uniquement composé d'air sec), dans des proportions qui sont telles que l'humidité relative est constante à plus ou moins 2 % au cours de l'essai. Les airs de génération et complémentaire d'entraînement sont des airs propres. L'air comprimé du réseau (7 à 10 bars) est acheminé jusqu'à un conditionneur d'air comprimé (3 bars), le TSI® modèle 3074B. L'air lui arrivant traverse un pré-filtre permettant l'élimination des plus grosses particules et des gouttelettes d'eau, puis un filtre éliminant les

particules plus fines et le reste des gouttelettes d'eau ou d'huile. Une membrane et un filtre terminal permettent d'assécher complètement l'air et d'éliminer les dernières particules. C'est donc un air sec et purifié qui est acheminé vers trois débitmètres massiques Brooks® modèles 5850S et 5851S : un débitmètre régulateur de 0 à 5 L.min⁻¹ raccordé directement sur la cellule de génération pour l'injection de l'air de génération et deux débitmètres de 2 à 50 L.min⁻¹ dont l'un est relié à une enceinte d'humidification avant que ces deux ne soient raccordés pour alimenter la cellule de génération d'un air d'entraînement. Les bioaérosols générés, collectés dans l'enceinte (7), peuvent alors être étudiés et/ou échantillonnés grâce à tous types d'appareils (de mesure, de collecte...) connectés à une des 6 sondes en zone terminale de l'enceinte de prélèvement (8). Quelles que soient les conditions expérimentales ou le type d'échantillonneurs connectés, l'enceinte de prélèvement a été dimensionnée de manière à ce que les 6 orifices d'entrée des sondes captent de manière homogène le bioaérosol (Simon *et al.*, 2011).

Dans le cadre de ces essais de comparaison de protocoles de préparation d'une culture cellulaire, toutes les générations ont été réalisées à paramètres constants : le débit de génération Q_G s'élevait à 4 L.min⁻¹, le débit d'entraînement Q_E à 20 L.min⁻¹, la hauteur de film liquide H_{liq} était de 8 mm et l'humidité relative était ajustée à 50 %, à plus ou moins 2 %.



| Figure 35. Photo du dispositif de génération sous PSM [© Xavier Simon / INRS].

3.1.4 ANALYSES DES CULTURES LIQUIDES ET CARACTÉRISATION DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS

3.1.4.1 Analyses des cultures liquides de cellules

Avant chaque génération, une partie de la suspension était réservée pour deux types d'analyse. Tout d'abord, un ensemencement sur milieux gélosés pour un dénombrement de la flore viable et cultivable, où les résultats sont exprimés en Unités Formant Colonie (UFC) par millilitre de suspension. Ensuite, une analyse par épifluorescence après marquage des cellules au DAPI, pour un dénombrement des spores

totales, les résultats s'expriment alors en nombre de spores par millilitre de suspension. Le détail des deux méthodes de dénombrement sont présentées et détaillées respectivement en Annexe II et Annexe III (mise en place de l'analyse, calculs des concentrations, expression des résultats...).

3.1.4.2 Caractérisation des bioaérosols générés

Le bioaérosol généré à partir d'une culture liquide est analysé et caractérisé par plusieurs outils (Figure 36). Tout d'abord, une des sondes de l'enceinte est reliée à un compteur optique de particules, le Grimm® 1.109 permettant un relevé continu en temps réel de la concentration en nombre des particules d'un aérosol. L'air, aspiré grâce à une pompe de débit constant ajusté à $1,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ et échantillonné par le biais d'une sonde isocinétique, est soumis à une cellule de mesure optique. Il permet ainsi une analyse de la concentration en particules sur 31 canaux granulométriques compris entre $0,25$ et $32 \mu\text{m}$. Ensuite, trois des sondes de la partie terminale de l'enceinte sont reliées à 3 cassettes de prélèvement fermées de 37 mm (Millipore®). Une cinquième sonde est reliée à un impacteur en cascade, le Sioutas (SKC Inc.). Ces deux dispositifs de prélèvement (cassette fermée et impacteur Sioutas) sont présentés et détaillés respectivement en Annexe V et Annexe VI. Pour les cassettes comme pour le Sioutas, la durée de l'échantillonnage est en moyenne de $50 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ à partir du moment où le bioaérosol est stabilisé (stabilité visualisable grâce aux données du Grimm). Enfin, la sixième et dernière sonde a été utilisée lors des essais complémentaires (pour l'étude des deux protocoles améliorés A' et B') pour l'ajout d'un spectromètre laser, le TSI™ LAS (Laser Aerosol Spectrometer), permettant de mesurer la taille des particules d'un aérosol et ainsi en définir la distribution granulométrique. Complémentaire du Grimm, il permet de mesurer des tailles beaucoup plus petites (allant de $0,09 \mu\text{m}$ à $7,5 \mu\text{m}$) par le biais de 100 canaux configurables.

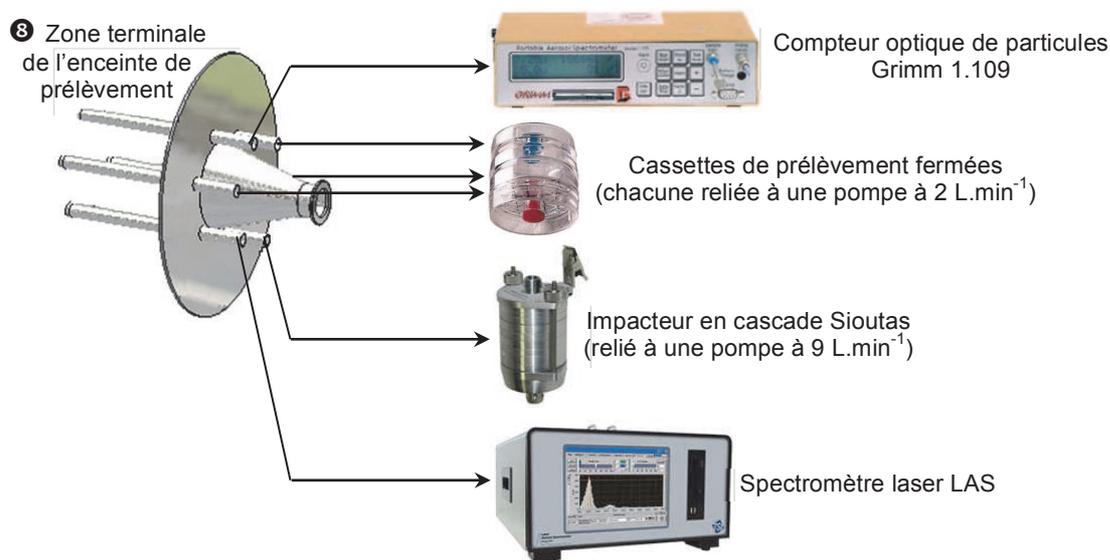


Figure 36. Appareils d'analyse et de prélèvement connectés en zone terminale de l'enceinte de prélèvement, pour la caractérisation des bioaérosols expérimentaux [images issus des sites www.directindustry.com, chromservis.cz et www.tsi.com].

Pour ce qui est de l'impacteur en cascade Sioutas, les flores impactées sur les membranes de chaque étage de collecte ont été extraites (Annexe VI) pour être analysées par mise en culture sur milieux gélosés (Annexe II). Les bioaérosols échantillonnés en cassettes fermées ont été extraits de la cassette (Annexe V) pour être analysés par mise en culture sur milieux gélosés (Annexe II) et par épifluorescence au DAPI (Annexe III). Enfin, les données issues du Grimm et celles issues du LAS ont été utilisées pour établir des distributions granulométriques du bioaérosol.

3.1.5 EXPLOITATION DES RÉSULTATS

3.1.5.1 Niveaux de concentrations des cultures et des bioaérosols

Tout d'abord, les analyses réalisées sur les cultures liquides ont permis d'obtenir des niveaux de concentrations de ces suspensions en microorganismes viables cultivables et exprimées en UFC.mL⁻¹ mais aussi en spores totales (spores.mL⁻¹).

Ensuite, les analyses concernant les bioaérosols fournissent (par le biais des prélèvements en cassettes fermées) des concentrations en viables cultivables et en spores totales. Initialement exprimées en UFC ou spores par millilitre de suspension, un calcul intermédiaire permet de ramener ces concentrations à une quantité d'air puisqu'il s'agit ici de bioaérosols. Les concentrations sont alors exprimées en UFC ou spores par mètre cube d'air prélevé, selon la formule :

$$C = \frac{c \times V_{\text{ext}} \times 1000}{V_{\text{air}}} \quad (\text{Équation 3})$$

où C est la concentration exprimée en UFC.m⁻³ ou en spores.m⁻³, c est la concentration exprimée en UFC.mL⁻¹ ou en spores.mL⁻¹, V_{ext} est le volume de suspension extrait de la cassette en mL (soit 10 mL) et V_{air} le volume d'air échantillonné en L, calculé en multipliant la durée du prélèvement (min) avec le débit moyen de la pompe (L.min⁻¹), ce dernier prenant en compte les débits avant et après prélèvement.

3.1.5.2 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Sioutas

Les données issues du Sioutas sont également des concentrations en UFC.mL⁻¹ pour chacun des étages d'impaction, concentrations là aussi converties en UFC.m⁻³. En revanche, les résultats sont représentés en distributions granulométriques avec le diamètre aérodynamique (en μm) représenté en échelle logarithmique sur l'axe des abscisses et la distribution des particules ramenée à l'amplitude logarithmique des classes sur l'axe des ordonnées. Cette grandeur, sans unité, se calcule selon la formule :

$$y = \frac{C_i}{C_{\text{tot}} \times d\log D_{\text{ae}}} \quad (\text{Équation 4})$$

où C_i représente la concentration moyenne en cultivables pour la classe i (en UFC par mètre cube d'air analysé), C_{tot} définit la concentration totale en cultivables tous étages confondus (UFC.m⁻³) et $d\log D_{\text{ae}}$ (sans unité) caractérise l'amplitude des classes en échelle logarithmique (différence des logarithmes des bornes supérieure et inférieure de la classe).

3.1.5.3 Granulométries obtenues avec les COP Grimm et LAS

Le Grimm, lui, fournit comme résultat un nombre de particules par litre d'air dont le diamètre optique est supérieur à une valeur donnée ($> 0,25 \mu\text{m}$, $> 0,28 \mu\text{m}$, $> 0,30 \mu\text{m}$...). Le principe est le même que pour les données issues de l'impaction sur le Sioutas : les résultats ont été représentés sous la forme d'une distribution granulométrique, avec le diamètre optique (en μm) représenté en échelle logarithmique comme axe des abscisses et la distribution des particules ramenée à l'amplitude logarithmique des classes sur l'axe des ordonnées. Cette grandeur sans unité se calcule selon la formule :

$$y = \frac{C_i}{C_{>0,25} \times d\log D_{ae}} \quad (\text{Équation 5})$$

où C_i représente la concentration moyenne en particules pour la classe i (en nombre de particules par litre d'air analysé), $C_{>0,25}$ définit la concentration totale en particules déterminée par le Grimm (en nombre par litre d'air) et $d\log D_{ae}$ (sans unité) caractérise l'amplitude des classes en échelle logarithmique (différence des logarithmes des bornes supérieure et inférieure de la classe).

Enfin, hormis les bornes des classes de diamètres optiques qui sont différentes, les données issues du LAS sont traitées de la même façon que celles issues du Grimm (distribution granulométrique des particules ramenée à l'amplitude logarithmique des classes). Pour les résultats LAS comme pour les résultats Grimm, les concentrations étant relevées à intervalles réguliers, l'analyse des données est réalisée sur une période durant laquelle le bioaérosol est jugé stable par l'opérateur.

3.1.5.4 Statistiques

Tous les paramètres attachés à ces exploitations de résultats (moyennes arithmétiques, écarts-types et intervalles de confiance à 95 %) ont été calculés avec le logiciel Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation). De même, les graphiques ont été réalisés avec ce même logiciel. En revanche, les tests statistiques (analyses de la variance à 95 % sur les données log associées à un test des étendues multiples) ont été réalisés par le biais du logiciel Statgraphics Centurion XV, version 15.2.00 (StatPoint Technologies). Dans les chapitres suivants, des abréviations sont utilisées pour la plupart des indicateurs ; ainsi, «probabilité» est substituée par la lettre p , IC signifie «intervalle de confiance» et r «coefficient de corrélation».

3.2 RÉSULTATS

3.2.1 STABILITÉ DES CULTURES CELLULAIRES LIQUIDES

Le premier élément étudié pour tenter de comparer les 4 protocoles A, B, C et D concerne la stabilité des cultures de cellules de *T. vulgaris* au cours du temps. La culture cellulaire préparée au temps t_0 est générée à 3 reprises consécutives dans la journée aux temps t_0 , t_1 et t_2 . L'évolution des concentrations en cultivable (mise en culture) et en spores totales (épifluorescence) de la culture est alors suivie aux temps t_0 , t_1 et t_2 (Figure 37). Et que cela soit en termes de cultivable ou de spores totales, il n'y a aucune différence statistique entre les concentrations à t_0 , celles à t_1 et celles à t_2 ($n = 3$; $0,1696 < p < 0,9973$) et ce, quel que soit le protocole utilisé. Autrement dit, il n'y a aucune perte significative en microorganismes durant toute la période entre t_0 et t_2 qui correspond approximativement à 5h, temps durant lequel ont lieu les 3 générations successives des cultures. Quel que soit le protocole,

les cultures sont stables pour une durée d'au moins 5 heures (temps jugé arbitrairement suffisant pour les futures expériences à mener).

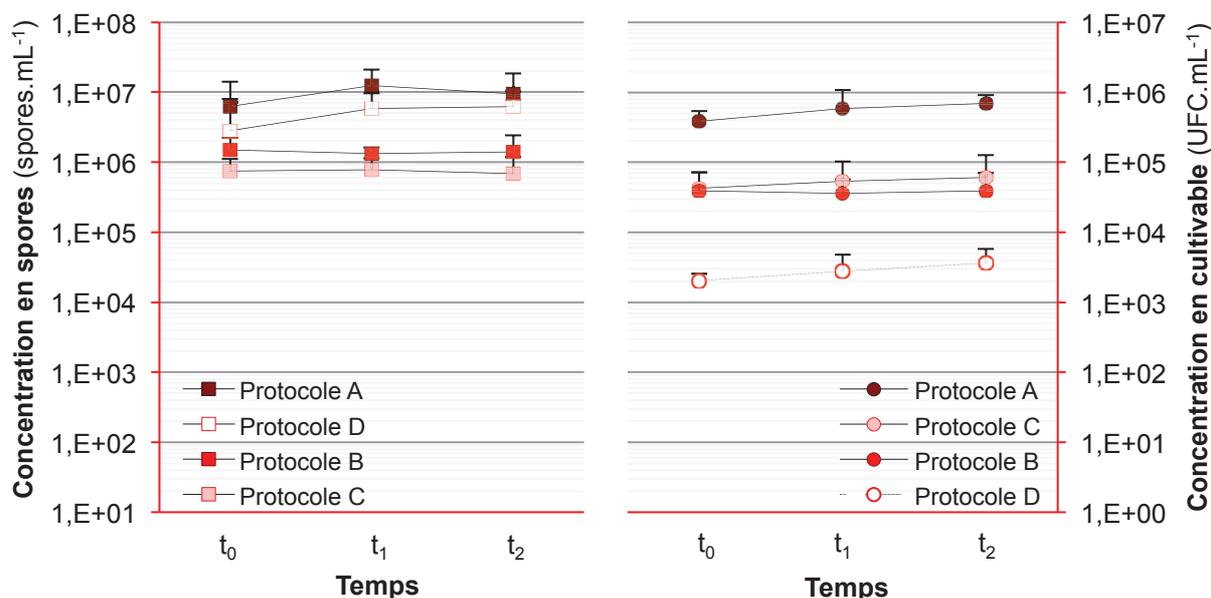


Figure 37. Concentrations en spores totales (□, graphe de gauche) et en bactéries cultivables (○, graphe de droite) des cultures cellulaires avant (t₀) et pendant (t₁ puis t₂) la génération, pour chacun des protocoles de préparation étudiés. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 3 mesures.

La stabilité des cultures à l'origine des bioaérosols est un paramètre important à caractériser mais qui ne permet pas d'éliminer ou de mettre en avant l'un des 4 protocoles A, B, C ou D. Chacun d'eux conduisant à des suspensions liquides stables, nous nous sommes ensuite intéressés aux niveaux de concentrations de ces mêmes cultures.

3.2.2 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES CULTURES CELLULAIRES

Les concentrations en cultivable ou en spores totales ont été mesurées sur chaque culture liquide de cellules de *T. vulgaris* avant leur aérosolisation par bullage. Les résultats présentés dans la Figure 38 sont les concentrations relevées sur les cultures à t₀. Les résultats des concentrations mesurées durant la génération (aux temps t₁ et t₂) n'ont pas été pris en compte dans ce graphique.

Une analyse de la variance sur les valeurs logarithmiques des concentrations, associée à un test des étendues multiples (n = 3 ; F = 57,22 ; p = 0,0000), a démontré qu'en terme de cultivable, les concentrations des cultures obtenues avec le protocole D sont statistiquement inférieures à celles obtenues avec n'importe lequel des 3 autres protocoles (la valeur moyenne est de 2,05(±0,49)x10³ UFC.mL⁻¹). Le protocole A, avec une valeur moyenne de 3,84(±1,59)x10⁵ UFC.mL⁻¹ permet la réalisation de cultures cellulaires significativement plus concentrées que tous les autres protocoles. En revanche, l'analyse ne montre aucune différence entre les protocoles B et C. La même analyse sur les concentrations en spores totales ne révèle aucune différence entre les 4 protocoles (n = 3 ; F = 1,38 ; p = 0,3173). La valeur la plus basse est de 7,42(±3,66)x10⁵ spores.mL⁻¹ (protocole C) alors que la plus élevée est de 6,29(±7,95)x10⁵ spores.mL⁻¹ (protocole A). Et le fait qu'il n'y ait pas de

différence statistique est à rapprocher de la mauvaise répétabilité de la méthode, les barres d'erreur (intervalles de confiance) étant relativement élevées pour ces mesures de concentrations par épifluorescence.

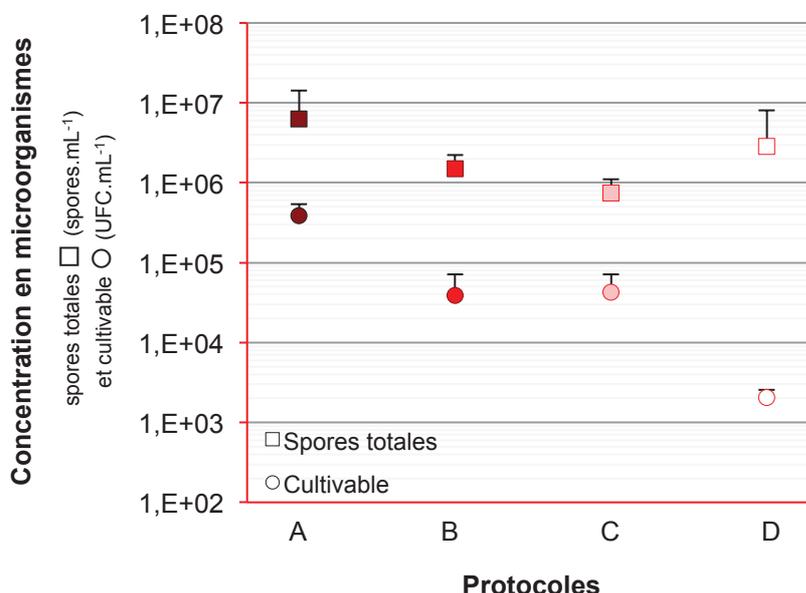


Figure 38. Concentrations en *T. vulgaris* obtenues par mise en culture (○) et épifluorescence (□) des cultures cellulaires avant génération, pour les protocoles de préparation A, B, C et D. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 3 mesures.

Même si le protocole D semble d'ores et déjà écarté pour des concentrations en cultivable trop faibles et que le protocole A est celui qui fournit les concentrations les plus élevées, il convient aussi et surtout de regarder les concentrations obtenues après génération, le bioaérosol étant notre matrice de travail. L'étape suivante est donc de comparer les concentrations obtenues après génération des différentes cultures cellulaires.

3.2.3 NIVEAUX DE CONCENTRATIONS DES BIOAÉROSOLS GÉNÉRÉS

Les concentrations en bactéries cultivables ou en spores totales ont été mesurées sur les bioaérosols obtenus après génération des cultures cellulaires réalisées à partir de l'un des 4 protocoles. Les résultats présentés en Figure 39 sont les concentrations relevées sur 9 bioaérosols issus de 3 cultures cellulaires différentes, chacune générée trois fois consécutivement dans une journée.

Une analyse de la variance sur les valeurs logarithmiques des concentrations, associée à un test des étendues multiples ($n = 9$; $F = 106,34$; $p = 0,0000$), a démontré qu'en terme d'UFC, les concentrations des bioaérosols obtenues avec le protocole D sont statistiquement inférieures à celles obtenues avec n'importe lequel des 3 autres protocoles. La moyenne ne dépasse pas 10^3 UFC.m⁻³ avec une valeur de $3,94(\pm 2,21) \times 10^2$ UFC.m⁻³. Le protocole A, avec une valeur moyenne de $1,51(\pm 0,26) \times 10^5$ UFC.m⁻³ permet la réalisation de cultures cellulaires significativement plus concentrées que les trois autres protocoles. De la même manière, l'analyse par épifluorescence des spores totales conduit à la même conclusion ($n = 9$;

F = 29,73 ; p = 0,0000). La valeur la plus basse relevée est de $1,12(\pm 0,49) \times 10^5$ spores.m⁻³ (protocole D) alors que la plus élevée est de $1,13(\pm 0,27) \times 10^6$ spores.m⁻³ (protocole A). Il est à noter également que, quel que soit le paramètre étudié (cultivable ou spores totales) les barres d'erreur (ici, les intervalles de confiance) sont extrêmement faibles pour les concentrations associées aux protocoles A et B. Ces mêmes intervalles de confiance associés aux protocoles C et D sont beaucoup plus élevés traduisant ainsi une reproductibilité moins bonne.

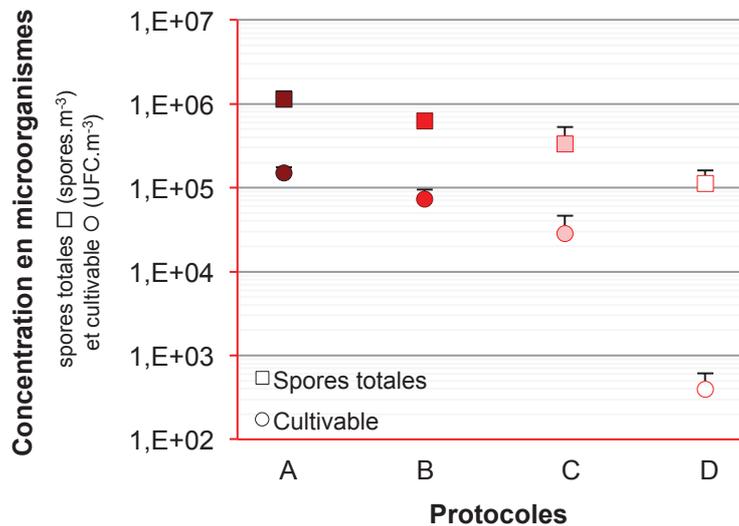


Figure 39. Concentrations en *T. vulgaris* obtenues par mise en culture (O) et épifluorescence (□) des bioaérosols obtenus après génération des cultures, pour les protocoles de préparation A, B, C et D. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 9 mesures.

Les premiers résultats sur cultures cellulaires ont montré que les protocoles A et B produisent des cultures de bonne qualité car riches en cellules et stables pendant la durée des expériences. Les bioaérosols générés par ces deux protocoles sont également les plus riches en cellules de *T. vulgaris* aussi bien en terme de cultivable que de spores totales. Ce sont aussi les deux protocoles qui permettent la meilleure reproductibilité des résultats. C'est pourquoi nous avons tenté d'améliorer ces deux protocoles (protocoles A' et B'). Les protocoles A' et B' ayant été testés uniquement à partir d'une seule culture cellulaire (au lieu de trois comme précédemment), les résultats présentés en Figure 40 sont les concentrations relevées sur 3 échantillons de bioaérosols générés consécutivement à partir d'une seule et même culture.

L'analyse de la variance sur ces concentrations a montré qu'en terme de cultivable, le protocole A' conduisait à des concentrations significativement plus élevées que les 3 autres protocoles (n = 3 ; F = 7,88 ; p = 0,0090). Néanmoins, l'intervalle de confiance associé est relativement élevé ce qui est à l'origine de la probabilité associée au test (0,9 %) qui rend la conclusion délicate et discutable. D'ailleurs, la même analyse, non plus à 95 % mais à 90 %, conclue qu'il n'y a pas de différence statistique entre les concentrations. En revanche, il n'y a aucune différence statistique entre les 4 protocoles en termes de concentrations en spores totales (n = 3 ; F = 2,24 ; p = 0,1605) cette conclusion découlant également des importantes barres d'erreur.

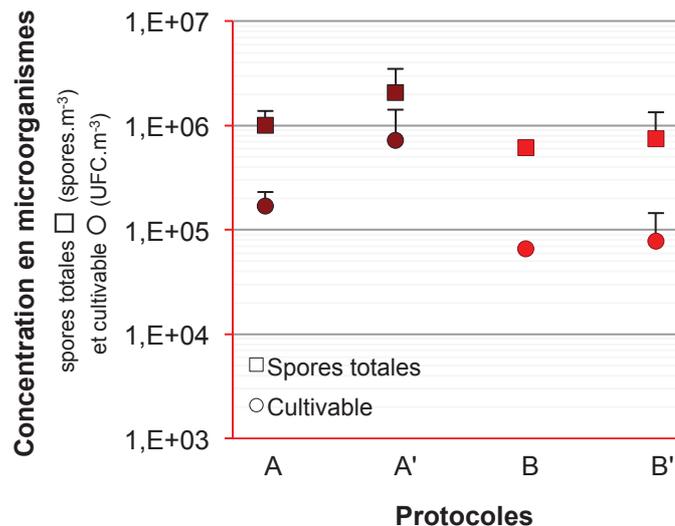


Figure 40. Concentrations en *T. vulgaris* obtenues par mise en culture (○) et épifluorescence (□) des bioaérosols obtenus après génération des cultures, pour les protocoles de préparation A, A', B et B'. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 3 mesures.

L'étude des niveaux de concentrations sur les échantillons de bioaérosols a permis l'élimination de deux protocoles (le C et le D) dont les concentrations, peu reproductibles, n'étaient pas assez élevées (moins de 3×10^4 UFC.m⁻³ et moins de 4×10^5 spores.m⁻³). Sur la base de ces résultats, il est difficile de conclure sur la qualité relative des protocoles A, A', B et B', l'étude des niveaux de concentration ne paraissant pas suffisante pour choisir préférentiellement l'un des protocoles. C'est pourquoi nous sommes intéressés aux distributions granulométriques obtenues pour ces 4 protocoles.

3.2.4 DISTRIBUTIONS GRANULOMÉTRIQUES DES BIOAÉROSOLS

3.2.4.1 Granulométries obtenues avec un Compteur Optique de Particules

Un relevé instantané et continu de la concentration en particules en sortie de l'enceinte de prélèvement avec un compteur optique de particules a permis l'obtention de distributions granulométriques des bioaérosols générés avec les protocoles A, A', B et B'. Ces 4 distributions sont présentées en Figure 41.

Tout d'abord, nous pouvons constater que les distributions des bioaérosols issus de l'aérosolisation des cultures préparées avec les protocoles A et A' sont très similaires voire superposables (Figure 41a et Figure 41b). Pour les deux, le COP Grimm® 1.109 révèle que la population dans sa globalité est submicronique avec la présence de très nombreuses particules inférieures à 0,3 µm. Les mesures effectuées avec le TSI™ LAS, qui permet de caractériser des classes de particules inférieures à celles observables au Grimm®, confirme une distribution avec un mode compris entre 0,1 et 0,2 µm (Figure 41c).

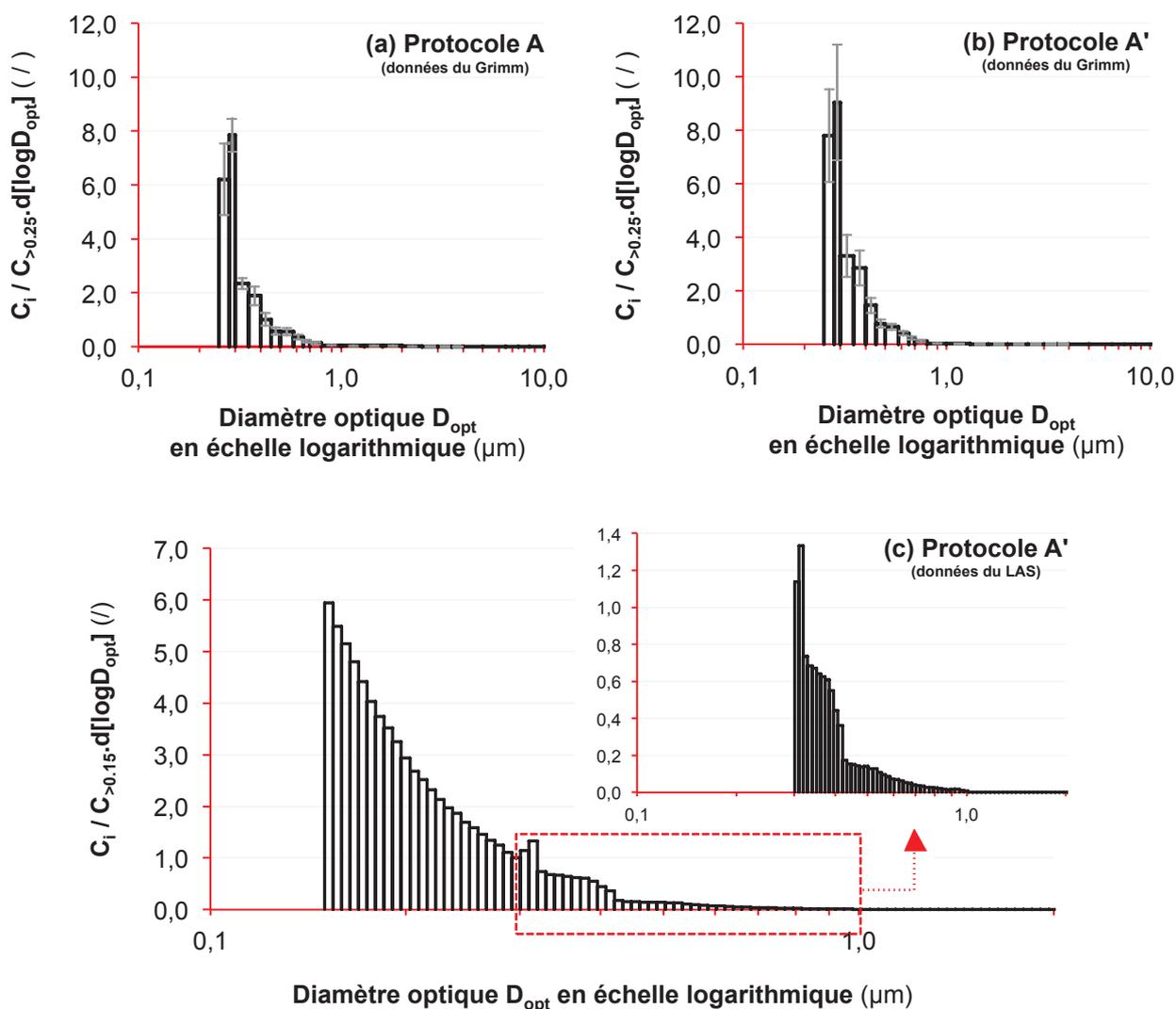


Figure 41. Distributions granulométriques des cellules de *T. vulgaris* aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles A et A'. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec les Compteurs Optiques de Particules Grimm® G 1.109 (a et b) ou TSI™ LAS (c) et les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 9 (protocole A) ou 3 (protocole A') mesures.

Le protocole A comme le protocole A' conduisent à l'aérosolisation d'une très grande quantité de particules résiduelles ; pour l'un comme pour l'autre des protocoles, il est impossible de distinguer une quelconque autre population de particules de diamètre optique supérieur à 0,3 μm. Il est très fortement probable que ces particules résiduelles proviennent du tampon phosphate, solution utilisée pour la récupération des cellules à partir des flasques mais aussi pour la reprise du culot en toute fin de préparation. Les distributions étant superposables, l'amélioration apportée au protocole A' (reprise du culot en eau ultrapure au lieu du tampon) ne semble pas être une solution alternative au problème des particules résiduelles qui viennent masquer la population d'intérêt.

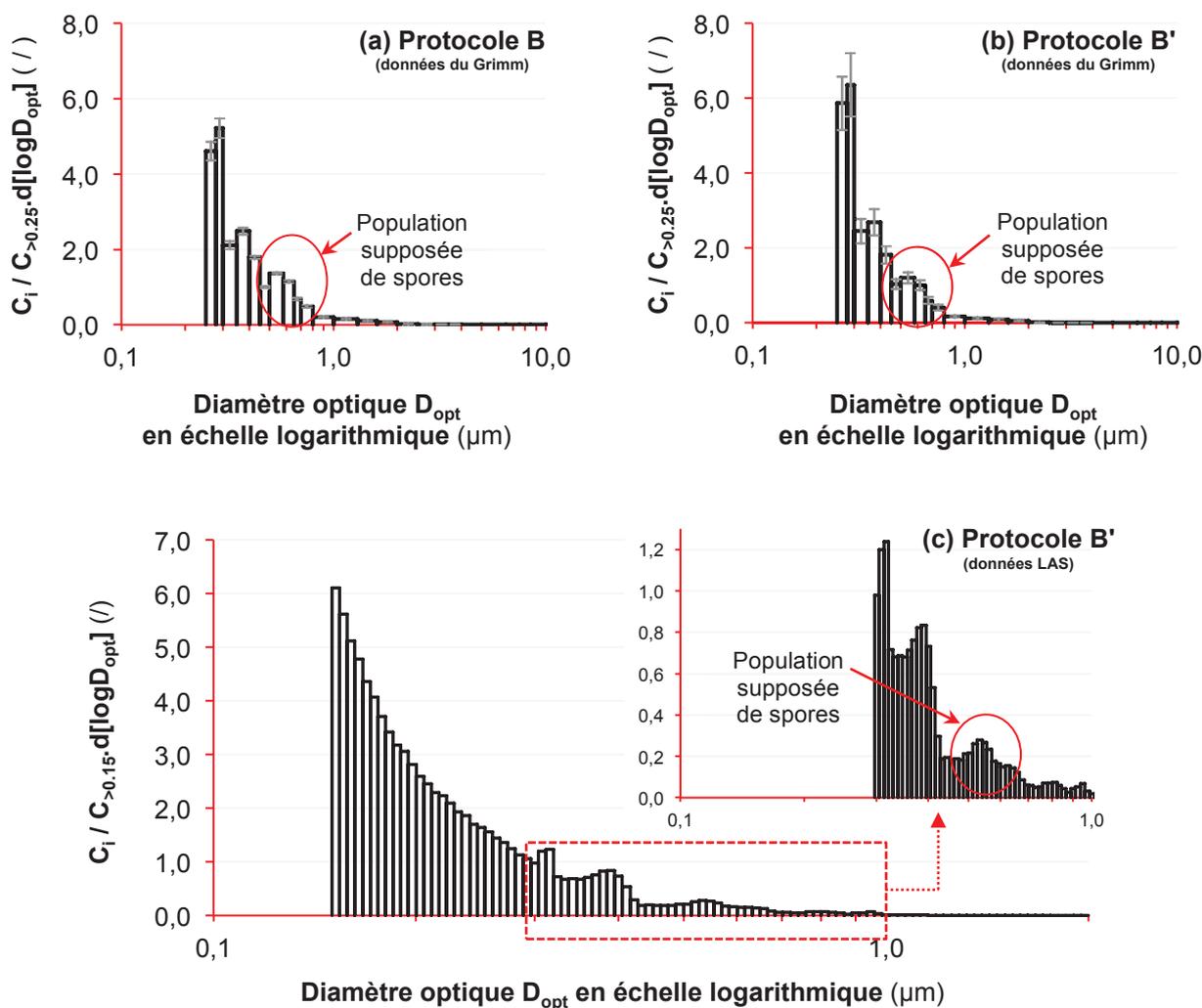


Figure 42. Distributions granulométriques des cellules de *T. vulgaris* aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles B et B'. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec les COP Grimm® G 1.109 (a et b) ou TSI™ LAS (c) et les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 9 (protocole B) ou 3 (protocole B') mesures.

Les distributions obtenues grâce au Grimm® pour les protocoles B et B' (Figure 42a et Figure 42b) sont très différentes de celles obtenues avec les protocoles A et A'. En effet, une partie des particules générées ont un diamètre optique supérieur à 1 μm. Et malgré la présence de particules résiduelles (fines particules inférieures à 0,3 μm), deux autres populations semblent se dessiner : une première centrée sur l'intervalle 0,35-0,40 μm et une seconde centrée sur l'intervalle 0,50-0,60 μm. Le fait que cette seconde population soit centrée sur un diamètre optique de 0,55 μm, proche de 0,57 μm qui est le diamètre aérodynamique attendu des spores de *T. vulgaris* (Reponen *et al.*, 1998), nous laisse fortement supposer qu'il s'agit de la population d'intérêt de spores isolées. De plus, les données obtenues avec le LAS viennent confirmer la présence de cette population d'intérêt (Figure 42c). Néanmoins, le diamètre optique n'est pas comparable à un diamètre aérodynamique (même si les valeurs ne sont pas fondamentalement éloignées) et cela ne nous permet pas d'aller plus loin dans l'interprétation. Les particules inférieures à 0,3 μm sont des particules résiduelles probablement dues à des traces de Tween 80 même si le culot est repris en eau ultrapure, mais la quantité est bien moins élevée que celle observée pour les protocoles A

et A'. La comparaison à présent du protocole B avec le protocole B' montre qu'il n'y a pas de différence notable, la modification entre les deux résultant d'une réduction de la taille des pores du fritté (de 16-40 μm à 10-16 μm). Les deux distributions granulométriques sont d'allure semblable et présentent les mêmes niveaux de concentration.

L'étude des distributions granulométriques des particules totales du bioaérosol a permis l'élimination de deux protocoles (A et A') entraînant l'aérosolisation d'un très grand nombre de particules non désirées et parasites, masquant l'éventuelle présence de la population d'intérêt. Sur les 6 protocoles initialement testés, deux restent encore à être évalués sur leurs différences, les distributions granulométriques en termes de particules totales ne l'ayant pas permis. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux distributions granulométriques en cultivable issues du prélèvement sur l'impacteur en cascade Sioutas.

3.2.4.2 Granulométries obtenues avec un impacteur en cascade

Les bioaérosols ont également été prélevés sur un impacteur en cascade, le Sioutas, de manière à obtenir une distribution granulométrique en cultivable. Les distributions obtenues pour les bioaérosols générés à partir des protocoles B et B' sont respectivement représentées en Figure 43a et Figure 43b.

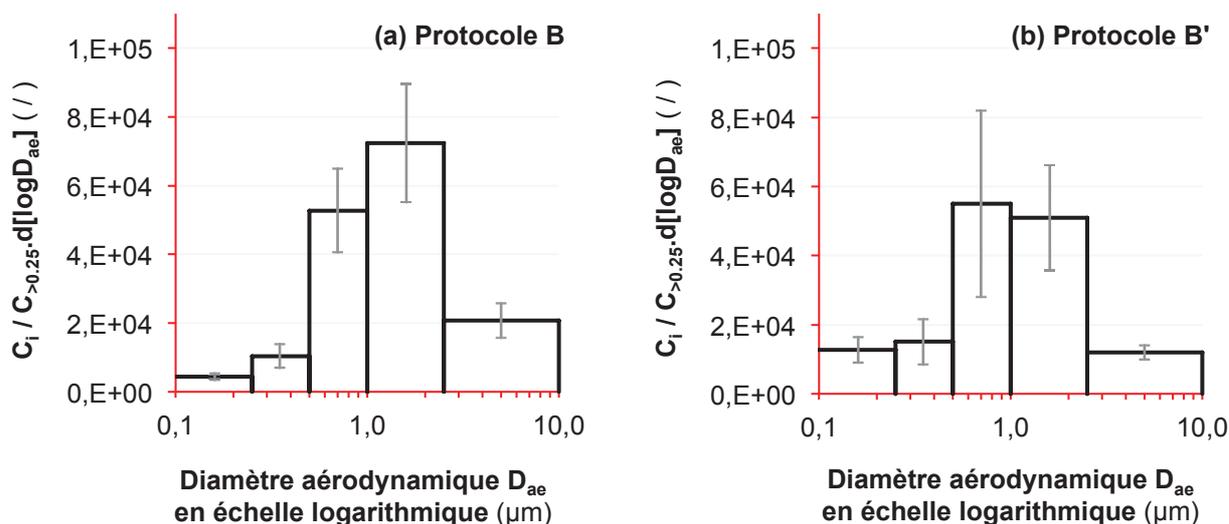


Figure 43. Distributions granulométriques des cellules cultivables de *T. vulgaris* aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles B ou B'. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec l'impacteur en cascade Sioutas et les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 9 (protocole B) ou 3 (protocole B') mesures.

Si aucune différence notable n'a pu être faite sur les distributions granulométriques précédentes, l'observation des Figure 43a et Figure 43b montre, en revanche, deux répartitions différentes même si, dans les deux cas, la majorité des particules biologiques cultivables est collectée sur les étages 0,5-1,0 μm et 1,0-2,5 μm . Le changement de porosité du fritté de filtration pour le protocole B' engendre une inversion des concentrations sur ces deux étages d'impaction. Pour le protocole B, la majorité des cellules aérosolisées cultivables se trouve sur l'étage d'impaction 1,0-2,5 μm alors que pour le protocole B', il s'agit de l'étage 0,5-1,0 μm ce qui paraît normal puisque le fritté utilisé pour le protocole B' est plus sélectif que celui utilisé pour B (pores plus petits). Or, Reponen *et al.* (1998) ont caractérisé les spores de

T. vulgaris comme ayant un diamètre aérodynamique moyen de 0,57 μm cette valeur pouvant aller jusqu'à un peu plus de 1 μm sous certaines conditions d'humidité relative notamment. Les faibles quantités de cultivable sur les deux premiers étages d'impaction (diamètres aérodynamiques compris entre 0,1 et 0,5 μm) laissent supposer qu'il s'agit de très petits fragments de mycélium. À noter également la présence d'entités cultivables sur l'étage 2,5-10 μm en concentration non négligeable, donc de tailles beaucoup plus importantes que le diamètre des spores de *T. vulgaris* attendu et qui pourrait signifier la présence d'agglomérats de spores et/ou de mycélium non fragmentés. Les données obtenues avec l'impacteur en cascade Sioutas permettent donc de montrer que les deux protocoles B et B' conduisent à deux types de bioaérosols de nature différente.

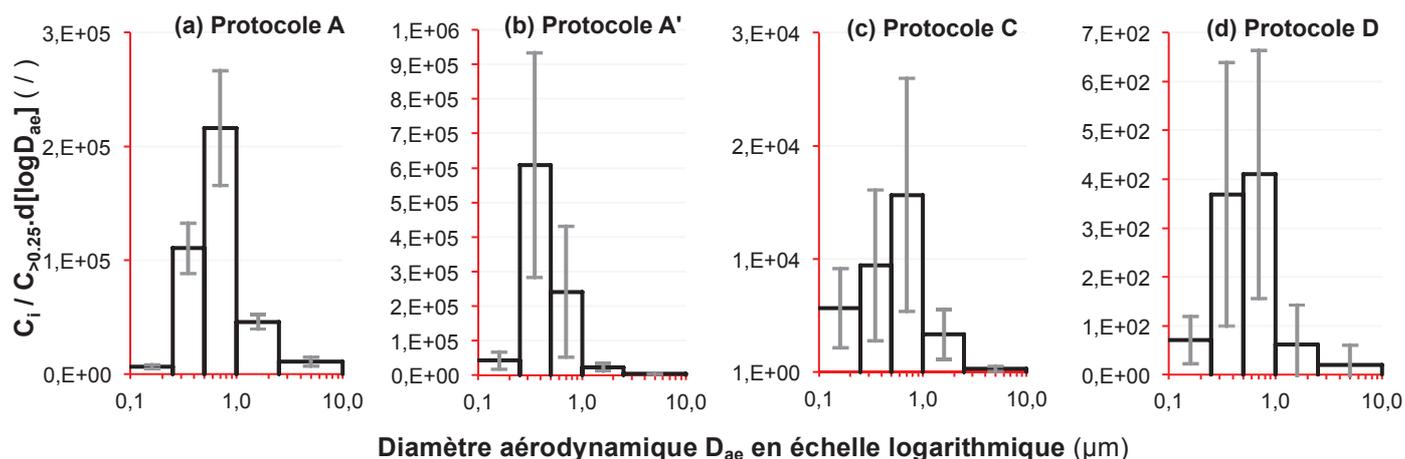


Figure 44. Distributions granulométriques des cellules cultivables de *T. vulgaris* aérosolisées à partir des cultures préparées selon les protocoles A, A', C ou D. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec l'impacteur en cascade Sioutas et les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur 9 (protocoles A, C et D) ou 3 (protocole A') mesures.

En plus de pouvoir apporter un élément de différenciation entre les deux protocoles B et B', ces distributions granulométriques ont également permis de confirmer les conclusions précédemment établies (Figure 44). À savoir la présence de très nombreuses particules submicromiques pour les protocoles A et A' (Figure 44a et Figure 44b respectivement) et des concentrations à la fois faibles et peu reproductibles pour les protocoles C et D (Figure 44c et Figure 44d respectivement). En effet, les particules cultivables prédominent sur l'étage d'impaction 0,5-1,0 μm pour le protocole A et sur l'étage 0,25-0,5 μm pour le protocole A'. Comme les données issues du Sioutas fournissent une concentration en cultivable, nous savons à présent que la population de fines particules résiduelles, déjà mises en évidence avec les données issues du Grimm, sont des entités cultivables qui pourraient être dues à l'étape de sonication qui fragmenterait les cellules végétatives en petites entités cellulaires à l'origine de ces distributions. C'est pourquoi l'amélioration apportée au protocole A (par récupération du culot final en eau ultrapure au lieu du tampon phosphate) n'a eu aucune incidence sur les distributions granulométriques Grimm (Figure 41a et Figure 41b). Ce n'était à priori pas le tampon phosphate qui était responsable de la grande quantité de particules résiduelles comme nous le pensions mais l'étape de sonication qui engendrait la fragmentation du mycélium. Pour ce qui est des protocoles C et D, les concentrations en cultivables sont effectivement très faibles avec moins de 2×10^4 particules sur l'étage le plus représenté pour le protocole C (Figure 44c) et moins de 5×10^2 pour le protocole D (Figure 44d).

En conclusion, les données obtenues grâce à l'impacteur en cascade Sioutas ont permis l'obtention de distributions granulométriques des particules cultivables conduisant au choix de l'un des deux protocoles B et B'. C'est le protocole B' qui, au vu de l'ensemble des résultats, paraît le plus approprié pour la génération de bioaérosols expérimentaux de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* dans le cadre de nos travaux. Le but a ensuite été de voir si ce protocole était applicable aux deux autres espèces modèles, *Thermobifida fusca* et *Streptomyces californicus* et voir si les résultats obtenus pour ces deux autres espèces sont similaires aux résultats obtenus pour *Thermoactinomyces vulgaris*.

3.2.5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de *Thermobifida fusca*

La génération de bioaérosols expérimentaux de cellules de *T. fusca* à partir d'une culture liquide préparée selon le protocole B' a permis l'obtention de résultats similaires à ceux obtenus pour les bioaérosols de *T. vulgaris*, malgré le fait que cette espèce soit beaucoup plus fastidieuse en termes de croissance. Une incubation de 15 jours ne conduit pas toujours à la croissance du microorganisme et donc à la formation de spores. Un exemple de distribution granulométrique des cellules aérosolisées de *T. fusca* est présenté en Figure 45. La population supposée d'intérêt (de diamètre optique compris entre 0,5 et 0,6 μm) est moins visible que ce qui avait été observé pour *T. vulgaris* mais néanmoins se devine. De plus, lorsque l'on observe les cellules aérosolisées de *T. fusca* au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI, il est possible d'observer de nombreuses spores relativement bien individualisées (seuls quelques amas peuvent ponctuellement être rencontrés) et quelques fragments de mycélium (Figure 46). Cette étude qualitative avait été réalisée sur les bioaérosols de *T. vulgaris* et montrait des résultats similaires (résultats non montrés).

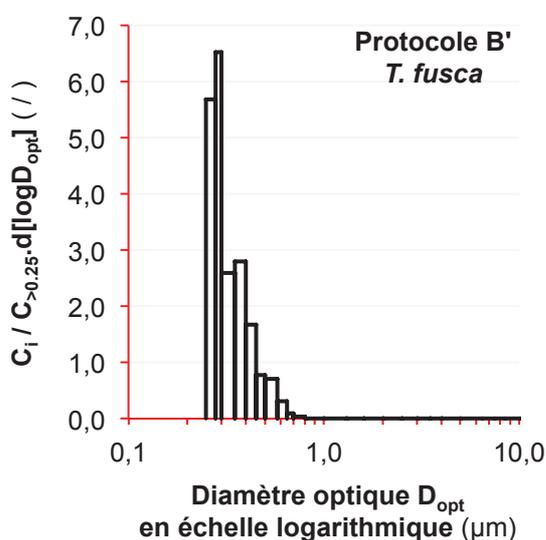


Figure 45. Distribution granulométrique des cellules de *T. fusca* aérosolisées à partir d'une culture préparée selon le protocole B'. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec les COP Grimm® G 1.109.

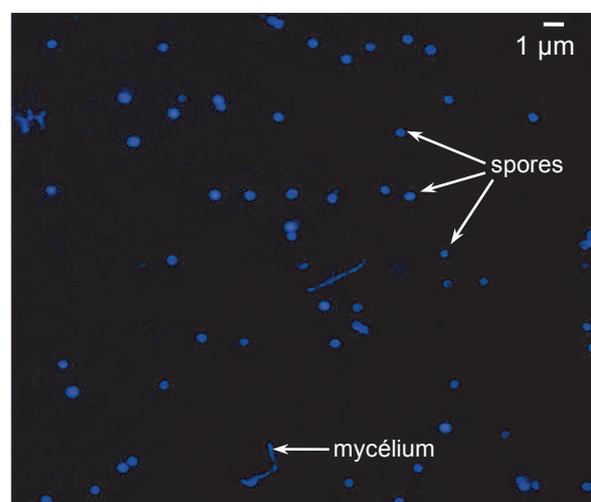


Figure 46. Cellules (spores et mycélium) de *T. fusca* aérosolisées à partir d'une culture liquide préparée avec le protocole B' et observées au microscope à épifluorescence (x1 000, microscope Leica DM2500, caméra Qicam Qimaging Fast1394, logiciel Histolab de Microvision Instruments).

Les analyses réalisées sur le deuxième modèle *Thermobifida fusca* démontrent que le protocole B' permet la réalisation de cultures liquides de cellules de cette espèce, aptes à être générées et produire un bioaérosol aux caractéristiques requises.

3.2.5.1 Aérosolisation de cellules de *Streptomyces californicus*

Avant d'analyser les résultats obtenus pour l'espèce *S. californicus*, il est à noter que la réalisation de la culture cellulaire (à partir de laquelle sont aérosolisées les cellules) ne s'est pas faite avec le protocole B'. En effet, une fois décrochées de la surface des géloses, les cellules (spores et mycélium) colmatent immédiatement le fritté de porosité 4 rendant impossible la filtration. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser le protocole qui, au vu des résultats observés avec l'espèce *T. vulgaris*, semblait le meilleur après le protocole B'. Il s'agit du protocole B dont la seule différence est l'utilisation d'un fritté de porosité 3 (pores de diamètres un peu plus grands).

À concentrations en cultivables ou en spores totales équivalentes, les distributions granulométriques obtenues pour cette espèce sont très similaires et présentent une allure identique avec une population de particules fines inférieures à 0,3 µm et toujours une population centrée sur 0,55 µm mais recouverte par des particules plus fines (résultat non montré). En revanche, un des essais menés sur cette espèce nous a permis l'obtention d'une culture extrêmement concentrée en spores et en entités cultivables de manière générale, puisque le bioaérosol résultant de la génération de cette culture était concentré à hauteur de $6,97 \times 10^8$ spores.m⁻³ d'air généré et $9,54 \times 10^7$ UFC.m⁻³. Jusqu'alors, la concentration en spores la plus élevée obtenue était un bioaérosol de cellules de *T. vulgaris* dont la concentration était inférieure à $3,7 \times 10^7$ spores.m⁻³.

L'obtention d'un tel bioaérosol nous a fourni des détails supplémentaires sur les diamètres optiques des populations de particules. En effet, la distribution granulométrique de ce bioaérosol extrêmement riche en spores et en entités cultivables est présentée en Figure 47. Relativement atypique par rapport à toutes les distributions obtenues et présentées précédemment, elle révèle la présence d'une population de diamètre optique médian de 0,575 µm (population comprise entre 0,5 et 0,65 µm) que l'on supposait être la population d'intérêt mais que l'on n'avait jamais pu mettre en évidence jusqu'à présent.

Les analyses réalisées sur le troisième modèle *Streptomyces californicus* démontrent que le protocole B permet la réalisation de cultures liquides de cellules de cette espèce, aptes à être aérosolisées et à produire un bioaérosol aux caractéristiques requises pour la suite de nos expérimentations.

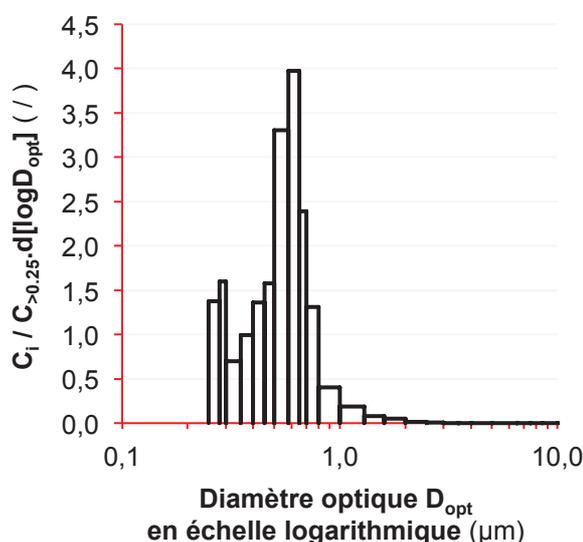


Figure 47. Distribution granulométrique des cellules de *S. californicus* aérosolisées à partir d'une culture préparée selon le protocole B. Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec les COP Grimm® G 1.109.

3.3 DISCUSSION

3.3.1 CONDITIONS DE MISES EN CULTURE DES SOUCHES EN MILIEU GÉLOSÉ

Avant de discuter des différents protocoles de préparation testés, il convient de se demander si en amont de la préparation, la croissance des trois espèces à l'origine des cultures de cellules aptes à être générées est satisfaisante. Pour la croissance sur flasques, les trois espèces *Thermoactinomyces vulgaris* (ATCC® 43649), *Thermobifida fusca* (ATCC® BAA-629) et *Streptomyces californicus* (ATCC® 3312) sont ensemencées sur gélose Trypticase™ Soy Agar durant 15 jours, à 50 °C pour les deux premières et à 28 °C pour la dernière. Ces conditions n'ont pas été choisies au hasard. Concernant le milieu et la température de croissance, le fournisseur de ces souches ATCC®, LGC Standards, préconise l'ensemencement de *T. vulgaris* sur gélose TSA (BBL™ Trypticase™ Soy Agar) à 50 °C, celui de *T. fusca* sur milieu Hagerdal (Hagerdal *et al.*, 1978) à 50 °C et celui de *S. californicus* à 26 °C sur gélose aux extraits de levure et de malt (Difco™ ISP medium 2). Or le milieu Hagerdal est une gélose relativement complexe au vu des éléments qui la composent. Pas moins de 10 sels différents parmi d'autres éléments entrent dans la composition du milieu, ce qui, à court terme, peu poser des problèmes d'organisation et d'efficacité. Un autre milieu recommandé (notamment par d'autres fournisseurs comme le centre agréé DSMZ), le milieu Czapek, lui a été substitué. De plus, pour la croissance de l'espèce et la production de spores, nous avons choisi une durée d'incubation de 15 jours comme compromis entre les durées de 7 jours (Gazenko *et al.*, 1998) et 3 semaines (Reponen *et al.*, 1998) fournies par la littérature. Et ces mêmes auteurs ont d'ailleurs utilisé une durée d'une semaine pour une espèce de *Streptomyces*. C'est pour être certain d'avoir une production sporale suffisante que nous avons décidé de pousser à deux semaines la durée d'incubation pour chacune des trois espèces. Néanmoins, après avoir testé ces paramètres de croissance recommandés, si un tapis microbien était clairement formé pour *T. vulgaris* après 15 jours d'incubation, ce n'était pas du tout le cas pour les deux autres espèces qui ne présentaient aucun signe de croissance ou au mieux quelques traces de mycélium. Cette absence de croissance ne pouvant à priori pas être due à une incubation insuffisante, nous nous sommes intéressés aux données de la littérature. Mais celles-ci ne nous ont pas fourni d'éléments visant à s'intéresser à un milieu plutôt qu'un autre. De nombreuses géloses, spécifiques ou non, peuvent être utilisées. En revanche, de cette recherche nous avons noté que la culture de *S. californicus* était plutôt réalisée à 28 °C (et non 26 °C), notamment auprès des autres organismes de collection, tel que les centres DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures) ou JSCC (Japan Society for Culture Collection). Nous avons donc décidé d'essayer de cultiver les deux microorganismes sur gélose non spécifique TSA, *T. fusca* à 50 °C et *S. californicus* à 28 °C. Les résultats ayant été aussi concluants qu'avec la souche de *T. vulgaris*, toutes les mises en culture pour croissance et formation de spores ont été réalisées en gélose TSA durant 15 jours à 50 °C ou 28 °C selon la souche. Ce premier point de croissance des souches a donc fait l'objet d'une courte étude d'optimisation même si les résultats n'ont pas été présentés en tant que tels.

3.3.2 COMPARAISON DES PROTOCOLES DE PRÉPARATION

Au total, 6 protocoles de préparation d'une culture liquide de cellules apte à être générée par bullage ont été étudiés et comparés. Le travail a principalement été réalisé sur la souche *Thermoactinomyces vulgaris*, les deux autres ayant été utilisées pour la confirmation du protocole choisi et l'apport de quelques résultats supplémentaires. La comparaison s'est faite par étude de nombreux paramètres qui ont permis au fur et à mesure d'éliminer un ou plusieurs protocoles ; ces paramètres sont très diversifiés

puisqu'il s'agit de la concentration en microorganismes des cultures cellulaires liquides avant leur génération, de même que leur stabilité dans le temps durant toute la période de génération ainsi que la concentration des bioaérosols issus de ces générations. Le but est d'obtenir des bioaérosols relativement concentrés afin de pouvoir réaliser des gammes de concentrations pour les travaux envisagés par la suite. La variabilité des mesures est aussi prise en compte, des résultats reproductibles étant recherchés. Mais ces paramètres ne suffisent pas à conclure c'est pourquoi des informations complémentaires ont été apportées par les distributions granulométriques associées aux bioaérosols générés, le but étant d'obtenir un bioaérosol représentatif de celui potentiellement retrouvé en conditions réelles d'exposition.

3.3.2.1 Concentrations en microorganismes cultivables et en spores totales

En étudiant les caractéristiques des cultures cellulaires liquides de cellules de *T. vulgaris*, nous avons mis en évidence que n'importe lequel des 4 protocoles A, B, C ou D (et par extrapolation A' et B') est stable sur une période de 5 h à 6 h, période largement suffisante pour les travaux présentés dans le chapitre suivant. À ce niveau là de l'étude, les protocoles A, B et C présentent des niveaux de concentrations en microorganismes qui ne sont pas statistiquement différents, ce qui n'est pas le cas du protocole D pour lequel la concentration en cultivable est extrêmement faible pour une culture pure liquide. C'est aussi le protocole qui mène aux concentrations en bioaérosols générés les plus faibles que ce soit en cultivables ou en spores. Or, ce protocole D, par ailleurs détaillé en Figure 33, a pour particularité d'avoir une première sélection des cellules récupérées des flasques par élimination des entités inférieures à 0,45 μm (filtration à travers une membrane) et une deuxième sélection par traitement à l'éthanol à 30 %. Dans leurs travaux, Gazenko *et al.*, (1998) précisent que ce traitement de seulement une minute à l'éthanol non concentré n'a pas d'incidence sur la viabilité des spores mais est suffisant pour détruire les cellules végétatives. On pourrait donc imaginer que ces spores, bien présentes à en juger par les concentrations aussi bien dans les cultures que dans les bioaérosols, perdent leur cultivabilité sous l'effet du traitement à l'éthanol. Néanmoins, les distributions granulométriques en cultivables (Figure 44) comme en particules totales (graphique non montré) ont une allure tout à fait similaire aux distributions obtenues pour le protocole A (une population bien distinguable de particules résiduelles retrouvées au Grimm et le cultivable essentiellement sur les étages d'impaction 0,25-0,5 μm et 0,5-1 μm du Sioutas). Les résultats obtenus avec ce protocole sont compliqués à interpréter et quelques peu contradictoires et surtout, les concentrations obtenues sont beaucoup trop faibles pour espérer pouvoir faire des gammes de concentrations comme nous le souhaitons. C'est pourquoi il a été le premier des protocoles à être éliminé.

Ensuite, un autre protocole a pu être éliminé au regard des concentrations des bioaérosols expérimentaux (on ne s'attache plus aux cultures avant génération puisqu'il n'y a pas de différence de concentrations sur les protocoles restants) : il s'agit du protocole C qui, en plus d'être associé à une mauvaise reproductibilité des résultats, présente des concentrations plus faibles que les deux autres protocoles. Pour ce protocole (détaillé en Figure 32), la récupération des cellules de *T. vulgaris* n'est faite qu'avec de l'eau ultrapure stérile, là où les autres protocoles font intervenir des agents chimiques et/ou mécaniques (solutions de Tween 80 ou de tampon phosphate conjuguées ou non à l'action de billes de verre). Il ne paraît pas absurde de conclure que l'eau seule est beaucoup moins efficace que les autres solutions pour la récupération des spores et du mycélium de *T. vulgaris* et d'émettre l'hypothèse que la grande variabilité des résultats obtenus résulte de la mise en contact d'une solution d'eau ultrapure avec ces spores, de nature hydrophobes (Erikson, 1947). Une fois ce protocole C éliminé pour cause de concentrations faibles qui plus est, non reproductibles, ne reste plus que 4 protocoles sur les 6.

Enfin, au regard des protocoles restants, A et A' fournissent des concentrations en cultivables et en spores totales supérieures aux protocoles B et B'. C'était déjà le cas pour les cultures de cellules où les concentrations en cultivables comme en spores totales étaient supérieures pour les cultures préparées avec le protocole A. Si l'on regarde plus en détail les protocoles (Figure 30 et Figure 31) les protocoles A et A' sont basés sur une récupération des cellules avec du tampon phosphate et des billes de verre conjugués à une sonication et la phase de purification fait intervenir deux centrifugations. Les protocoles B et B' sont basés sur une récupération des cellules avec du Tween 80 et des billes de verre, la phase de purification enchaînant une étape de filtration et une de centrifugation. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables, au niveau de la récupération des cellules et/ou au niveau du nettoyage de la suspension de cellules. On peut dès lors envisager que l'utilisation de la solution de tampon phosphate est plus efficace pour le décrochage des cellules que ne l'est le Tween 80 ou bien que l'augmentation de la concentration en microorganismes est à mettre sur le compte de l'étape de sonication, décrite par les auteurs du protocole comme favorisant le décrochage des cellules de la surface des billes de verre (Kawamoto *et al.*, 1982), voire les deux conjuguées. À l'inverse, il est aussi possible d'imaginer que cette différence de concentrations est essentiellement due à l'étape de filtration des protocoles B et B', la filtration étant plus sélective qu'une centrifugation et donc, pouvant conduire à une perte en microorganismes. À noter que les auteurs du protocole A ont démontré qu'il n'y avait pas d'effet du pH sur la cultivabilité des spores des souches de leur étude, les protocoles A et A' faisant intervenir un tampon phosphate à pH 7.

3.3.2.2 Granulométries des bioaérosols et nature des cellules aérosolisées

L'analyse de distributions granulométriques est relativement compliquée à faire dans la mesure où les compteurs optiques de particules (COP Grimm et COP LAS) ne mesurent en aucun cas la même chose que l'impacteur Sioutas. Les compteurs de particules donnent un résultat en diamètre optique sur toutes les particules du bioaérosol alors que l'impacteur fournit un diamètre aérodynamique uniquement sur les particules viables et cultivables de ce même bioaérosol. Comparer les données est également difficile puisqu'il n'existe aucune relation simple entre diamètre optique et diamètre aérodynamique d'une particule.

Ce sont des essais ultérieurs sur l'aérosolisation de cellules de *Streptomyces californicus*, dont les résultats premiers sont d'ailleurs présentés dans le chapitre qui suit, qui ont permis d'obtenir un élément de réponse très important. En effet, une des cultures cellulaires de *S. californicus*, extrêmement concentrées en spores avec presque $7,0 \times 10^8$ spores.m⁻³ (concentration mise en évidence par épifluorescence après marquage au DAPI) a fourni une granulométrie particulière en rapport avec toutes celles précédemment étudiées, mais qui nous a permis de mettre en évidence cette population de spores de *S. californicus* alors que jusque là, nous n'avions que des hypothèses concernant les essais réalisés avec *T. vulgaris*. Ceci est en grande partie dû au fait que la préparation de la culture a été réalisée avec le protocole B (moins sélectif que le protocole B' et donc, permettant une concentration plus élevée) conjuguée à des paramètres de génération permettant la génération d'un bioaérosol concentré (ceci fait l'objet d'un paragraphe détaillé dans le chapitre qui suit). Ces résultats ont permis de situer les spores de *S. californicus* comme ayant un diamètre optique compris entre 0,5 et 0,65 µm (diamètre optique médian de 0,575 µm). Or, malgré le peu de données à ce sujet, les spores de *Streptomyces californicus* ont un diamètre aérodynamique estimé inférieur à 1 µm (Markkanen *et al.*, 2009). Celui des spores de *Thermoactinomyces vulgaris* est évaluée à 0,57 µm (Reponen *et al.*, 1998). Néanmoins, nos propres expérimentations et observations nous ont montré que le diamètre d'une spore n'était pas constant au sein d'une même espèce et même au sein d'un échantillon donné. Bien que non précis, il nous a été

donné de voir des spores à 0,6 μm de diamètre avec le logiciel Histolab (Microvison Instrument) et d'autres à 0,9 μm au sein d'un même échantillon contenant une seule et même espèce provenant de la même culture. C'est pourquoi cette analyse, complémentaire mais non des moindres, des distributions granulométriques et des niveaux de concentrations de ce bioaérosol très concentré nous a permis de confirmer que la population d'intérêt pour nous (composée d'une très grande part de spores mais aussi de fragments de mycélium) a un diamètre optique compris entre 0,5 et 0,65 μm . Et que cette même population d'intérêt fait donc partie des entités cultivables dénombrées sur l'étage de l'impacteur correspondant à la classe des particules comprises entre 0,5 et 1,0 μm .

À partir de là et grâce à cette conclusion, l'interprétation des granulométries obtenues lors des essais de comparaison des protocoles n'est plus le seul fait d'hypothèses. Les granulométries Grimm obtenues à partir des protocoles A et A' (Figure 41) révèlent la présence en grande proportion de particules résiduelles, inférieures à 0,3 μm , ainsi que la présence de particules fines comprises entre 0,3 et 0,5 μm . Mais la population d'intérêt comprise entre 0,5 et 0,65 μm n'est pas visualisable, ni grâce au Grimm, ni même grâce au LAS, en zoomant sur la partie d'intérêt. La première hypothèse émise concerne les particules résiduelles de diamètre optique inférieur à 0,3 μm que nous pensons être des particules résiduelles dues aux composants du tampon phosphate utilisé pour ce protocole. En effet, pour le protocole A, le culot final est repris dans du tampon phosphate, cette solution étant alors le constituant majoritaire de la culture cellulaire. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous l'avons remplacé par de l'eau ultrapure lors de l'amélioration au protocole A devenu ainsi le protocole A'. Néanmoins, après centrifugation l'élimination du surnageant n'est jamais totale et des traces de tampon peuvent encore être retrouvées dans le bioaérosol généré. La deuxième hypothèse envisagée concerne les particules de diamètres optiques compris entre 0,3 et 0,5 μm qui pourraient être des fragments de mycélium. Les auteurs du protocole dont s'inspire le protocole A (Kawamoto *et al.*, 1982) ont démontré dans leurs travaux que le mycélium des actinomycètes sur lesquels portent leur étude (*Micromonospora* sp.) n'est pas affecté par une sonication de 30 secondes (ou très peu), qu'il commence à se fragmenter au bout de deux minutes, pour être totalement disloqué au bout de 30 minutes. Même s'il ne s'agit pas de la même espèce, la sonication dans le protocole A étant de 20 minutes, il est très probable que la population de particules comprises entre 0,3 et 0,5 μm de diamètre optique soit constituée de fragments de mycélium. C'est d'autant plus probable que les données obtenues en cultivable avec le Sioutas pour le protocole A' démontrent que la population majoritairement retrouvée est située sur l'étage d'impaction 0,25-0,5 μm et que, de ce fait, ces particules sont donc des entités cultivables. Les granulométries en cultivables obtenues pour le protocole A montre que l'étage le plus représenté est l'étage 0,5-1,0 μm et au vu des conclusions précédentes, il est alors possible d'envisager que les cellules cultivables sont très proches de la limite inférieure de l'étage, à savoir 0,5 μm . Cette étape de sonication semble donc avoir un impact non négligeable sur l'ensemble des résultats et peuvent également expliquer les concentrations en cultivable et en spores plus élevées qu'avec les autres protocoles B et B'. La sonication, en plus d'être à l'origine d'une fragmentation hyphale des cellules végétatives conduisant à un nombre plus élevé d'entités potentiellement cultivables, peut également conduire à une désagglomération des spores entre eux ou à un détachement des spores du mycélium de par les vibrations engendrées par ce traitement. Les spores qui n'auraient pas été comptées par épifluorescence du fait qu'elles soient prises dans un agglomérat de spores non comptables, se retrouvent alors dénombrées, ce qui entraîne une concentration plus élevée.

Si l'on regarde à présent ce que l'on obtient pour les protocoles B et B', les distributions granulométriques issues des données Grimm et confirmées par les données LAS (Figure 42) révèlent la présence de 3 populations de particules : les deux populations déjà discutées pour les protocoles A et A' (particules résiduelles de diamètre optique inférieur à 0,3 μm et fines particules de diamètres compris entre 0,3 et 0,5 μm) mais aussi et surtout une troisième population de diamètres optiques compris entre 0,5 et 0,65 μm , cette dernière population contenant les spores d'intérêt pour nos travaux. La granulométrie en cultivables du protocole B vient également appuyer ce résultat dans la mesure où on met en évidence que l'étage le plus concentré (proportionnellement à la taille de la classe) est l'étage d'impaction 0,5-1,0 μm . Pour le protocole B, il s'agit de la classe 1,0-2,5 μm , ce qui est un résultat tout à fait logique puisque le fritté utilisé en B est moins sélectif que celui utilisé en B', du fait de pores de diamètres plus grands. Il permet alors la récupération d'entités plus grosses telles que des amas de spores ou du mycélium.

Un schéma récapitulatif permettant de resituer les différents types de cellules (spores, agglomérats de spores, fragments de mycélium...) sur les distributions granulométriques obtenues avec le COP Grimm et l'impacteur Sioutas (et donc, de faire le lien entre ces deux derniers) est présenté en Figure 48.

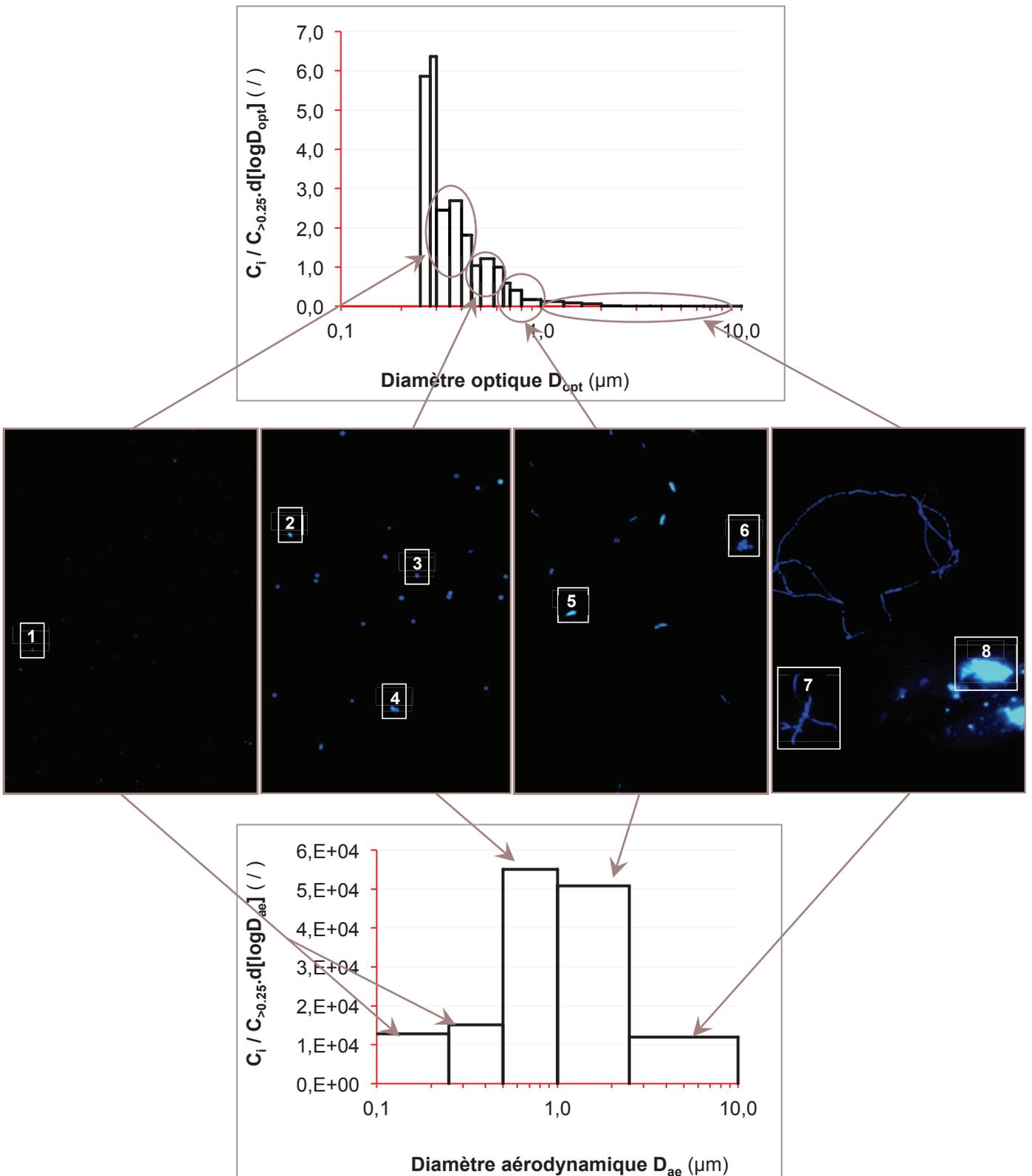


Figure 48. Mise en relation des populations obtenues avec le COP Grimm (graphe du haut) et l'impacteur Sioutas (graphe du bas) avec les différents types de cellules de *T. vulgaris* observées par épifluorescence. Les granulométries, ici présentées, sont celles obtenues avec le protocole B'.

1. 2. 5. fragments de mycélium / 3. spore isolée / 4. spores accolées par deux / 6 et 8. agglomérats de spores / 7. grosse structure mycéliale.

3.3.2.3 Choix du protocole de préparation des cultures aptes à la génération d'actinomycètes

Le but de cette étude préalable était de pouvoir générer des bioaérosols contenant des cellules d'actinomycètes et de pouvoir obtenir une bonne reproductibilité lors de la production de bioaérosols expérimentaux. Ces bioaérosols permettront ensuite la validation de l'outil PCR développé, avant de l'étudier sur des bioaérosols collectés en conditions réelles d'exposition. Il est en effet beaucoup plus facile de faire une première caractérisation en conditions dites de laboratoire, avec des échantillons de nature et de concentrations connus et maîtrisés. La génération est ici réalisée par bullage sur une culture liquide de cellules et 4 protocoles de préparation de cette culture issus de la littérature ont été testés de manière à définir lequel est le plus adapté à l'obtention de bioaérosols de manière reproductible et avec des concentrations aussi élevées que possible en cellules. Ce choix s'est donc fait sur la base de plusieurs critères, profitables sinon indispensables.

En effet, tout d'abord, nous avons cherché à obtenir des bioaérosols expérimentaux avec des concentrations d'un certain niveau. Nous verrons dans le chapitre suivant que les travaux ont été menés sur des bioaérosols présentant des concentrations différant entre elles de plusieurs logs. Lors de cette comparaison de protocoles, les paramètres de génération n'ont pas fait l'objet d'une optimisation. Donc, nous nous sommes placés dans l'optique de pouvoir encore augmenter sensiblement la concentration des bioaérosols (moyennant le réglage de paramètres que nous verrons également dans le chapitre suivant), de la même façon qu'il est toujours possible (et beaucoup plus facile) de générer de faibles concentrations. Plus les niveaux de concentrations obtenus sont élevés, plus la gamme de concentrations des bioaérosols expérimentalement produits est large. Ceci nous permet alors de balayer la majorité des concentrations rencontrées en conditions réelles d'exposition plutôt que se restreindre à des concentrations basses ne reflétant pas la réalité du terrain.

Les protocoles B et B' sont les deux protocoles qui permettent l'obtention de bioaérosols ayant des concentrations en cellules élevées et similaires, de l'ordre 10^5 UFC et 10^6 spores par mètre cube d'air. Ce sont des concentrations plus que satisfaisantes dans la mesure où il est possible d'espérer augmenter ces concentrations d'un facteur 10 par l'optimisation des paramètres de génération. Des bioaérosols expérimentaux dont la concentration en cellules peut atteindre 10^7 spores.m⁻³ d'air permet de balayer une large gamme de concentrations potentiellement retrouvées en plates-formes de compostage. Les concentrations engendrées par les protocoles A et A' étaient légèrement supérieures, ce n'était en revanche pas le cas des protocoles C et D produisant des bioaérosols de concentrations beaucoup plus faibles.

Deux autres paramètres qui ont également été pris en considération sont la stabilité dans le temps de la culture préparée et la reproductibilité du protocole de préparation. Même s'il permet l'obtention de bioaérosols très concentrés, un protocole ne sera pas retenu s'il ne permet pas de réaliser une culture stable sur une période de 5h environ, ni des cultures reproductibles donnant des bioaérosols de concentrations équivalentes à paramètres de génération constants. Les protocoles B et B' sont des protocoles qui permettent l'obtention de cultures stables, il n'y a pas de décroissance en microorganismes ni de perte de la viabilité des cellules. De plus, les intervalles de confiance associés aux valeurs de concentrations moyennes calculées ont démontré que les différentes cultures étaient obtenues de manière très reproductible d'un essai à l'autre. Ce n'était en revanche pas le cas des protocoles C et D.

Ensuite, la nature du bioaérosol est importante, à savoir le type de cellules qui le compose. En effet les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses sporulantes qui forment donc du mycélium (cellules végétatives) à l'origine de spores. Néanmoins, ce sont les spores (plus que le mycélium) qui ont été

démontrées comme porteuses des antigènes de paroi responsables des inflammations pulmonaires à l'origine des pneumopathies d'hypersensibilité. Il est donc important que le bioaérosol produit contienne en majorité ces spores d'intérêt, bien que les résultats aient démontré qu'obtenir une suspension ne contenant que des spores est impossible. D'ailleurs, lorsque l'on regarde ces protocoles et les différentes étapes qui les composent, il est évident (lorsque ce n'est pas indiqué par l'auteur) que les cellules visées par la préparation sont les spores. En effet, chacun des 4 protocoles testés se compose de deux grandes étapes : une première étape de récupération de toutes les cellules produites par le microorganisme et une seconde étape de purification par élimination du mycélium et tout autre élément. Mais les résultats ont démontré qu'obtenir une suspension de spores et uniquement de spores est impossible, de par la présence d'artéfacts tels que mycélium, restes de géloses... Néanmoins ces artéfacts sont en plus ou moins grande quantité selon le protocole utilisé, le but étant d'obtenir un bioaérosol expérimental le plus proche possible du bioaérosol échantillonné en conditions réelles d'exposition, ici en plate-forme de compostage. Le protocole B' permet la génération d'un bioaérosol complexe composé d'un mélange de spores isolées, de spores agglomérées et de fragments de mycélium de diverses tailles (fragments inférieurs à 0,5 μm ou mycélium s'étalant sur plusieurs micromètres de long). La composition est la même pour le protocole B mais quantitativement, il y a un peu plus de particules de grande taille. Ces deux protocoles (notamment le B') conduisent donc à l'obtention de bioaérosols qualitativement très intéressants de par leurs caractéristiques cellulaires. Les bioaérosols, composés en grande partie de spores mais aussi de fragments de mycélium sont proches des bioaérosols réels échantillonnés dans les environnements de travail (en plates-formes notamment). Et ceci n'est pas le cas pour les autres protocoles puisque, par exemple, les bioaérosols issus des cultures préparées avec les protocoles A', C ou D contiennent en grande partie de très petits fragments de mycélium.

Enfin, un dernier paramètre qui a également compté dans le choix du protocole concerne le fait que les protocoles B et B', à la différence de tous les autres, permettent la visualisation des différentes populations de particules. En effet, pour ces deux protocoles, nous avons pu mettre en évidence sur les distributions granulométriques, la population de particules résiduelles, la population des petits fragments de mycélium mais aussi la population de spores, là où cette population d'intérêt est totalement noyée par la prédominance de particules résiduelles pour tous les autres protocoles. Or, visualiser la population d'intérêt, grâce aux mesures en temps réel fournies par le COP Grimm, est un atout considérable notamment lorsque l'on souhaite produire un bioaérosol avec une concentration pré-estimée. Moyennant l'ajustement d'un paramètre développé par Simon *et al.*, (2012), l'indicateur de génération I_G que l'on verra plus en détail dans le chapitre suivant, nous pouvons prédire les niveaux de concentrations (en spores et/ou en cultivable) du bioaérosol, en tout début de génération avant qu'il ne soit échantillonné. Donc, la visualisation en temps réel de la population d'intérêt permet l'utilisation et l'ajustement d'un paramètre qui lui, permet une pré-caractérisation du bioaérosol avant même sa génération.

En conclusion générale de ce chapitre, les nombreux essais menés ont permis la mise au point d'un protocole de préparation de cultures de cellules d'actinomycètes permettant la génération de bioaérosols expérimentaux. Six protocoles ont été testés et les résultats obtenus ont montré que ces protocoles influençaient la nature du bioaérosol généré. Le but recherché est d'obtenir des bioaérosols expérimentaux aux concentrations élevées, reproductibles et aux caractéristiques proches des bioaérosols environnementaux. Ce sont les protocoles B' et B (ajustement en fonction de l'espèce) qui permettent d'obtenir des bioaérosols expérimentaux ayant les caractéristiques précédentes. Ces protocoles seront utilisés dans la suite de l'étude pour le développement, l'optimisation et la caractérisation de techniques en conditions dites de laboratoire, avant de les évaluer en conditions réelles d'exposition.

CHAPITRE 4

Caractérisation de la méthode PCR en conditions de 'laboratoire'

4.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	155
4.1.1 ÉTUDE SUR CULTURES PURES DE CELLULES.....	155
4.1.1.1 Préparation des cultures pures de cellules.....	155
4.1.1.2 Analyses réalisées.....	155
4.1.2 ÉTUDE SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX.....	156
4.1.2.1 Préparation des cultures liquides et génération par bullage.....	156
4.1.3 ANALYSES RÉALISÉES	157
4.1.4 EXPLOITATION DES RÉSULTATS	158
4.2 RÉSULTATS	158
4.2.1 DÉNOMBREMENTS SUR CULTURES DE CELLULES DE <i>T. vulgaris</i>	158
4.2.2 DÉNOMBREMENTS SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX.....	159
4.2.2.1 Bioaérosols de <i>T. vulgaris</i>	159
4.2.2.2 Bioaérosols de <i>T. fusca</i>	161
4.2.2.3 Bioaérosols de <i>S. californicus</i>	162
4.3 DISCUSSION	163
4.3.1 GAMMES DE CONCENTRATIONS DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS ET PERTINENCE DES RÉGRESSIONS	163
4.3.2 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC LA MISE EN CULTURE SUR MILIEUX GÉLOSÉS	164
4.3.3 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC L'ÉPIFLUORESCENCE PAR COLORATION AU DAPI.....	166
4.4 CONCLUSION	168

CHAPITRE 4 - CARACTÉRISATION DE LA MÉTHODE PCR EN CONDITIONS DE 'LABORATOIRE'

Après avoir développé et optimisé la technique de qPCR, dont le détail est présenté en Chapitre 1, nous avons cherché à comparer cette technique à deux techniques plus traditionnellement utilisées : le dénombrement par mise en culture sur milieux gélosés et la microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI. Cette comparaison s'est faite à deux niveaux : tout d'abord sur cultures de cellules pures (cellules de *Thermoactinomyces vulgaris*) puis, sur bioaérosols expérimentaux (cellules de *T. vulgaris*, de *Thermobifida fusca* ou de *Streptomyces californicus*). Cette étape de validation en conditions dites « de laboratoire » sur des échantillons connus et maîtrisés est nécessaire avant de pouvoir appliquer la méthode à des échantillons de terrains (bioaérosols environnementaux).

4.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE

4.1.1 ÉTUDE SUR CULTURES PURES DE CELLULES

4.1.1.1 Préparation des cultures pures de cellules

La souche ATCCTM 43649 de *Thermoactinomyces vulgaris* a été inoculée (par repiquage à l'écouvillon d'une culture stock) dans deux fioles contenant chacune 25 mL de bouillon nutritif de soja (Tryptic Soy Broth, AES) et incubée à 50 °C, sous agitation permanente à 80 rpm. Après 15 jours de croissance, la culture de *T. vulgaris* a été récupérée et centrifugée 7 min à 7 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot repris dans 40 mL d'eau ultrapure stérile au total. Cette solution mère a ensuite été diluée (facteur 10) cinq fois successivement dans une solution de Tween 80 à 0,05 %. Les 6 suspensions ainsi obtenues ont été divisées en trois parties aliquotées (constituant 3 répétitions), chacune de ces 18 suspensions étant analysée de la même façon.

4.1.1.2 Analyses réalisées

Les 18 suspensions cellulaires obtenues ont été analysées de trois manières différentes. Tout d'abord, un dénombrement de la flore viable cultivable par ensemencement sur milieux gélosés a été réalisé, les résultats s'exprimant en unités formant colonie par millilitre de suspension. S'agissant de l'espèce *T. vulgaris*, la mise en culture a été réalisée sur gélose TSA (Becton Dickinson), avec une incubation à 50 °C durant 3 jours. Un dénombrement des spores totales a été réalisé par épifluorescence après marquage des cellules au DAPI, les résultats s'exprimant alors en nombre de spores par millilitre de suspension. Chacune de ces deux analyses, mise en culture sur milieux gélosés et épifluorescence au DAPI, sont présentées et détaillées respectivement en Annexe II et Annexe III (mise en place de l'analyse, calculs des concentrations, expression des résultats...). Enfin, les 18 échantillons sont analysés en qPCR, par extraction puis amplification de l'ADN, le gène *gyrB* étant le gène ciblé. La méthodologie est décrite en Annexe IV et comme les cultures préparées sont des cultures de cellules de *T. vulgaris*, l'ADN extrait a été amplifié avec les oligonucléotides Tvu F751-R824/S776 avec une température d'hybridation-élongation de 58 °C.

4.1.2 ÉTUDE SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX

4.1.2.1 Préparation des cultures liquides et génération par bullage

Les protocoles d'ensemencement de chacune des trois espèces modèles ont préalablement été décrits dans le Chapitre 2 (paragraphe 2.1.1.1) sachant que 6 flasques de culture sont nécessaires pour réaliser une seule culture liquide apte à être générée par bullage et ce, quelque soit l'espèce. Autant de flasques sont nécessaires pour l'obtention de volume et de concentration suffisants.

Après 15 jours de croissance du germe selon les conditions qui lui sont spécifiques (50 °C pour *T. vulgaris* et *T. fusca* et 28 °C pour *S. californicus*), les cellules sont décrochées de la surface de la gélose par ajout de 15 mL d'une solution de Tween 80 à 0,05 % et d'environ 400 billes de verre dans chacune des 6 flasques. Les solutions sont immédiatement filtrées sur fritté de porosité 3 ou 4. Ce premier (de pores de 16 à 40 µm de diamètre) est utilisé pour l'aérosolisation des cellules de *S. californicus* alors que la filtration de *T. vulgaris* ou de *T. fusca* se fait sur fritté de porosité 4 (pores de 10 à 16 µm de diamètre). Une fois filtrée, les 90 mL de suspension sont centrifugés 7 min à 7 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris en eau ultrapure stérile dans un volume final de 50 mL ou de 100 mL selon la concentration du bioaérosol désirée. Tout ceci est résumé dans la Figure 49.

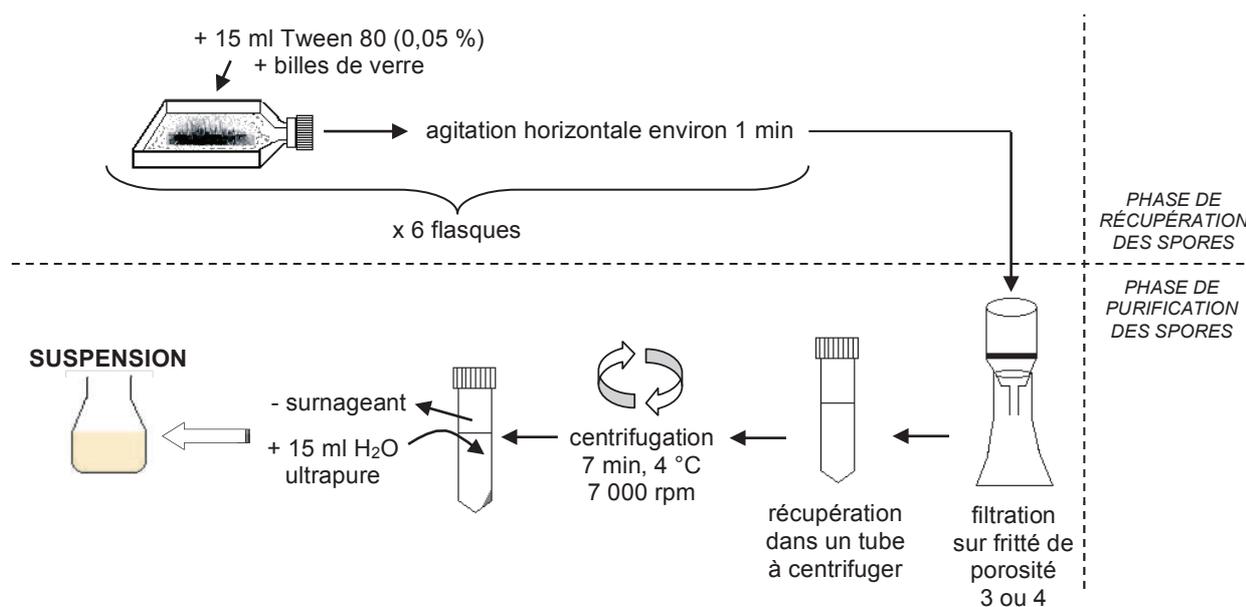


Figure 49. Protocole de préparation d'une culture liquide de cellules d'actinomycètes (fritté 3 pour les cellules de *Streptomyces californicus* et 4 pour celles de *Thermoactinomyces vulgaris* et de *Thermobifida fusca*) à partir de cultures gélosées et basés sur la norme AFNOR NF T 72-145 (2006).

La génération par bullage de la suspension liquide a déjà fait l'objet d'une présentation dans le Chapitre 3 (paragraphe 3.1.3), le procédé étant identique. Néanmoins, à l'inverse des essais précédents, le but a été de générer des bioaérosols de différentes concentrations et donc, avoir une gamme d'échantillons la plus large possible en termes de concentrations. Ceci a pu se faire à la fois par la modification du débit de génération Q_G , pouvant varier entre 0,5 et 5,0 L.min⁻¹, mais aussi par dilution de la culture liquide initiale (culture dont le protocole est présenté sur la Figure 49). Parallèlement à ceci, un outil a été développé afin de pouvoir cibler la concentration finale du bioaérosol avant même de

commencer son prélèvement (Simon *et al.*, 2012). Il s'agit du calcul d'un indice de génération appelé I_G dont la formule est la suivante :

$$I_G = \frac{C_N(d_{opt} \geq 0,45 \mu m)}{C_N(0,30 \leq d_{opt} < 0,45 \mu m)} \times f_D \text{ (Équation 6)}$$

où $C_N(d_{opt} \geq 0,45 \mu m)$ et $C_N(0,30 \leq d_{opt} < 0,45 \mu m)$ représentent les concentrations en nombre de particules pour les diamètres optiques supérieur à $0,45 \mu m$ et pour ceux compris entre $0,30$ et $0,45 \mu m$ respectivement. Ces deux grandeurs sont mesurées en temps réel grâce au compteur optique de particules Grimm 1.109. Et f_D est un facteur représentant le degré de dilution de la suspension initiale. Arbitrairement, $f_D = 1$ lorsque le culot de cellules obtenu à partir des 6 flasques de culture est remis en suspension dans 50 mL d'eau ultrapure et $f_D = 0,5$ lorsque il est repris dans 100 mL. Dès lors, f_D peut prendre n'importe quelle valeur comprise entre $0,5$ et 1 en fonction du volume d'eau dans lequel le culot est remis en suspension.

Au final, ce sont 14 cultures liquides de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris*, 7 de cellules de *Thermobifida fusca* et 5 de cellules de *Streptomyces californicus* qui ont été préparées en vue d'être générées. Une solution d'eau ultrapure stérile servant de blanc a également été aérosolisée pour l'obtention d'échantillons négatifs.

4.1.3 ANALYSES RÉALISÉES

Les 27 bioaérosols générés (26 à partir de cultures liquides d'actinomycètes et 1 à partir d'une solution d'eau stérile) ont tous été analysés et caractérisés de la même manière par deux outils. Une des sondes de l'enceinte était reliée au compteur optique de particules, le Grimm® 1.109 alors que les 5 autres étaient connectées à des cassettes fermées de prélèvements chacune reliée à une pompe Gilian® GilAir de débit nominal $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (Annexe V). La durée de l'échantillonnage était de $45 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ à partir du moment où le bioaérosol était stabilisé (stabilité visualisable grâce aux données du Grimm). Une fois le prélèvement effectué et la flore extraite des cassettes (protocole décrit dans l'Annexe V), les échantillons ont été analysés de trois manières différentes, les mêmes que pour les cultures pures de cellules (4.1.1.2) : un dénombrement de la flore viable cultivable par ensemencement sur milieux gélosés, un dénombrement des spores totales par microscopie à épifluorescence après marquage des cellules au DAPI et quantification de l'ADN par qPCR après extraction préalable. Les mises en culture se font sur gélose TSA (Becton Dickinson), avec une incubation à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (bioaérosols de *T. vulgaris* ou de *T. fusca*) ou à $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (bioaérosols de *S. californicus*) et une lecture quotidienne durant 3 jours. Pour les qPCR, l'amplification de l'ADN de *T. vulgaris* est réalisée avec les oligonucléotides Tvu F751-R824/S776, celle de *T. fusca* avec les oligonucléotides Tfu F374-R472/S419 et celle de *S. californicus* avec les oligonucléotides SM fw8-rev9/p6. La température d'hybridation-élongation utilisée pour les amplifications avec les oligonucléotides Tvu et SM est de $58 \text{ }^\circ\text{C}$, elle est de $63,3 \text{ }^\circ\text{C}$ pour les oligonucléotides Tfu. Chacune de ces trois analyses, mise en culture sur milieux gélosés, épifluorescence au DAPI et quantification de l'ADN par qPCR, sont présentées et détaillées respectivement en Annexe II, Annexe III et Annexe IV (mise en place de l'analyse, calculs des concentrations, expression des résultats...).

4.1.4 EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Tout d'abord, pour les échantillons de cultures pures, les analyses réalisées ont permis d'obtenir 27 concentrations moyennes (5 réplicats par bioaérosol généré) en microorganismes viables cultivables (exprimées en UFC.mL⁻¹), en spores totales (spores.mL⁻¹) et en ADN (copies du gène ciblé.mL⁻¹).

Ensuite, les analyses concernant les bioaérosols ont fourni eux aussi (par le biais des prélèvements en cassettes fermées) des concentrations en viables cultivables, en spores totales et en copies de gène. Initialement exprimées en UFC, spores ou nombre de copies du gène ciblé par millilitre de suspension, un calcul intermédiaire (Équation 3, vue dans le chapitre 3.1.5) permet de ramener ces concentrations à un volume d'air. Les concentrations sont alors exprimées en UFC, spores ou copies de gène par mètre cube d'air prélevé.

Le compteur de particules Grimm, qui fournit comme résultat un nombre de particules par litre d'air analysé dont le diamètre optique est supérieur à une valeur donnée (> 0,25 µm, > 0,28 µm, > 0,30 µm...) nous a servi essentiellement à déterminer la période de stabilité du bioaérosol généré et à calculer l'indice I_G grâce aux concentrations en nombre de particules pour les diamètres optiques supérieur à 0,45 µm et pour ceux compris entre 0,30 et 0,45 µm.

Tous les paramètres statistiques attachés à ces exploitations de résultats (moyennes arithmétiques, écarts-types et intervalles de confiance à 95 %) ont été calculés avec le logiciel Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation). De même, les graphiques ont été réalisés avec ce même logiciel. En revanche, les tests statistiques (régression simple à un facteur avec probabilité associée, coefficient de corrélation, test de Durbin-Watson...) ont été réalisés par le biais du logiciel Statgraphics Centurion XV, version 15.2.00 (StatPoint Technologies). Dans les chapitres suivants, des abréviations sont utilisées pour la plupart des indicateurs ; ainsi, «probabilité» est substituée par la lettre p, IC signifie «intervalle de confiance» et r «coefficient de corrélation».

4.2 RÉSULTATS

4.2.1 DÉNOMBREMENTS SUR CULTURES DE CELLULES DE *T. vulgaris*

Le premier résultat à observer concerne les niveaux de concentrations obtenus pour ces échantillons et de ce fait, la gamme de concentrations que nous avons obtenue. Celle-ci s'étend de 7,50x10⁴ à 1,00x10¹ UFC.mL⁻¹ (soit une différence de 3,9 log) et de 2,75x10⁷ à 1,75x10³ spores.mL⁻¹ (représentant une différence de 4,2 log). La préparation des cultures de cellules permet donc l'obtention d'une gamme de concentrations relativement large, représentée par 6 échantillons dont les concentrations sont théoriquement espacées d'un facteur 10.

Une régression linéaire entre la variable « concentration en ADN » et la variable « concentration en viable cultivable » (sur les valeurs logarithmiques) sur cultures pures de cellules de *T. vulgaris* montre une relation statistiquement significative et forte (n = 6 ; r = 0,997 ; p < 10⁻⁴) entre les deux variables (Figure 50). Le modèle ajusté permet d'expliquer 99,31 % de la variabilité de la concentration en ADN et l'absence d'autocorrélation sérielle des résidus (p = 0,4296) confirme la validation du modèle. La même régression linéaire entre la variable « concentration en ADN » et la variable « concentration en spores totales » (valeurs logarithmiques) montre également une relation statistiquement significative (n = 6 ; r = 0,998 ; p < 10⁻⁴) entre ces deux variables. Le modèle explique 99,52 % de la variabilité issue de C_{ADN} et comme précédemment, le modèle est validé par une absence d'autocorrélation sérielle des résidus (p = 0,8947).

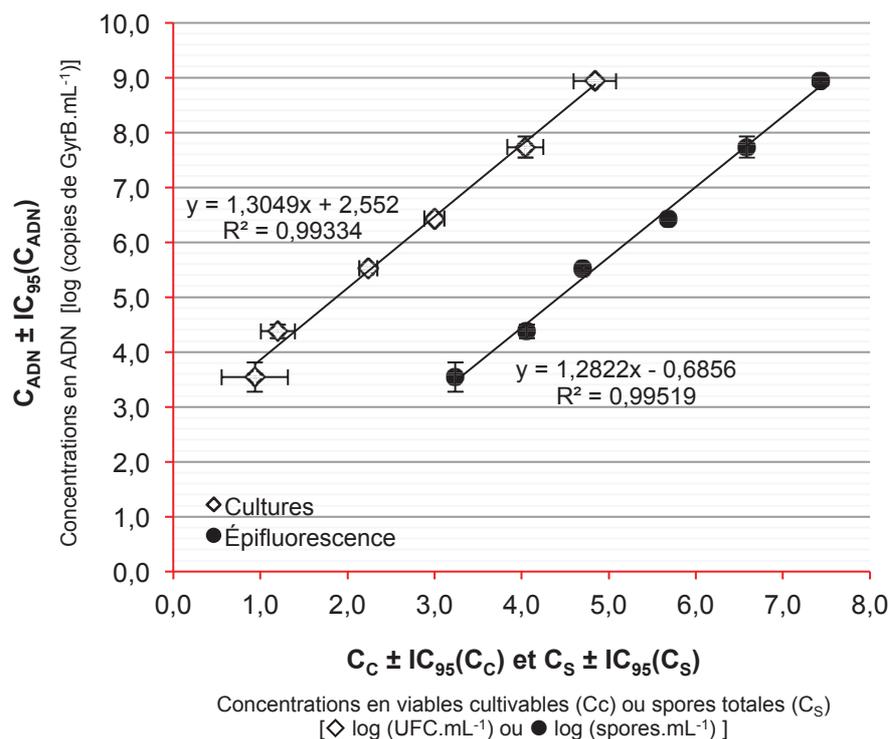


Figure 50. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur cultures pures de *T. vulgaris* : concentration en bactéries cultivables C_C (◇) ou en spores totales C_S (●). Les concentrations sont représentées en valeurs logarithmiques (log₁₀). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur trois répétitions.

Il y a donc une corrélation entre les concentrations obtenues en qPCR et celles obtenues avec les techniques traditionnelles (mise en culture ou épifluorescence) sur cultures liquides pures de cellules de *T. vulgaris*. Par ailleurs, les niveaux de concentrations obtenus montrent que la concentration en ADN est de $3,79 \times 10^2$ à $1,14 \times 10^4$ fois plus élevée que celle en cultivable selon l'échantillon considéré (la différence moyenne entre les deux valeurs est de $3,38 \pm 0,50$ log). Ces résultats font également apparaître que, pour ce type d'échantillons, la concentration en ADN est de $2,17 \times 10^0$ à $3,12 \times 10^1$ fois plus élevée que celle en spores totales (la différence moyenne entre les deux valeurs est de $0,81 \pm 0,47$ log). Les trois techniques sont donc corrélées mais avec des niveaux de concentrations très différents.

4.2.2 DÉNOMBREMENTS SUR BIOAÉROSOLS EXPÉRIMENTAUX

4.2.2.1 Bioaérosols de *T. vulgaris*

Pour ce qui est de *Thermoactinomyces vulgaris*, treize cultures de cellules ont été aérosolisées. Les concentrations mesurées en cultivable s'étendent de $8,63 \times 10^3$ à $2,55 \times 10^6$ UFC.m⁻³ d'air et celles en spores totales de $4,32 \times 10^5$ à $3,63 \times 10^7$ spores.m⁻³ d'air, soit respectivement une étendue en concentrations de 2,5 log et de 1,9 log sur les 13 échantillons de bioaérosols.

Pour la comparaison des concentrations en ADN avec celles en cultivables tout comme pour la comparaison des concentrations en ADN avec celles en spores, les treize échantillons de bioaérosols expérimentaux ne suffisent pas à déterminer une éventuelle corrélation (Figure 51). La gamme de concentrations représentée par ces échantillons n'est pas assez large pour mettre en place un test statistique, même si une relation linéaire semble se dégager entre les concentrations obtenues par qPCR et par mises en culture, de même qu'entre celles obtenues par qPCR et épifluorescence. Il est nécessaire de générer des bioaérosols moins concentrés (de concentrations inférieures à 10^5 UFC.m⁻³). À noter également que les rapports « concentration en spores totales » sur « concentrations en cultivable » sont ici en moyenne de $1,22 \pm 0,20$ log. Ils sont du même ordre de grandeur que les rapports obtenus sur les essais présentés dans le Chapitre 3 (Figure 40) où ils étaient en moyenne de $1,01 \pm 0,30$ log.

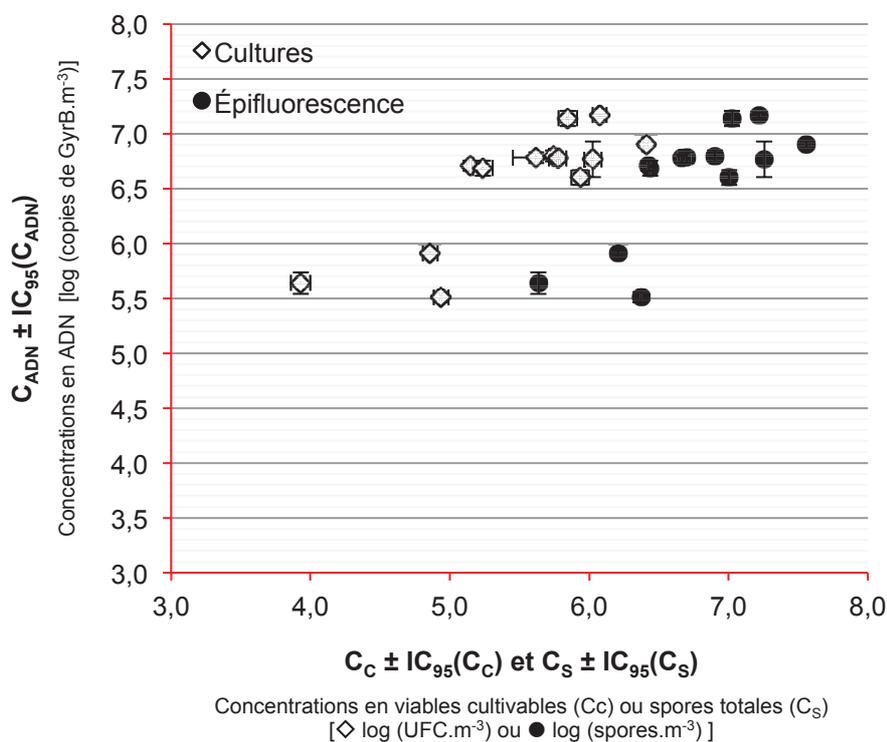


Figure 51. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de *T. vulgaris* : concentration en bactéries cultivables C_C (◇) ou en spores totales C_S (●). Les concentrations sont représentées en logarithmes (\log_{10}). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur cinq répétitions (il n'y a pas de réplicat pour les concentrations en spores totales).

La Figure 51 montre également que pour ce type d'échantillons, la concentration en ADN est de 3,13 à 51,9 fois plus élevée que celle en cultivable selon l'échantillon considéré (l'écart moyen entre les deux grandeurs étant de $1,06 \pm 0,38$ log). Elle est également 0,52 à 7,22 fois moins élevée que celle en spores totales (l'écart moyen étant de $0,16 \pm 0,36$ log). Rappelons que le comptage par la méthode d'épifluorescence ici réalisée ne tient compte que des spores alors que la qPCR prend en compte spores et cellules végétatives. Même si les grandeurs sont différentes et par conséquent non comparables, les résultats donnent lieu à des conclusions très différentes de celles mises en évidence pour les cultures pures ; néanmoins, ceci permet de confirmer l'importance de l'échantillon et l'effet de la matrice. La

conclusion principale est que les trois techniques sont fortement corrélées mais avec des niveaux de concentrations très différents. Ces résultats seront discutés dans le chapitre 4.3.

4.2.2.2 Bioaérosols de *T. fusca*

Pour ce qui est de la deuxième espèce modèle, *Thermobifida fusca*, ce sont six cultures de cellules qui ont été aérosolisées. Les concentrations en cultivable s'étendent de $3,26 \times 10^3$ à $3,37 \times 10^6$ UFC.m⁻³ d'air et celles en spores totales de $7,92 \times 10^4$ à $2,91 \times 10^7$ spores.m⁻³ d'air. Les six échantillons s'étalent donc sur 2,5 log de différence en termes de cultivable et 3 log en termes de spores totales.

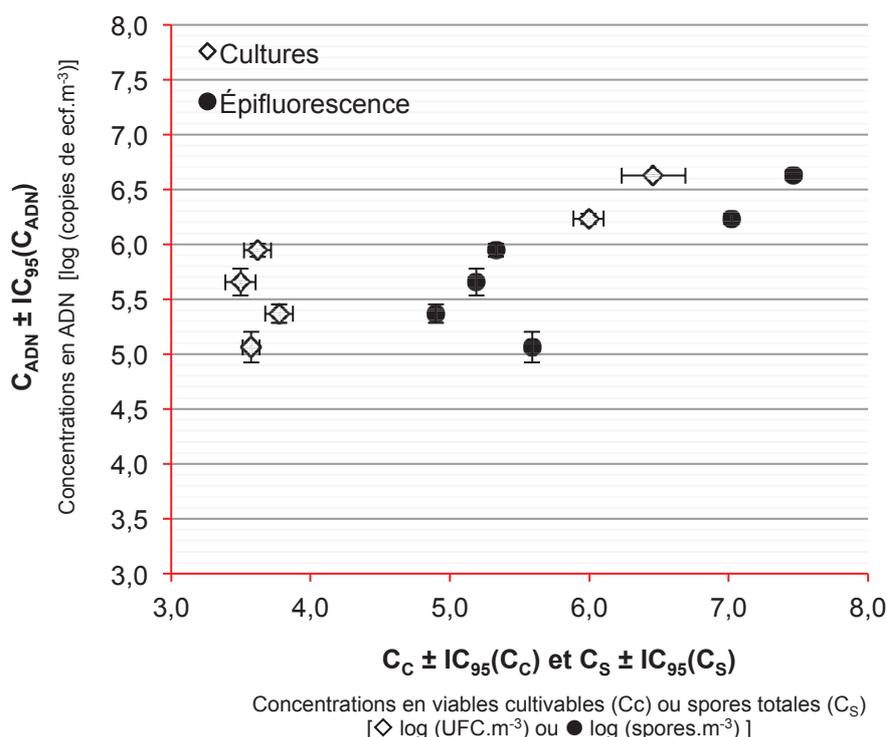


Figure 52. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de *T. fusca* : concentration en bactéries cultivables C_C (◇) ou en spores totales C_S (●). Les concentrations sont représentées en logarithmes (\log_{10}). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur cinq répétitions (il n'y a pas de réplicat pour les concentrations en spores totales).

Pour la comparaison des concentrations en ADN avec celles en cultivables d'une part et avec celles en spores d'autre part, six échantillons ne suffisent absolument pas à déterminer une éventuelle corrélation par le biais d'outils statistiques (Figure 52). Trop peu de bioaérosols ont pu être générés donnant lieu à une gamme de concentrations très hétérogène et donc, non exploitable. Néanmoins, la Figure 52 montre également que pour ce type d'échantillons, la concentration en ADN est de $1,25 \times 10^0$ à $2,07 \times 10^2$ fois plus élevée que celle en cultivable selon l'échantillon considéré (l'écart moyen entre les deux grandeurs étant de $1,81 \pm 0,95$ log) mais de 0,33 à 6,90 fois moins élevé que celle en spores totales (l'écart moyen étant de $0,10 \pm 0,69$ log).

4.2.2.3 Bioaérosols de *S. californicus*

Pour *Streptomyces californicus*, cinq cultures de cellules ont été aérosolisées (Figure 53). Les concentrations en cultivable s'étendent de $5,27 \times 10^3$ à $4,54 \times 10^5$ UFC.m⁻³ d'air et celles en spores totales de $2,33 \times 10^5$ à $3,29 \times 10^6$ spores.m⁻³ d'air. Les cinq échantillons de bioaérosols s'étalent sur 1,9 log de différence en termes de cultivable et 1,1 log en termes de spores totales.

De la même façon que pour les bioaérosols de *T. fusca*, la comparaison des concentrations en ADN avec celles en cultivables d'une part et avec celles en spores d'autre part, ne peut être réalisée sans la génération de bioaérosols supplémentaires (Figure 53). À peine 5 échantillons de bioaérosols expérimentaux ont pu être aérosolisés ce qui est très insuffisant et non exploitable. Néanmoins, la Figure 52 montre que pour ce type d'échantillons, la concentration en ADN est de $1,25 \times 10^0$ à $2,07 \times 10^2$ fois plus élevée que celle en cultivable selon l'échantillon considéré (l'écart moyen entre les deux grandeurs étant de $1,81 \pm 0,95$ log) mais de 0,33 à 6,90 fois moins élevée que celle en spores totales (l'écart moyen étant de $0,10 \pm 0,69$ log).

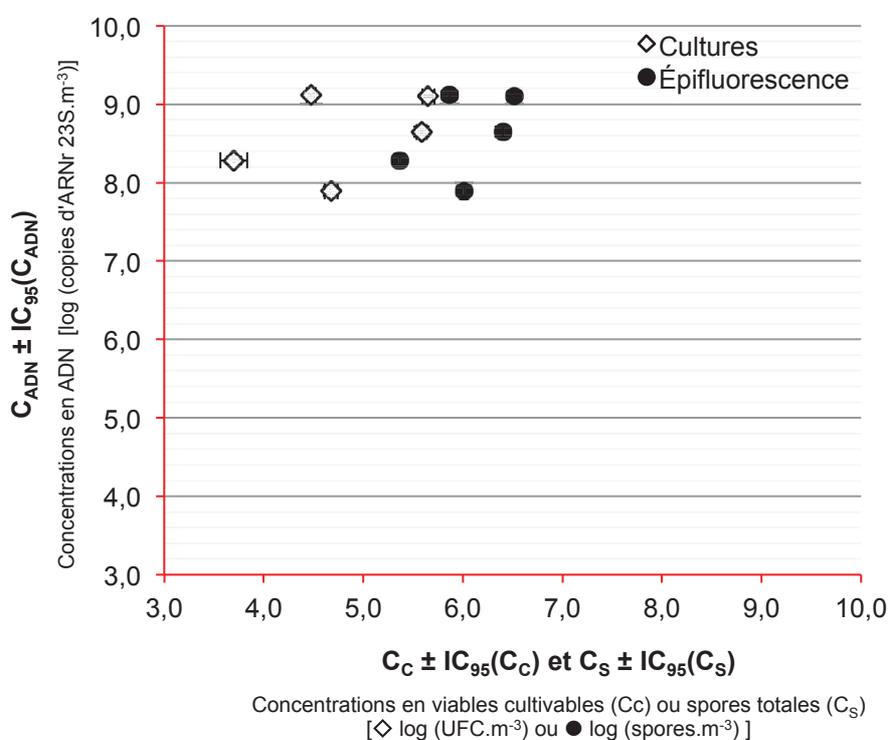


Figure 53. Relation entre la concentration en ADN et les dénombrements issus des techniques traditionnelles, sur bioaérosols expérimentaux de *S. californicus* : concentration en bactéries cultivables C_C (◇) ou en spores totales C_S (●). Les concentrations sont représentées en logarithmes (\log_{10}). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 % réalisés sur cinq répétitions (il n'y a pas de réplicat pour les concentrations en spores totales).

La Figure 53 montre également que la concentration en ADN est de $1,16 \times 10^3$ à $4,38 \times 10^4$ fois plus élevée que celle en cultivable (l'écart moyen entre les deux grandeurs étant de $3,79 \pm 0,76$ log) et de $7,62 \times 10^1$ à $1,79 \times 10^3$ fois plus élevée que celle en spores totales (l'écart moyen entre les deux grandeurs étant de $2,57 \pm 0,54$ log).

4.3 DISCUSSION

4.3.1 GAMMES DE CONCENTRATIONS DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS ET PERTINENCE DES RÉGRESSIONS

Avant de s'intéresser à la comparaison de l'outil qPCR avec les méthodes traditionnelles (mise en culture et épifluorescence, qui restent des techniques de référence), il convient de discuter des niveaux de concentrations des échantillons à la base des conclusions obtenues. Tout d'abord, en ce qui concerne les cultures pures, même si les concentrations mesurées se rapportent à un volume et non à une quantité d'air, il est néanmoins possible de voir que la gamme réalisée est relativement étendue, balayant ainsi bon nombre de concentrations. Les régressions obtenues à partir des tests statistiques représentent donc des analyses robustes des résultats.

Pour ce qui est des échantillons de bioaérosols expérimentaux, le développement de l'indicateur de génération I_G est un outil qui nous a énormément aidés pour cibler avec plus ou moins d'incertitudes les concentrations des bioaérosols expérimentaux. Sans cet indicateur, nous ne serions pas arrivés à obtenir des échantillons de concentrations aussi différentes. Cet indicateur ayant fait préalablement l'objet d'une caractérisation poussée (Simon *et al.*, 2012), il ne sera pas discuté ici. Treize échantillons (sans compter le blanc) ont permis une comparaison de la qPCR avec deux autres méthodes, sur bioaérosols de *T. vulgaris* avec des concentrations en cultivable s'étalant sur 2,5 log et en spores totales sur 1,9 log. Certes, pour l'une comme pour l'autre des deux grandeurs, nous aurions voulu obtenir des bioaérosols moins concentrés ($< 10^5$ UFC.m⁻³ ou spores.m⁻³) mais un autre problème peut potentiellement se poser : celui de la limite de quantification associée à la mise en culture et à l'épifluorescence. Même s'il n'est pas possible de calculer avec exactitude cette limite (du fait du grand nombre de variables qui entrent en compte), on peut néanmoins estimer qu'elle est de l'ordre de 10^3 UFC.m⁻³ et 10^4 spores.m⁻³ dans le cas de nos essais. Il est donc relativement compliqué de générer des bioaérosols très peu concentrés. Les tentatives que nous avons faites se sont soldées par une impossibilité à obtenir un résultat en cultivable : soit la concentration était une estimation par les petits nombres, soit aucune colonie n'apparaissait sur les géloses. Pour l'étude des bioaérosols de cellules de *T. fusca*, seuls six échantillons (sans compter le blanc) sont à l'origine des conclusions, notamment à cause d'une difficulté de mise en culture sur flasques cellulaires. Malgré cela, les concentrations des six échantillons s'étendent sur 2,5 log en cultivable et sur 3 log en spores totales. Pour l'étude réalisée sur les bioaérosols de cellules de *S. californicus*, seuls cinq échantillons ont pu être aérosolisés et ne permettent pas une gamme élargie de concentrations (1,9 log de différence pour les concentrations en cultivable et à peine 1,1 log pour celles en spores). Une relation linéaire entre concentrations en ADN et concentrations en cultivables ou en spores semble se dégager de ces divers résultats (surtout lorsque l'on regarde les résultats obtenus avec *T. vulgaris*) mais ils ne s'agit pas de conclusions basées sur des régressions statistiques sinon de simples observations. De ce fait, une interprétation plus poussée des résultats sur ces espèces nécessiterait des expérimentations supplémentaires ceci afin d'augmenter la représentativité des modèles. Cette première observation tend à démontrer toute la précaution à prendre pour l'interprétation des résultats (comparaison de la technique qPCR avec les méthodes traditionnelles). La génération de bioaérosols d'actinomycètes demande encore à être améliorée, pour la production d'échantillons peu concentrés et pour une meilleure robustesse des résultats concernant notamment les espèces *T. fusca* et *S. californicus*. D'autres essais devront être réalisés.

4.3.2 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC LA MISE EN CULTURE SUR MILIEUX GÉLOSÉS

Les études de comparaison de la méthode de PCR temps réel avec celle plus conventionnelle de mises en culture sont très nombreuses dans la littérature. Elles touchent de très nombreux types d'échantillons, avec aussi bien des échantillons d'eau (Noble *et al.*, 2010), que des échantillons cliniques (Sedgley *et al.*, 2006), des échantillons vétérinaires (Koskinen *et al.*, 2010), des aérosols (Buttner *et al.*, 2001; Rintala *et al.*, 2004)... Elles étudient aussi de très nombreuses espèces microbiennes (bactéries, champignons...). Néanmoins, même si certaines études sont réalisées à partir de bioaérosols expérimentaux (Dalwai *et al.*, 2007), de telles études sont peu fréquentes. La plupart du temps, il s'agit d'échantillons environnementaux contenant une communauté microbienne et non d'échantillons purs, ne contenant qu'une seule espèce. De ce fait, il n'est pas rare que les auteurs concluent à une absence de corrélation entre les résultats observés en qPCR et ceux obtenus en culture (Fittipaldi *et al.*, 2010; Pietarinen *et al.*, 2008; Rintala *et al.*, 2004). Le fait de comparer préalablement les deux techniques sur des échantillons connus (soit des cultures pures soit des bioaérosols expérimentaux se rapprochant de la matrice d'intérêt) nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre les deux. En effet, nous avons pu observer une corrélation significative et forte entre les concentrations obtenues par qPCR et celles obtenues par mise en culture sur les échantillons de cultures pures de cellules de *T. vulgaris* et il semble que la conclusion tende à être la même pour les bioaérosols expérimentaux (même s'il est à noter un manque d'échantillons testés).

Ces corrélations s'accompagnent néanmoins d'une différence en termes de niveaux de concentrations. Pour un échantillon donné, la différence entre la concentration en ADN et la concentration en cultivable correspondante peut être de l'ordre d'un facteur 10 (bioaérosols de *T. vulgaris*), d'un facteur 100 (bioaérosols de *T. fusca*) voire d'un facteur supérieur (cas des bioaérosols de *S. californicus* et des cultures pures de cellules de *T. vulgaris*).

Tout d'abord, cette différence observée pourrait s'expliquer par de la non-cultivabilité due à un mauvais choix des paramètres de mise en culture. Prenons par exemple le cas de l'espèce *T. vulgaris* qui a étéensemencée à 50 °C sur milieu TSA, milieu utilisé pour l'isolement de germes exigeants et non exigeants. Des essais complémentaires (résultats non montrés) ont été réalisés sur l'espèce modèle *T. vulgaris*, dans le but d'optimiser la croissance de ce microorganisme. Pour ce faire, une comparaison de plusieurs conditions de mise en culture a été réalisée et une matrice d'expérimentation a été mise en place pour tester trois températures (45 °C, 50 °C et 56 °C) et trois milieux de culture : la gélose non sélective BBL™ Trypticase™ Soy Agar (Becton Dickinson), le milieu R8 de Amner (Amner *et al.*, 1989) et le milieu Difco™ Actinomycete Isolation Agar supplémenté en glycérol (Becton Dickinson). Ces paramètres ont été testés simultanément afin de définir la meilleure association entre ces deux paramètres conduisant à la concentration la plus élevée (meilleur rendement). Les résultats ont clairement fait apparaître que la mise en culture sur gélose TSA et l'incubation à 50 °C sont les conditions optimales pour la croissance de l'espèce *T. vulgaris*. Pour compléter ces conditions, le temps d'incubation a également été étudié et pour le dénombrement par mise en culture sur boîtes de Pétri, trois jours sont nécessaires pour le comptage des colonies ; un comptage sur 24 h ou 48 h n'est pas suffisant car des colonies apparaissent au troisième jour, mais au-delà de 72 h, la gélose se dessèche considérablement à la température de 50 °C, ne rendant plus les comptages possibles. La source de non cultivabilité de l'espèce a donc une origine autre que celle des conditions de mise en culture qui sont optimales. Cela a été démontré pour *T. vulgaris* mais ce sont aussi de très bonnes conditions de culture pour les 2 autres espèces.

En revanche, la nature même des cellules pourrait être à l'origine de cette différence dans les niveaux de concentrations. En effet, le développement de *Thermoactinomyces vulgaris* conduit à la formation de spores endogènes, aussi appelées endospores. Et si de nombreux, sinon la plupart, des actinomycètes peuvent induire la germination sous conditions environnementales favorables (nutriments, croissance, température...), les spores des *Thermoactinomyces* sp. ne le peuvent pas. Elles doivent préalablement être réactivées car il s'agit d'endospores constitutivement dormantes (Ensign, 1978; Locci, 2006). Les différentes possibilités de réactivation pour de telles spores de sortir de cette dormance ont préalablement été étudiées (Kalakoutskii & Agre, 1976). Le fait que ces spores ne poussent pas en milieux gélosés sans une réactivation préalable constitue un élément supplémentaire pouvant conduire à la sous-estimation de la méthode de mise en cultures sur géloses (Attwell & Colwell, 1982). Ceci peut donc expliquer en partie le fait que la concentration en cultivable soit beaucoup plus faible que celle en ADN pour les échantillons de cultures pures de cellules de *T. vulgaris*. En revanche, nous avons également observé que la différence entre concentration en ADN et concentration en cultivable est beaucoup moins importante pour les bioaérosols de *T. vulgaris* que pour les cultures pures de cette même espèce. Les grandeurs ne sont pas comparables entre elles (UFC.mL⁻¹ et UFC.m⁻³) mais les rapports concentration en d'ADN sur concentration en cultivable ne sont pas du tout du même ordre de grandeur. La méthode de préparation des suspensions à l'origine des bioaérosols expérimentaux a été détaillée dans le paragraphe 3.1.2.2. Le choix de ce protocole-ci pour la génération expérimentale en voie liquide de cellules de *Thermoactinomyces vulgaris* a préalablement été argumenté et justifié dans le chapitre 3. Nous y avons démontré que le bioaérosol artificiellement généré à partir de ce protocole est un mélange complexe de spores isolées, de spores agglomérées et de mycélium (cellules végétatives) de différentes tailles. Il est essentiellement composé de spores isolées et la diversité des particules obtenues rend le bioaérosol artificiel proche du bioaérosol environnemental échantillonné sur certains lieux de travail comme les plates-formes de compostage. Ayant connaissance de la composition du bioaérosol généré et en se référant aux éléments discutés ci-dessus, nous nous attendrions à ce que la différence entre les concentrations obtenues par PCR et par mise en culture soit plus importante sur ces bioaérosols. De ce fait, il convient de se demander si un voire plusieurs éléments en amont de l'analyse des bioaérosols (préparation de la suspension, génération en voie liquide et/ou récupération de la flore) aurait pu avoir une incidence sur l'état de dormance des spores, les réactiver et donc augmenter le taux de cellules cultivables dans les échantillons. Kalakoutskii & Agre (1976) et Ensign (1978) ont clairement expliqué dans leurs travaux que les spores dormantes peuvent être réactivées par choc thermique, selon deux manières différentes : soit par un bref refroidissement (jusqu'à 1 h à 20 °C) suivi d'un choc thermique (10 à 20 min à 100 °C), soit par un refroidissement prolongé ne nécessitant pas de choc thermique (de plus d'1 h à 48 h à 20 °C). Ces deux moyens permettent l'un comme l'autre de réactiver des spores en dormance, pouvant ensuite germer si elles sont ensemencées à leur température de croissance (50 à 55 °C). Or, si l'on se réfère aux protocoles de préparations des suspensions liquides de *T. vulgaris* et d'aérosolisation de ces mêmes suspensions via le générateur de type bulleur, le temps qui s'écoule entre le moment où les flasques de cultures sont sorties de l'étuve à 50 °C (première étape) et le moment où la flore générée est prête à être analysée par dénombrement sur milieux gélosés est approximativement de 3 h 30. Un peu plus de trois heures pendant lesquelles tout se passe à température ambiante (~ 20 °C), génération y comprise. Tampons, solutions et diluants sont également utilisés à température ambiante. Ces résultats suggèrent que la génération d'une suspension liquide de cellules de *T. vulgaris* dans sa globalité permet une réactivation des spores et donc, une possible germination de la bactérie (phénomène de différenciation conduisant de la forme sporale à la forme végétative). De ce fait, ceci expliquerait l'augmentation du taux de cultivabilité de l'espèce mise en évidence pour ces échantillons de bioaérosols, mais qui reste relativement bas pour des suspensions de cellules (4.2.1) où les spores restent en dormance. Tout est également réalisé à température ambiante

mais moins d'une heure s'écoule entre la préparation des échantillons et leur ensemencement sur géloses.

Mais l'argument de la dormance des spores n'explique qu'une partie des résultats puisque pour les échantillons de bioaérosols des deux autres espèces (*T. fusca* et *S. californicus*) la concentration en ADN est également supérieure à celle en cultivable. Or, le problème de réactivation des spores ne se pose pas pour ces deux autres espèces ; ni les spores de *T. fusca*, ni celles de *Streptomyces* ne sont constitutivement dormantes. Une autre explication est donc à l'origine de cette différence entre les deux techniques. Hormis les particules non biologiques, le bioaérosol est composé de deux types d'entités biologiques : des spores et des fragments de mycélium. Par définition, une spore est une cellule renfermant un génome. De ce fait, en culture, une sporeensemencée va donner lieu à une colonie dénombrée. Et en qPCR, en partant du principe que la séquence de gène recherchée est en copie unique dans le génome, une spore analysée va correspondre à une copie du gène dénombrée. En revanche, un fragment de mycélium peut être constitué d'une ou plusieurs cellules, chacune renfermant son génome. Mais en culture, il est fortement présumé qu'un fragment de mycélium ne va donner qu'une colonie à moins que les étapes de mises en culture ne fractionnent ce mycélium (vortexage, étalement au râteau...). Nous pouvons donc supposer que dans la majorité des cas, un fragment de mycéliumensemencé donnera lieu à une colonie dénombrée. À contrario, par le biais de l'étape d'extraction d'ADN permettant normalement (dans le cas d'une efficacité de 100 %) l'extraction de l'ADN de toutes les cellules, un fragment de mycélium analysé par qPCR va correspondre à autant de copies du gène que de cellules qui auront composé le fragment. De ce fait, de manière synthétique et en faisant l'hypothèse que le gène recherché soit en copie unique, une spore donnera lieu à une colonie en culture (si tant est soit-elle ne soit pas en dormance) et à une copie de gène en qPCR. Mais un fragment de mycélium composé de n cellules et dont on retrouvera n copies du gène en qPCR ne donnera qu'une colonie en culture, tout ceci bien évidemment en se plaçant dans le cas où l'efficacité des étapes est maximale. Le génome de *T. fusca* étant entièrement séquencé, il est sûr que la portion de gène recherchée (séquence codant le facteur ecf) est en copie unique chez cette espèce. La conclusion selon laquelle la qPCR dénombre toutes les cellules d'un fragment de mycélium alors que la culture dénombrerait uniquement l'entité dans sa globalité semble se vérifier. Et cette hypothèse semble être confortée par le rapport très élevé observé pour *S. californicus*, dont le protocole de préparation entraîne l'aérosolisation de nombreux fragments de mycélium. Pour rappel, le protocole de préparation de la suspension à l'origine de ces bioaérosols (protocole B) diffère quelque peu du protocole utilisé pour les deux autres espèces (protocole B'), puisque le fritté utilisé pour éliminer les grosses particules est moins sélectif. De ce fait, nous avons vu dans le chapitre précédent que la nature du bioaérosol s'en retrouvait modifiée avec pour modification principale une augmentation du nombre de fragments de mycélium de plus grande taille. Ceci expliquerait donc parfaitement le rapport bien plus élevé pour les bioaérosols de *S. californicus*. Face à la qPCR, la mise en culture entraîne une sous-estimation du nombre réel de microorganismes présents dans l'échantillon, cette conclusion ayant déjà été démontrée à maintes reprises dans la littérature (Albrecht *et al.*, 2007; Amman *et al.*, 1995; Dalwai *et al.*, 2007; Lignell *et al.*, 2008; Rinsoz *et al.*, 2008).

4.3.3 COMPARAISON DE LA qPCR AVEC L'ÉPIFLUORESCENCE PAR COLORATION AU DAPI

Pour ce qui est de la comparaison entre la technique qPCR et celle d'épifluorescence, une corrélation forte a été mise en évidence pour les échantillons de cultures pures de cellules de *T. vulgaris*, ceci étant en adéquation avec les travaux réalisés par Chen & Li (2005a), même si le germe étudié était *Escherichia coli* et le fluorochrome était l'acridine orange. Mais tout comme précédemment, il est

impossible d'émettre une quelconque conclusion sur les échantillons de bioaérosols expérimentaux. Comparer les concentrations obtenues en qPCR et en épifluorescence et surtout trouver une explication à la différence observée s'avère compliqué. En effet, il serait normal d'envisager que la concentration en ADN (prenant théoriquement en compte toutes les cellules) soit plus élevée que la concentration obtenue par épifluorescence (pour laquelle, seules les spores sont dénombrées). C'est effectivement le cas pour les échantillons de cultures pures de *T. vulgaris* (avec un rapport compris entre 2,2 et 31,2) ainsi que pour les bioaérosols de *S. californicus* (avec des rapports supérieurs à 10³). Mais ce n'est le cas ni pour les échantillons de bioaérosols de *T. vulgaris* ni pour ceux de *T. fusca*, où ce sont les concentrations obtenues après marquage au DAPI des cellules qui se retrouvent être plus élevées que celles obtenues par PCR temps réel.

Le fait que nous n'observions aucune décroissance du rapport « concentration en spores totales » sur « concentration en ADN » au fur et à mesure que décroît la concentration d'un échantillon (et ce, pour une espèce bactérienne donnée) nous laisse supposer que le problème ne vient pas d'une limite haute de quantification par qPCR. D'autant plus que pour les bioaérosols de *S. californicus*, des concentrations allant jusqu'à 10⁹ copies de gène.m⁻³ ont été retrouvées. Une hypothèse qui pourrait être évoquée, mais qui ne serait alors pas sans conséquence, serait d'envisager la présence d'inhibiteurs de la qPCR, capables d'avoir une influence telle que la concentration retrouvée en qPCR serait sous-estimée. L'hypothèse alors avancée serait celle d'une perte de microorganismes (spores ou mycélium) à partir de l'étape d'extraction d'ADN et due à une ou plusieurs étapes liées à la génération et/ou à l'échantillonnage du bioaérosol. Bon nombre d'inhibiteurs de la PCR sont reportés dans la littérature, mais ils sont le plus souvent dus à des composés biologiques comme les sels biliaires des échantillons de fécès (Lantz *et al.*, 1997), les acides humiques contenus dans les échantillons de sol ou de plantes (Watson & Blackwell, 2000), l'immunoglobuline des échantillons sanguins (Al-Soud *et al.*, 2000)... Malgré cela, d'autres sources d'inhibiteurs existent, dues au matériel (consommables) ou aux réactifs utilisés, qui peuvent être en contact avec les échantillons. Dans le cas de nos essais, des sources potentielles pourraient provenir de la cassette d'échantillonnage du bioaérosol (fibres de cellulose), du pad absorbant (fibres de cellulose) ou de la membrane (polycarbonate) contenus dans la cassette ou encore de la solution d'extraction (faite à partir de Tween 80 et de peptone). Mais excepté les éléments des membranes, aucun de ces composés ne peut être à l'origine d'une baisse de la concentration en ADN, soit parce qu'ils n'ont pas d'effet reconnu (comme le polystyrène), soit parce qu'ils sont utilisés en quantité beaucoup trop faible pour avoir un éventuel impact (comme le chlorure de sodium contenu dans la peptone). D'un autre côté, Bej *et al.* (1991) ont mis en évidence dans leur étude que les filtres les plus couramment utilisés pour la filtration d'échantillons (c'est-à-dire en acétate de cellulose ou en polycarbonate) sont des inhibiteurs de la PCR, lorsque l'extraction d'ADN est réalisée directement sur ces membranes. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle il y a une extraction préalable de la flore contenue dans les cassettes de prélèvements avant analyses au risque d'une faible perte de microorganismes. Il est néanmoins possible d'envisager que lors de cette extraction de la flore, de petites quantités de fibres de cellulose et/ou de polycarbonate soient entraînées dans l'échantillon récupéré, à cause d'une désagrégation des membranes lors de l'agitation 20 min à 2000 rpm au Multi-reax par exemple. Et cela demanderait par ailleurs une étude plus approfondie sur la caractérisation de ces possibles interférences, sur le pourcentage d'inhibition...

Si cette hypothèse est effectivement vérifiée, nous pourrions alors nous demander pourquoi nous n'observons pas cela pour *Streptomyces californicus*. Là encore, une explication pourrait être fournie, explication s'appuyant sur le gène recherché et qui viendrait encore plus renforcer la première hypothèse des inhibiteurs de la qPCR. Le gène recherché pour la recherche de *S. californicus* et plus généralement des streptomycètes mésophiles est une portion du gène codant l'ARNr23S. Or, ce gène n'est pas représenté en copie unique dans le génome de ces bactéries, mais en multiples copies. C'est d'ailleurs là un des inconvénients de la qPCR tout du moins des oligonucléotides utilisés. Nous ne savons pas en

combien de copies ce gène est représenté donc associer une concentration en ADN à une concentration en microorganismes est ici impossible. Mais ceci permet néanmoins d'apporter une réponse au fait que la concentration obtenue en qPCR soit bien plus élevée que celle en spores totales.

La qPCR permet d'obtenir une quantité d'ADN qui, lorsque la séquence ciblée est présente en plusieurs copies dans le génome, ne peut pas être directement reliée à un nombre de bactéries. De plus, nous avons vu dans le paragraphe précédent que la qPCR prend en compte toutes les formes de la bactérie, alors que nous avons fait le choix de ne dénombrer que les spores avec la technique d'épifluorescence. Or, ce sont les spores qui portent sur leur paroi les antigènes reconnus comme impliqués dans les pneumopathies d'hypersensibilité (Kurup *et al.*, 2006) ; de ce fait, nous pourrions dès lors envisager l'épifluorescence comme la technique la plus appropriée. Or, ce n'est pas le cas, dans la mesure où cette technique n'est pas applicable sur des échantillons environnementaux, trop complexes pour pouvoir y faire du comptage et ce, pour plusieurs raisons. En effet, lorsque les échantillons contiennent beaucoup trop de cellules microbiennes (comme c'est le cas pour les bioaérosols de plates-formes de compostage), les échantillons marqués apparaissent souvent comme une masse de couleur rendant tout dénombrement impossible. Et plus les cellules à dénombrer sont petites, plus le risque d'erreur dans l'énumération est grand. Tous ces biais entraînant des erreurs de comptage avec cette technique ont préalablement fait l'objet de travaux (Eduard *et al.*, 2001). De plus, il existe des problèmes de fixation non spécifique entre le fluorochrome et les particules abiotiques qui sont en très grande quantité dans les aérosols de plates-formes de compostage (Cartwright *et al.*, 2009). Et même si des améliorations sont apportées à la technique, restent également les problèmes de spécificité. Premièrement, parce que le fluorochrome se fixe préférentiellement sur les séquences riches en AT de l'ADN des cellules (Kapusinski, 1995; Lin *et al.*, 1977) et qu'hormis les *Thermoactinomyces*, les actinomycètes sont des bactéries à haut pourcentage en GC (Prescott *et al.*, 2007). Deuxièmement, l'inconvénient avec cette technique (qui peut aussi en être un avec la culture si elle se fait sur géloses non spécifiques) est que l'on ne détermine pas les espèces en présence (Rinsoz *et al.*, 2008). La PCR temps réel résout ce problème de par sa spécificité.

4.4 CONCLUSION

Ce travail avait pour but de comparer les résultats obtenus en qPCR avec ceux obtenus avec les deux techniques que sont la mise en culture sur milieu gélosé et l'épifluorescence après marquage au DAPI et ce, en conditions dites de laboratoire. Ceci a été réalisé dans un premier temps sur des cultures pures de cellules du modèle prédominant de notre étude (*Thermoactinomyces vulgaris*) avant de rapidement passer sur des échantillons de bioaérosols expérimentaux de chacun des trois modèles de l'étude (*T. vulgaris*, *Thermobifida fusca* et *Streptomyces californicus*). Tous modèles confondus, les résultats ont démontré que les concentrations obtenues avec la technique de qPCR étaient bien corrélées avec celles obtenues par mises en culture ainsi qu'avec celles obtenues par épifluorescence, ceci ayant été mis en exergue sur des échantillons de cultures pures essentiellement. Même si cela n'a pas été prouvé sur bioaérosols expérimentaux, démontrer une corrélation entre ces méthodes est important dans la mesure où cela permettra de se référer à des données déjà existantes dans la littérature pour de futurs travaux.

Cette étude nous a également permis de discuter sur les trois techniques pour en dégager les avantages et inconvénients. La mise en culture ne permet le dénombrement que des cellules viables et cultivables et donc, entraîne une grande sous-estimation de la concentration réellement présente. Cet inconvénient peut être accentué si les spores de l'espèce étudiée sont constitutivement dormantes et nécessitent une réactivation. De plus, sur des échantillons environnementaux, la technique de culture est

connue pour des problèmes de compétition entre les espèces, de prolifération de certaines espèces au dépend d'autres, d'envahissement de la gélose (Chang *et al.*, 1994; Taha *et al.*, 2007b)... Et même en utilisant des milieux extrêmement spécifiques (parfois fastidieux à préparer, quelques fois inefficaces), il est très difficile de quantifier un genre ou une espèce avec précision sans avoir besoin de techniques plus poussées en aval (séquençage par exemple). La technique d'épifluorescence pallierait ces problèmes (puisque nous l'utilisons pour dénombrer les spores reconnues comme responsables des pneumopathies) si elle était applicable sur des échantillons environnementaux. Or, la technique est incompatible avec des échantillons aussi complexes (problèmes des particules abiotiques...) et ne permet pas non plus d'identification des espèces, synonyme de notions de risques (Duquenne *et al.*, 2012). La technique de PCR temps réel, associée bien évidemment à une pertinence de la cible recherchée et donc des oligonucléotides utilisés pour l'amplification et la détection, passe outre ces problèmes. Elle peut s'affranchir des inconvénients de sous-estimation (dénombrement de l'ADN de toutes les cellules recherchées) ou encore de spécificité. En revanche, relier cette quantité d'ADN à une quantité de microorganismes peut s'avérer délicate lorsque le gène recherché est en copies multiples dans le génome. Ceci peut être chose fréquente, notamment si l'on travaille sur la recherche d'un groupe d'espèces mais peut être résolu si l'on fait en sorte que le gène cible ne présente qu'une copie unique. Par contre, un problème de la technique est le fait que la technique, en plus de quantifier l'ADN des spores, quantifie aussi l'ADN des cellules végétatives et surtout l'ADN libre qui n'est en aucun cas associé à une notion de risque, ce qui peut conduire à une surestimation des risques pour la santé.

Mesures par qPCR des actinomycètes
dans les bioaérosols collectés en conditions réelles d'exposition

5.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	173
5.1.1 ORGANISATION GÉNÉRALE DE LA CAMPAGNE DE MESURES.....	173
5.1.2 PRÉSENTATION DES PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE	174
5.1.2.1 Plate-forme A (déchets verts et boues)	174
5.1.2.2 Plate-forme B (déchets verts, biodéchets et ordures ménagères)	177
5.1.2.3 Plate-forme C (déchets verts et boues).....	179
5.1.2.4 Plate-forme D (déchets ménagers, refus de tri).....	181
5.1.2.5 Plate-forme E (déchets verts et biodéchets).....	183
5.1.3 STRATÉGIES DE MESURES DES BIOAÉROSOLS	185
5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°1.....	185
5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°2	185
5.1.3.2 Méthodes de prélèvement des bioaérosols	186
5.1.4 TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS.....	187
5.1.5 MÉTHODES D'ANALYSES DES BIOAÉROSOLS	187
5.1.5.1 Mesure pondérale des poussières inhalables.....	187
5.1.5.2 Pré-traitement des échantillons.....	188
5.1.5.3 Dénombrement des bactéries cultivables par mise en culture sur géloses.....	188
5.1.5.4 Dénombrement des trois espèces/groupes ciblés d'actinomycètes par qPCR.....	188
5.1.6 EXPLOITATION DES RÉSULTATS	189
5.1.6.1 Concentrations en poussières inhalables.....	189
5.1.6.2 Concentrations en bactéries viables cultivables et en ADN	189
5.1.6.3 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Marple	189
5.1.6.4 Statistiques	189
5.2 RÉSULTATS	190
5.2.1 DÉROULEMENT DE LA CAMPAGNE DE PRÉLÈVEMENTS	190
5.2.2 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS D'ACTIVITÉS EN CASSETTES FERMÉES	191
5.2.3 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS DE RÉFÉRENCE EN CASSETTES FERMÉES	194
5.2.4 FACTEURS DE VARIATION DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min ⁻¹	195
5.2.5 COMPARAISON DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min ⁻¹ ET À 25 L.min ⁻¹	198
5.2.6 CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES MESURÉS	202
5.2.7 ÉTUDE DE L'AÉROSOL GÉNÉRÉ AU COURS DE LA FERMENTATION SUR LA PLATE-FORME E .	203
5.3 DISCUSSION	206
5.3.1 APPRÉCIATION DES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES CULTIVABLES.....	206
5.3.2 CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES MESURÉES PAR qPCR	206
5.3.3 PARAMÈTRES INFLUENÇANT LES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES	207
5.3.4 LES POINTS DE RÉFÉRENCE.....	208

5.3.5 INFLUENCE DE LA MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT SUR LES CONCENTRATIONS MESURÉES.....	210
5.3.6 DISTRIBUTION GRANULOMÉTRIQUE DES BIOAÉROSOLS ÉMIS LORS DE LA FERMENTATION	211
5.3.7 LES INTERFÉRENCES	212
5.3.8 RISQUES LIÉS AUX CONCENTRATIONS MESURÉES	213
5.4 CONCLUSIONS.....	214

CHAPITRE 5 - MESURES PAR qPCR DES ACTINOMYCÈTES DANS LES BIOAÉROSOLS COLLECTÉS EN CONDITIONS RÉELLES D'EXPOSITION

La méthode développée a été employée en conditions réelles d'exposition. Une campagne de mesures a ainsi été organisée afin de mesurer les bioaérosols émis lors des activités de compostage. Le premier objectif de l'étude est d'évaluer en conditions réelles d'exposition la méthode qPCR développée au laboratoire. Le second objectif est d'utiliser cette méthode afin d'apporter des informations nouvelles sur les bioaérosols émis lors de ces activités de compostage.

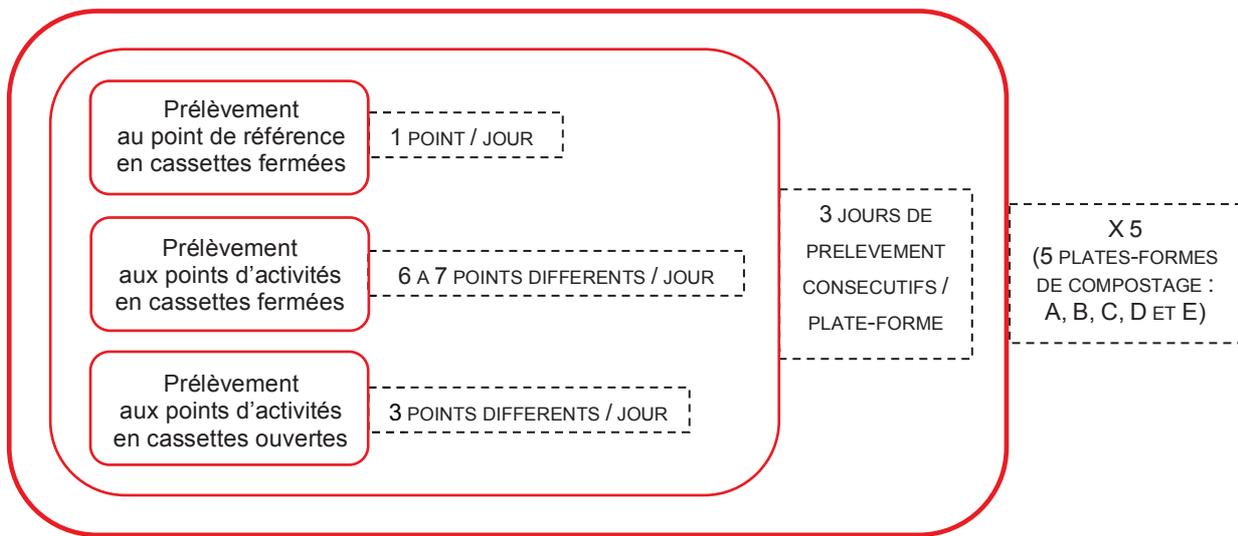
5.1 MATÉRIEL ET MÉTHODE

5.1.1 ORGANISATION GÉNÉRALE DE LA CAMPAGNE DE MESURES

La campagne de mesure a été menée sur 5 plates-formes situées dans l'est de la France et les prélèvements ont été effectués entre avril et juillet 2011. Les plates-formes diffèrent l'une de l'autre par le type de déchets traités (déchets verts, biodéchets, déchets ménagers, boues de station d'épuration), le procédé de compostage employé, le type d'installation et l'organisation des activités (Tableau 11). Cette campagne comprend deux études distinctes dont le plan d'expérience est présenté en Figure 54. La première étude a pour objectif de mesurer les bioaérosols à proximité des activités se déroulant au cours du processus de compostage, sur l'ensemble des plates-formes. La seconde étude a pour objectif d'apporter des informations complémentaires sur les caractéristiques des aérosols émis à proximité de la zone de fermentation sur une seule plate-forme. Il s'agit notamment de déterminer la répartition des bactéries dans les différentes fractions granulométriques des bioaérosols générés dans ce cas précis.

Tableau 11. Caractéristiques des plates-formes échantillonnées (DV : déchets verts ; B : boues ; BD : biodéchets ; DMR : déchets ménagers résiduels).

	Type de déchets principalement traités	Bâtiments de fermentation	Durée de la fermentation	Types de retournements	Type d'aérations	Type d'humidification
Plate-forme A	DV + B	andains extérieurs couverts	8-9 semaines	✓ retournements par chargeuse	✓ systèmes d'aspiration ou d'insufflation d'air au sol	✓ systèmes d'arrosage au toit
Plate-forme B	DV + BD + DMR	casier en bâtiment fermé	3 semaines	✓ retournements grâce à un pont mobile muni de vis inclinées	✓ systèmes d'insufflation d'air au sol et d'aspiration au toit	× pas d'arrosage
Plate-forme C	DV	andains extérieurs ouverts	4-5 semaines	× pas de retournement	✓ systèmes d'aération forcée au sol	× pas d'arrosage
Plate-forme D	DMR	bio-réacteur stabilisateur (BRS)	2-3 jours	✓ BRS en rotation permanente	✓ ventilation contrôlée dans le BRS	✓ humidification contrôlée dans le BRS
Plate-forme E	DV + BD	andains en bâtiments fermés	4 semaines	✓ retournements grâce à une roue pelleuse	✓ présence d'un système de ventilation	✓ arrosages grâce à la roue pelleuse



+ Études complémentaires sur la plate-forme E

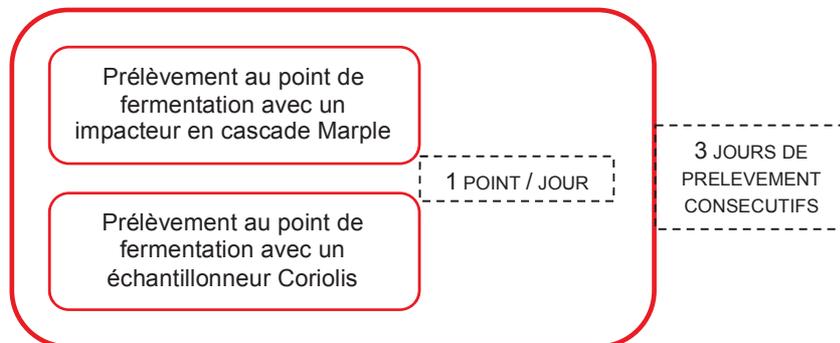


Figure 54. Schématisation du plan d'expérience général utilisé pour l'étude visant à caractériser l'outil qPCR développé, en conditions réelles d'exposition.

5.1.2 PRÉSENTATION DES PLATES-FORMES DE COMPOSTAGE

5.1.2.1 Plate-forme A (déchets verts et boues)

Il s'agit d'une plate-forme de compostage prenant en charge les déchets verts mais aussi les boues de stations d'épuration. Deux types de compost y sont alors produits : un compost à base de déchets verts et un à base de boues. Le schéma simplifié des installations et du fonctionnement général est présenté en Figure 55.

Les déchets qui arrivent sur la plate-forme par camion-benne sont réceptionnés en extérieur avant de subir un broyage ; ils subissent ensuite la fermentation durant 6 mois dans des andains extérieurs mais couverts, avec au sol un système d'aspiration ou d'insufflation d'air selon les casiers (Figure 56a et Figure 56b) ; ils sont donc ventilés mais aussi arrosés avec retournements réguliers (amélioration de l'aération du compost). Le compost issu de cette étape est criblé et les refus sont mélangés aux boues. Les boues, elles, sont donc mélangées avec de la matière structurante de bois (refus de criblage des déchets verts comme les écorces...) et malaxées avant d'être mises en andains sous hall couvert durant 8 à 10 jours (ceci pour assurer le démarrage du processus de compostage). Ces 2 andains sont munis d'un système d'aspiration au sol et en toiture (le bâtiment est sous dépression, l'aspiration débouchant

sur un biofiltre). À l'issue de cette période, le compost est transporté (Figure 56f) dans les andains extérieurs couverts pour la suite du processus, à savoir environ 8 semaines de fermentation. Une passerelle (à 5 mètres de hauteur environ) permet d'accéder à l'arrière des différents andains. Pour les deux types de compost, s'ensuit un trimestre de maturation (Figure 56c) puis un criblage fin et un criblage moyen (Figure 56d et Figure 56e) avant que le produit fini qui en résulte ne soit stocké. Son utilisation sera principalement destinée à l'épandage agricole.

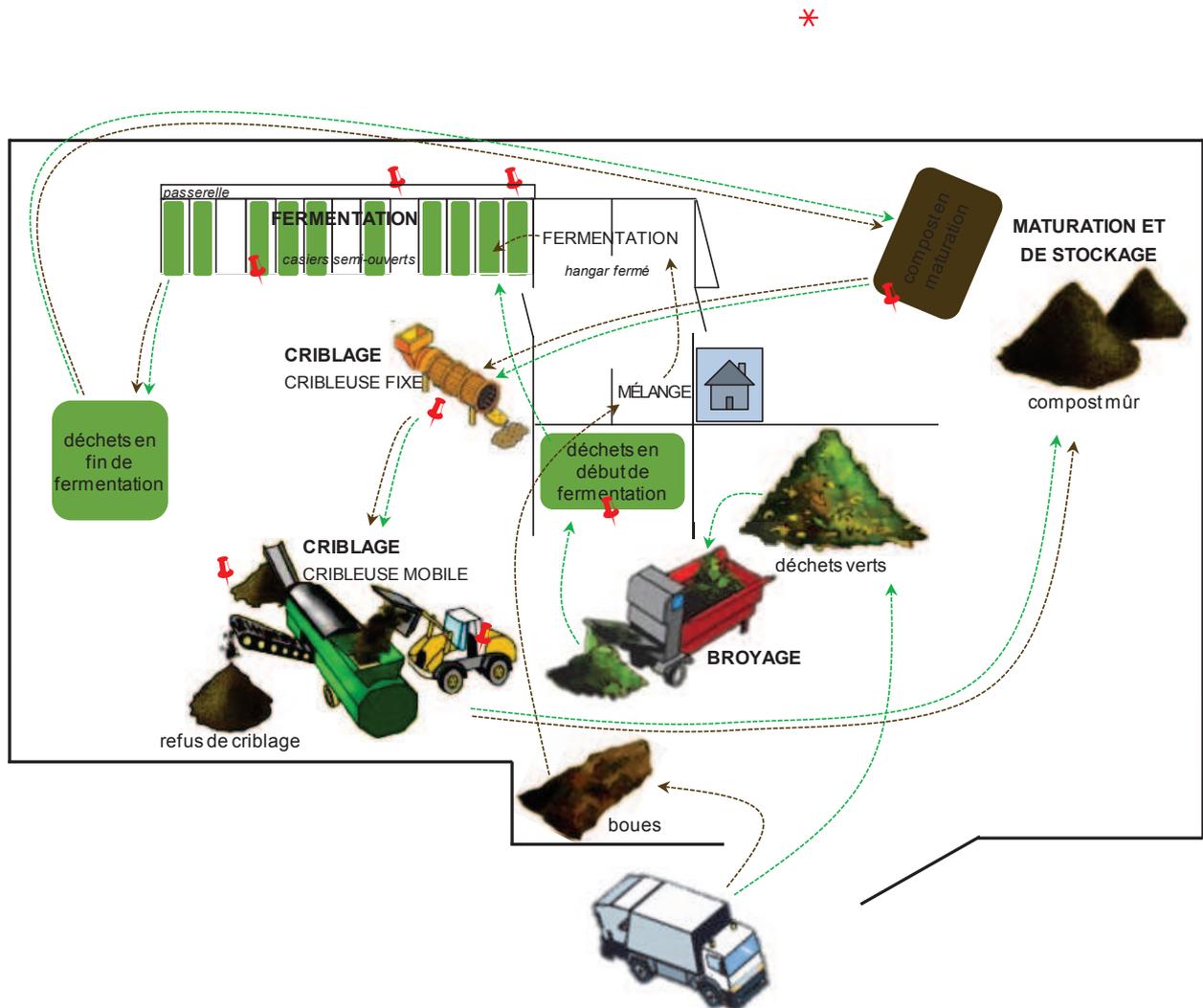


Figure 55. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage A (les tracés verts représentent le parcours des déchets verts alors que les tracés marron sont associés à celui des boues). Sont également représentés les emplacements des points de prélèvement (⚙) et de référence (*). La maison représente l'accueil de la plate-forme [images extraites des sites <http://www.syndicat-centre-herault.org> et <http://www.ademe.fr>].



(a) Andains de fermentation des déchets



(b) Andains de fermentation des déchets



(c) Andain de maturation du compost



(d) Criblage du compost (cribleuse fixe)



(e) Criblage du compost (cribleuse mobile)



(f) Cabine de la chargeuse

Figure 56. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage A [© Philippe Duquenne, Laetitia Betelli / INRS].

5.1.2.2 Plate-forme B (déchets verts, biodéchets et ordures ménagères)

Il s'agit d'une plate-forme de compostage qui, en plus des ordures ménagères et biodéchets des ménages, traite aussi les déchets verts. Son fonctionnement est décrit sur la Figure 57.

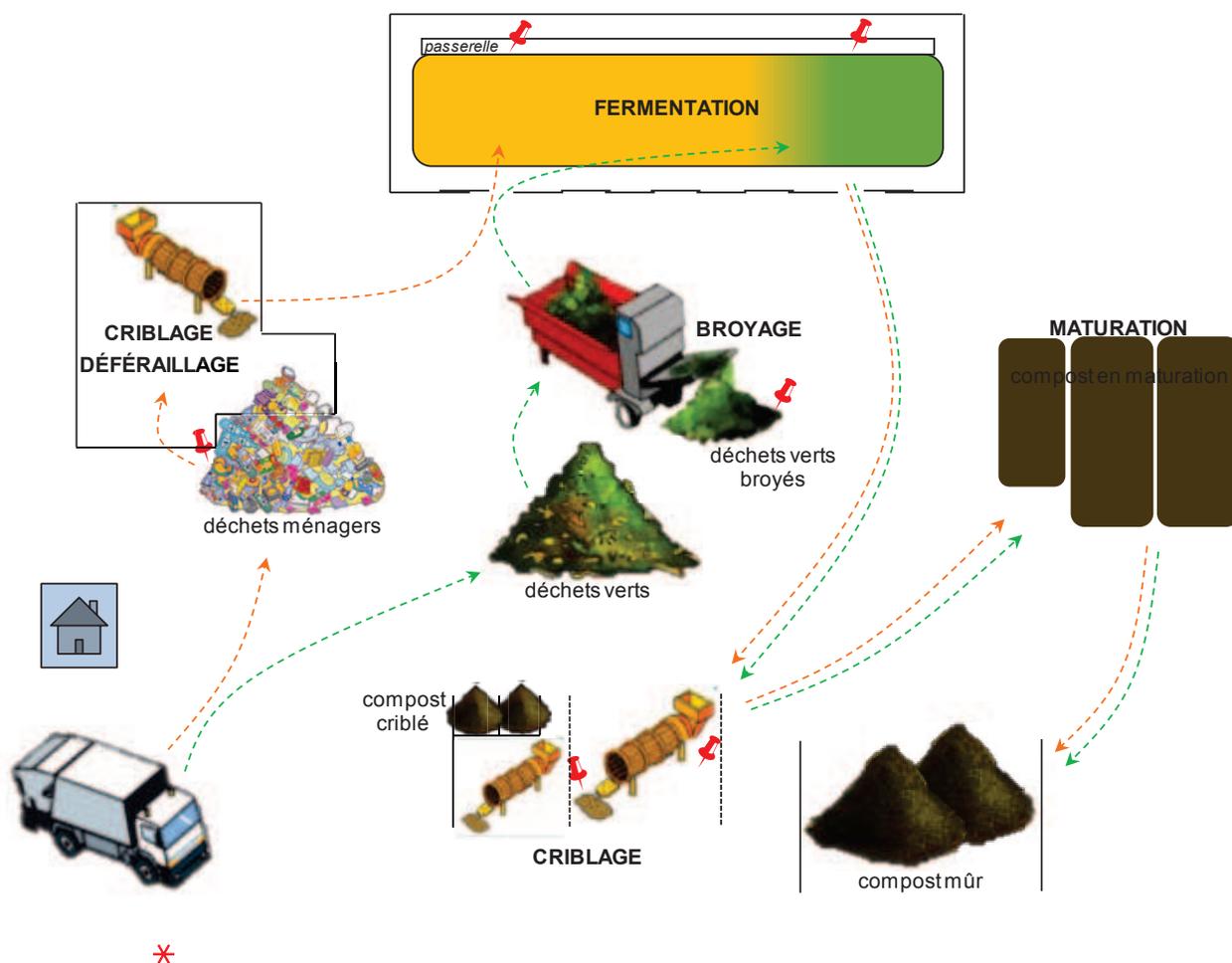


Figure 57. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage B (les tracés verts représentent le parcours des déchets verts et biodéchets alors que les tracés orange concernent celui des déchets ménagers). Sont également représentés les emplacements des points de prélèvement (↗) et de référence (*). La maison représente l'accueil de la plate-forme [images extraites des sites <http://www.syndicat-centre-herault.org> et <http://www.ademe.fr>].

Pour ce qui est des ordures ménagères résiduelles, les ordures brutes qui arrivent sur la plate-forme sont réceptionnées dans une fosse (Figure 58a), d'où elles vont être reprises via un grappin (piloté par un salarié depuis une cabine de commande) pour subir un prétraitement. Celui-ci consiste tout d'abord en un criblage qui va éliminer les refus les plus grossiers, les ordures étant déposées sur un tapis roulant à travers un crible rotatif (trommel) de maille 150 mm. Ensuite, il va y avoir un déferrailage magnétique pour une récupération des métaux en vue d'une valorisation. Après criblage et déferrailage, la fraction compostable ($\approx 60\%$) est amenée dans le bâtiment de fermentation accélérée par chargeur. Ce bâtiment, appelé réacteur de fermentation, forme un casier unique de 80 mètres de long sur 25 de large. Les déchets sont donc déposés à l'intérieur où ils vont y être retournés (tous les jours) et aérés mécaniquement à l'aide d'un pont mobile horizontalement, composé de quatre vis inclinées (Figure 58b). Le pont parcourt la longueur du casier en une heure. Ce réacteur de fermentation accélérée est

également équipé d'une aération forcée par soufflage au sol et d'un dispositif d'aspiration ($\approx 140\,000\text{ m}^3/\text{h}$) sous la toiture (complété par un biofiltre à l'extérieur). La matière reste 3 semaines dans ce bâtiment fermé avant d'être progressivement déposée sur tapis roulant et emmené vers le bâtiment d'affinage pour une amélioration qualitative (Figure 58c) et (Figure 58d). Là, le compost passe dans un deuxième trommel de 25 mm depuis lequel il chute à la verticale dans un système de tri balistique (rebond sur tôles inclinées) : les éléments tels que les cailloux, bouts de verre, capsules... sont alors éliminés et redirigés vers un autre centre. Le compost ainsi obtenu va ensuite être récupéré et stocké en andains jusqu'à sa stabilisation (étape de maturation) après quoi il pourra être valorisé en agriculture.



(a) Réception des déchets ménagers



(b) Andains de fermentation des déchets



(c) Andains de compost en sortie de criblage



(d) Benne de compost en sortie de criblage

Figure 58. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage B [© Laetitia Betelli / INRS].

En ce qui concerne les biodéchets (ordures putrescibles), ils ne subissent pas l'étape de prétraitement : ils sont directement acheminés en fermentation (3 dernières portes du bâtiment, soit 25 % de la surface du casier entier), alors que les déchets verts subissent l'étape de broyage. Le compost issu des déchets verts est lui aussi utilisé pour la valorisation agricole, mais un autre compost « biodéchets » ultrafin est réservé aux particuliers.

5.1.2.3 Plate-forme C (déchets verts et boues)

La troisième plate-forme étudiée prend en charge déchets verts et boues. Son fonctionnement est décrit sur la Figure 59. À savoir que deux types de boues de station d'épuration sont amenées à la plate-forme : des boues pâteuses compostées en très petites quantités ainsi que des boues solides qui ne sont pas compostées sinon entreposées dans un bâtiment en vue d'y être déshydratées (Figure 60c).

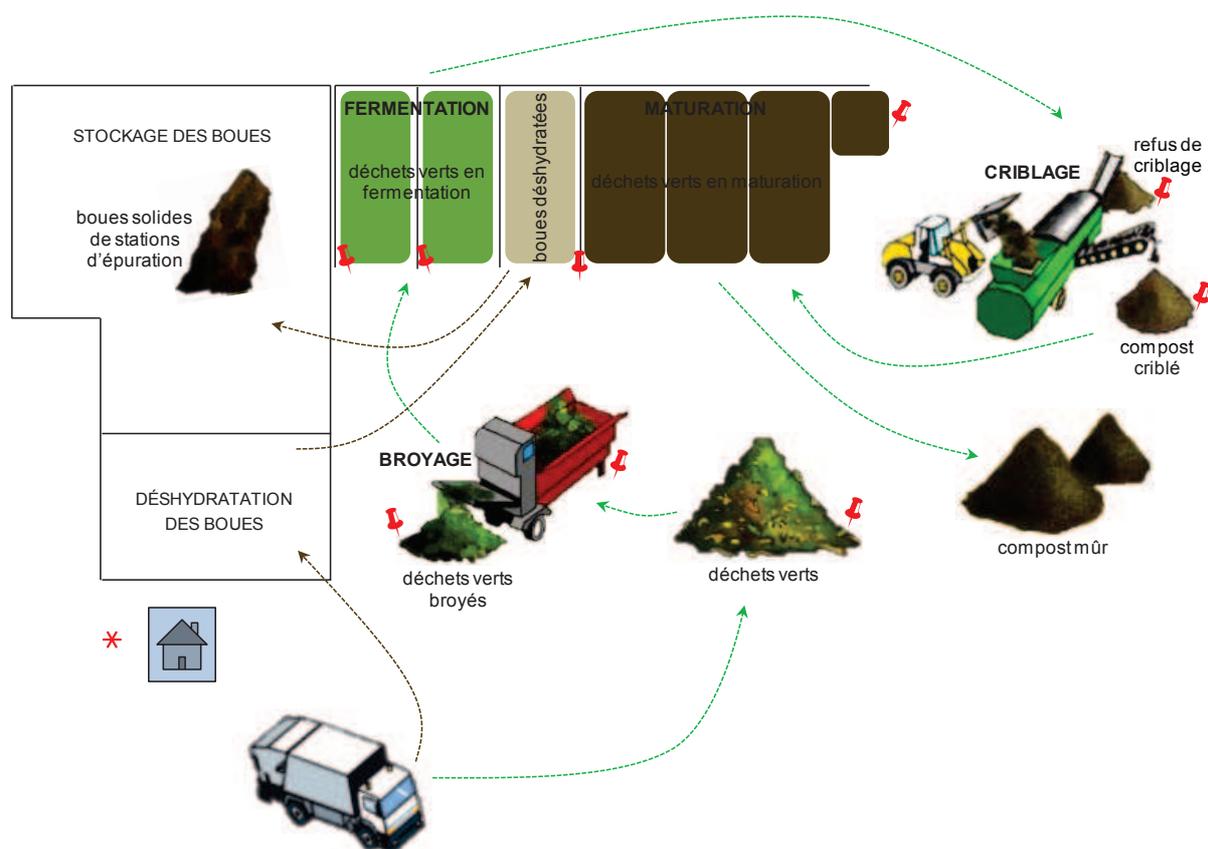


Figure 59. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage C (les tracés verts représentent le parcours des déchets verts et les tracés marron, celui des boues). Sont également représentés les emplacements des points de prélèvement (♣) et de référence (*). La maison représente l'accueil de la plate-forme [images extraites des sites <http://www.syndicat-centre-herault.org> et <http://www.ademe.fr>].

Les déchets verts arrivant à la plate-forme sont broyés environ une fois par semaine (Figure 60a) puis stockés dans 3 andains à l'air libre. Là, les déchets subissent l'étape de fermentation durant 4 à 5 semaines (Figure 60b). Comme les andains sont équipés d'un dispositif d'aération forcée par le sol, il n'y a pas besoin de retournement lors de cette étape. À l'issue de ce temps, les déchets fermentés sont transférés dans 3 autres andains (également en extérieur) pour subir la maturation durant 4 semaines. Les déchets, après fermentation et maturation, sont ensuite criblés (Figure 60d) afin d'affiner le compost qui en résulte (Figure 60e). Le compost résultant uniquement du traitement des boues pâteuses

représente à peine 100 tonnes produites par an, là où la production de compost issu des déchets verts s'élève à 1 000 tonnes annuelles).



(a) Tas de déchets verts broyés



(b) Déchargement de déchets en cours de fermentation



(c) Boues déshydratées en fermentation



(d) Criblage du compost (cribleuse mobile)



(e) Compost criblé et mûr

Figure 60. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage C [© Philippe Duquenne, Laetitia Betelli / INRS].

5.1.2.4 Plate-forme D (déchets ménagers, refus de tri)

Cette quatrième plate-forme, dont le fonctionnement général est décrit sur Figure 61, prend en charge les ordures ménagères (ainsi que les refus de tri) qu'elle va valoriser en un compost urbain dont 99% est mis à disposition des agriculteurs, le reste étant donné aux particuliers et aux collectivités.

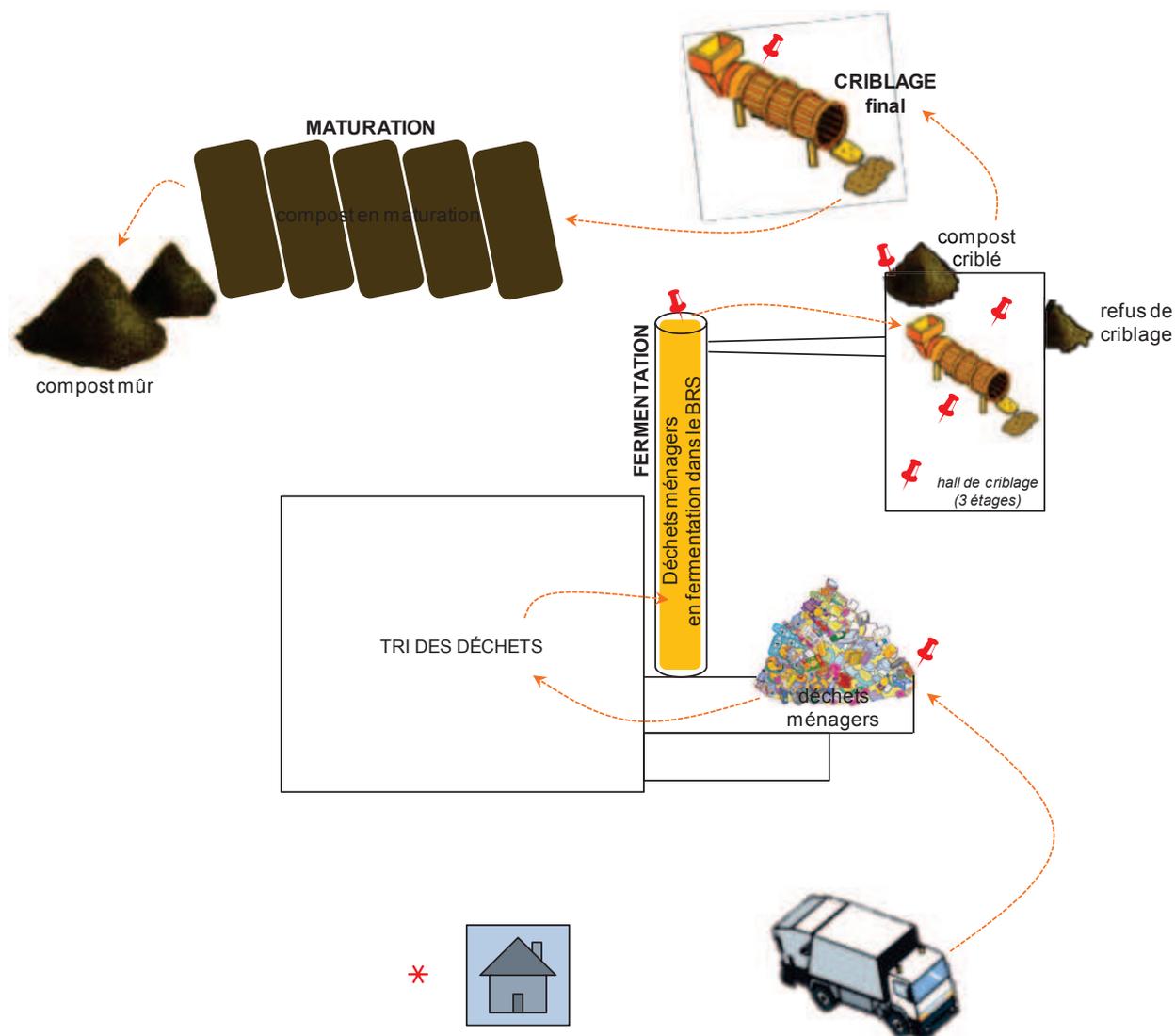


Figure 61. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage D (les tracés orange représentent le parcours des déchets ménagers). Sont également représentés les emplacements des points de prélèvement (📌) et de référence (*). La maison représente l'accueil de la plate-forme. [images extraites des sites <http://www.syndicat-centre-herault.org> et <http://www.ademe.fr>].

Les ordures ménagères qui arrivent sur la plate-forme sont réceptionnées dans une fosse d'environ 800 m³ de capacité (Figure 62a), où elles sont mélangées aux refus de tri des déchets recyclables (représentant environ 40 % du total). Progressivement, un grappin (piloté depuis un poste de commande) va ensuite les emmener dans un cylindre de fermentation ou BRS (Bio-Réacteur Stabilisateur) d'une longueur de 48 mètres pour 4,25 mètres de diamètre et en rotation permanente (1 tour par minute). Grâce à l'action de microorganismes, au contrôle constant de paramètres (ventilation et humidification) ainsi qu'à un brassage régulier (rotation permanente), les déchets organiques vont y subir une dégradation accélérée durant 2 jours et demi par fermentation aérobie à température élevée (60 °C).



(a) Réception des déchets ménagers



(b) Extrémité terminale du cylindre de fermentation (BRS)



(c) Criblage par séparation balistique avec rebond



(d) Compost en sortie de criblage

Figure 62. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage D [© Philippe Duquenne, Laetitia Betelli / INRS].

En sortie du cylindre (Figure 62b), la matière est acheminée par une bande transporteuse vers le bâtiment d'affinage où va se dérouler la deuxième étape du compostage, à savoir le criblage. Un trommel (tamis rotatif filtrant à alimentation interne), va faire une première séparation des matières plastiques qui seront ensuite incinérées et des déchets inertes (comme le verre) qui seront réacheminés vers un centre d'enfouissement technique. Une séparation balistique par rebond va affiner la qualité du compost (Figure 62c) en séparant les matières organiques valorisables des déchets non organiques (donc non valorisables) qui seront amenés dans un centre de stockage des déchets non dangereux. Le compost va être mis à sécher avant d'être à nouveau criblé ceci afin d'éliminer les particules trop petites qui auraient échappées au trommel (Figure 62d). Le compost est ensuite mis en andains sur l'aire de stockage extérieure du site pour y subir la troisième et dernière étape de maturation, durant 8 semaines.

5.1.2.5 Plate-forme E (déchets verts et biodéchets)

Cette dernière plate-forme traite la fraction fermentescible des déchets ménagers et les déchets verts, auxquels il faut ajouter les papiers et cartons servant à compenser les variations saisonnières. Son fonctionnement est présenté sur la Figure 63.

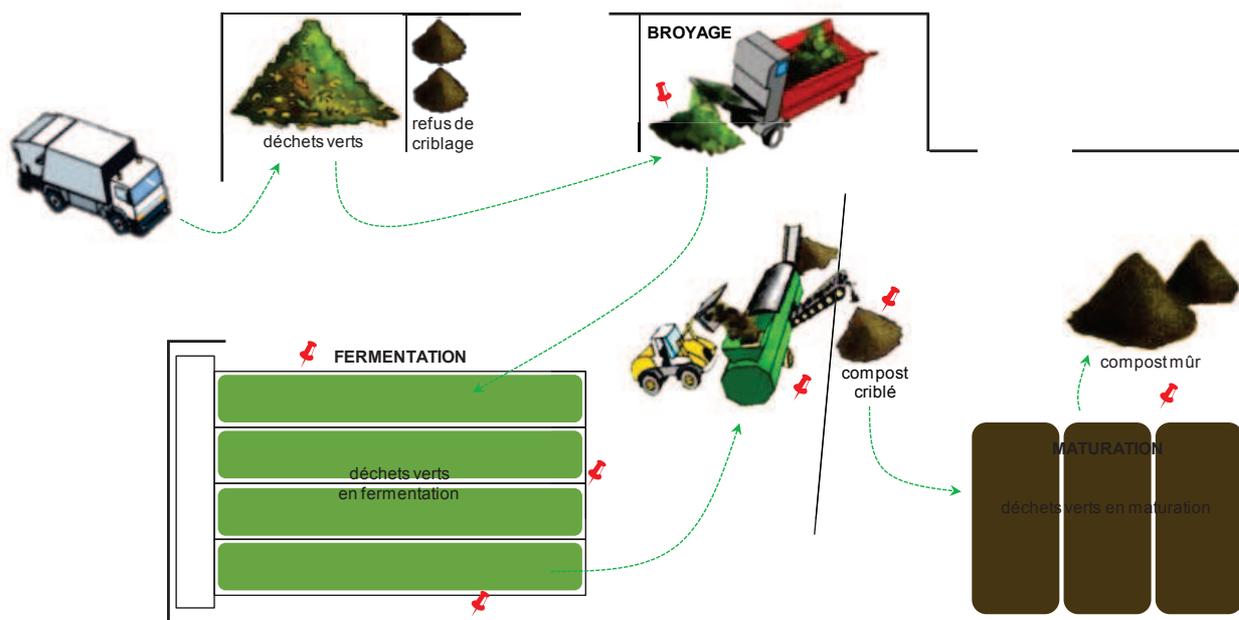


Figure 63. Schéma des installations et du fonctionnement général de la plate-forme de compostage E (les tracés verts représentent le parcours des déchets verts et biodéchets). Sont également représentés les emplacements des points de prélèvement (↯) et de référence (*). La maison représente l'accueil de la plate-forme [images extraites des sites <http://www.syndicat-centre-herault.org> et <http://www.ademe.fr>].



(a) Andain de fermentation des déchets



(b) Andain de fermentation des déchets



(c) Criblage



(d) Compost en sortie de cribleuse



(e) Compost criblé et mûr

Figure 64. Photographies de quelques activités et installations au sein de la plate-forme de compostage E [© Philippe Duquenne, Laetitia Betelli / INRS].

Les déchets réceptionnés sur la plate-forme sont alors broyés puis stockés dans une cellule tampon d'une capacité de 12 tonnes, avant d'être transportés dans le bâtiment de fermentation. Ce bâtiment contient 4 andains de fermentation contigus, séparés par des murets, qui possèdent un système de ventilation capable de diffuser de l'air en fonction de la température des andains (Figure 64a et Figure 64b). Une roue pelleuse se déplace le long de ces murets de séparation afin d'effectuer un retournement de la matière tout en l'arrosant, mais aussi un transfert de la matière d'un andain à l'autre. Les déchets amenés dans ce bâtiment après le broyage passent une semaine dans chacun de ces 4 andains de fermentation. Un affinage par criblage (Figure 64c et Figure 64d) est ensuite réalisé de manière à éliminer les déchets magnétiques (procédé magnétique de déferraillage) ainsi que les éléments grossiers indésirables (crible rotatif de maille 20 mm). Le compost est alors mis à maturation durant deux à trois mois. La dégradation de la matière continue jusqu'à stabilisation de l'activité biologique et le compost mûr ainsi obtenu (Figure 64e) est revendu à une coopérative agricole.

5.1.3 STRATÉGIES DE MESURES DES BIOAÉROSOLS

Tous les prélèvements ont été effectués en ambiance. Les dispositifs de prélèvements étaient placés à 1,7 m du sol, avec les orifices de captage tournés vers l'activité.

5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°1

Les mesures ont été effectuées sur les 5 plates-formes A, B, C, D et E. Pour chacune, 6 à 7 points de prélèvement ont été positionnés à proximité des activités caractéristiques. Un autre point, appelé « point de référence » et présumé non-exposé, a été placé à l'écart et au minimum à 40 m des activités, en amont de la direction des vents dominants. Les échantillons ont été collectés en cassettes fermées ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) en chacun de ces points, à raison d'un échantillon par jour et ce, durant 3 jours consécutifs. Un jour de prélèvement correspond à une tournée de prélèvements. Des prélèvements ont également été effectués en cassettes ouvertes ($25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) à proximité des activités présumées les plus exposantes, parmi 3 des points décrits précédemment. Les échantillons correspondants ont été collectés parallèlement à ceux qui ont été faits en cassettes fermées sur 3 jours consécutifs. Si les zones d'activités pour les prélèvements en cassettes fermées ont été choisies de manière à étudier un maximum d'étapes dans le processus de compostage, celles pour les prélèvements en cassettes ouvertes visaient essentiellement les activités potentiellement plus productrices de bioaérosols. La référence est toujours la même sur les 3 tournées, ce qui n'est pas forcément le cas des points aux zones d'activités (en fonction des tâches effectuées, vis-à-vis de la gêne occasionnée aux travailleurs...). La durée des prélèvements est précisée dans le Tableau 12. Les échantillons collectés sont destinés à l'analyse des bactéries cultivables mésophiles, des bactéries cultivables thermophiles et de *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida* sp., et *Streptomyces* sp., par qPCR.

5.1.3.1 Mesures effectuées dans le cadre de l'étude n°2

Les mesures ont été effectuées sur la plate forte E, à proximité de la zone de fermentation (Figure 63 et Figure 64a et Figure 64b). Les prélèvements ont été effectués simultanément avec les dispositifs suivants : deux cassettes fermées ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) dont l'une est destinée à la mesure des poussières inhalables, une cassette ouverte ($25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) et un impacteur en cascade Marple ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Pour chaque tournée, tous ces échantillonnages ont été réalisés au même point de prélèvement. Hormis la cassette

destinée aux poussières inhalables, les trois autres prélèvements sont destinés à l'analyse des bactéries cultivables mésophiles, des bactéries cultivables thermophiles et de *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida* sp., et *Streptomyces* sp., par qPCR. Des prélèvements ponctuels ont également été effectués à l'aide du cyclone haut débit Coriolis® μ en vu de ces mêmes analyses par culture et par PCR. La durée des prélèvements est précisée dans le Tableau 12.

5.1.3.2 Méthodes de prélèvement des bioaérosols

✦ Prélèvement en cassettes fermée ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) et ouverte ($25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$)

Pour chaque tournée, les bioaérosols ont été prélevés par filtration de l'air sur des cassettes porte-filtre. Nous avons procédé à deux types de prélèvements en cassettes : un prélèvement où les cassettes sont fermées et reliées à une pompe individuelle de débit nominal $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ et un prélèvement en cassettes ouvertes (la partie supérieure de la cassette étant retirée), où celles-ci sont alors connectées à des pompes de débit nominal $25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Le protocole détaillé d'échantillonnage par filtration sur cassettes est présenté en Annexe V.

✦ Prélèvement à l'aide de l'impacteur en cascade Marple ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$)

À ces prélèvements en cassettes, s'ajoutent ceux effectués avec le Marple, qui est un impacteur en cascade 8 étages relié à une pompe de débit nominal $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Il permet la collecte de particules dont le diamètre aérodynamique est compris entre $0,5$ et $21 \mu\text{m}$. Le protocole détaillé du fonctionnement du Marple est présenté dans l'Annexe VII.

✦ Prélèvement à l'aide du cyclone Coriolis® μ ($300 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$)

Des échantillons ont également été récoltés grâce au Coriolis® μ , un échantillonneur d'aérosol en milieu liquide à haut débit (jusqu'à $300 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Il permet de réaliser des prélèvements d'air conséquents (jusqu'à 3 m^3 en 10 minutes). Le protocole détaillé du fonctionnement du Coriolis est présenté dans l'Annexe VIII.

Le Tableau 12 détaille les différents types d'échantillonnage de bioaérosols effectués (nombre d'échantillons, types d'échantillonneurs, volumes d'air que cela représente...) et ce, plate-forme par plate-forme.

Tableau 12. Détails des prélèvements de bioaérosols effectués sur les 5 plates-formes de compostage étudiés.

Plates-formes Tournées de prélèvements	Plate-forme A			Plate-forme B			Plate-forme C			Plate-forme D			Plate-forme E		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3
Cassettes fermées (2 L.min⁻¹)															
nombre d'échantillons aux activités	7	7	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7
nombre d'échantillons de référence	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
durées des prélèvements (min)	de 76 à 373			de 300 à 359			de 299 à 300			de 300 à 301			de 286 à 305		
débits moyens de prélèvements (L.min ⁻¹)	de 1,96 à 2,08			de 1,93 à 2,14			de 1,95 à 2,04			de 1,93 à 2,04			de 1,99 à 2,02		
moyenne des volumes d'air prélevé (L)	6,36(±1,64)x10 ²			6,34(±0,49)x10 ²			5,98(±0,06)x10 ²			5,96(±0,09)x10 ²			5,98(±0,12)x10 ²		
Cassettes ouvertes (25 L.min⁻¹)															
nombre d'échantillons aux activités	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
durées des prélèvements (min)	de 167 à 375			de 300 à 339			de 300 à 359			de 300 à 311			de 290 à 305		
débits moyens de prélèvements (L.min ⁻¹)	de 25,29 à 27,74			de 23,09 à 24,87			de 23,05 à 25,40			de 19,07 à 25,22			de 17,15 à 26,12		
moyenne des volumes d'air prélevé (L)	6,83(±2,37)x10 ³			7,53(±0,31)x10 ³			7,51(±0,50)x10 ³			7,03(±0,61)x10 ³			7,16(±0,87)x10 ³		
Impacteur en cascade Marple (2 L.min⁻¹)															
nombre d'échantillons aux activités													1	1	1
durées des prélèvements (min)													de 293 à 305		
débits moyens de prélèvements (L.min ⁻¹)													de 2,006 à 2,012		
moyenne des volumes d'air prélevé (L)													6,01(±0,12)x10 ²		
Coriolis (300 L.min⁻¹)															
nombre d'échantillons aux activités													1	1	1
durées des prélèvements (min)													5		
débits moyens de prélèvements (L.min ⁻¹)													300,00		
moyenne des volumes d'air prélevé (L)													1,50(±0,00)x10 ³		

5.1.4 TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Une fois collectés, les échantillons sont conservés tel quel, à 4 °C en attendant leur analyse le lendemain (le temps entre prélèvement et analyse devant être le plus court possible). Les échantillons ne sont pas reconditionnés pour le transport : les membranes restent dans les cassettes, alors rebouchées, et les cônes contenant le fluide de collecte issu des prélèvements en Coriolis sont refermés. Seules les membranes contenues dans l'impacteur en cascade Marple sont retirées de chaque étage d'impaction et conditionnées individuellement de manière stérile dans des tubes à centrifuger.

5.1.5 MÉTHODES D'ANALYSES DES BIOAÉROSOLS

Tous les bioaérosols collectés (et ce, quel que soit le type de prélèvement) ont été analysés le lendemain de leur prélèvement.

5.1.5.1 Mesure pondérale des poussières inhalables

Pour chacune des 3 tournées E1, E2 et E3, deux des sept échantillons prélevés aux points d'activités en cassettes fermées (2 L.min⁻¹) sont prélevés à l'étape de fermentation. Si l'un des deux

échantillons a été étudié selon le mode opératoire classique décrit en Annexe V, l'autre a servi à mesurer la quantité de poussières inhalables. Pour ce faire, la cassette est montée au laboratoire de manière conventionnelle mais la membrane qui y est enchâssée est préalablement pesée, donnant ainsi sa masse avant prélèvement. Une fois le bioaérosol échantillonné et la cassette ramenée au laboratoire, la membrane sur laquelle les particules se sont impactées ne subit pas une extraction en milieu liquide sinon une simple pesée afin de connaître la masse après prélèvement. Par différence des deux masses avant et après échantillonnage, il est alors possible de connaître la quantité (et donc la concentration) de poussières inhalables de l'échantillon.

5.1.5.2 Pré-traitement des échantillons

Les échantillons prélevés en cassettes fermées, tout comme ceux prélevés en cassettes ouvertes, requièrent une étape préalable d'extraction de la flore, ceci afin de récupérer tous les microorganismes récoltés sur les membranes enchâssées dans les cassettes. Celle-ci est décrite dans l'Annexe V. C'est également le cas en ce qui concerne les bioaérosols issus de l'impacteur en cascade Marple (Annexe VII). Enfin, l'échantillonneur haut débit Coriolis permettant d'échantillonner les bioaérosols en milieu liquide, il ne nécessite pas cette étape préalable d'extraction de la flore. Le liquide d'extraction contenant les microorganismes échantillonnés est directement analysé tel quel. Hormis les cassettes servant à déterminer la concentration en poussières inhalables, tous les autres échantillons (bioaérosols issus des cassettes fermées, des cassettes ouvertes, des différents étages de l'impacteur et des Coriolis) sont analysés de la même façon : par mise en culture sur milieux gélosés et par PCR temps réel après extraction de l'ADN.

5.1.5.3 Dénombrement des bactéries cultivables par mise en culture sur géloses

Les échantillons ont été analysés par mise en culture de la flore viable cultivable sur milieux gélosés, les résultats s'exprimant en unités formant colonie par mètre cube d'air échantillonné. Deux groupes de microorganismes ont été recherchés. Tout d'abord, les bactéries cultivables mésophiles ont été recherchées par ensemencement sur géloses TSA supplémentées en actidione et incubation à 25 °C pendant 5 jours. Ensuite, les bactéries cultivables thermophiles ont été dénombrées par mise en culture sur géloses TSA et incubation à 56 °C durant 3 jours. L'analyse de mise en culture sur milieux gélosés est présentée et détaillée en Annexe II (mise en place de l'analyse, calculs des concentrations, expression des résultats...).

5.1.5.4 Dénombrement des trois espèces/groupes ciblés d'actinomycètes par qPCR

Les suspensions ont également été analysées en qPCR, par extraction puis amplification de l'ADN. L'ADN des suspensions à analyser a été extrait avec le kit commercialisé FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals). Trois microorganismes ou groupes de microorganismes ont été recherchés par qPCR : *Thermoactinomyces vulgaris* par amplification de l'ADN avec les oligos Tvu F751-R824/S776, *Thermobifida fusca* et *Thermobifida alba* (voire d'autres *Thermobifida* sp.) avec les oligos Tfu F374-R472/S419 et le groupe des streptomycètes mésophiles (élargi à d'autres espèces comme *Saccharomonospora* sp.) avec les oligos SM fw8-rev9/p6. La méthodologie complète de l'analyse par qPCR est décrite en Annexe IV.

5.1.6 EXPLOITATION DES RÉSULTATS

5.1.6.1 Concentrations en poussières inhalables

Les pesées effectuées sur certains échantillons, avant et après prélèvements en cassettes fermées fournissent une masse de poussières inhalables en gramme de matière. Cette masse correspondant à la quantité globale d'air prélevé sur l'échantillon donné, il suffit ensuite de la ramener à 1 m³ d'air pour obtenir la concentration en poussières inhalables, alors exprimée en g.m⁻³.

5.1.6.2 Concentrations en bactéries viables cultivables et en ADN

Les analyses de mise en culture sur milieux gélosés des bioaérosols issus des prélèvements en cassettes fermées, en cassettes ouvertes et avec le Coriolis, fournissent des concentrations en bactéries viables cultivables exprimées en UFC.mL⁻¹. Le calcul est détaillé dans l'Annexe II. Les analyses de ces mêmes échantillons en qPCR donne des résultats en copies de gène.mL⁻¹, le calcul étant détaillé en Annexe IV. Un calcul intermédiaire permet de ramener ces concentrations à une quantité d'air puisqu'il s'agit ici de bioaérosols. Les concentrations sont alors exprimées en UFC ou copies de gène par mètre cube d'air prélevé, selon la formule :

$$C = \frac{c \times V_{\text{ext}} \times 1000}{V_{\text{air}}} \quad (\text{Équation 3})$$

où C est la concentration exprimée en UFC.m⁻³ ou copies de gène.m⁻³, c est la concentration exprimée en UFC.m⁻³ ou copies de gène.mL⁻¹ et V_{ext} est le volume de suspension extrait de la cassette ou utilisé pour le Coriolis en mL (soit 10 mL et 25 mL respectivement). V_{air} est le volume d'air échantillonné en L, calculé en multipliant la durée du prélèvement (min) avec le débit moyen de la pompe (L.min⁻¹) prenant en compte les débits avant et après prélèvement.

5.1.6.3 Granulométries obtenues avec l'impacteur en cascade Marple

Les données issues du Marple sont également des concentrations en UFC.mL⁻¹ pour chacun des étages d'impaction, concentrations là aussi converties en UFC.m⁻³. En revanche, les résultats sont représentés en distributions granulométriques avec le diamètre aérodynamique (en µm) représenté en échelle logarithmique sur l'axe des abscisses et la concentration des particules ramenée à l'amplitude logarithmique des classes sur l'axe des ordonnées. Cette grandeur, qui s'exprime en UFC.m⁻³, se calcule selon la formule :

$$y = \frac{C_i}{d \log D_{ae}} \quad (\text{Équation 7})$$

où C_i représente la concentration en cultivables pour la classe i (en UFC par mètre cube d'air analysé) et $d \log D_{ae}$ (sans unité) caractérise l'amplitude des classes en échelle logarithmique (différence des logarithmes des bornes supérieure et inférieure de la classe).

5.1.6.4 Statistiques

Concernant les concentrations aux points d'activité et aux points de référence en cassettes fermées, les graphiques ont été réalisés avec le logiciel Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation).

Les médianes et taux de réponse qui y sont associés sont calculés avec ce même logiciel. L'étude des facteurs de variation des concentrations mesurées à $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a nécessité la mise en place d'analyses statistiques sur les valeurs logarithmiques des concentrations qui sont des analyses de la variance (ANOVA) à un facteur associées à des tests des étendues multiples. Ces tests, mais aussi les probabilités et les boîtes à moustache renseignant sur les moyennes, les médianes et les barres d'erreur, sont réalisés par le biais du logiciel Statgraphics Centurion XV, version 15.2.00 (StatPoint Technologies). Pour ce qui est de l'étude de comparaison des concentrations mesurées à $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ et à $25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, les deux logiciels ont été utilisés : Microsoft® Office Excel® pour les graphiques et le calcul de rapports et Statgraphics Centurion XV pour les tests de corrélation réalisés sur les valeurs logarithmiques. Enfin, les distributions granulométriques concernant l'étude de l'aérosol généré au cours de la fermentation sur plate-forme E ont été établies avec Microsoft® Office Excel®. Dans les chapitres suivants, des abréviations sont utilisées pour la plupart des indicateurs ; ainsi, «probabilité» est substituée par la lettre p, n signifie «nombre d'observations» et r «coefficient de corrélation».

5.2 RÉSULTATS

5.2.1 DÉROULEMENT DE LA CAMPAGNE DE PRÉLÈVEMENTS

La campagne de mesures en plates-formes de compostage a permis de prélever un total de 113 échantillons (98 échantillons aux points d'activités et 15 aux points de référence) en cassettes fermées ($2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Tous ont été analysés hormis un point de référence qui n'a pu être étudié qu'en culture mais pas en qPCR. En cassettes ouvertes ($25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), 45 échantillons ont été collectés mais en raison d'un problème avec la pompe de prélèvement, un des échantillons a été invalidé avant analyses. Par conséquent, seuls 44 ont été analysés en cultures et en qPCR.

Pour les trois journées de prélèvement effectuées sur chacune des 5 plates-formes visitées, le déroulement des mesures a été des plus normal. Les conditions de prélèvements, qu'elles soient matérielles ou météorologiques, étaient telles que les activités de travail ont été menées de manière habituelle sans interruption brutale. En effet, aucune panne n'a été déplorée durant les journées de prélèvements ni aucune mauvaise condition météorologique qui aurait pu interrompre les échantillonnages (Tableau 13).

Tableau 13. Caractéristiques météorologiques (températures et vitesses des vents) observées lors des 3 journées de prélèvements sur les 5 plates-formes de compostage [données issues du site <http://www.meteorologic.net>].

	Période des prélèvements		Température (°C) entre 9 h et 16 h		Vitesse du vent (km/h) entre 9 h et 16 h	
	dates	jour	min.	max.	min.	max.
Plate-forme A	du 11 au 13 avril 2011	1 (A1)	17,2	21,3	3	15
		2 (A2)	10,1	12,1	25	30
		3 (A3)	8,8	11,7	7	11
Plate-forme B	du 10 au 12 mai 2011	1 (B1)	20,9	24,6	4	11
		2 (B2)	19,9	23,0	3	9
		3 (B3)	16,3	19,7	8	18
Plate-forme C	du 20 au 22 juin 2011	1 (C1)	15,3	19,0	22	29
		2 (C2)	20,3	23,8	19	25
		3 (C3)	17,9	24,6	17	30
Plate-forme D	du 28 au 30 juin 2011	1 (D1)	26,7	31,4	6	11
		2 (D2)	20,6	24,2	8	21
		3 (D3)	17,8	20,2	10	13
Plate-forme E	du 19 au 21 juillet 2011	1 (E1)	16,0	18,0	10	14
		2 (E2)	16,8	18,3	8	18
		3 (E3)	17,7	20,6	13	20

5.2.2 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS D'ACTIVITÉS EN CASSETTES FERMÉES

Les mesures effectuées en cassettes fermées ($2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) mettent en évidence la présence de microorganismes dans l'air des plates-formes de compostage visitées. Les concentrations mesurées varient fortement selon les microorganismes recherchés, la plate-forme de compostage considérée mais aussi le point de prélèvement au sein d'une même plate-forme et le jour d'échantillonnage pour un même point de prélèvement (Figure 65 et Figure 66).

Les concentrations en microorganismes cultivables aux zones d'activités varient de $1,7 \times 10^2$ à $9,4 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ en ce qui concerne les bactéries mésophiles et de $1,3 \times 10^3$ à $8,5 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ pour les bactéries thermophiles (Figure 65). De plus, tous les échantillons analysés sont positifs en culture. Les taux de réponse pour les analyses des flores mésophiles et thermophiles sont de 100 %. Néanmoins, pour 6 des 98 échantillons analysés en culture à 25 °C et 3 des 98 analysés en culture à 56 °C , une concentration précise n'a pu être déterminée en raison d'un nombre de colonies trop important sur les boîtes. Les dilutions appliquées aux échantillons étaient insuffisantes pour l'obtention d'un résultat.

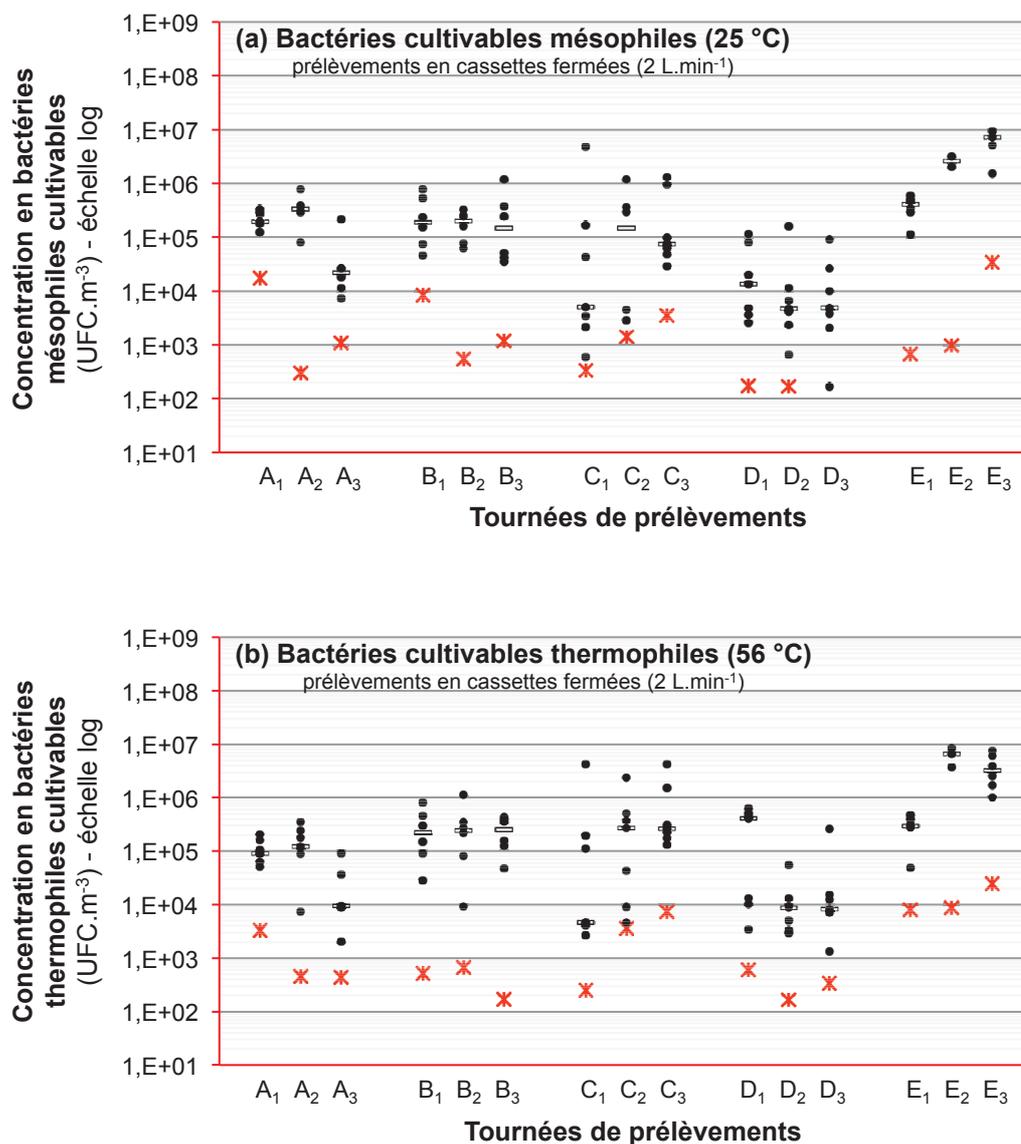


Figure 65. Concentrations en bactéries cultivables mésophiles (a) et thermophiles (b) retrouvées durant les tournées de prélèvements effectuées sur les 5 plates-formes de compostage (A à E). Pour chaque tournée, sont représentées les concentrations des différents points de prélèvement (●), la valeur médiane associée (□) et la concentration du point de référence (*). Les échantillons dont les concentrations sont inférieures à la limite de quantification ou trop élevées pour avoir pu être déterminées (dilutions des échantillons insuffisantes) ne sont pas représentés.

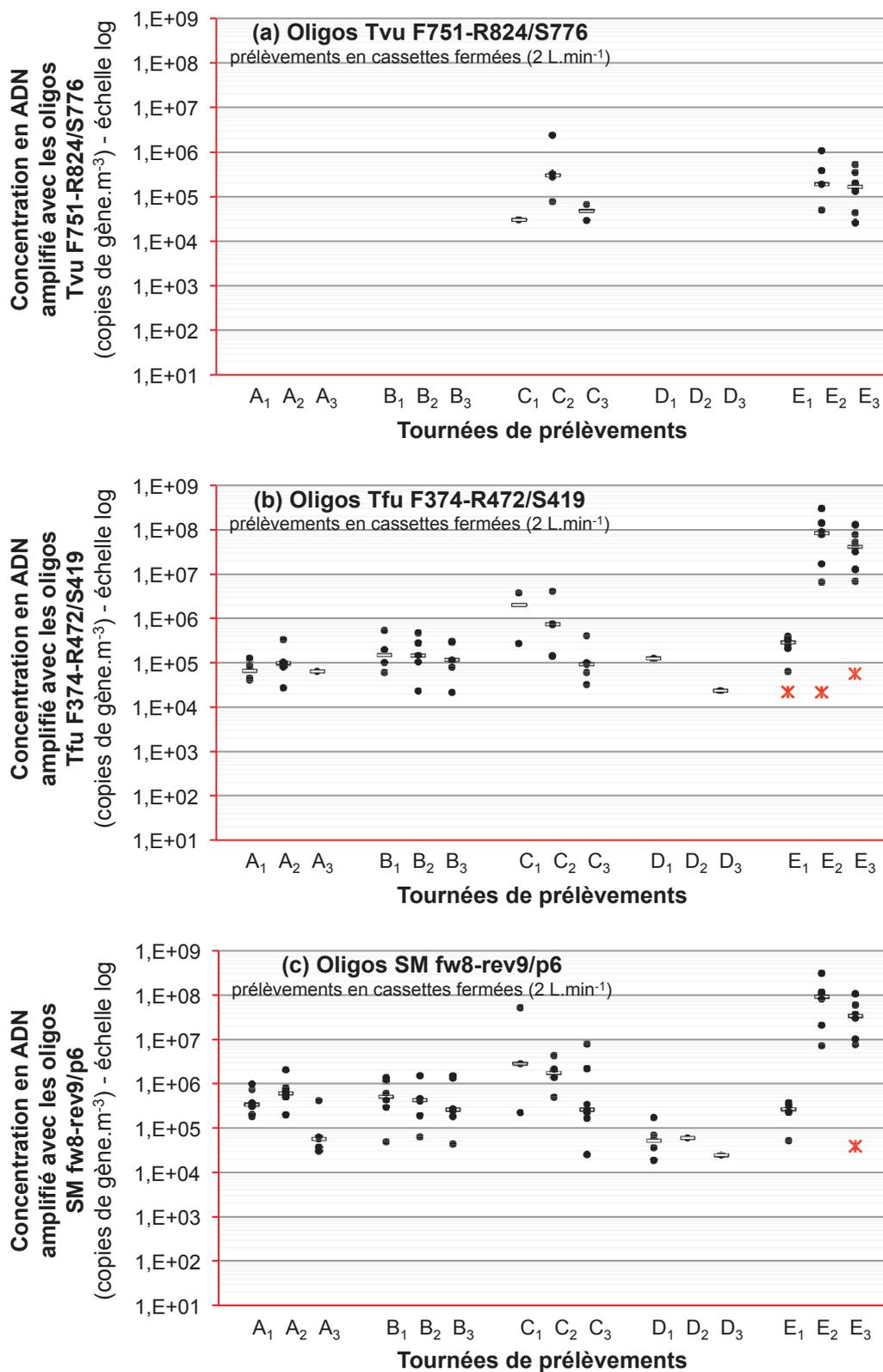


Figure 66. Concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tvu F751-R824/S776 (a), les oligos Tf u F374-R472/S419 (b) et les oligos SM fw8-rev9/p6 (c) retrouvées durant les tournées de prélèvements effectuées sur les 5 plates-formes. Pour chaque tournée, sont représentées les concentrations des différents points de prélèvement (●), la valeur médiane associée (◻) et la concentration du point de référence (*). Les échantillons dont les concentrations sont inférieures aux limites de détection ou de quantification ne sont pas représentés.

De la même façon, aux points d'activités, les concentrations en ADN sont comprises entre $2,6 \times 10^4$ et $2,4 \times 10^6$ copies de gène.m⁻³ pour l'amplification avec les oligos Tvu F751-R824/S776, entre $2,1 \times 10^4$ et $3,0 \times 10^8$ copies de gène.m⁻³ concernant les amplifications avec les oligos Tfu F374-R472/S419 et entre $1,9 \times 10^4$ et $3,1 \times 10^8$ copies de gène.m⁻³ pour celles avec les oligos SM fw8-rev9/p6 (Figure 66). En revanche, tous les échantillons ne sont pas positifs en qPCR. Toutes plates-formes confondues, le taux de réponse vis-à-vis de l'amplification par qPCR avec les oligos Tvu s'élève à 80,6 %. Néanmoins, parmi ces 79 échantillons positifs (sur les 98 au total), 61 présentent une quantité d'ADN en dessous de la limite de quantification définie pour cet outil analytique, ne permettant donc pas l'obtention d'une concentration. L'amplification d'ADN avec les oligos Tvu a donc permis d'obtenir une concentration pour 18,4 % des échantillons (18 échantillons sur les 98) alors que 62,2 % (61 échantillons), bien que positifs, sont en dessous de la limite de quantification et que 19,4 % (19 échantillons) présentent une concentration inférieure à la limite de détection (aucune portion de l'ADN d'intérêt n'est détectée). Vis-à-vis des amplifications réalisées avec les oligos Tfu, le taux de réponse s'élève à 92,9 % avec 57 échantillons présentant une concentration (58,2 %) et 34 en dessous de la limite de quantification (34,7 %). Pour les 7 autres échantillons, aucun fragment d'ADN d'intérêt n'a été détecté conduisant à une concentration inférieure à la limite de détection. Enfin, en ce qui concerne les amplifications avec les oligos SM, le taux de réponse est de 100 %. Tous les échantillons présentent une concentration mais 23 des 98 échantillons (23,5 %) sont en dessous du seuil de quantification de la méthode.

À titre d'information, le nombre d'échantillons conduisant à une concentration supérieure à 10^5 UFC ou copie de gène par mètre cube d'air (valeur arbitraire), tous échantillons confondus, est de 47 pour les analyses des bactéries cultivables mésophiles (51,1 % des échantillons) et 54 pour celles en cultivables thermophiles (56,8 %). Ce même nombre est de 11 pour les analyses en qPCR avec les oligos Tvu (61,1 % des échantillons présentant une concentration), 38 pour les analyses qPCR avec les oligos Tfu (67,2 %) et 61 pour celles avec les oligos SM (81,3 %).

5.2.3 CONCENTRATIONS MESURÉES AUX POINTS DE RÉFÉRENCE EN CASSETTES FERMÉES

Les concentrations en bactéries cultivables aux points de référence sont toutes inférieures à 10^5 UFC.m⁻³ et varient de $1,7 \times 10^2$ à $3,5 \times 10^4$ UFC.m⁻³ en ce qui concerne les bactéries mésophiles et de $1,7 \times 10^2$ à $2,5 \times 10^4$ UFC.m⁻³ pour les bactéries thermophiles (Figure 65). Là aussi, tous les échantillons sont positifs en culture (taux de réponse de 100 %) malgré le fait que l'un d'entre eux (3^{ème} jour de prélèvement de la plate-forme D) soit en dessous de la limite de quantification pour le dénombrement des bactéries mésophiles (sa concentration est inférieure à $8,4 \times 10^1$ UFC.m⁻³). Les concentrations en bactéries cultivables mesurées aux points de référence varient en fonction de la plate-forme et du jour de prélèvement. Mais quels que soient la plate-forme et le jour de prélèvement considérés, les concentrations en bactéries cultivables mésophiles et thermophiles, mesurées aux points de références, sont toujours inférieures à celles mesurées aux zones d'activités.

Si l'on regarde à présent les concentrations en ADN aux points de référence, nous pouvons voir que très peu de points sont représentés (Figure 66). Pour ce qui est de la concentration en ADN amplifié avec les oligos Tvu, aucun point n'est représenté sur le graphique car 12 des 15 échantillons de référence analysés sont négatifs, les 3 restants étant en dessous de la limite de quantification (Figure 66a). En ce qui concerne l'ADN amplifié avec les oligos Tfu, 5 des 15 points de référence s'avèrent négatifs et 7 sont en dessous de la limite de quantification. En revanche, les 3 points restants (correspondant tous trois à la plate-forme E) ont une concentration comprise entre $2,1 \times 10^4$ et $5,7 \times 10^4$ copies d'ecf.m⁻³. Ces trois points de référence présentent néanmoins des concentrations inférieures à celles mesurées aux points

d'activité. En effet, tous les points de cette plate-forme E présentent une concentration et par conséquent sont représentés sur le graphique (Figure 66b) et toutes ces concentrations sont supérieures à celle du point de référence correspondant. Enfin, vis-à-vis des amplifications d'ADN réalisées avec les oligos SM, 2 des 15 points de référence s'avèrent négatifs et 12 sont en dessous de la limite de quantification. En revanche, le point restant (correspondant au 3^{ème} point de référence de la plate-forme E) a une concentration de $3,9 \times 10^4$ copies d'*ecf*.m⁻³ (Figure 66c). Cette concentration reste donc inférieure à celles aux points d'activités pour cette journée de prélèvement (E₃) puisque ces derniers présentent tous une concentration (et par conséquent sont représentés sur le graphique) et que toutes ces concentrations sont supérieures à $3,9 \times 10^4$ copies d'*ecf*.m⁻³. Donc, tous points confondus et tous microorganismes recherchés, seuls 4 échantillons aux points de référence présentent des microorganismes détectables et quantifiables en qPCR.

5.2.4 FACTEURS DE VARIATION DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min⁻¹

Dans ce chapitre, nous avons cherché à observer l'organisation des concentrations en fonction de différents facteurs qui pourraient influencer sur les concentrations en cultivables et en ADN mesurées sur les bioaérosols échantillonnés à 2 L.min⁻¹. Ces facteurs sont la plate-forme de compostage visitée, le ou les types de déchets qui y sont traités, l'étape de compostage au point de prélèvement, l'activité au point de prélèvement (et aux environs) au moment des mesures et l'état de confinement au point d'échantillonnage. Le nombre d'échantillons et de réplicats étant insuffisants pour réaliser une ANOVA à plusieurs facteurs, les conclusions liées à ce chapitre ne seront dues qu'à des observations et ne seront pas basées sur des tests statistiques.

Tout d'abord, le facteur « plate-forme de compostage considérée » (A, B, C, D ou E) semblerait avoir un effet sur les concentrations mesurées, hormis pour le paramètre « ADN Tvu » (trop peu de données valides). Pour tous les autres paramètres, les concentrations associées à la plate-forme E sont plus élevées que celles des autres plates-formes. De la même façon, tous points confondus (hors points de référence), la plate-forme D est celle qui conduit aux échantillons de bioaérosols les moins concentrés (Figure 67).

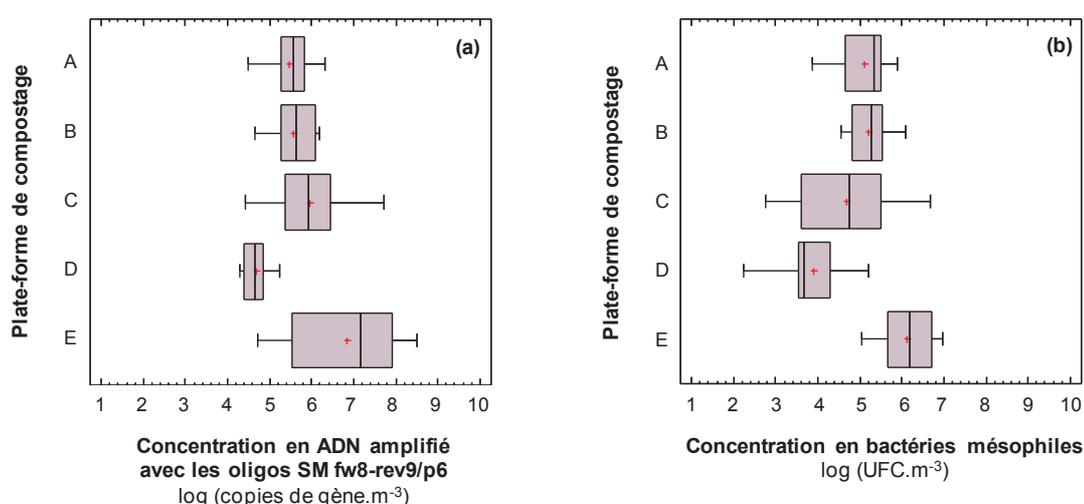


Figure 67. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM (a) et celles en cultivables mésophiles (b) en fonction de la plate-forme de compostage. La moyenne (+), la médiane (|) et les barres d'erreur sont associées à chaque bloc de valeurs.

Ensuite, nous avons regardé l'effet du type de déchets traités et compostés au point échantillonné. Nous avons ainsi pu établir 6 catégories : les déchets ménagers résiduels (DMR), les déchets verts (DV), les boues (B) mais aussi des mélanges de déchets avec les déchets verts associés aux boues (DV+B) ou aux biodéchets (DV+BD) et ces deux mêmes types associés aux déchets ménagers résiduels (DV+BD+DMR). Vis-à-vis des paramètres « ADN Tfu » et « ADN SM », le facteur « type de déchets » aurait une influence sur les concentrations observées, les déchets DV+BD amenant à des concentrations plus élevées qu'avec chacun des autres types (Figure 68). Pour le paramètre des bactéries cultivables (que ce soit les thermophiles ou les mésophiles comme nous pouvons le voir sur la Figure 68), les concentrations des points traitant des déchets DV+BD sont plus élevées que toutes les autres, hormis avec le type DV+BD+DMR pour lequel la différence n'est pas probante. Enfin, comme pour le paramètre précédent, il ne semble pas y avoir de différence entre les types de déchets au regard du paramètre « ADN Tvu ».

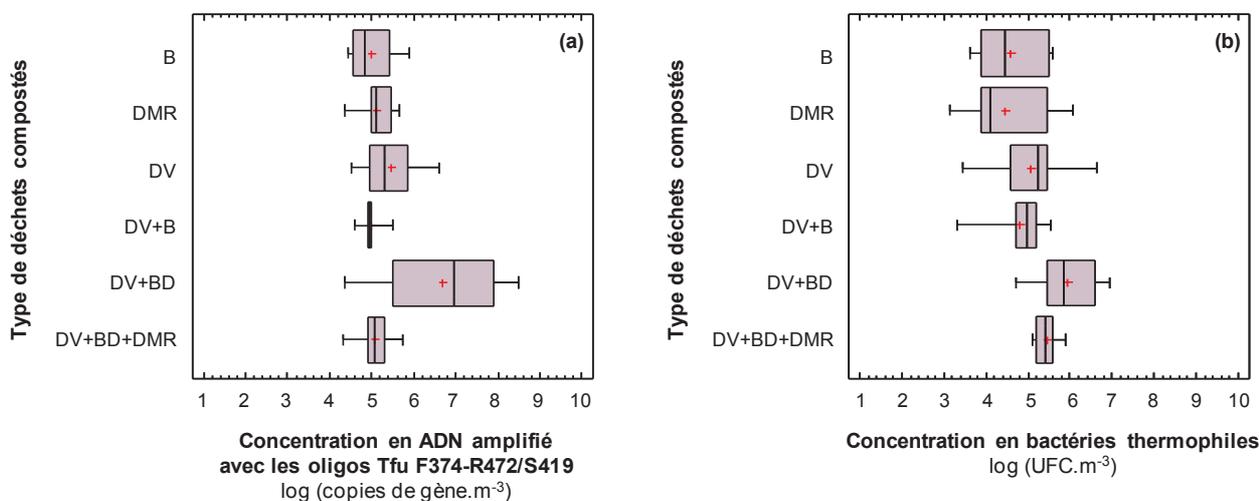


Figure 68. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tfu (a) et celles en cultivables thermophiles (b) en fonction du type de déchets compostés. La moyenne (+), la médiane (|) et les barres d'erreur sont associées à chaque bloc de valeurs.

Le troisième facteur étudié concerne l'étape dans le processus de compostage au point de prélèvement. Ainsi, 7 étapes ont été différenciées : la réception des déchets, le broyage (qui s'applique uniquement aux déchets verts), les deux étapes fondamentales que sont la fermentation d'un côté et la maturation de l'autre, l'étape de criblage (sans distinguer à quel moment dans le processus ce criblage se déroule, ni même de quel type il s'agit), le stockage et une étape appelé « chargeur ». Pour cette dernière étape, les prélèvements ont été effectués dans la cabine de la chargeuse se déplaçant au sein de la plate-forme, pour tous types de chargements et/ou déchargements.

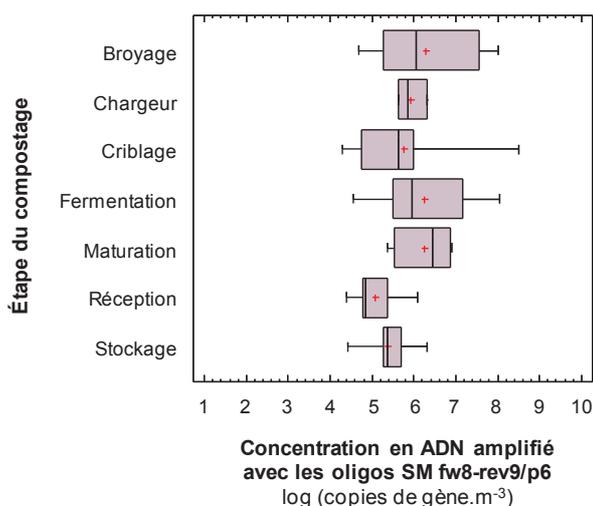


Figure 69. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM en fonction de l'étape de compostage. La moyenne (+), la médiane (|) et les barres d'erreur sont associées à chaque bloc de valeurs.

Au vu des concentrations, la simple observation des résultats et ce, quel que soit le paramètre étudié (hors « ADN Tvu » par manque de données), montre que les étapes de broyage, de fermentation et dans une moindre mesure dans le chargeur, entraînent des concentrations plus élevées en microorganismes recherchés.

L'état de confinement au point d'échantillonnage est l'avant-dernier facteur étudié. Il s'agit ici de voir si le fait que la zone d'activité soit située en bâtiment fermé, en bâtiment couvert ou en extérieur entraîne des différences sur les concentrations mesurées. L'observation des résultats montrent que les concentrations en bactéries cultivables, que ce soit en mésophiles ou en thermophiles, mesurées en bâtiment couvert, sont plus élevées que celles mesurées en bâtiment fermé ou en extérieur. La conclusion est la même pour les concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tfu comme le montrent les boîtes à moustache (Figure 70). En revanche, il semblerait qu'il n'y ait aucun effet de l'état de confinement sur les concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tvu ou avec les oligos SM.

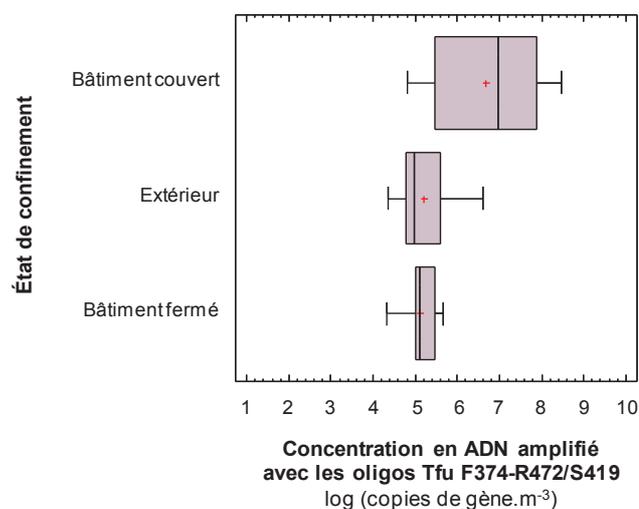


Figure 70. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tfu en fonction de l'état de confinement au point de prélèvement. La moyenne (+), la médiane (|) et les barres d'erreur sont associées à chaque bloc de valeurs.

Enfin, le dernier paramètre étudié concerne l'activité observée durant l'échantillonnage, au point de prélèvement et à proximité. Ainsi, nous avons distingué les échantillons présentant une activité au point de prélèvement mais aussi à proximité directe (++), ceux avec une activité au point de prélèvement mais ne subissant pas l'influence des points proches (+), ceux ne présentant pas d'activité au moment de l'échantillonnage mais sous influence de l'activité des points à proximité (-) et ceux ne présentant aucune activité, ni au point de prélèvement ni à proximité directe (- -). Les résultats montrent qu'il ne semble pas y avoir un quelconque effet de l'activité sur les concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tvu du fait du nombre faible de valeurs analysées, ni même en bactéries cultivables, mésophiles comme thermophiles. En revanche, les concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM et Tfu sembleraient influencées par les activités (

Figure 71) : elles sont plus élevées aux points où l'activité est la plus élevée, c'est-à-dire aux points présentant une activité au moment de l'échantillonnage mais aussi influencés par l'activité des points à proximité (++)).

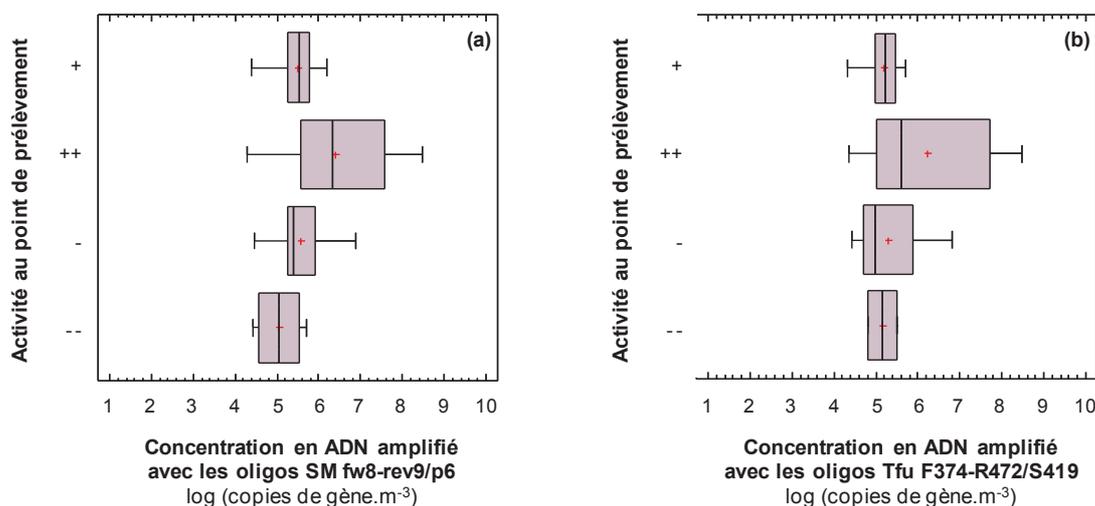


Figure 71. Variation des concentrations en ADN amplifié avec les oligos SM (a) et Tfu (b) en fonction de l'activité au point de prélèvement (++ pour une activité au point de prélèvement mais aussi à proximité, + pour de l'activité seulement au point de prélèvement, - pour de l'activité uniquement à proximité et - - pour une absence totale d'activité). La moyenne (+), la médiane (|) et les barres d'erreur sont associées à chaque bloc de valeurs.

5.2.5 COMPARAISON DES CONCENTRATIONS MESURÉES À 2 L.min⁻¹ ET À 25 L.min⁻¹

La campagne de mesures en plates-formes de compostage a permis de prélever 44 échantillons supplémentaires en cassettes ouvertes. De ces 44 échantillons prélevés à 25 L.min⁻¹, 38 l'ont été en même temps et au même endroit que des échantillons prélevés à 2 L.min⁻¹, permettant donc d'effectuer une comparaison entre ces deux types de prélèvements.

La première information qui émane de ces comparaisons concerne le nombre d'échantillons exploitables en qPCR. En effet, si l'on considère les résultats en termes de quantités d'ADN (copies de gènes par puits) avant conversion en concentrations par mètre cube d'air, nous pouvons voir que les résultats sont différents selon la méthode de prélèvement employée (Figure 72). Le seuil de quantification de la qPCR a précédemment été fixé à 10 copies de gène par puits (2.2.3.1). Cette donnée connue, les résultats des amplifications d'ADN par qPCR avec les oligos Tvu (Figure 72a) montrent que 36 échantillons à 25 L.min⁻¹ fournissent une quantité d'ADN au dessus du seuil de quantification (synonyme de concentration exploitable) contre 9 lorsque les échantillonnages sont réalisés à 2 L.min⁻¹. En ce qui concerne les amplifications avec les oligos Tfu (Figure 72b), 34 échantillons à 25 L.min⁻¹ ont une concentration exploitable alors que ce nombre n'est que de 24 pour les échantillons à 2 L.min⁻¹. Et enfin, pour ce qui est des amplifications avec les oligonucléotides SM (Figure 72c), ce sont 37 échantillons à 25 L.min⁻¹ qui ont une concentration exploitable contre 32 pour les échantillons à 2 L.min⁻¹. L'échantillonnage en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ permet l'exploitation d'un nombre d'échantillons plus élevé qu'en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹, du fait d'une plus grande quantité de matière récoltée sur le filtre. Ceci est d'autant plus visible pour les échantillons faiblement concentrés. À titre d'indication, le prélèvement en cassettes ouvertes a permis d'échantillonner en moyenne $7,21(\pm 1,18) \times 10^3$ litres d'air par cassette, contre une moyenne de $6,12(\pm 0,78) \times 10^2$ litres d'air pour le prélèvement en cassettes fermées.

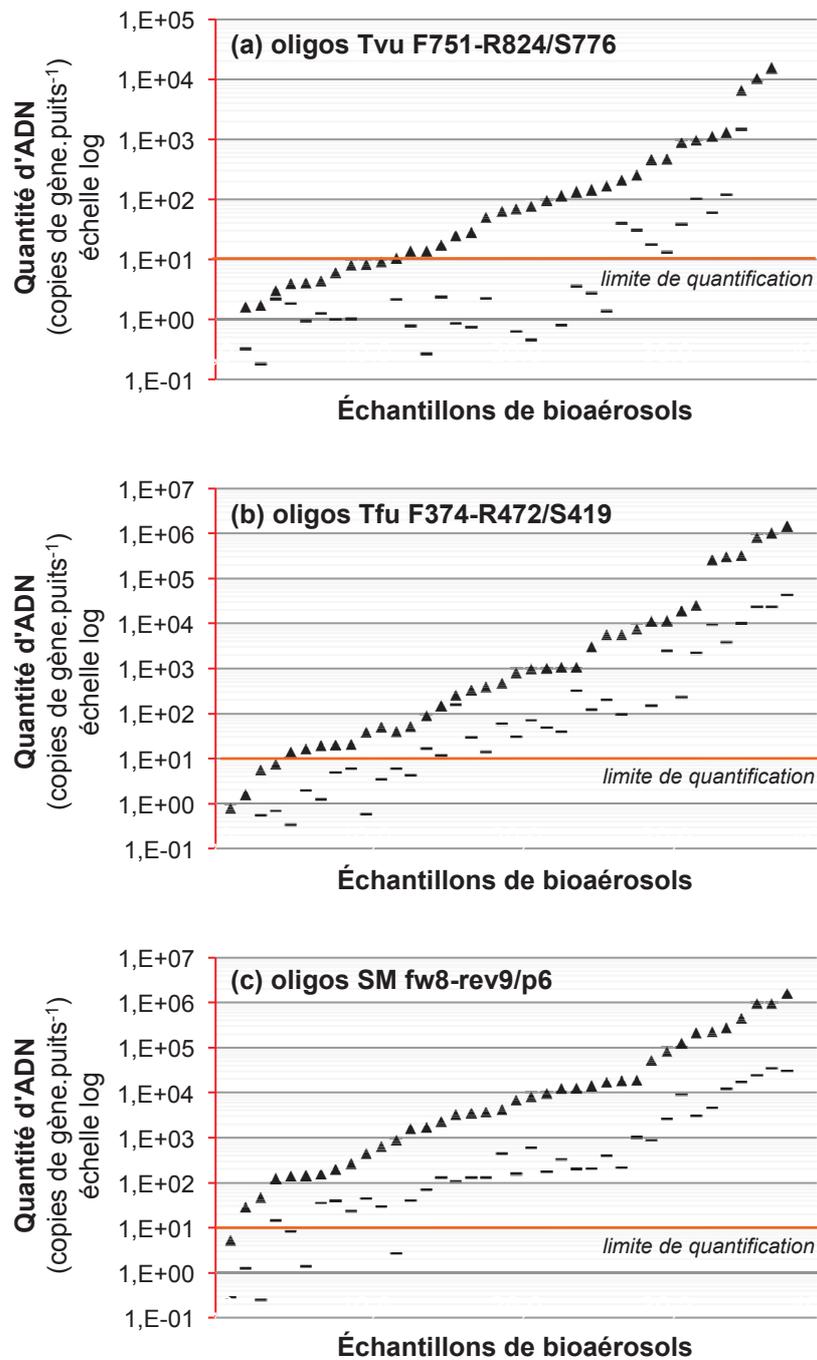
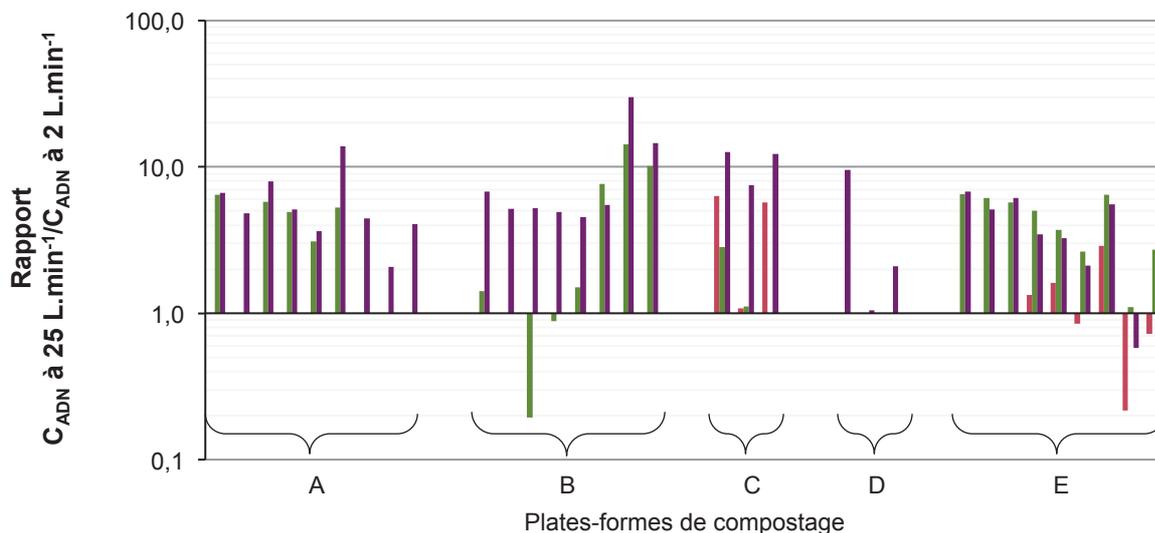


Figure 72. Quantités d'ADN, détectées par qPCR, des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ (▲) et en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹ (—). L'ADN est amplifié avec les oligos Tvu F751-R824/S776 (a), les oligos Tfu F374-R472/S419 (b) et les oligos SM fw8-rev9/p6 (c).

La deuxième information provient des concentrations à proprement parlé, exprimées en copies de gène quantifiées par mètre cube d'air. Une fois les échantillons en dessous de la limite de quantification éliminés (car non exploitables), nous nous sommes intéressés au rapport des concentrations en ADN obtenues pour les échantillons prélevés à 25 L.min⁻¹ sur celles des échantillons prélevés à 2 L.min⁻¹ (Figure 73). Les résultats nous montrent que quels que soient les microorganismes ciblés (qPCR réalisées avec les oligos Tvu, Tfu ou SM), la majorité des rapports sont supérieurs à 1, signifiant que la concentration finale obtenue avec un échantillonnage à 25 L.min⁻¹ est supérieure à celle obtenue au

même point et au même moment de prélèvement à un débit de 2 L.min⁻¹. Tous rapports confondus, seuls 6 sont inférieurs à 1 (ils s'étendent de 0,19 à 0,88) alors que les 58 autres valeurs sont supérieures à 1 et s'étendent de 1,05 à 30,01. Enfin, les tests de corrélations effectués sur les valeurs logarithmiques des concentrations de ces échantillons (sur lesquelles ont été calculés les rapports) montrent qu'il y a une corrélation linéaire forte (n = 64 ; p = 0,0000 ; r = 0,929) entre les concentrations à 2 L.min⁻¹ et celles à 25 L.min⁻¹ (Figure 74).



Échantillons de bioaérosols

Figure 73. Rapports des concentrations en ADN des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ sur les concentrations en ADN de ceux prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹. Les concentrations sont celles obtenues lors des amplifications de l'ADN avec les oligos Tvu F751-R824/S776 (■), les oligos Tfu F374-R472/S419 (■) et les oligos SM fw8-rev9/p6 (■).

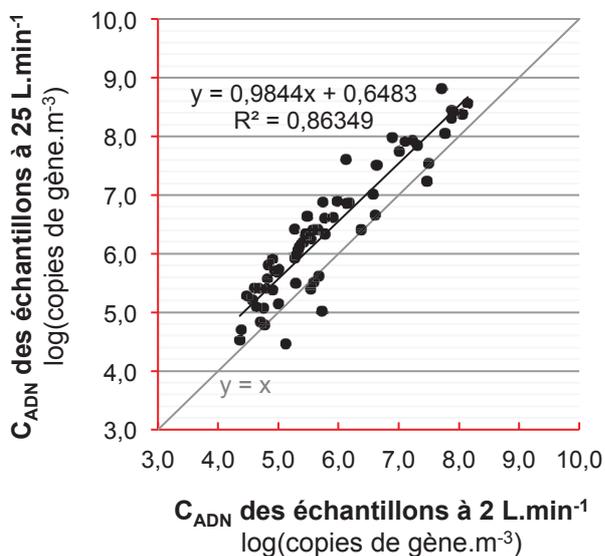


Figure 74. Relation entre la concentration en ADN des échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹ et celle de ces mêmes échantillons récoltés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹. Toutes les analyses en qPCR sont ici représentées (analyses avec les oligos Tvu, Tfu et SM confondus).

Ces résultats sont corroborés par les données en cultivables puisque les résultats nous montrent que, quels que soient les microorganismes ciblés (bactéries cultivables à

25 °C ou à 56 °C), la majorité des rapports sont, là aussi, supérieurs à 1 (Figure 75). La concentration finale obtenue avec un échantillonnage à 25 L.min⁻¹ est majoritairement supérieure à celle obtenue au même point et au même moment de prélèvement à un débit de 2 L.min⁻¹. Tous rapports confondus, 19 rapports sur les 70 sont inférieurs à 1 (ils s'étendent de 0,21 à 0,97) alors que les 51 autres valeurs sont supérieures à 1 et s'étendent de 1,04 à 85,25. Et là aussi, les résultats révèlent une corrélation linéaire entre les concentrations en cultivables obtenues avec un prélèvement à 2 L.min⁻¹ et celles avec un prélèvement à 25 L.min⁻¹ (Figure 76).

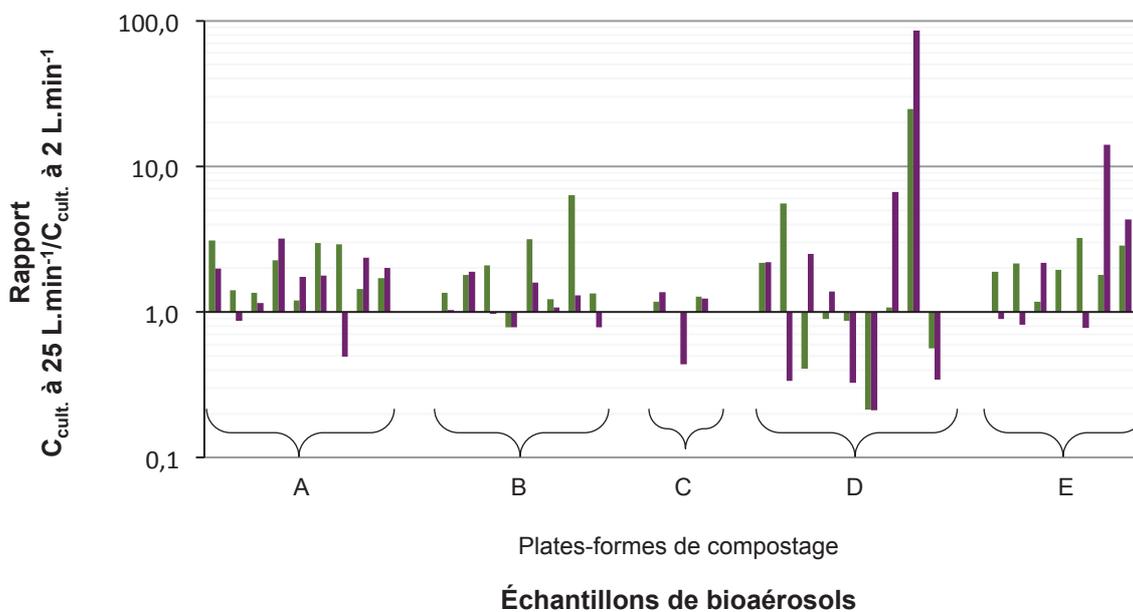


Figure 75. Rapport des concentrations en cultivables des bioaérosols échantillonnés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ sur les concentrations en cultivables de ceux prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹. Les concentrations sont celles obtenues par mises en culture à 25 °C (■) et à 56 °C (■).

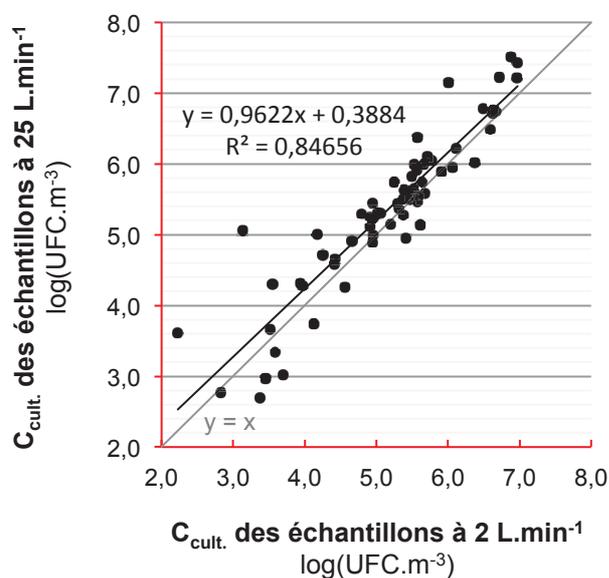


Figure 76. Relation entre la concentration en cultivable des échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹ et celle de ces mêmes échantillons récoltés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹. Toutes les analyses de mises en culture sont ici représentées (analyses à 25 °C et à 56 °C confondues).

5.2.6 CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES MESURÉS

Dans ce chapitre, nous avons cherché d'éventuelles corrélations linéaires entre les paramètres étudiés pour les échantillons prélevés en cassettes fermées d'une part et en cassettes ouvertes d'autre part. Les 5 paramètres étant les concentrations en mésophiles (25 °C), en thermophiles (56 °C), en ADN Tvu, en ADN Tfu et en ADN SM, ces trois derniers ayant été abrégés ainsi pour plus de facilité. Tous les paramètres statistiques associés à chacun des tests effectués et les conclusions engendrées sont récapitulées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Récapitulatif des corrélations obtenues lors des régressions effectuées sur les 5 paramètres biologiques étudiés (concentrations en cultivables et en ADN), pour les échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹ (partie du haut, sur la droite) et en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ (partie basse du tableau, à gauche). L'astérisque (*) signifie que la corrélation peut être invalidée à cause de la présence d'une autocorrélation sérielle des résidus.

	[cultivables mésophiles]	[cultivables thermophiles]	[ADN Tvu] - oligos Tvu F751-R824/S776	[ADN Tfu] - oligos Tfu F374-R472/S419	[ADN SM] - oligos SM fw8-rev9/p6
[cultivables mésophiles]		corrélation modérément forte n = 105 p = 0,0000 r = 0,861	pas de corrélation n = 12 p = 0,8509 r = 0,061	corrélation modérément forte * n = 54 p = 0,0000 r = 0,820	corrélation modérément forte n = 70 p = 0,0000 r = 0,881
[cultivables thermophiles]	corrélation modérément forte n = 42 p = 0,0000 r = 0,768		pas de corrélation n = 15 p = 0,8680 r = 0,047	corrélation modérément forte n = 57 p = 0,0000 r = 0,842	corrélation modérément forte n = 73 p = 0,0000 r = 0,815
[ADN Tvu] - oligos Tvu F751-R824/S776	corrélation relativement faible n = 24 p = 0,0187 r = 0,476	corrélation relativement faible n = 24 p = 0,0185 r = 0,477		pas de corrélation n = 17 p = 0,1341 r = 0,379	pas de corrélation n = 18 p = 0,2518 r = 0,285
[ADN Tfu] - oligos Tfu F374-R472/S419	corrélation forte n = 38 p = 0,0000 r = 0,904	corrélation modérément forte n = 38 p = 0,0000 r = 0,788	corrélation modérément forte n = 26 p = 0,0014 r = 0,595		corrélation forte n = 57 p = 0,0000 r = 0,944
[ADN SM] - oligos SM fw8-rev9/p6	corrélation modérément forte n = 41 p = 0,0000 r = 0,878	corrélation modérément forte * n = 41 p = 0,0000 r = 0,813	corrélation modérément forte n = 26 p = 0,0003 r = 0,654	corrélation modérément forte n = 40 p = 0,0000 r = 0,895	

prélèvements en cassettes fermées (2 L.min⁻¹)

prélèvements en cassettes ouvertes (25 L.min⁻¹)

Si l'on regarde tout d'abord les données des échantillons prélevés en cassettes fermées à 2 L.min⁻¹ (Tableau 14, partie du haut sur la droite), nous pouvons voir que le paramètre 'ADN Tvu' n'est corrélé à aucun des 4 autres paramètres ($12 < n < 18$; $r < 0,285$; $p > 0,252$). En revanche, il existerait une corrélation linéaire significative et forte entre les paramètres 'ADN Tfu' et 'ADN SM' ($n = 57$; $r = 0,944$; $p < 10^{-4}$). Pour les 5 autres cas (impliquant les paramètres 'mésophiles', 'thermophiles', 'ADN Tfu' et ADN 'SM'), une corrélation significative mais modérément forte a été mise en évidence ($54 < n < 105$; $r > 0,815$; $p < 10^{-4}$).

En ce qui concerne les échantillons prélevés en cassettes ouvertes à 25 L.min⁻¹ (Tableau 14, partie basse à gauche), il existe une corrélation linéaire mais relativement faible entre la concentration en ADN amplifiée avec les oligos Tvu et la concentration en cultivables, qu'ils s'agissent des mésophiles ($n = 24$; $r = 0,476$; $p = 0,019$) ou des thermophiles ($n = 24$; $r = 0,477$; $p = 0,019$). En revanche, il existerait une corrélation linéaire significative et forte entre les paramètres 'ADN Tfu' et 'mésophiles' ($n = 38$; $r = 0,904$; $p < 10^{-4}$). Pour les 7 autres cas, une corrélation significative mais modérément forte a été mise en évidence ($26 < n < 42$; $r > 0,595$; $p < 1,4 \times 10^{-3}$).

Sur les 10 corrélations étudiées pour chaque type d'échantillon, il y a plus de paramètres corrélés pour les échantillons prélevés à 25 L.min⁻¹ (les 10) que pour ceux prélevés à 2 L.min⁻¹ (6 seulement puisque le paramètre 'ADN Tvu' n'est corrélé à aucun des 4 autres).

5.2.7 ÉTUDE DE L'AÉROSOL GÉNÉRÉ AU COURS DE LA FERMENTATION SUR LA PLATE-FORME E

Les bioaérosols émis sur la plate-forme E au cours de l'étape de fermentation ont été étudiés de façon complète pendant trois jours consécutifs. Les résultats montrent des concentrations dans l'air en poussières inhalables, en bactéries cultivables et en ADN des microorganismes, variables selon le jour considéré (Tableau 15). Par exemple, les concentrations pondérales en poussières inhalables ont été mesurées à 0,12 mg.m⁻³ le premier jour de prélèvement, 9,16 mg.m⁻³ le second jour et 3,45 mg.m⁻³ le dernier jour. Des observations similaires ont été faites pour les autres paramètres mesurés (Tableau 15).

Pour chacun des paramètres étudiés (concentrations en cultivables et en ADN), nous avons également déterminé la distribution des microorganismes dans les différentes fractions granulométriques du bioaérosol. L'étude a été menée à l'aide de l'impacteur en cascade Marple. De la même façon qu'une différence dans les concentrations en poussières inhalables a été mise en exergue, il y a là aussi une fluctuation des concentrations selon le jour de prélèvement, quelque soit le paramètre considéré. Certains résultats doivent néanmoins être interprétés avec prudence du fait qu'il s'agit d'estimations, les valeurs étant en dessous de la limite de quantification de la méthode.

Tableau 15. Récapitulatif des concentrations obtenues lors de l'étude de l'aérosol généré au cours de la fermentation sur la plate-forme E. Les résultats sont présentés par type d'appareil de prélèvement et par grandeur mesurée et ce, pour les trois jours de prélèvement de la campagne. Les concentrations avec l'impacteur Marple correspondent à la somme des concentrations de tous les étages. Les prélèvements avec le Coriolis n'ont pu être réalisés le troisième jour au point étudié.

	Jours de prélèvement		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3
Cassettes fermées (2 L.min⁻¹)			
poussières inhalables (mg.m ⁻³)	0,12	9,16	3,45
cultivables mésophiles (UFC.m ⁻³)	3,43x10 ⁵	> 9,92x10 ⁶	9,39x10 ⁶
cultivables thermophiles (UFC.m ⁻³)	3,12x10 ⁵	> 9,92x10 ⁶	7,60x10 ⁶
ADN amplifié avec les oligos Tvu (copies de gène.m ⁻³)	1,64x10 ³ *	3,90x10 ⁵	3,42x10 ⁵
ADN amplifié avec les oligos Tfu (copies de gène.m ⁻³)	2,13x10 ⁵	1,40x10 ⁸	7,61x10 ⁷
ADN amplifié avec les oligos SM (copies de gène.m ⁻³)	2,26x10 ⁵	1,15x10 ⁸	5,89x10 ⁷
Cassettes ouvertes (25 L.min⁻¹)			
cultivables mésophiles (UFC.m ⁻³)	4,02Ex10 ⁵	> 7,22x10 ⁶	2,67x10 ⁷
cultivables thermophiles (UFC.m ⁻³)	6,76x10 ⁵	> 7,22x10 ⁶	3,27x10 ⁷
ADN amplifié avec les oligos Tvu (copies de gène.m ⁻³)	1,61x10 ³ *	3,31x10 ⁵	2,49x10 ⁵
ADN amplifié avec les oligos Tfu (copies de gène.m ⁻³)	1,22x10 ⁶	3,70x10 ⁸	2,07x10 ⁸
ADN amplifié avec les oligos SM (copies de gène.m ⁻³)	1,38x10 ⁶	2,42x10 ⁸	1,15x10 ⁸
Impacteur en cascade Marple (2 L.min⁻¹)			
cultivables mésophiles (UFC.m ⁻³)	3,67x10 ⁵	> 1,89x10 ⁷	9,80x10 ⁶
cultivables thermophiles (UFC.m ⁻³)	1,02x10 ⁶	> 1,82x10 ⁷	2,18x10 ⁷
ADN amplifié avec les oligos Tvu (copies de gène.m ⁻³)	5,23x10 ⁷ *	1,09x10 ⁵ *	5,19x10 ⁴ *
ADN amplifié avec les oligos Tfu (copies de gène.m ⁻³)	5,00x10 ⁵ *	9,75x10 ⁷	5,43x10 ⁷
ADN amplifié avec les oligos SM (copies de gène.m ⁻³)	4,34x10 ⁵ *	1,35x10 ⁸	4,48x10 ⁷
Coriolis (300 L.min⁻¹)			
cultivables mésophiles (UFC.m ⁻³)	> 3,00x10 ⁶	> 3,00x10 ⁶	/
cultivables thermophiles (UFC.m ⁻³)	3,00x10 ⁵	1,17x10 ⁶	/
ADN amplifié avec les oligos Tvu (copies de gène.m ⁻³)	8,56x10 ³ *	4,00x10 ⁴	/
ADN amplifié avec les oligos Tfu (copies de gène.m ⁻³)	1,94x10 ⁶	1,04x10 ⁷	/
ADN amplifié avec les oligos SM (copies de gène.m ⁻³)	3,48x10 ⁶	6,72x10 ⁶	/

* concentration en dessous de la limite de quantification (pour le Marple, cela peut concerner un, plusieurs, voire tous les étages)

Mais ces résultats révèlent également un profil de distribution des microorganismes différent d'un jour à l'autre. Pour l'illustrer, nous avons calculé le diamètre aérodynamique médian pour chaque paramètre étudié et pour chaque jour de prélèvement, de la même manière que se calcule la valeur appelée MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter). Pour le paramètre des bactéries cultivables mésophiles, cette valeur est de 10,0 µm le premier jour, de 11,0 µm le deuxième jour et de 9,0 µm le troisième. Pour les bactéries cultivables thermophiles, cette valeur est de 4,0 µm, 3,5 µm et 2,2 µm respectivement pour les premier, deuxième et troisième jours. En ce qui concerne les concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tfu, le diamètre aérodynamique médian est de 7,5 µm le premier jour, de 10,2 µm le deuxième jour et de 4,0 µm le troisième jour. Enfin, pour ce qui est du paramètre 'ADN SM', ce diamètre est de 6,3 et 6,2 µm respectivement les premier et troisième jours alors que la valeur s'élève à 12,0 µm lors du second jour de prélèvement. Toutes les concentrations en ADN amplifié avec les oligos Tvu étant des estimations (valeurs en deçà du seuil de quantification), le diamètre aérodynamique médian n'a pas été calculé sur ce paramètre là. Malgré ces différences, la concentration maximale est

généralement obtenue pour les diamètres aérodynamiques compris entre 10,0 et 20,0 μm (étages d'impaction 9,8-14,8 μm et 14,8-21,3 μm). Des exemples de distributions granulométriques obtenues sont donnés pour le jour 2 dans les Figure 77 et Figure 78.

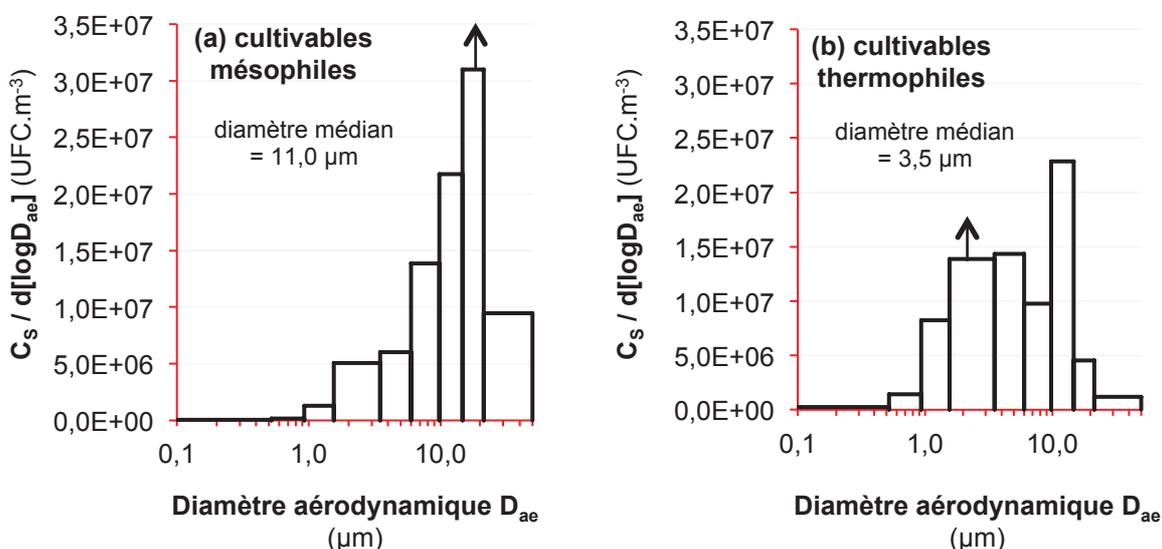


Figure 77. Distributions granulométriques d'un bioaérosol échantillonné sur la plate-forme de compostage E (prélèvement à $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ durant 5 h). Les distributions sont représentées en concentrations en bactéries cultivables mésophiles (a) ou thermophiles (b). Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec l'impacteur en cascade Marple.

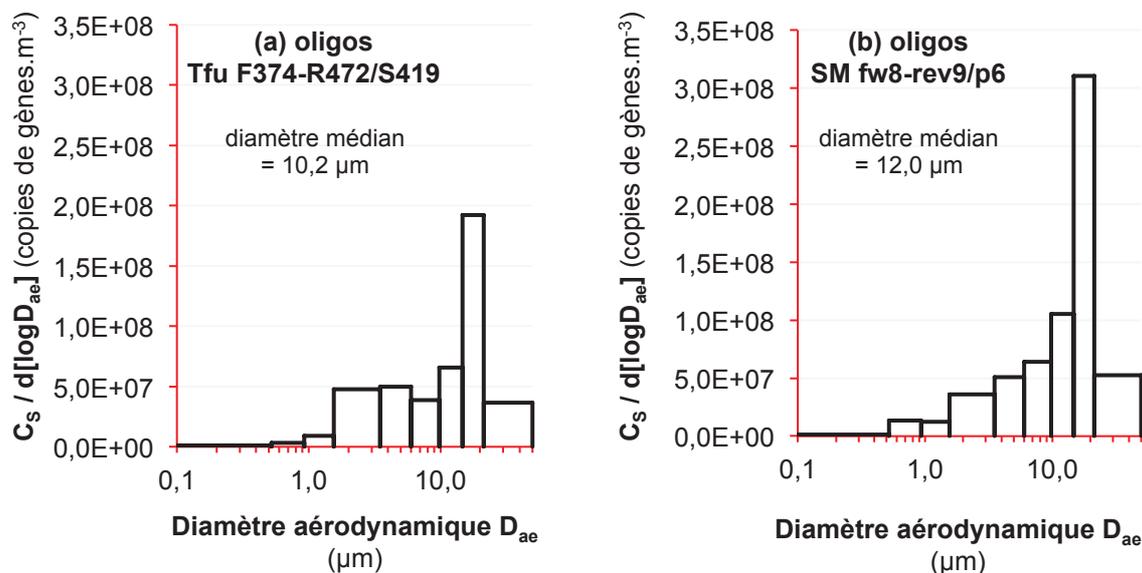


Figure 78. Distributions granulométriques d'un bioaérosol échantillonné sur la plate-forme de compostage E (prélèvement à $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ durant 5 h). Les distributions sont représentées en concentrations d'ADN amplifié avec les oligos Tfu (a) ou SM (b). Les diamètres proviennent de mesures réalisées avec l'impacteur en cascade Marple.

5.3 DISCUSSION

5.3.1 APPRÉCIATION DES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES CULTIVABLES

Notre étude a permis de mesurer les concentrations en bactéries dans l'air de cinq plates-formes de compostage en France. Les résultats révèlent que les concentrations en bactéries cultivables mesurées à proximité des activités sont toutes supérieures à celles mesurées aux points de référence. Sur les plates-formes visitées dans le cadre de notre étude, les activités de compostage sont donc génératrices d'aérosols bactériens. Les concentrations ambiantes mesurées au cours de notre étude sont comprises entre $1,7 \times 10^2$ et $2,7 \times 10^7$ UFC.m⁻³ pour les bactéries cultivables mésophiles et entre $9,4 \times 10^2$ et $3,3 \times 10^7$ UFC.m⁻³ pour les bactéries cultivables thermophiles. Les activités de compostage sont connues pour émettre des microorganismes et les composés qui leur sont associés dans l'air ambiant des plates-formes (Deacon *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Outre les bactéries cultivables, les moisissures cultivables mésophiles ou thermophiles (dont *Aspergillus fumigatus*), les endotoxines et les (1,3)-β-D-glucanes comptent parmi les microorganismes qui ont pu être mesurés dans l'air des plates-formes (Clark *et al.*, 1983; Douwes *et al.*, 2000; Duquenne *et al.*, 2012; Sykes *et al.*, 2011). De récentes études, fondées sur des méthodes de biologie moléculaire, ont apporté des informations complémentaires sur la biodiversité dans les bioaérosols issus du compostage (Bru-Adan *et al.*, 2009; Le Goff *et al.*, 2010).

Les concentrations ambiantes en bactéries cultivables, rapportées dans les travaux publiés, varient dans une gamme qui est relativement large. Pour les bactéries mésophiles, ces concentrations s'étendent de la limite inférieure de détection de la méthode à $5,5 \times 10^9$ UFC.m⁻³ (Tableau 3). Pour les bactéries thermophiles, elles varient de la limite inférieure de détection de la méthode à $2,0 \times 10^8$ UFC.m⁻³ (Tableau 3). Les concentrations que nous avons mesurées dans notre étude sont en accord avec celles rapportées dans des travaux antérieurs et qui ont été mesurées avec des méthodes similaires (Duquenne *et al.*, 2012; Lavoie *et al.*, 2006; Poirot *et al.*, 2010).

5.3.2 CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES MESURÉES PAR qPCR

Les résultats des mesures effectuées par le biais de la méthode qPCR sont particulièrement intéressants. Le Goff *et al.*, (2011) ont développé des oligonucléotides 16S ciblant le genre *Saccharopolyspora* et le groupe des *Thermoactinomycetaceae*. Les auteurs ont ainsi publié les premières données relatives aux concentrations en actinomycètes dans l'air des plates-formes de compostage. Des oligonucléotides ont été développés par d'autres équipes pour *Streptomyces sp.* (Rintala *et al.*, 2001; Rintala & Nevalainen, 2006) et pour *Saccharopolyspora rectivirgula* (Schafer *et al.*, 2011). Mais les méthodes développées n'ont pas encore été testées en conditions réelles d'exposition ou ont été utilisées dans des environnements autres que le compostage (Johansson *et al.*, 2011; Rintala *et al.*, 2004; Rintala & Nevalainen, 2006). Nos résultats constituent donc les seules mesures de concentrations disponibles à l'heure actuelle, pour les actinomycètes ciblés, dans l'air des plates-formes de compostage.

Les mesures effectuées par le biais de la méthode qPCR révèlent la présence de *Thermoactinomyces vulgaris*, de *Thermobifida sp.* et de *Streptomyces sp.* (bactéries ciblées) dans l'air des plates-formes investiguées. Ces bactéries font partie des populations microbiennes impliquées dans le compostage et ont déjà été identifiées dans le compost à différents stades du procédé (Adams & Frostick, 2009; Lacey, 1997; Steger *et al.*, 2007). Elles ont été identifiées dans les bioaérosols émis sur des plates-formes de compostage grâce à la technique de mise en culture (Lacey, 1997; Millner *et al.*,

1980) ou par le biais de méthodes de biologie moléculaire, notamment à l'occasion d'études métagénomiques (Bru-Adan *et al.*, 2009; Le Goff *et al.*, 2010). Nos résultats confirment donc leur présence dans les bioaérosols issus du compostage par le biais d'une méthode directe. Ils apportent des éléments nouveaux sur la densité et la fréquence relative de ces bactéries dans l'air des plates-formes. Les concentrations mesurées varient fortement en fonction de la plate-forme, de l'endroit où les prélèvements ont été effectués et de la période pendant lesquels ils ont été récoltés. Ceci sera d'ailleurs discuté ultérieurement dans ce chapitre. Les résultats montrent que *T. vulgaris* est présent à une fréquence et des concentrations moins élevées que celles mesurées pour les groupes *Thermobifida* sp. et *Streptomyces* sp.. Les oligonucléotides ciblant ces deux derniers groupes détectent un ensemble de microorganismes plus vaste que ceux ciblant la seule espèce *T. vulgaris*, ce qui peut expliquer les résultats. La probabilité de les échantillonner étant plus grande, les concentrations mesurées sont plus élevées, ce qui entraîne, dans le même temps, un taux de réponse plus important. Pour autant, les données suggèrent que *T. vulgaris* n'est pas systématiquement dominant sur les plates-formes et elles interrogent sur les déterminants de la présence de cet actinomycète dans les bioaérosols issus du compostage.

Les niveaux de concentrations mesurées dans notre étude par qPCR tendent à être supérieurs à ceux mesurés par culture. Les deux méthodes ne mesurent pas les mêmes grandeurs mais il est reconnu que la méthode par culture sous estime la densité des populations microbiennes de l'environnement (Amman *et al.*, 1995). En revanche, la PCR amplifie l'ADN des microorganismes quel que soit leur état physiologique et la mesure porte sur la population totale des bactéries (viables ou non, cultivables ou non). Ces résultats de PCR sont d'ailleurs d'avantage en accord avec les concentrations en bactéries totales (de 10^5 à 10^9 cellules.m⁻³) mesurées par épifluorescence dans les bioaérosols issus du compostage (Albrecht *et al.*, 2007; Duquenne *et al.*, 2012; Tolvanen *et al.*, 2005). Par ailleurs, les niveaux de concentrations mesurées dans notre étude par qPCR sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés par Le Goff *et al.* pour d'autres groupes (Le Goff *et al.*, 2011). Pour *T. vulgaris* et *Thermobifida* sp. le gène recherché est en copie unique dans les bactéries et l'on peut admettre que le nombre de copies du gène estime assez bien le nombre de cellules microbiennes. Les espèces amplifiées avec les oligos SM représentent un groupe plus diffus, largement représenté par *Streptomyces* sp., mais comprenant également des espèces d'autres genres. De plus, le gène ciblé peut être présent en copies multiples dans le génome de *Streptomyces*, ce nombre n'étant pas connu et qui plus est, fonction de l'espèce étudiée.

Notre étude montre l'utilité de la méthode qPCR développée pour la mesure des actinomycètes dans les bioaérosols issus du compostage. Bien que n'ayant pas d'équivalent direct, nos résultats corroborent les observations faites dans les études antérieures et constituent une validation indirecte de la méthode développée au laboratoire.

5.3.3 PARAMÈTRES INFLUENÇANT LES CONCENTRATIONS EN MICROORGANISMES

L'observation de nos résultats met en évidence l'influence de certains facteurs sur les concentrations ambiantes. En particulier, la plate-forme de compostage et le type de déchets traités semblent avoir un effet sur les concentrations mesurées pour l'ensemble des paramètres microbiens étudiés. L'activité à proximité du point de prélèvement et le degré de confinement en ce point auraient un effet qui ne concerne que certains microorganismes. En revanche, l'étape de compostage ne semble pas avoir d'influence sur les niveaux de concentrations mesurés dans notre étude.

Sur les plates-formes de compostage, les aérosols sont créés à partir des déchets entrants, du compost et des poussières déposées sur les installations ou sur les sols. La concentration microbienne dans les bioaérosols dépend de paramètres comme la charge microbienne initiale du compost, des déchets ou des poussières déposées, de l'intensité d'émission des aérosols et de la persistance des microorganismes dans l'air. Les facteurs influençant ces paramètres sont multiples et comprennent le type de déchets, le procédé de compostage mis en œuvre sur la plate-forme, la configuration des installations, l'intensité de l'activité (manipulation du compost, passage des engins...) et les conditions météorologiques. Le broyage des déchets, le déplacement des matières (déchets et compost) avec les chargeuses, le retournement et le criblage du compost sont décrits dans la littérature comme les principales activités émettrices de bioaérosols et de poussières (Fischer *et al.*, 2008; Pankhurst *et al.*, 2011b; Sanchez-Monedero *et al.*, 2003; Sykes *et al.*, 2011). Un effet de la saison sur les bioaérosols émis par les activités de compostage a également été mis en évidence dans certaines études (Fracchia *et al.*, 2006; Persoons *et al.*, 2010; Schlosser *et al.*, 2009). Les concentrations mesurées sont également dépendantes de la position du capteur par rapport aux activités (Persoons *et al.*, 2010). Nos résultats ne sont donc pas surprenants. Pour autant, ces derniers corroborent pour partie ceux des études antérieures dans lesquelles l'agitation des déchets (Persoons *et al.*, 2010) et la plate-forme (Fracchia *et al.*, 2006) comptaient parmi les principaux déterminants de la variabilité des concentrations en bioaérosols. Les facteurs régissant l'émission des bioaérosols génèrent une grande variabilité des concentrations mesurées en un même point et pendant des périodes différentes. Cette variabilité rend la distinction entre les groupes statistiques difficiles et explique les différences observées entre les études. De surcroît, les points de prélèvement sélectionnés dans notre étude étaient destinés à suivre une activité en particulier. Toutefois, ils étaient probablement sous l'influence des autres activités en cours sur la plate-forme au même moment. En conséquence, les bioaérosols mesurés dans notre étude sont vraisemblablement issus de plusieurs activités. Cette hypothèse est appuyée par les corrélations calculées à partir de nos données (*T. vulgaris* mis à part).

5.3.4 LES POINTS DE RÉFÉRENCE

En l'absence de Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle (VLEP) pour les bioaérosols, l'évaluation de l'aérobiocontamination à un point de référence non exposé revêt une importance particulière pour l'interprétation des données de mesure. En effet, ce sont les seuls éléments de comparaison permettant d'apprécier les niveaux de concentration mesurés à proximité des zones d'activité. Collectés en retrait des activités de la plate-forme, ces échantillons d'air ambiant devraient refléter le niveau de base de l'air environnant. Ils ont pour objectif de servir à l'interprétation des mesures effectuées aux points d'activité. Pour de tels environnements (compostage), certaines études ont essayé de proposer des VLEP. Aussi, il est courant de voir citées des concentrations limites de 10^4 UFC.m⁻³ pour les bactéries totales, 10^3 UFC.m⁻³ pour les bactéries Gram négatif ou encore $0,1$ µg.m⁻³ pour les endotoxines (Clark, 1984; Lavoie & Marchand, 1997; Malmros *et al.*, 1992; Marchand *et al.*, 1995). Néanmoins, il ne s'agit pas de données de références officielles sinon d'estimations à partir de données observées.

L'air extérieur contient naturellement des microorganismes à des concentrations variables en fonction de la zone géographique, de la présence d'une source à proximité et de la saison (Brodie *et al.*, 2007; Jones & Cookson, 1983; Kaarakainen *et al.*, 2008). Les données bibliographiques relatives aux concentrations microbiennes dans l'air extérieur de la zone géographique que nous avons étudié sont inexistantes ; nous avons extrapolé avec les résultats publiés dans d'autres zones géographiques. Ainsi, la concentration en bactéries mésophiles dans l'air en milieu urbain ou périurbain a été mesurée entre 80

et $2,8 \times 10^3$ UFC/m³ à Marseille en France (di Giorgio *et al.*, 1996), entre 88 et $6,6 \times 10^3$ UFC/m³ à proximité d'une zone résidentielle à Berlin en Allemagne (Zucker & Muller, 2004) et entre 44 et $9,3 \times 10^2$ UFC/m³ à proximité d'une zone industrielle à Terragona en Espagne (Vilavert *et al.*, 2009). Une étude menée dans un environnement mixte incluant des zones rurales, commerciales urbaines et industrielles, en périphérie de Washington aux Etats-Unis, a mis en évidence des concentrations en bactéries mésophiles comprises entre 4,2 et $1,6 \times 10^3$ UFC/m³ (Jones & Cookson, 1983). Des concentrations de l'ordre $1,0 \times 10^3$ UFC.m⁻³ ont été mesurées en zone rurale et au centre de la ville de Kuopio en Finlande (Kaarakainen *et al.*, 2008). Les données relatives aux bactéries cultivables thermophiles sont moins nombreuses. Les niveaux de base, généralement inférieurs à $1,0 \times 10^3$ UFC/m³, qui sont rapportés dans les études de dispersion des bioaérosols autour des plates-formes de compostage, suggèrent que ces bactéries sont naturellement présentes en faible concentration dans l'air (Herr *et al.*, 2003; Kämpfer *et al.*, 2002). Les niveaux de base concernant les bactéries qui ont été ciblées par qPCR dans notre étude ne sont pratiquement pas documentés dans la littérature. Dans leur étude, Kaarakainen *et al.*, ont établi un niveau de base pour *Streptomyces* sp. mesuré par qPCR inférieur à 10^2 cellules/m³ (Kaarakainen *et al.*, 2008). Pour *Thermoactinomyces vulgaris* et *Thermobifida* sp., les mesures par PCR ne sont pas disponibles mais les études publiées suggèrent que ces bactéries sont naturellement présentes en concentration faible dans l'air extérieur (Herr *et al.*, 2003; Recer *et al.*, 2001).

Les concentrations en bactéries cultivables mésophiles mesurées aux points de référence dans notre étude, généralement inférieures à 10^4 UFC.m⁻³ (hormis deux points légèrement supérieurs) sont en accord avec les niveaux de base rapportés dans la littérature sur des études menées hors plates-formes de compostage. Elles sont également cohérentes avec les observations relatées sur des travaux menés en plates-formes de compostage, sur les points considérés par les auteurs comme des points de référence (Duquenne *et al.*, 2012; Herr *et al.*, 2003; Hryhorczuk *et al.*, 2001). En revanche, pour les bactéries thermophiles, 6 des 15 concentrations mesurées (notamment pour les plates-formes C et E) sont légèrement supérieures à celles publiées sur des environnements extérieurs (hors compostage). Ceci indique que certains points de référence, particulièrement ceux de la plate-forme E, ont été sous l'influence d'une source de bioaérosols au moment du prélèvement. Les bioaérosols générés au sein des plates-formes de compostage peuvent se disperser aux alentours dans la direction des vents dominants. La distance à laquelle les bioaérosols émis peuvent être détectés varie en fonction de la taille de la plate-forme, la fréquence d'agitation des andains de compost, du taux d'humidité du compost, de la topographie locale et des conditions météorologiques (Recer *et al.*, 2001). Les concentrations mesurées diminuent à mesure que l'on s'éloigne de la plate-forme et la majorité des études menées sur ce sujet tend à montrer que le niveau naturel de concentrations de l'air est atteint à partir d'une distance de 250 m (Sanchez-Monedero *et al.*, 2003; Taha *et al.*, 2007a). Des recommandations précisent que le niveau de base doit être déterminé en amont des vents dominants et à au moins 25 m au-delà des limites du site (Gilbert *et al.*, 1999). Dans notre étude, les points de référence ont été positionnés avec une attention particulière et en conformité avec ces recommandations. L'influence mise en évidence dans nos mesures peut être due à un changement de conditions météorologiques ou à la présence d'une autre source non identifiée. Cette influence reste faible et les quelques différences observées ne remettent pas en cause nos résultats. D'autant plus que la concentration au point de référence est toujours inférieure à celle obtenue à proximité des activités dans le cas de notre étude. Nos points de références peuvent donc être considérés comme valides.

5.3.5 INFLUENCE DE LA MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT SUR LES CONCENTRATIONS MESURÉES

Les résultats mettent en évidence un effet de la méthode employée pour le prélèvement sur les concentrations mesurées. En effet, les concentrations mesurées avec la cassette ouverte (25 L.min⁻¹) s'avèrent plus élevées que celles mesurées avec la cassette fermée (2 L.min⁻¹). Les résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces deux méthodes n'échantillonnent pas la même fraction de l'aérosol. En effet, les efficacités d'échantillonnage et de collecte de la cassette en fonction de la taille des particules ont été étudiées à plusieurs reprises et pour différentes conditions opératoires (Gorner *et al.*, 2010; Kenny *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000). Lorsqu'elle est utilisée dans sa configuration « fermée » avec un débit de 2 L.min⁻¹, la cassette sélectionne une fraction proche de la fraction inhalable de l'aérosol ambiant. La fraction inhalable, définie comme étant la fraction massique des particules totales en suspension dans l'air inhalée par le nez et par la bouche, est décrite de façon conventionnelle au niveau international (AFNOR, 1993; AFNOR, 1996a). Ces performances ont été résumées dans l'annexe d'une norme entièrement dédiée au prélèvement d'aérosol à l'aide d'une cassette (AFNOR, 2008). En revanche, lorsqu'elle est utilisée dans sa configuration « ouverte » avec un débit de 25 L.min⁻¹, la cassette échantillonne une fraction dite « fraction maximale collectée » de l'aérosol ambiant. La fraction maximale collectée avait été définie par la norme NF X 43-261 (AFNOR, 1988) comme la fraction massique des particules de l'aérosol, collectée par un appareil d'échantillonnage aussi peu sélectif que possible. Elle n'est pas décrite par une convention mais elle est supposée englober des aérosols de tailles plus larges. En pratique, cette fraction est obtenue par prélèvement à poste fixe à un débit de 25 L.min⁻¹, avec un dispositif proche de celui que nous avons employé. Les études comparatives menées sur différents aérosols indiquent que la cassette ouverte permet de collecter une fraction plus importante de l'aérosol ambiant par rapport à la cassette fermée (Beaulieu *et al.*, 1980; Buchan *et al.*, 1986). Des études plus récentes supportent également ces conclusions (Clinkenbeard *et al.*, 2002; Koehler *et al.*, 2012). Il pourrait être reproché que le fait d'échantillonner la fraction totale entraîne un biais dans les mesures réalisées, du fait qu'une grande partie de cet aérosol a très peu de risques d'être inhalée et donc ne représente pas un potentiel danger pour l'Homme. Or, les microorganismes que nous ciblons (spores et mycélium d'actinomycètes) sont de l'ordre du micromètre voire quelques micromètres si des amas sont formés. Or, pour ces aérosols, la convention internationale des différentes fractions des particules en suspension dans l'air inhalé établit que même des particules comprises entre 50 et 100 µm de diamètre aérodynamique ont encore 50 % de risque d'être inhalées par l'organisme (Lauwerys *et al.*, 2007). Ce pourcentage s'élève à 80 % ou plus, pour les particules inférieures à 10 µm. Il convient d'ajouter à cela que, contrairement à la mise en culture sur milieux gélosés où cela peut entraîner des envahissements de la gélose plus importants, la méthode qPCR développée est un outil spécifique. De ce fait, échantillonner la fraction totale plutôt que la fraction inhalable n'entraîne aucun biais dans ce cas, sachant également que toutes les formes des actinomycètes sont prises en compte (spores, cellules végétatives, amas...) car potentiellement porteuses des antigènes responsables des pneumopathies d'hypersensibilité (même si les spores sont plus largement impliquées).

La comparaison des deux méthodes met également en évidence l'importance du volume d'air échantillonné pour la mesure des microorganismes par qPCR. Dans nos essais, le prélèvement à 2 L.min⁻¹ conduit systématiquement à un nombre d'échantillons exploitables pour l'analyse par PCR en temps réel (c'est-à-dire au dessus de la limite de quantification) inférieur à celui obtenu avec le prélèvement à 25 L.min⁻¹. Ceci est notamment très marqué pour *T. vulgaris*, espèce présente en concentration plus faible dans l'air des plates-formes visitées. Les quelques mesures effectuées avec le Coriolis ne semblent pas apporter d'amélioration tangible pour cette souche (échantillons non exploitables le premier jour). Les volumes d'air moyens échantillonnés avec la cassette fermée, le

Coriolis et la cassette ouverte sont respectivement de l'ordre de 0,6, 1,5 et 7,2 m³. Le prélèvement d'air effectué avec un débit élevé et une durée de quelques heures permet de collecter une quantité de biomasse microbienne d'avantage en adéquation avec les limites de la méthode d'analyse par PCR en temps réel. Cette limite de la cassette ouverte ne remet pas en question nos résultats puisque des concentrations ont pu être mesurées pour la majorité des microorganismes que nous recherchions. En revanche, elle interroge sur le déploiement de ce dispositif de prélèvement pour la mesure des bioaérosols par PCR dans des environnements peu contaminés. Dans notre étude, la cassette fermée au débit de 2 L.min⁻¹ a été choisie pour sa compatibilité avec la réalisation de prélèvements individuels, mieux adaptés à la mesure des expositions ; ceci parce qu'elle estime de façon acceptable la fraction inhalable et est pratique d'utilisation. Mais augmenter le volume d'air prélevé en cassette fermée par augmentation de la durée de prélèvement n'est pas forcément possible dans la mesure où le filtre se colmaterait relativement vite rendant ainsi le prélèvement impossible à analyser. Nos résultats indiquent que des études sont nécessaires pour définir une méthode de prélèvement des bioaérosols mieux adaptée à l'analyse par PCR en temps réel et compatible avec les mesures d'exposition aux bioaérosols.

5.3.6 DISTRIBUTION GRANULOMÉTRIQUE DES BIOAÉROSOLS ÉMIS LORS DE LA FERMENTATION

Les mesures effectuées dans notre étude sur la plate-forme E révèlent que les bioaérosols ont une distribution granulométrique variable selon les microorganismes recherchés et le jour du prélèvement. Pour les bactéries cultivables mésophiles, le diamètre médian est supérieur à 9 µm sur l'ensemble des trois jours. Sur la même période, le diamètre médian évolue entre 2,2 et 4 µm pour les bactéries cultivables thermophiles. Les diamètres médians obtenus pour *Streptomyces* sp. et pour *Thermobifida* sp. varient dans une gamme plus large. Peu de données ont été publiées concernant la répartition des bactéries dans les différentes fractions granulométriques des bioaérosols générés lors des activités de compostage. Pour les bactéries cultivables, une étude rapporte un diamètre médian proche de 2 µm (Pankhurst *et al.*, 2011a) et une autre, des concentrations égales sur une gamme allant de 1 à 6 µm (Byeon *et al.*, 2008). Les autres données disponibles concernent les moisissures ou les poussières aéroportées. Nos résultats apportent donc une contribution importante à la connaissance sur les bioaérosols dans ce secteur, notamment pour les bactéries ciblées par qPCR pour lesquelles aucune donnée n'était disponible jusqu'alors. L'absence de résultats pour *T. vulgaris* confirme l'inadéquation de la méthode qPCR développée avec les dispositifs de prélèvement à faible débit pour la mesure des microorganismes présents en faible concentration dans l'air.

Les facteurs régissant la mise en suspension des microorganismes dans l'air sont multiples ; ils incluent les conditions météorologiques, la nature de la matière sur laquelle ils se sont développés, l'intensité d'agitation de celle-ci et les propriétés intrinsèques des microorganismes. Pour Nielsen *et al.* (1997), la prépondérance des actinomycètes dans les bioaérosols issus du compostage peut s'expliquer par la présence de ces bactéries en grande quantité dans le compost et par leur propension à être mis en suspension facilement dans l'air (Nielsen *et al.*, 1997). Il est généralement admis que les bactéries aéroportées sont majoritairement attachées à des particules physiques alors que les microorganismes capables de sporuler, comme les moisissures, les actinomycètes et certains *Bacillus* sp., sont plus facilement dispersés dans l'air sous forme de spores (Cox, 1987; Griffiths & DeCosmo, 1994). Les spores des actinomycètes ont un diamètre aérodynamique estimé à moins de 2 µm (Madelin & Johnson, 1992; Reponen *et al.*, 1998). Nos résultats suggèrent que les actinomycètes générés dans l'atmosphère de la plate-forme E, au moment de la fermentation, sont portés par des particules de taille plus importante. Ces particules aéroportées sont vraisemblablement constituées d'agglomérats de spores, de

mycélium et/ou de particules non microbiologiques. Une première explication serait que les particules sont émises dans l'air en l'état à partir du compost. Une seconde hypothèse, serait que les agrégats sont formés dans l'air à partir de particules de taille moins importante. Cette dernière hypothèse est supportée par Taha *et al.* (2007) qui estiment que les activités d'agitation du compost, la température élevée de ce dernier et son pH (qui affecte la charge des particules générées) sont favorables à ce phénomène (Taha *et al.*, 2007a). Nos résultats expérimentaux sont difficilement attribuables préférentiellement à l'une ou l'autre des hypothèses. La variabilité de la distribution granulométrique d'un jour à l'autre peut s'expliquer par les différences d'activité qui ont été observées sur le site. Ces différences se reflètent dans les résultats de mesures des microorganismes et poussières aéroportées qui ont été effectuées parallèlement aux mesures avec l'impacteur Marple. Elles supposent des conditions d'agitation des matières contaminées variables d'un jour à l'autre et donc, des conditions de génération des bioaérosols différentes. L'agitation de composts d'humidités différentes peut aussi générer des aérosols aux propriétés distinctes (Plinke *et al.*, 1991).

Ces résultats soulignent que les modalités de génération des actinomycètes lors du compostage des déchets sont relativement complexes et encore non élucidées. Les déterminants de la mise en suspension de ces bactéries dans l'air sont nombreux et les résultats obtenus dans le cas particulier de la plate-forme E ne peuvent être généralisés à l'ensemble des activités de compostage. D'autre part, si nos mesures ont été effectuées à proximité de compost en fermentation, une étude antérieure menée sur le même site suggèrent que les capteurs étaient probablement sous l'influence des activités adjacentes (Duquenne *et al.*, 2012). Il apparaît donc nécessaire de répéter les mesures dans d'autres circonstances (plus grand nombre de répétitions, meilleur cloisonnement des activités...) afin de mieux appréhender la répartition des microorganismes dans les fractions granulométriques des bioaérosols générés lors du compostage.

5.3.7 LES INTERFÉRENCES

Le développement de notre méthode de mesure des actinomycètes par qPCR a été effectué dans l'optique de la robustesse suggérée par les travaux de référence existants (Bustin *et al.*, 2009; Peccia & Hernandez, 2006). Il est reconnu que la méthode d'analyse par PCR peut être sujette à des interférences (Alvarez *et al.*, 1995; Wilson, 1997). L'inhibition des réactions d'amplification par des composés interférents présents dans les échantillons collectés en conditions réelles d'exposition a été décrite pour différents bioaérosols (Keswani *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2010)). Pour autant, nous n'avons recherché les interférences éventuelles qui auraient pu se manifester lors de nos analyses. Les acides humiques présents dans le compost font partie des composés qui auraient pu interférer sur nos mesures (LaMontagne *et al.*, 2002; Matheson *et al.*, 2010; Watson & Blackwell, 2000). Toutefois, nous pensons que les composés interférents n'ont pas affecté de manière significative nos résultats. En effet, le kit d'extraction utilisé possède une étape efficace de purification. Par ailleurs, l'effet des interférents se serait manifesté pour les échantillons contenant beaucoup de matière. Or, la comparaison des résultats obtenus par les méthodes de prélèvement par filtration à 2 et 25 L/min ne supporte pas cette hypothèse. Nos résultats ne peuvent donc pas être remis en cause par l'absence de recherche des interférences dans l'analyse.

Toutefois, il apparaît nécessaire d'incorporer la recherche de phénomènes d'inhibition de la PCR par des contaminants de l'ADN dans le processus d'analyse par PCR, afin de lever toute ambiguïté sur la validité des résultats. Un travail de développement complémentaire doit donc être envisagé dans ce sens. L'une des approches pourrait être l'analyse systématique des échantillons sur plusieurs dilutions successives des extraits d'ADN (Yamamoto *et al.*, 2010). Une autre solution consisterait à intégrer un

contrôle interne d'amplification dans les puits de PCR tel que suggéré dans certains travaux (Hartman *et al.*, 2005).

5.3.8 RISQUES LIÉS AUX CONCENTRATIONS MESURÉES

Il n'existe pas de VLEP pour les actinomycètes aéroportés et pour les bioaérosols en général. Plusieurs auteurs ont pourtant proposés des valeurs guides avec par exemple, des valeurs de 10^4 UFC.m⁻³ pour les bactéries totales, 10^3 UFC.m⁻³ pour les bactéries Gram négatif ou encore 90 UE.m⁻³ pour les endotoxines (Lavoie & Marchand, 1997; Poulsen *et al.*, 1995). Néanmoins, il ne s'agit pas de données de références officielles sinon d'estimations à partir de données observées. Elles ne sont pas reconnues de façon consensuelle au niveau international et ne sont pas toutes reliées à des effets sur la santé. L'interprétation des résultats de mesures en matière de risques liés à l'exposition aux agents et aux concentrations rencontrées sur les plates-formes de compostage reste donc délicate.

L'exposition des opérateurs travaillant sur les plates-formes de compostage est rapportée dans la littérature. Les niveaux d'exposition varient dans une gamme relativement large et peuvent atteindre les $4,5 \times 10^9$ UFC.m⁻³ pour les bactéries cultivables mésophiles (Lavoie *et al.*, 2006; Schlosser *et al.*, 2009) et $5,3 \times 10^7$ UFC.m⁻³ pour les bactéries cultivables thermophiles et actinomycètes associés (Bünger *et al.*, 2007; Schlosser *et al.*, 2009). Des expositions ont également été rapportées pour les poussières inhalables (Bünger *et al.*, 2007; Douwes *et al.*, 1997; Douwes *et al.*, 2000; Poirot *et al.*, 2010; Schlosser *et al.*, 2009; Sykes *et al.*, 2011; Van Tongeren *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2006), les moisissures dont *Aspergillus fumigatus* (Bünger *et al.*, 2007; Lavoie *et al.*, 2006; Schlosser *et al.*, 2009), les (1-3)- β -D-glucanes (Douwes *et al.*, 2000; Sykes *et al.*, 2011; Wouters *et al.*, 2006) et les endotoxines (Bünger *et al.*, 2007; Douwes *et al.*, 1997; Douwes *et al.*, 2000; Schlosser *et al.*, 2009; Sykes *et al.*, 2011; Van Tongeren *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2006). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que l'exposition aux aérosols issus du compostage a des effets inflammatoires et immuno-allergiques sur la santé des travailleurs (Bünger *et al.*, 2000; Douwes *et al.*, 1997; Douwes *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011). Les symptômes concernent principalement les voies aériennes supérieures, les yeux et la peau. Les agents les plus souvent incriminés dans ces pathologies sont les endotoxines ou les (1-3)- β -D-glucanes (Douwes *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011) et les actinomycètes et moisissures thermophiles (Bünger *et al.*, 2000; Bünger *et al.*, 2007; Vincken & Roels, 1984). Les travaux de Bünger *et al.* (2004), alertent également sur les mycotoxines (Bünger *et al.*, 2004). Par ailleurs, des cas cliniques de pneumopathies hypersensibilité liés aux activités de compostage ont également été rapportés dans la littérature (Brown *et al.*, 1995; Bünger *et al.*, 2007). Les actinomycètes, particulièrement les souches thermophiles, ont été associés à des pneumopathies d'hypersensibilité et pourraient jouer un rôle important dans ces observations cliniques (Kurup, 1989). Plusieurs revues bibliographiques récentes ont fait le point des connaissances sur les risques liés à l'exposition aux bioaérosols générés par les activités de compostage (Domingo & Nadal, 2009; Porta *et al.*, 2009). Ces revues soulignent que les mécanismes impliqués dans le développement des symptômes et des maladies (agents, niveaux d'exposition) ne sont pas élucidés. Pour autant, le personnel travaillant sur les plates-formes de compostage est sujet au développement de pathologies diverses qui justifient l'attention particulière qui est donnée à cette activité (Drew *et al.*, 2009; Harrison, 2007; Jager & Eckrich, 1997; Sykes *et al.*, 2007).

Le prélèvement individuel est recommandé pour évaluer l'exposition des salariés aux polluants atmosphériques et nos résultats de mesure en ambiance ne peuvent pas être directement extrapolés à des mesures d'exposition. Cependant, certains travaux rapportent que les résultats des prélèvements individuels conduisent à des concentrations supérieures à celles obtenues par le biais des mesures en ambiance (Sykes *et al.*, 2011). Les principales activités des salariés travaillant sur les plates-formes sont

de deux types. D'une part, le nettoyage et la maintenance des installations ainsi que la manipulation du compost, activités déjà décrites comme étant source d'exposition. D'autre part, la conduite des chargeuses pour le déplacement des déchets et des andins. Pour cette activité, les travailleurs sont situés dans la cabine de l'engin et sont sensés être protégés par un système de ventilation équipant la cabine. Cependant, des expositions aux bioaérosols issus du compostage ont été décrites, à ce poste de travail, dans la littérature (Bünger *et al.*, 2007; Fracchia *et al.*, 2006; Schlosser *et al.*, 2009; Sykes *et al.*, 2011). D'ailleurs, les concentrations les plus élevées que nous ayons relevées sur la plate-forme A ont été mesurées dans la cabine de la chargeuse. Les concentrations ambiantes mesurées au cours de notre étude suggèrent que les salariés travaillant à proximité des activités de compostage peuvent être exposés à des bioaérosols en quantité importante. Ils appellent une réflexion sur les mesures de prévention existantes au sein des plates-formes correspondantes. L'approche moléculaire apporte une information plus précise sur la nature des actinobactéries susceptibles être inhalées par les travailleurs. La combinaison de la méthode développée au cours de ce travail avec les méthodes par culture et le dosage des composés microbiens (endotoxines, glucanes...) devrait apporter de meilleures connaissances sur la caractérisation de l'exposition.

5.4 CONCLUSIONS

L'étude a permis de mesurer les concentrations en *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida* sp. et *Streptomyces* sp. dans l'air de 5 plates-formes de compostage par le biais de la méthode qPCR préalablement développée au laboratoire. Elle apporte également des données relatives aux bactéries cultivables. Les résultats confirment que les activités de compostage sont génératrices de bioaérosols contenant, notamment, des actinomycètes. Ils soulignent également la complexité des modalités de génération de ces bactéries dans l'air des plates-formes. Par ailleurs, contrairement à la technique de culture qui, en plus de sous-estimer largement les microorganismes, n'est pas spécifique, l'approche PCR apporte des informations plus précises sur les bactéries présentes qui seront utiles pour une meilleure évaluation des risques. L'étude est particulièrement novatrice car elle a livré les seules mesures de concentrations disponibles à l'heure actuelle, pour *T. vulgaris*, *Thermobifida* sp., et *Streptomyces* sp., dans l'air des plates-formes de compostage. De même, elle apporte les seules données sur la répartition de ces bactéries dans les différentes fractions granulométriques des bioaérosols générés sur les plates-formes de compostage.

La méthode développée pourra être adaptée pour la mesure des expositions à ces bactéries dans d'autres secteurs ou d'autres situations professionnelles pour lesquels la présence d'actinomycètes est avérée ou suspectée. L'épandage du compost, les habitations (Johansson *et al.*, 2011; Rintala *et al.*, 2004), l'agriculture et l'élevage (Lee *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2010; Roussel *et al.*, 2011) ou encore les minoteries (Awad, 2007) sont quelques exemples. Les plates-formes sélectionnées pour notre étude sont assez bien représentatives des situations qui peuvent être rencontrées dans le compostage. Pour autant, les résultats obtenus ne peuvent être généralisés à l'ensemble des activités de compostage et des mesures à plus grande échelle sont nécessaires afin de mieux appréhender la présence de ces microorganismes dans les bioaérosols. Nos travaux suggèrent également une réflexion concernant l'adéquation entre les méthodes traditionnellement utilisées pour le prélèvement des bioaérosols et les limites de détection de la qPCR d'une part et soulignent la nécessité de prendre en compte les interférences potentielles dans le processus analytique d'autre part.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'aérosolisation des agents microbiens et des composés qui leur sont associés dans l'air des environnements de travail est un réel problème en santé au travail qui suscite de plus en plus d'intérêt. Le cas concret et spécifique du groupe bactérien des actinomycètes, présents dans les bioaérosols émis durant les activités de compostage en est l'une des nombreuses illustrations. Pour autant, les connaissances relatives à l'exposition des salariés aux actinomycètes aéroportés restent incomplètes et apporter des données sur ce sujet représente un réel besoin au regard de ce qui a été publié dans la littérature.

Les travaux menés durant la thèse ont porté sur le développement et l'évaluation d'une méthode de mesure, fondée sur la qPCR, pour la recherche et la quantification dans l'air d'actinomycètes ayant un intérêt en hygiène du travail. Les actinomycètes cibles choisis ont été d'une part, l'espèce thermophile *Thermoactinomyces vulgaris* et, d'autre part, les espèces thermophiles appartenant au groupe des *Thermobifida* sp. (*T. fusca* et *T. alba* notamment). Les travaux ont également intégré une méthode déjà publiée pour la recherche par qPCR des bactéries appartenant au groupe des *Streptomyces* sp. mésophiles, impliquées également dans les pathologies respiratoires. Le travail a débuté par le développement et l'optimisation de la méthode d'analyse (extraction d'ADN et PCR temps réel). Cette étape a intégré le design des oligonucléotides, la conception d'une gamme étalon d'ADN pour la quantification absolue de chaque microorganisme ciblé, l'optimisation des conditions de PCR et le choix d'une méthode d'extraction de l'ADN appropriée au type d'échantillons sur lequel porte l'analyse. Ensuite, les caractéristiques de la méthode développée ont été étudiées au laboratoire, sur des cultures pures et des bioaérosols expérimentaux. Enfin, la méthode a été utilisée pour étudier les bioaérosols émis en conditions réelles d'exposition sur des plates-formes de compostage.

Les résultats obtenus pendant la thèse ont abouti au développement d'une méthode d'analyse par qPCR fondée sur l'amplication de l'ADN par le biais de sondes d'hybridation (TaqMan). Les oligonucléotides spécifiques ciblant le gène *gyrB* pour *T. vulgaris* et le gène *ecf* pour *Thermobifida fusca* et *Thermobifida alba* (les deux espèces étant phylogénétiquement trop proches pour pouvoir les différencier) ont ainsi été développés. Nos essais montrent également que les oligonucléotides publiés pour *Streptomyces* sp. avaient une spécificité moins stricte que celle annoncée initialement par les auteurs. Un travail de clonage moléculaire a permis d'établir une gamme étalon d'ADN nécessaire à la quantification absolue des bactéries et ce, pour chacun des 3 types d'actinomycètes ciblés. Les résultats de comparaison de 4 kits commerciaux d'extraction de l'ADN nous ont permis de choisir le kit FastDNA® SPIN kit for soil (MPBiomedicals), vis-à-vis de son efficacité d'extraction et de la répétabilité des résultats. Les études menées au laboratoire sur des cultures pures et des bioaérosols expérimentaux ont montré une corrélation forte entre les concentrations microbiennes mesurées par le biais de l'analyse par qPCR et celles obtenues après mise en culture. Les résultats d'analyse par qPCR sont également corrélés aux mesures des spores totales par microscopie à épifluorescence, mais ces corrélations sont moins fortes. Les études menées au laboratoire ont nécessité un important travail préalable, couronné par le développement et la maîtrise de la production de bioaérosols expérimentaux à partir des bactéries modèles sélectionnées pour la thèse. Au final, les travaux menés dans cette partie de la thèse ont abouti à une méthode permettant de quantifier de manière répétable et spécifique les bactéries appartenant à l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris* et au groupe des *Thermobifida* sp. La méthode est moins

spécifique pour les bactéries appartenant au groupe des streptomycètes mésophiles. Les campagnes de prélèvements effectués sur 5 plates-formes de compostage en France ont permis de mesurer les concentrations en bactéries mésophiles et thermophiles par culture et de confirmer que les activités de compostage étaient génératrices de bioaérosols. Les mesures effectuées par le biais de la méthode qPCR préalablement développée au laboratoire ont également permis d'établir les concentrations en *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermobifida sp.* et *Streptomyces sp.* dans l'air des plates-formes investiguées. Les concentrations peuvent d'ailleurs atteindre des valeurs relativement élevées selon les points échantillonnés, notamment si le prélèvement est à proximité directe d'une activité impliquant le brassage du compost. Les mesures effectuées révèlent aussi que les bioaérosols ont une distribution granulométrique variable selon les microorganismes recherchés et le jour du prélèvement. Par ailleurs, des essais ont été menés en vue de comparer deux méthodes de prélèvement de bioaérosols (cassette fermée 2 L/min et cassette ouverte 25 L/min). Les résultats ont montré que le prélèvement d'un volume d'air important était d'avantage compatible avec les limites de détection de l'analyse par qPCR, notamment pour les microorganismes présents en faible quantité dans l'air.

Du développement de la méthode qPCR pour la quantification des actinomycètes aéroportés à son application sur des échantillons environnementaux, les travaux ont apporté de nombreuses données et permis d'acquérir des éléments de validation concernant la méthode mise en place. Ils ont livré les seules mesures de concentrations disponibles à l'heure actuelle, pour *T. vulgaris*, *Thermobifida sp.*, et *Streptomyces sp.*, dans l'air des plates-formes de compostage. De même, l'étude a apporté les seules données sur la répartition de ces bactéries dans les différentes fractions granulométriques des bioaérosols générés sur les plates-formes de compostage. Les résultats soulignent la complexité des modalités de génération de ces bactéries. La méthode qPCR présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la technique est quantitative et elle s'avère beaucoup plus rapide ou plus facile à mettre en place que certaines méthodes plus traditionnelles ; elle est aussi répétable et reproductible. Par ailleurs, l'approche par qPCR apporte des informations plus précises sur les bactéries présentes qui seront utiles pour une meilleure évaluation des risques. La méthode est spécifique d'une espèce, d'un genre ou même d'une famille de microorganismes (dans la mesure où les oligonucléotides ont été correctement choisis et/ou dessinés). Ceci permet de cibler directement un ou plusieurs germes reconnus comme pathogènes et désignés comme indicateurs de contamination. Ce qui est aussi un réel avantage de la méthode est le fait de pouvoir directement relier le résultat obtenu grâce à la PCR à un nombre de microorganismes ; lorsque le gène ciblé est en copie unique dans le génome bactérien recherché, une copie détectée équivaut à une bactérie. La méthode développée pourra être adaptée pour la mesure des expositions à ces bactéries dans d'autres secteurs ou d'autres situations professionnelles pour lesquels la présence d'actinomycètes est avérée ou suspectée.

Mais ces résultats suscitent aussi plusieurs interrogations qui ouvrent des perspectives de travaux de recherche dans l'avenir. En premier lieu, la nécessité de prendre en compte les interférences potentielles dans le processus analytique impose des recherches complémentaires. Nos travaux suggèrent également une réflexion concernant l'adéquation entre les méthodes traditionnellement utilisées pour la mesure de l'exposition aux bioaérosols et les limites de détection de la qPCR. Des études pourraient ainsi être menées dans le but d'améliorer les méthodes et stratégies de prélèvement d'échantillons destinées à l'analyse par qPCR. Ces études devront inclure les performances des appareils de prélèvement, leur positionnement lors de l'échantillonnage, le support de collecte, la durée de prélèvement et le volume d'air prélevé. Des essais préalables en conditions dites de laboratoire seront nécessaires avant de passer en conditions réelles d'exposition. Par ailleurs, les plates-formes sélectionnées pour notre étude offrent une bonne représentation des situations qui peuvent être rencontrées dans le compostage. Pour autant, les résultats obtenus ne peuvent être généralisés à l'ensemble des activités de compostage et des mesures à plus grande échelle sont nécessaires afin de

mieux appréhender la présence de ces microorganismes dans les bioaérosols. Enfin, plusieurs actinomycètes sont impliqués dans les pathologies professionnelles et sont présents dans l'air des lieux de travail. La mesure des expositions à ces bactéries imposent de définir les microorganismes cibles pertinents pour une meilleure évaluation des risques. Ceci passe par la définition de microorganismes indicateurs ou par le développement de méthodes, de type qPCR multiplexes, permettant de quantifier plusieurs de ces actinomycètes en même temps. À plus long terme, les mesures des bioaérosols par qPCR pourront être utilisées dans le cadre d'études épidémiologiques, de manière à fournir des éléments sur les effets dose-réponse. Ceci devrait contribuer au développement de moyens de préventions adéquates pour les salariés exposés à des agents microbiologiques dans leur travail.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adams, J. D. & Frostick, L. E. (2009).** Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. *Waste Management* **29**, 598-605.
- AFNOR (1988).** NF X 43-261 - Air des lieux de travail : prélèvement à poste fixe et mesurage de la pollution particulaire totale. *Association française de normalisation*, 1-9.
- AFNOR (1993).** NF X 43-276 (EN 481) - Atmosphères des lieux de travail : définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. *Association française de normalisation*, 1-13.
- AFNOR (1996a).** NF X 43-100 (ISO 7708) - Qualité de l'air : définition des fractions de taille des particules pour l'échantillonnage lié aux problèmes de santé. *Association française de normalisation*, 1-16.
- AFNOR (1996b).** NF V 08-002 (EN ISO 7218) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations. *Association française de normalisation*, 1-56.
- AFNOR (1998).** XP X 43-244 - Air des lieux de travail : éléments de terminologie en hygiène du travail (l'exposition, son évaluation, les valeurs limites). *Association française de normalisation*, 1-16.
- AFNOR (2000).** NF X 43-247 (EN 13098) - Atmosphères des lieux de travail : règles pour le mesurage de micro-organismes et d'endotoxine en suspension dans l'air. *Association française de normalisation*, 1-30.
- AFNOR (2006).** NF T 72-145 (EN 12353) - Antiseptiques et désinfectants chimiques : conservation des organismes test utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide. *Association française de normalisation*, 1-23.
- AFNOR (2008).** NF X 43-257 - Qualité de l'air - Air des lieux de travail - Prélèvement d'aérosol à l'aide d'une cassette (orifice 4 mm). *Association française de normalisation*, 1-12.
- Al-Soud, W. A., Jonsson, L. J. & Radstrom, P. (2000).** Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *Journal of clinical microbiology* **38**, 345-350.
- Albrecht, A., Witzemberger, R., Bernzen, U. & Jackel, U. (2007).** Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods. *Annals of agricultural and environmental medicine* **14**, 81-85.
- Alvarez, A. J., Buttner, M. P. & Stetzenbach, L. D. (1995).** PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Applied and environmental microbiology* **61**, 3639-3644.
- Amman, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**, 143-169.
- Amner, W., Edwards, C. & McCarthy, A. J. (1989).** Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *Applied and environmental microbiology* **55**, 2669-2674.
- An, H. R., Mainelis, G. & White, L. (2006).** Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. *Atmospheric environment* **40**, 7924-7939.
- Athalye, M., Lacey, J. & Goodfellow, M. (1981).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Journal of applied bacteriology* **51**, 289-297.
- Attwell, R. W. & Colwell, R. R. (1982).** Use of epifluorescence microscopy in studies of the germination and recovery of thermoactinomycetes. *Applied and environmental microbiology* **43**, 478-482.
- Avram, A. (1970).** [*Streptomyces albus*, the causative agent of black-grain mycetoma]. *Sabouraudia* **7**, 241-246.
- Awad, A. H. A. (2007).** Airborne dust, bacteria, actinomycetes and fungi at a flourmill. *Aerobiologia* **23**, 59-69.
- Balty, I., Bayeux-Dunglas, M.-C., Caron, V., David, C., Delépine, A., Duquenne, P. & Le Bacle, C. (2008).** Les risques biologiques en milieu professionnel, pp. 1-52.
- Bayard, R. & Gourdon, R. (2010).** Traitement biologique des déchets. *Techniques de l'Ingénieur Référence G2060, version 2*, 1-24.
- Beaulieu, H. J., Fidino, A. V., Arlington, K. L. & Buchan, R. M. (1980).** A comparison of aerosol sampling techniques: "open" versus "closed-face" filter cassettes. *American industrial hygiene association journal* **41**, 758-765.
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Dicesare, J. L. & Atlas, R. M. (1991).** Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and environmental microbiology* **57**, 3529-3534.
- Bergey, D. H. (1989).** *Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 4 : Actinomycetes)*, 1st edition edn. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins.
- Bergey, D. H. (2009).** *Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 3 : The Firmicutes)*, 2nd edition edn: Williams & Wilkins.
- Bergey, D. H. (2011).** *Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 5 : The Actinobacteria)*, 2nd edition edn: Williams & Wilkins.

References bibliographiques

- Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Parker, J. P., Zubieta, I. X., Piceno, Y. M. & Andersen, G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 299-304.
- Brown, J. E., Masood, D., Couser, J. I. & Patterson, R. (1995). Hypersensitivity pneumonitis from residential composting: residential composter's lung. *Annals of allergy, asthma & immunology* **74**, 45-47.
- Bru-Adan, V., Wery, N., Moletta-Denat, M., Boiron, P., Delgenes, J. P. & Godon, J. J. (2009). Diversity of bacteria and fungi in aerosols during screening in a green waste composting plant. *Current microbiology* **59**, 326-335.
- Buchan, R. M., Soderholm, S. C. & Tillery, M. I. (1986). Aerosol sampling efficiency of 37 mm filter cassettes. *American industrial hygiene association journal* **47**, 825-831.
- Bünger, J., Antlauf-Lammers, M., Schulz, T. G., Westphal, G. A., Müller, M. M., Ruhnu, P. & Hallier, E. (2000). Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occupational and environmental medicine* **57**, 458-464.
- Bünger, J., Westphal, G., Mönnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E. & Müller, M. (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* **202**, 199-211.
- Bünger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R. & Hallier, E. (2007). A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *International archives of occupational and environmental health* **80**, 306-312.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. & other authors (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611-622.
- Buttner, M. P., Cruz-Perez, P. & Stetzenbach, L. D. (2001). Enhanced detection of surface-associated bacteria in indoor environments by quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2564-2570.
- Byeon, J. H., Park, C. W., Yoon, K. Y., Park, J. H. & Hwang, J. (2008). Size distributions of total airborne particles and bioaerosols in a municipal composting facility. *Bioresource technology* **99**, 5150-5154.
- Cartwright, C., Horrocks, S., Kirton, J. & Crook, B. (2009). Review of methods to measure bioaerosols from composting sites, pp. 1-69: Environment Agency.
- Carvalho, E., Sindt, C., Verdier, A., Galan, C., O'Donoghue, L., Parks, S. & Thibaudon, M. (2008). Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains. *Aerobiologia* **24**, 191-201.
- Chang, C. W., Hwang, Y. H., Grinshpun, S. A., Macher, J. M. & Willeke, K. (1994). Evaluation of counting error due to colony masking in bioaerosol sampling. *Applied and environmental microbiology* **60**, 3732-3738.
- Chen, C.-C., Yu, T.-S., Chang, J.-Y., Chang, C.-W., Shih, T.-S. & Hwang, J.-S. (1998). A computer simulation study on bioaerosol colony counting error due to masking effect. *Annals of occupational hygiene* **42**, 501-510.
- Chen, P. S. & Li, C. S. (2005a). Quantification of airborne *Mycobacterium tuberculosis* in health care setting using real-time qPCR coupled to an air-sampling filter method. *Aerosol science and technology* **39**, 371-376.
- Chen, P. S. & Li, C. S. (2005b). Sampling performance for bioaerosols by flow cytometry with fluorochrome. *Aerosol science and technology* **39**, 231-237.
- Chen, P. S. & Li, C. S. (2005c). Real-time quantitative PCR with gene probe, fluorochrome and flow cytometry for microorganism analysis. *Journal of environmental monitoring* **7**, 257-262.
- Chiang, C.-F., Yang, H.-H. & Chi, T.-W. (2003). Monitoring of bioaerosol emission from a sludge composting facility. *International journal of applied science and engineering* **1**, 148-159.
- Chun, J. & Goodfellow, M. (1995). A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **45**, 240-245.
- Clark, C. S., Rylander, R. & Larsson, L. (1983). Levels of gram-negative bacteria, *Aspergillus fumigatus*, dust, and endotoxin at compost plants. *Applied and environmental microbiology* **45**, 1501-1505.
- Clark, C. S. (1984). Health effects associated with waste water treatment and disposal. *Water pollution control federation journal* **56**, 625-627.
- Clinkenbeard, R. E., England, E. C., Johnson, D. L., Esmen, N. A. & Hall, T. A. (2002). A field comparison of the IOM inhalable aerosol sampler and a modified 37-mm cassette. *Applied occupational and environmental hygiene* **17**, 622-627.
- Cooper, J. N., Anderson, J. G. & Campbell, C. D. (2002). How resilient are microbial communities to temperature changes during composting? In *Microbiology of composting*, pp. 3-16. Edited by H. Insam, N. Riddech & S. Klammer: Springer.
- Corbaz, R., Gregory, P. H. & Lacey, M. E. (1963). Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *Journal of general microbiology* **32**, 449-454.

Références bibliographiques

- Cox, C. S. (1987). *The aerobiological pathway of microorganisms*. Chichester, New-York: John Wiley & Sons.
- Crawford, D. L. & Gonda, M. A. (1977). The sporulation process in *Thermomonospora fusca* as revealed by scanning and transmission electron microscopy. *Canadian journal of microbiology* **23**, 1088-1095.
- Cross, T. (1970). The diversity of bacterial spores. *Journal of applied bacteriology* **33**, 95-102.
- Dalphin, J. C. & Caillaud, D. (1999). Etiologies of extrinsic allergic alveolitis, pp. 1-9. Hôpital Louis Pradel, Lyon, France: Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies Orphelines Pulmonaires (GERMOP).
- Dalwai, F., Spratt, D. A. & Pratten, J. (2007). Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology* **45**, 3072-3076.
- Danneberg, G., Grünekle, E., Seitz, M., Hartung, J. & Driesel, A. J. (1997). Microbial and endotoxin immissions in the neighborhood of a composting plant. *Annals of agricultural and environmental medicine* **4**, 169-173.
- Darragh, A. H., Buchan, R. M., Sandfort, D. R. & Coleman, R. O. (1997). Quantification of air contaminants at a municipal sewage sludge composting facility. *Applied occupational and environmental hygiene* **12**, 190 - 194.
- de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C. & de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in microbiology* **143**, 785-790.
- Deacon, L., Pankhurst, L., Liu, J. & other authors (2009). Endotoxin emissions from commercial composting activities. *Environnemental health* **8 Suppl 1**, S9.
- Deloraine, A., Hedreville, L. & Arthus, C. (2002). Etude bibliographique sur l'évaluation des risques liés aux bioaérosols générés par le compostage des déchets. *Contrat ADEME/CAREPS Rapport* **317**.
- di Giorgio, C., Krempff, A., Guiraud, H., Binder, P., Tiret, C. & Dumenil, G. (1996). Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. *Atmospheric environment* **30**, 155-160.
- Domingo, J. L. & Nadal, M. (2009). Domestic waste composting facilities: a review of human health risks. *Environment International* **35**, 382-389.
- Douwes, J., Dubbeld, H., van Zwieten, L., Wouters, I., Doekes, G., Heederik, D. & Steerenberg, P. (1997). Work related acute and (sub-)chronic airways inflammation assessed by nasal lavage in compost workers *Annals of agricultural and environmental medicine* **4**, 149-151.
- Douwes, J., Wouters, I., Dubbeld, H., van Zwieten, L., Steerenberg, P., Doekes, G. & Heederik, D. (2000). Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation with bio-aerosol exposure. *American journal of industrial medicine* **37**, 459-468.
- Drew, G. H., Jordinson, G. M., Smith, M. A. & Pollard, S. J. T. (2009). Evaluating the quality of bioaerosol risk assessments for composting facilities in England and Wales. *Resources, conservation and recycling* **53**, 507-512.
- Duquenne, P. & Greff-Mirguet, G. (2005). Sampling and analysis of microbial aerosols. *Hygiène et sécurité du travail - Cahiers de notes documentaires* **198**, 23-28.
- Duquenne, P., Simon, X., Koehler, V., Goncalves-Machado, S., Greff, G., Nicot, T. & Poirot, P. (2012). Documentation of bioaerosol concentrations in an indoor composting facility in France. *Journal of Environmental Monitoring*.
- Eduard, W., Blomquist, G., Herbert Nielsen, B. & Kulvik Heldal, K. (2001). Recognition errors in the quantification of microorganisms by fluorescence microscopy. *The annals of occupational hygiene* **45**, 493-498.
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual review of microbiology* **32**, 185-219.
- Epstein, E., Wu, N., Youngberg, C. & Croteau, G. (2001). Dust and bioaerosols at a biosolids composting facility. *Compost science & utilization* **9**, 250-255.
- Erikson, D. (1947). Differentiation of the vegetative and sporogenous phases of the actinomycetes; the lipid nature of the outer wall of the aerial mycelium. *Journal of general microbiology* **1**, 39-44.
- Filion, G. (2008). Détection rapide de spores de *Bacillus* par hybridation in situ en fluorescence, pp. 106. Québec Département de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval.
- Fischer, G., Albrecht, A., Jäckel, U. & Kämpfer, P. (2008). Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations. *International journal of hygiene and environmental health* **211**, 132-142.
- Fittipaldi, M., Codony, F. & Morato, J. (2010). Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *Water SA* **36**, 417-424.
- Flärdh, K., Findlay, K. C. & Chater, K. F. (1999). Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145**, 2229-2243.

Références bibliographiques

- Flårdh, K. & Buttner, M. J. (2009). Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 36-49.
- Folmsbee, M. & Strevett, K. A. (1999). Bioaerosol concentration at an outdoor composting center. *Journal of the air & waste management association* **49**, 554-561.
- Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M. & Martinotti, M. G. (2006). The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 973-984.
- Fykse, E. M., Langseth, B., Olsen, J. S., Skogan, G. & Blatny, J. M. (2008). Detection of bioterror agents in air samples using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 351-258.
- Gazenko, S. V., Reponen, T. A., Grinshpun, S. A. & Willeke, K. (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Applied and environmental microbiology* **64**, 4410-4415.
- Géhin, D. & Le Bacle, C. (2011). Endotoxines en milieu de travail - 1. Origine et propriétés toxiques des endotoxines. *Métrieologie. Documents pour le médecin du travail* **126**, 225-240.
- Gilbert, E. J., Ward, C. W., Crook, B., Frederickson, J., Garrett, A. J. & Gladding, T. (1999). *Standardised protocol for the sampling and enumeration of airborne micro-organisms at composting facilities*. Wellingborough/GB: The Composting Association.
- Goodfellow, M. & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology* **37**, 189-216.
- Gorner, P., Simon, X., Wrobel, R., Kauffer, E. & Witschger, O. (2010). Laboratory study of selected personal inhalable aerosol samplers. *Annals of occupational hygiene* **54**, 165-187.
- Greff-Mirguet, G. (2002). Sampling and analysis of airborne endotoxins. *Hygiène et sécurité du travail - Cahiers de notes documentaires* **187**, 73-87.
- Gregory, P. H. & Lacey, M. E. (1963). Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *Journal of general microbiology* **30**, 75-88.
- Griffiths, W. D. & DeCosemo, G. A. L. (1994). The assessment of bioaerosols: a critical review. *Journal of aerosol science* **25**, 1425-1458.
- Grinshpun, S. A., Reponen, T. & Willeke, K. (1997). Aerosol characteristics of airborne actinomycetes and fungi. *Journal of aerosol science* **28**, 667-668.
- Ha, T. L. (2006). Synthèse bibliographique sur les méthodes de mesure des aérosols de Légionelles - Rapport n° DDD/SB-2006-011, pp. 1-40: CSTB, France.
- Hagerdal, B. G., Ferchak, J. D. & Pye, E. K. (1978). Cellulolytic Enzyme System of Thermoactinomyces sp. Grown on Microcrystalline Cellulose. *Applied and environmental microbiology* **36**, 606-612.
- Harrison, E. Z. (2007). Health impacts of composting air emissions. *Biocycle* **November**, 45-50.
- Hartman, L. J., Coyne, S. R. & Norwood, D. A. (2005). Development of a novel internal positive control for Taqman based assays. *Molecular and cellular probes* **19**, 51-59.
- Haugland, R. A., Brinkman, N. & Vesper, S. J. (2002). Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of microbiological methods* **50**, 319-323.
- Heida, H., Bartman, F. & van der Zee, S. C. (1995). Occupational exposure and indoor air quality monitoring in a composting facility. *American Industrial Hygiene Association Journal* **56**, 39-43.
- Heidelberg, J. F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C. & Colwell, R. R. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3585-3588.
- Henningson, E. W. & Ahlberg, M. S. (1994). Evaluation of microbiological aerosol samplers : a review. *Journal of aerosol science* **25**, 1459-1492.
- Henssen, A. (1957). Contributions to the morphology and systematics of the thermophilic actinomycetes. *Archives of microbiology* **26**, 373-414.
- Herr, C. E., Zur Nieden, A., Jankofsky, M., Stilianakis, N. I., Boedeker, R. H. & Eikmann, T. F. (2003). Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: a cross sectional study. *Occupational and environmental medicine* **60**, 336-342.
- Hoskisson, P. A., Hobbs, G. & Sharples, G. P. (2000). Response of *Micromonospora echinospora* (NCIMB 12744) spores to heat treatment with evidence of a heat activation phenomenon. *Letters in applied microbiology* **30**, 114-117.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N. & Moomey, M. (2001). Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. *Annals of agricultural and environmental medicine* **8**, 177-185.

Références bibliographiques

- Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M. & Kawai, F. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Applied microbiology and biotechnology* **87**, 771-779.
- Jager, E. & Eckrich, C. (1997). Hygienic aspects of biowaste composting. *Annals of agricultural and environmental medicine* **4**, 99-105.
- Jamey, C. (2008). Actinomycetes and farmer's lung disease : microbiological and serological reevaluation (thesis n°25-08-10). In *Besançon*, pp. 125. Besançon: Franche-Comté University (Medecine and Pharmacy department).
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory : pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology* **45**, 2761-2764.
- Jensen, P. A., Todd, W. F., Davis, G. N. & Scarpino, P. V. (1992). Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria. *American industrial hygiene association journal* **53**, 660-667.
- Johansson, E., Vesper, S., Levin, L., LeMasters, G., Grinshpun, S. & Reponen, T. (2011). Streptomyces in house dust: associations with housing characteristics and endotoxin. *Indoor air* **21**, 300-310.
- Jones, B. L. & Cookson, J. T. (1983). Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and environmental microbiology* **45**, 919-934.
- Kaarakainen, P., Meklin, T., Rintala, H., Hyvärinen, A., Kärkkäinen, P., Vepsäläinen, A., Hirvonen, M.-R. & Nevalainen, A. (2008). Seasonal variation in airborne microbial concentrations and diversity at landfill, urban and rural sites. *CLEAN - Soil, air, water* **36**, 556-563.
- Kagen, S. L., Fink, J. N., Schlueter, D. P., Kurup, V. P. & Fruchtman, R. B. (1981). *Streptomyces albus*: a new cause of hypersensitivity pneumonitis. *Journal of allergy and clinical immunology* **68**, 295-299.
- Kalakoutskii, L. V. & Agre, N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological reviews* **40**, 469-524.
- Kämpfer, P., Jureit, C., Albrecht, A. & Neef, A. (2002). Imission of microorganisms from composting facilities. In *Microbiology of composting*. Edited by H. Insam, N. Riddech & S. Klammer: Springer.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry* **70**, 220-233.
- Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50**, 127-134.
- Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1982). Spore Resistance of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis* and related organisms. *Agricultural and biological chemistry* **46**, 221-231.
- Kenny, L. C., Aitken, R., Chalmers, C. & other authors (1997). A collaborative European study of personal inhalable aerosol sampler performance. *Annals of occupational hygiene* **41**, 135-153.
- Keswani, J., Kashon, M. L. & Chen, B. T. (2005). Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust. *Journal of environmental monitoring* **7**, 311-318.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research* **35**, W43-46.
- Kleyn, J. G., Johnson, W. M. & Wetzler, T. F. (1981). Microbial aerosols and actinomycetes in etiological considerations of mushroom workers' lungs. *Applied and environmental microbiology* **41**, 1454-1460.
- Kleyn, J. G. & Wetzler, T. F. (1981). The microbiology of spent mushroom compost and its dust. *Canadian journal of microbiology* **27**, 748-753.
- Koehler, K. A., Anthony, T. R., Van Dyke, M. & Volckens, J. (2012). Solid versus liquid particle sampling efficiency of three personal aerosol samplers when facing the wind. *Annals of occupational hygiene* **56**, 194-206.
- Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., van Haeringen, W. A., Lam, T. J. & Pyorala, S. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of dairy science* **93**, 5707-5715.
- Kroppenstedt, R. M. & Evtushenko, L. I. (2006). The family Nocardioptera. In *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria*, pp. 754-795: Springer.
- Kurup, V. P. (1979). Characterization of some members of the genus *Thermomonospora*. *Current Microbiology* **2**, 267-272.
- Kurup, V. P. (1989). Hypersensitivity pneumonitis due to sensitization with thermophilic actinomycetes. *Immunology and allergy clinics of North America* **9**, 285-306.
- Kurup, V. P., Zacharisen, M. C. & Fink, J. N. (2006). Hypersensitivity pneumonitis. *The indian journal of chest diseases & allied sciences* **48**, 115-128.
- Lacey, J. & Dutkiewicz, J. (1976). Methods for examining the microflora of mouldy hay. *Journal of applied bacteriology* **41**.

Références bibliographiques

- Lacey, J. & Dutkiewicz, J. (1994). Bioaerosols and occupational lung disease. *Journal of aerosol science* **25**, 1371-1404.
- Lacey, J. (1997). Actinomycetes in composts. *Annals of agricultural and environmental medicine* **4**, 113-121.
- LaMontagne, M. G., Michel, F. C., Jr., Holden, P. A. & Reddy, C. A. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of microbiological methods* **49**, 255-264.
- Lantz, P. G., Matsson, M., Wadström, T. & Radström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of microbiological methods* **28**, 159-167.
- Lauwerys, R., Haufroid, V., Hoet, P. & Lison, D. (2007). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*, 5ème édition edn: Masson.
- Lavoie, J. & Marchand, G. (1997). Détermination des caractéristiques à considérer d'un point de vue de santé et sécurité des travailleurs dans les centres de compostage des déchets domestiques - Rapport R-159, IRSST, Montréal, Canada, pp. 37 pages.
- Lavoie, J., Dunkerley, C. J., Kosatsky, T. & Dufresne, A. (2006). Exposure to aerosolized bacteria and fungi among collectors of commercial, mixed residential, recyclable and compostable waste. *Science of the total environment* **370**, 23-28.
- Le Goff, O., Bru-Adan, V., Bacheley, H., Godon, J. J. & Wery, N. (2010). The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 325-340.
- Le Goff, O., Godon, J. J., Steyer, J.-P. & Wery, N. (2011). New specific indicators for qPCR monitoring of airborne microorganisms emitted by composting plants. *Atmospheric environment* **45**, 5342-5350.
- Lee, S. A., Adhikari, A., Grinshpun, S. A., McKay, R., Shukla, R. & Reponen, T. (2006). Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *Journal of occupational and environmental hygiene* **3**, 118-130.
- Li, S. N., Lundgren, D. A. & Rovell-Rixx, D. (2000). Evaluation of six inhalable aerosol samplers. *American industrial hygiene association journal* **61**, 506-516.
- Lignell, U., Meklin, T., Rintala, H., Hyvarinen, A., Vepsäläinen, A., Pekkanen, J. & Nevalainen, A. (2008). Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Letters in applied microbiology* **47**, 303-308.
- Lin, M. S., Comings, D. E. & Alfi, O. S. (1977). Optical studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* **60**, 15-25.
- Liu, J., Pankhurst, L. J., Deacon, L. J. & other authors (2011). Evaluation of inflammatory effects of airborne endotoxin emitted from composting sources. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**, 602-606.
- Locci, R. (2006). Actinomycete spores. *Encyclopedia of life sciences*.
- Madelin, T. M. & Johnson, H. E. (1992). Fungal and actinomycete spore aerosols measured at different humidities with an aerodynamic particle sizer. *Journal of applied bacteriology* **72**, 400-409.
- Mainelis, G., Adhikari, A., Willeke, K., Lee, S.-A., Reponen, T. & Grinshpun, S. A. (2002a). Collection of airborne microorganisms by a new electrostatic precipitator. *Journal of aerosol science* **33**, 1417-1432.
- Mainelis, G., Gorny, R. L., Reponen, T., Trunov, M., Grinshpun, S. A., Baron, P., Yadav, J. & Willeke, K. (2002b). Effect of electrical charges and fields on injury and viability of airborne bacteria. *Biotechnology bioengineering* **79**, 229-241.
- Mainelis, G., Berry, D., An, H. R., Yao, M., DeVoe, K., Fennell, D. E. & Jaeger, R. (2005). Design and performance of a single-pass bubbling bioaerosol generator. *Atmospheric environment* **39**, 3521-3533.
- Makino, S. & Cheun, H. I. (2003). Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *Journal of microbiological methods* **53**, 141-147.
- Malmros, P., Sigsgaard, T. & Bach, B. (1992). Occupational health problems due to garbage sorting. *Waste management & research* **10**, 227-234.
- Marchand, G., Lavoie, J. & Lazure, L. (1995). Evaluation of bioaerosols in a municipal solid waste recycling and composting plant. *Journal of the air & waste management association* **45**, 778-781.
- Markkanen, P., Pelkonen, J., Tapanainen, M., Mäki-Paakkanen, J., Jalava, P. & Hirvonen, M.-R. (2009). Co-cultivated damp building related microbes *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* induce immunotoxic and genotoxic responses via oxidative stress. *Inhalation toxicology* **21**, 857-867.
- Martin, E., Kampfer, P. & Jackel, U. (2010). Quantification and identification of culturable airborne bacteria from duck houses. *Annals of occupational hygiene* **54**, 217-227.
- Martin, M. C., Manteca, A., Castillo, M. L., Vazquez, F. & Mendez, F. J. (2004). *Streptomyces albus* isolated from a human actinomycetoma and characterized by molecular techniques. *Journal of clinical microbiology* **42**, 5957-5960.

Références bibliographiques

- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N. & Lehto, R. (2010). Assessing PCR inhibition from humic substances. *The open enzyme inhibition journal* **3**, 38-45.
- McCarthy, A. J. & Broda, P. (1984). Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against [¹⁴C]lignin-labelled wheat lignocellulose. *Journal of general microbiology* **130**, 2905-2913.
- McCarthy, A. J. & Cross, T. (1984a). A taxonomic study of Thermomonospora and other monosporic actinomycetes. *Journal of general microbiology* **130**, 5-25.
- McCarthy, A. J. & Cross, T. (1984b). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB - List No. 15. *International journal of systematic bacteriology* **34**, 355-357.
- McCarthy, A. J., Peace, E. & Broda, P. (1985). Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Applied microbiology and biotechnology* **21**, 238-244.
- McDevitt, J. J., Lees, P. S., Merz, W. G. & Schwab, K. J. (2004). Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples. *Mycopathologia* **158**, 325-335.
- McNeil, M. M. & Brown, J. M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical microbiology reviews* **7**, 357-417.
- Meyer, J. (1976). Nocardiosis, a new genus of the order Actinomycetales. *International journal of systematic bacteriology* **26**, 487-493.
- Millner, P. D., Bassett, D. A. & Marsh, P. B. (1980). Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from Sewage Sludge Compost Piles Subjected to Mechanical Agitation in Open Air. *Applied and environmental microbiology* **39**, 1000-1009.
- Miyashita, K., Kato, T. & Tsuru, S. (1982). Actinomycetes occurring in soil applied with compost. *Soil science and plant nutrition* **28**, 303-313.
- Mustin, M. (1999). *Le compost: Gestion de la matière organique*: Editions François Dubusc, Paris.
- Nevalainen, A., Pastuszka, J., Liebhaber, F. & Willeke, K. (1992). Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. *Atmospheric environment* **26**, 531-540.
- Nielsen, B. H., Würtz, H., Breum, N. O. & Poulsen, O. M. (1997). Microorganisms and endotoxin in experimentally generated bioaerosols from composting household waste. *Annals of agricultural and environmental medicine* **4**, 159-168.
- Noble, R. T., Blackwood, A. D., Griffith, J. F., McGee, C. D. & Weisberg, S. B. (2010). Comparison of rapid quantitative PCR-based and conventional culture-based methods for enumeration of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in recreational waters. *Applied and environmental microbiology* **76**, 7437-7443.
- Oppliger, A., Charriere, N., Droz, P. O. & Rinsoz, T. (2008). Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *The annals of occupational hygiene* **52**, 405-412.
- Orr, C. & Martin, R. A. (1958). Thermal precipitator for continuous aerosol sampling. *Review of scientific instruments* **29**, 129-130.
- Pankhurst, L. J., Akeel, U., Hewson, C., Maduka, I., Pham, P., Saragossi, J., Taylor, J. & Lai, K. M. (2011a). Understanding and mitigating the challenge of bioaerosol emissions from urban community composting. *Atmospheric environment* **45**, 85-93.
- Pankhurst, L. J., Deacon, L. J., Liu, J. & other authors (2011b). Spatial variations in airborne microorganism and endotoxin concentrations at green waste composting facilities. *International journal of hygiene and environmental health* **214**, 376-383.
- Peccia, J. & Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric environment* **40**, 3941-3961.
- Pepys, J., Jenkins, P. A., Festenstein, G. N., Gregory, P. H., Lacey, M. E. & Skinner, F. A. (1990). Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. 1963. *Allergy proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* **11**, 101-102, discussion 197-199.
- Persoons, R., Parat, S., Stoklov, M., Perdrix, A. & Maitre, A. (2010). Critical working tasks and determinants of exposure to bioaerosols and MVOC at composting facilities. *International journal of hygiene and environmental health* **213**, 338-347.
- Philippe, L. (2009). Contrôle de l'air : couplage biocollecteur/cytomètre en phase solide *Salles propres* **63**, 55-60.
- Pietarinen, V. M., Rintala, H., Hyvarinen, A., Lignell, U., Karkkainen, P. & Nevalainen, A. (2008). Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. *Journal of environmental monitoring* **10**, 655-663.
- Plinke, M. A., Leith, D., Holstein, D. B. & Boundy, M. G. (1991). Experimental examination of factors that affect dust generation. *American industrial hygiene association journal* **52**, 521-528.
- Poirot, P., Grosjean, J., Monta, N., Nicot, T., Zimmermann, F., Duquenne, P., Greff-Mirguet, G., Koehler, V. & Piernot, C. (2010). Approaching chemical and microbiological risks in the composting sector. *Hygiène et sécurité du travail* **221**, 1-14.

References bibliographiques

- Porta, D., Milani, S., Lazzarino, A. I., Perucci, C. A. & Forastiere, F. (2009). Systematic review of epidemiological studies on health effects associated with management of solid waste. *Environmental health* **8**, 60.
- Porter, J., Deere, D., Hardman, M., Edwards, C. & Pickup, R. (1997). Go with the flow – use of flow cytometry in environmental microbiology *FEMS Microbiology ecology* **24**, 93-101.
- Poulsen, O. M., Breum, N. O., Ebbehøj, N. & other authors (1995). Sorting and recycling of domestic waste. Review of occupational health problems and their possible causes. *Sci Total Environ* **168**, 33-56.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003). Chapitre 25 : Les actinomycètes. In *Microbiologie*, pp. 506-517. Edited by D. Boek.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2007). *Microbiologie (Chapitre 24)*, Second french edition (5th american edition translation) edn: de boeck.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W. & Benedict, R. G. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Applied microbiology* **6**, 52-79.
- Pridham, T. G. & Lyons, A. J., Jr. (1961). *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman et Henrici: taxonomic study of strains labeled *Streptomyces albus*. *Journal of bacteriology* **81**, 431-441.
- Provost, F., Laurent, F., Uzcategui, L. R. & Boiron, P. (1997). Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *Journal of clinical microbiology* **35**, 1157-1160.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International journal of systematic bacteriology* **46**, 1088-1092.
- Recer, G. M., Browne, M. L., Horn, E. G., Hill, K. M. & Boehler, W. F. (2001). Ambient air levels of *Aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. *Aerobiologia* **17**, 99-108.
- Reinthaler, F., Wüst, G., Haas, D., Feierl, G., Ruckebauer, G. & Marth, E. (2004). Simple emission-reducing measures in an open biological waste treatment plant. *Aerobiologia* **20**, 83-88.
- Reinthaler, F. F., Marth, E., Eibel, U. & other authors (1997). The assessment of airborne microorganisms in large-scale composting facilities and their immediate surroundings. *Aerobiologia* **13**, 167-175.
- Reponen, T. A., Gizenko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K. & Cole, E. C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3807-3812.
- Rinsoz, T., Duquenne, P., Greff-Mirguet, G. & Oppliger, A. (2008). Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment : comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmospheric environment* **42**, 6767-6774.
- Rintala, H., Nevalainen, A., Ronka, E. & Suutari, M. (2001). PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Molecular and cellular probes* **15**, 337-347.
- Rintala, H., Hyvarinen, A., Paulin, L. & Nevalainen, A. (2004). Detection of streptomycetes in house dust—comparison of culture and PCR methods. *Indoor air* **14**, 112-119.
- Rintala, H. & Nevalainen, A. (2006). Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR. *Journal of environmental monitoring* **8**, 745-749.
- Roussel, S., Sudre, B., Reboux, G. & other authors (2011). Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environnemental research* **111**, 744-750.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H. & Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology* **53**, 349-410.
- Sahu, A., Grimberg, S. J. & Holsen, T. M. (2005). A static water surface sampler to measure bioaerosol deposition and characterize microbial community diversity. *Journal of aerosol science* **36**, 639-650.
- Sanchez-Monedero, M. A., Stentiford, E. I. & Mondini, C. (2003). Biofiltration at composting facilities: effectiveness for bioaerosol control. *Environnemental sciences and technologies* **37**, 4299-4303.
- Sanchez-Monedero, M. A., Stentiford, E. I. & Urpilainen, S. T. (2005). Bioaerosol generation at large-scale green waste composting plants. *Journal of the air & waste management association* **55**, 612-618.
- Schafer, J., Kampfer, P. & Jackel, U. (2011). Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative real-time PCR. *Annals of occupational hygiene* **55**, 612-619.
- Schlosser, O., Huyard, A., Carnick, K., Yanez, A., Catalan, V. & Quang, Z. D. (2009). Bioaerosol in composting facilities: occupational health risk assessment. *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation* **81**, 866-877.

Références bibliographiques

- Schlosser, O., Huyard, A., Rybacki, D. & Do Quang, Z. (2012). Protection of the vehicle cab environment against bacteria, fungi and endotoxins in composting facilities. *Waste management* **32**, 1106-1115.
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. & Garbelotto, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and environmental microbiology* **70**, 3512-3520.
- Sedgley, C., Nagel, A., Dahlen, G., Reit, C. & Molander, A. (2006). Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of endodontics* **32**, 173-177.
- Shen, F. T., Lu, H. L. & Young, C. C. (2005). Relatedness of *Gordonia terrae* strains by comparative analysis of 16S rDNA, *gyrB* gene sequences and enzymatic profiles. In *Abstracts of XI the International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology*, pp. 70-71.
- Simon, X., Duquenne, P. & Jeandidier, V. (2009a). French patent pending no. 09 59364. Cellule de génération d'aérosols et générateur d'aérosols pourvu d'une telle cellule (aerosol bubbling system based on a controlled-height liquid film and aerosol generator provided with such a bubbling system). pp. 1-20.
- Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Faure, M. & Greff-Mirguet, G. (2009b). Caractérisations physique et biologique d'un bioaérosol expérimental généré par bullage d'air à travers un film de suspension bactérienne. 24^{ème} Congrès Français sur les Aérosols (CFA 2009), Paris: ASFERA.
- Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Piernot, C., Coulais, C. & Faure, M. (2011). Aerosolisation of *Escherichia coli* and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator. *Journal of aerosol science* **42**, 517-531.
- Simon, X., Betelli, L., Koehler, V., Coulais, C. & Duquenne, P. (2012). Generation of actinomycetes aerosols containing spores and mycelium: performances of a liquid bubbling aerosolizer *Aerosol science and technology* **47**, 158-168.
- Singh, M., Kallan, B. M., Kajal, N. C., Sandhu, M. S. & Singh, S. (1990). Hypersensitivity pneumonitis in Punjab, India. *American review of respiratory disease* **141**, A316.
- Sirigul, C., Wongwit, W., Phanprasit, W., Paveenkittiporn, W., Blacksell, S. D. & Ramasoota, P. (2006). Development of a combined air sampling and quantitative real-time PCR method for detection of *Legionella* spp. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* **37**, 503-507.
- Song, J., Weon, H. Y., Yoon, S. H., Park, D. S., Go, S. J. & Suh, J. W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomyces spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS microbiology letters* **202**, 97-102.
- Sorensen, S. P. L. (1909). Enzymstudien. II: Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochemische Zeitschrift* **21**, 131-304.
- Stackebrandt, E. & Woese, C. R. (1981). Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Current microbiology* **5**, 197-202.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, actinobacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology* **47**, 479-491.
- Steger, K., Sjogren, A. M., Jarvis, A., Jansson, J. K. & Sundh, I. (2007). Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 487-498.
- Strom, P. F. (1985). Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Applied and environmental microbiology* **50**, 906-913.
- Sykes, P., Jones, K. P. & Wildsmith, J. D. (2007). Managing the potential public health risks from bioaerosol liberation at commercial composting sites in the UK: An analysis of the evidence base. *Resources, conservation and recycling* **52**, 410-424.
- Sykes, P., Morris, R. H. K., Allen, J. A., Wildsmith, J. D. & Jones, K. P. (2011). Workers' exposure to dust, endotoxin and [beta]-(1-3) glucan at four large-scale composting facilities. *Waste management* **31**, 423-430.
- Taha, M. P. M., Drew, G. H., Longhurst, P. J., Smith, R. & Pollard, S. J. T. (2006). Bioaerosol releases from compost facilities: Evaluating passive and active source terms at a green waste facility for improved risk assessments. *Atmospheric environment* **40**, 1159-1169.
- Taha, M. P. M., Drew, G. H., Tamer, A., Hewings, G., Jordinsonc, P. J., Longhurst, P. J. & Pollard, S. J. T. (2007a). Improving bioaerosol exposure assessments of composting facilities — Comparative modelling of emissions from different compostages and processing activities. *Atmospheric environment* **41**, 4504-4519.
- Taha, M. P. M., Drew, G. H., Vestlund, A. T., Aldred, D., Longhurst, P. J. & Pollard, S. J. T. (2007b). Enumerating actinomycetes in compost bioaerosols at source—Use of soil compost agar to address plate 'masking'. *Atmospheric environment* **41**, 4759-4765.
- Tendler, M. D. & Burkholder, P. R. (1961). Studies on the thermophilic actinomycetes. I. Methods of cultivation. *Applied microbiology* **9**, 394-399.

References bibliographiques

- Thorne, P. S., Kiekhaefer, M. S., Whitten, P. & Donham, K. J. (1992). Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and environmental microbiology* **58**, 2543-2551.
- Tolvanen, O., Nykänen, J., Nivukoski, U., Himanen, M., Veijanen, A. & Hänninen, K. (2005). Occupational hygiene in a Finnish drum composting plant. *Waste management* **25**, 427-433.
- Treuhaft, M. W. & Arden Jones, M. P. (1982). Comparison of methods for isolation and enumeration of thermophilic actinomycetes from dust. *Journal of clinical microbiology* **16**, 995-999.
- Trudil, D., Loomis, L., Pabon, R., Hasan, J. A. K. & Trudil, C. L. (2000). Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples. In *Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications*.
- Unsworth, B. A., Cross, T., Seaward, M. R. & Sims, R. E. (1977). The longevity of thermoactinomycete endospores in natural substrates. *The Journal of applied bacteriology* **42**, 45-52.
- Van den Bogart, H. G., Van den Ende, G., Van Loon, P. C. & Van Griensven, L. J. (1993). Mushroom worker's lung: serologic reactions to thermophilic actinomycetes present in the air of compost tunnels. *Mycopathologia* **122**, 21-28.
- Van Tongeren, M., Van Amelsvoort, L. & Heederik, D. (1997). Exposure to organic dusts, endotoxins, and microorganisms in the municipal waste industry. *International journal of occupational and environmental health* **3**, 30-36.
- Vilavert, L., Nadal, M., Inza, I., Figueras, M. J. & Domingo, J. L. (2009). Baseline levels of bioaerosols and volatile organic compounds around a municipal waste incinerator prior to the construction of a mechanical-biological treatment plant. *Waste Management* **29**, 2454-2461.
- Vincken, W. & Roels, P. (1984). Hypersensitivity pneumonitis due to *Aspergillus fumigatus* in compost. *Thorax* **39**, 74-75.
- Waksman, S. A. & Henrici, A. T. (1943). The Nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of bacteriology* **46**, 337-341.
- Watson, R. J. & Blackwell, B. (2000). Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Canadian journal of microbiology* **46**, 633-642.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* **173**, 697-703.
- Wellington, E. M., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J. & Jorgensen, N. O. (1992). Taxonomic status of *Kitasatosporia*, and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *International journal of systematic bacteriology* **42**, 156-160.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* **63**, 3741-3751.
- Witt, D. & Stackebrandt, E. (1990). Unification of the genera *Streptoverticillum* and *Streptomyces*, and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *Systematic and applied microbiology* **13**, 361-371.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **51**, 221-271.
- Wouters, I. M., Spaan, S., Douwes, J., Doekes, G. & Heederik, D. (2006). Overview of personal occupational exposure levels to inhalable dust, endotoxin, beta(1->3)-glucan and fungal extracellular polysaccharides in the waste management chain. *Annals of occupational hygiene* **50**, 39-53.
- Yamamoto, N., Kimura, M., Matsuki, H. & Yanagisawa, Y. (2010). Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter. *Journal of bioscience and bioengineering* **109**, 83-88.
- Zeng, Q. Y., Westermarck, S. O., Rasmuson-Lestander, A. & Wang, X. R. (2006). Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR. *Journal of environmental monitoring* **8**, 153-160.
- Zhang, Z., Wang, Y. & Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International journal of systematic bacteriology* **48**, 411-422.
- Zucker, B. A. & Muller, W. (2004). Airborne microorganisms in animal stables: stability of endotoxins in the environment. *Berliner und munchener tierarztliche wochenschrift* **117**, 6-11.

Annexes

ANNEXE I. RÉALISATION DES GAMMES ÉTALONS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE

À partir d'une culture en milieu liquide des trois espèces *Thermoactinomyces vulgaris* ATCC™ 43649, *Thermobifida fusca* ATCC™ BAA-629 et *Streptomyces californicus* ATCC™ 3312, une extraction d'ADN puis une PCR classique ont été réalisées afin d'obtenir de manière ciblée une grande quantité du fragment d'ADN d'intérêt (produits PCR). Ces produits PCR ont été ligués dans des vecteurs plasmidiques et ces produits de ligation ont ensuite été introduits dans des cellules bactériennes compétentes (*Escherichia coli* TOP 10). Après mise en culture de ces cellules transformées, les clones recombinants ont été sélectionnés après vérification de l'intégration des plasmides et ces derniers ont été purifiés via un kit basé sur une lyse bactérienne alcaline associée à une filtration, ainsi qu'une purification de l'ADN plasmidique sur colonne, basée sur un échange d'anions. Les plasmides ont enfin été digérés par une enzyme de restriction (pour la linéarisation du vecteur et de son insert) et dosés, de manière à calculer le nombre de copies du gène cible dans nos échantillons. Au final, trois gammes étalons (une par espèce) ont été réalisées pour la quantification des échantillons en PCR temps réel.

I.i PRÉPARATION DES SÉQUENCES D'INTÉRÊT

Cette préparation se fait par mise en culture de chacune des espèces (*Thermoactinomyces vulgaris* ATCC™ 43649 et *Thermobifida fusca* ATCC™ BAA629 et *Streptomyces californicus* ATCC™ 3312) par grattage à l'écouvillon de la culture stock dans 25 mL de bouillon trypto-caséine soja ou TSB (AES Chemunex). Les fioles sont mises à incuber 3 jours sous agitation permanente à 100 rpm, à 28 °C pour *S. californicus* et à 50 °C pour les deux autres. Après croissance, les 25 mL de chaque espèce sont centrifugés 7 min à 7 000 rpm et à 4 °C afin de retirer un maximum de surnageant (milieu de culture) pour ne garder que le culot (suspension bactérienne concentrée). L'ADN de ces suspensions est ensuite extrait par utilisation du kit FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) selon le protocole préconisé par le fournisseur.

I.ii AMPLIFICATION DES SÉQUENCES D'INTÉRÊT ET VÉRIFICATION DES PRODUITS PCR

Les PCR mises en place pour l'amplification des séquences d'intérêt sont des PCR classiques. Les réactions PCR se composent de : 12,5 µL d' iQ™ supermix (Bio-Rad®) à 1 X final, 1 µL de chaque amorce à 200 nM final, 7,5 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire et 2 µL d'extrait ADN. À savoir que l'ADN de *Thermoactinomyces vulgaris* est amplifié avec le couple d'amorces Tvu F751-R824, celui de *Thermobifida fusca* avec Tfu F374-R472 et celui de *Streptomyces californicus* avec SM fw8-rev9. Après dépôt des 25 µL d'échantillon en microplaque, les amplifications par PCR se font par le biais du thermocycleur C1000™ (Bio-Rad®) avec les cycles suivants : une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie de 35 cycles d'hybridation et élongation comprenant 30 sec à 95 °C, 30 sec à 60 °C et 30 sec à 72 °C, pour finir par une élongation finale de 10 min à 72 °C. Une vérification de ces produits PCR est ensuite réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 3,5 %.

I.iii CLONAGE MOLÉCULAIRE (LIGATION, TRANSFORMATION, ET SÉLECTION DES CLONES)

Les étapes du clonage se font par ligation de chaque produit PCR brut obtenu dans un vecteur, le pCR[®]II-TOPO[®], transformation de cellules compétentes *Escherichia coli* TOP 10, puis sélection des clones recombinants ; cela est réalisé par utilisation du kit de clonage moléculaire TOPO TA Cloning[®] kit Dual Promoter (with pCR[®]II-TOPO[®] vector) with One Shot[®] TOP10[®] chemically competent *E. coli* (Invitrogen[™]) selon le protocole préconisé. Une vérification de la validité des clones (intégration du plasmide) est ensuite réalisée par extraction de l'ADN des clones, PCR classique et électrophorèse sur gel d'agarose. Cette extraction d'ADN se fait par la méthode 'freeze-boil', à savoir un passage des échantillons 5 min dans de l'eau à 100 °C puis dans de la glace pendant 10 min, une centrifugation 10 min à 20 000 xg à 4 °C avec récupération du surnageant contenant l'ADN. Les réactions PCR se composent de : 2,5 µL de tampon (QBiogene) à 1 X final, 0,2 µL de dNTPs (QBiogene) à 1 X final, 0,05 µL de Taq polymérase (QBiogene) à 15 U/µL, 1,25 µL de chaque amorce à 500 nM final, 17,25 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire et 2 µL d'extrait ADN. Les cycles PCR sont les suivants : une dénaturation initiale de 5 min à 95 °C suivie de 35 cycles d'hybridation et élongation comprenant 30 sec à 95 °C, 30 sec à 60 °C et 30 sec à 74 °C, pour finir par une élongation finale de 5 min à 72 °C. L'électrophorèse pour vérification des clones est ensuite révélée sur gel d'agarose à 3,5 %, après quoi, les clones sélectionnés sont pré-enrichis dans du bouillon LB supplémenté en kanamycine (0,5 µL/mL) et incubés à 37 °C sous agitation permanente durant 24 h.

I.iv PURIFICATION, DOSAGE ET DIGESTION DES PLASMIDES

Les 3 suspensions enrichies (correspondant aux 3 espèces) ont ensuite été purifiées via le kit QIAfilter[™] plasmid midi kit (QIAGEN[®]) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Chacun des 3 extraits plasmidiques purifiés est ensuite dosé par spectrophotométrie (DU[®] 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter[®]). Ce dosage spectrophotométrique est réalisé entre 210 nm et 320 nm par palier de 0,5 nm afin de pouvoir obtenir un pic de densité optique correspondant à une concentration en ADN de l'extrait plasmidique. Ces extraits sont ensuite digérés par une enzyme de restriction (BamHI) ceci afin de linéariser le vecteur et son insert. Les réactions se composent de : 5 µL d'extrait plasmidique, 2 µL d'enzyme BamHI à 20 U, 5 µL d'albumine de sérum bovin, 5 µL de tampon 10 X et 38 µL d'eau ultrapure stérile. La digestion se fait à 37 °C pendant 12 h.

ANNEXE II. DÉNOMBREMENT DE LA FLORE CULTIVABLE PAR MISE EN CULTURE SUR MILIEUX GÉLOSÉS

Le dénombrement des germes cultivables dans une suspension cellulaire, ici décrit, est une méthode d'analyse basée sur une norme AFNOR (AFNOR, 1996b). Le principe repose sur l'étalement d'une quantité connue d'une suspension (diluée ou non) sur un milieu gélosé approprié et dénombrement des colonies après incubation de ces mêmes milieux ensemencés. Il est à noter que le mode opératoire décrit ci-dessous peut s'appliquer à une suspension microbienne issue d'un échantillon d'air (échantillon environnemental ou obtenu artificiellement par génération) ou préparée à partir d'une culture microbienne.

II.i DILUTIONS DES ÉCHANTILLONS

Avant ensemencement, la suspension à étudier est diluée successivement au dixième, dans le diluant isotonique qu'est la solution tryptone-sel (TS). Ces dilutions sont définies en fonction de la concentration présumée de la suspension mère. La dilution se fait par ajout d' 1 mL de suspension à diluer dans un tube contenant 9 mL de TS (AES Chemunex) ensuite vortexés. La solution de TS peut également être préparée en laboratoire par mélange de chlorure de sodium NaCl (Sigma) à 8,5 g/L, de tryptone (Oxoïd) à 1 g/L et d'eau purifiée de type II. La solution (chauffée sous agitation pour une dissolution complète) est ensuite autoclavée 15 min à 121 °C.

II.ii ENSEMENCEMENT DES SUSPENSIONS ET INCUBATION DES MILIEUX

Une fois les dilutions effectuées, les suspensions voulues (au minimum 3 dilutions successives sont sélectionnées) sont inoculées sur 2 boîtes de Pétri (duplicat) contenant chacune 20 mL de milieu gélosé approprié à la population bactérienne ciblée. L'inoculation se fait par dépôt de 0,1 mL de la suspension sur le milieu et étalement uniforme par le biais d'un râteau, tige en L et stérile. Les milieux sont ensuite mis à incuber à la température optimum de croissance de la population de microorganismes recherchée, durant un nombre de jours donné (toujours selon la population étudiée) avec une lecture des boîtes toutes les 24 h.

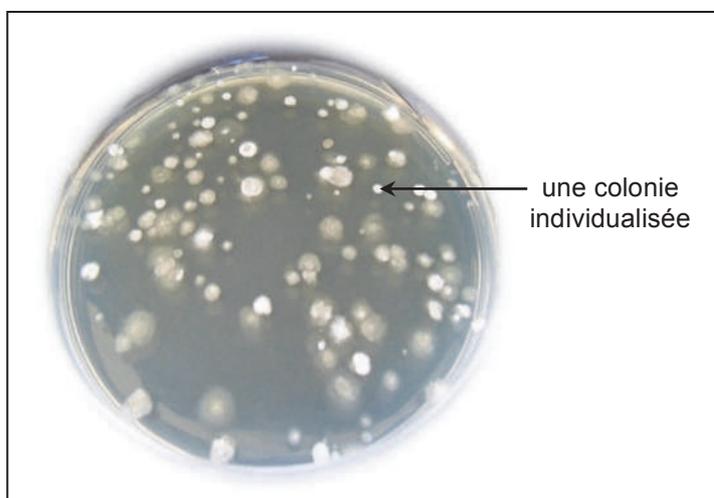


Figure 79. Photo d'une culture de *Thermoactinomyces vulgaris* sur gélose TSA après 3 jours d'incubation à 50 °C [© Laetitia Betelli / INRS].

De manière générale, les bactéries mésophiles sont incubées durant 5 jours alors que les bactéries thermophiles sont incubées sur une période de 3 jours. La lecture des boîtes se fait par comptage des colonies formées (Figure 79) ; ce comptage peut prendre en compte toutes les colonies de la boîte (si la suspension inoculée est pure ou si le dénombrement concerne la population totale) ou des colonies

d'intérêt, de morphologie bien particulière (si le dénombrement ne concerne qu'une espèce ou un groupe bactérien particuliers).

II.iii CONCENTRATION EN MICROORGANISMES VIABLES ET CULTIVABLES

Pour qu'un comptage soit valable et donc utilisable pour le calcul de la concentration, il est nécessaire de compter les colonies sur deux dilutions successives et qu'au moins une de ces 4 boîtes contienne un minimum de 15 colonies. Les boîtes contenant plus de 300 colonies ne sont pas prises en compte dans les calculs. Dans ce cas de figure (cas général), la concentration de la suspension en microorganismes viables cultivables, notée C_c et exprimée en unité formant colonie (UFC) par millilitre de suspension, se calcule selon la formule suivante :

$$C_c = \frac{\sum N}{v(n_1+0,1n_2)d} \text{ (Équation 8)}$$

où :

$\sum N$ est la somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient un minimum de 15 colonies (les boîtes contenant plus de 300 colonies ou avec une valeur aberrante de colonies n'étant pas retenues) ;

v est le volume de suspension inoculée dans chaque boîte (en mL) ;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution (dilution la plus concentrée) ;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution (dilution la moins concentrée) ;

et d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la plus concentrée des deux).

Dans le cas où, pour un échantillon donné, pas une seule boîte ne contient un minimum de 15 colonies, l'estimation des petits nombres est appliquée. Mais la concentration associée ne représente en aucun cas un résultat significatif puisqu'il s'agit d'une estimation. La concentration N se calcule alors selon la formule :

$$C_c = \frac{\sum N}{n \times v \times d} \text{ (Équation 9)}$$

où :

$\sum N$ est la somme des colonies dénombrées sur les boîtes retenues ;

v est le volume de suspension inoculée dans chaque boîte (en mL) ;

n est le nombre de boîtes retenues ;

et d est le taux de dilution correspondant à la dilution correspondante.

Enfin, en cas d'absence totale de colonie sur les boîtes, le résultat s'exprime de la manière suivante :

$$C_c < 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

Si l'échantillon de départ est un échantillon d'air (généré artificiellement ou prélevé en condition réelle d'exposition), ces résultats, exprimés en UFC par mL de suspension, peuvent être ensuite ramenés en UFC par m^3 d'air prélevé selon la formule :

$$C'_c = \frac{C_c \times V_E \times 1000}{V_A} \text{ (Équation 3)}$$

où :

C_C est la concentration calculée précédemment et exprimée en UFC.mL⁻¹ ;

V_E est le volume de liquide d'extraction ayant servi lors de l'échantillonnage ou pour la récupération des microorganismes à partir d'un filtre (en mL) ;

et V_A est le volume d'air prélevé (en L).

II.iv LIMITES DE CONFIANCE ASSOCIÉES

Afin d'estimer la validité d'un résultat, il est nécessaire, pour chaque concentration calculée, de déterminer l'intervalle de confiance (limites inférieure et supérieure) associé qui traduit indirectement l'incertitude de la concentration estimée. Avec une probabilité associée de 95 %, l'intervalle de confiance δ (qui caractérise la répartition et donc la dispersion des microorganismes dans l'échantillon) est calculé selon l'équation suivante :

$$\delta = \left[\frac{1,92 + \sum N}{v(n_1+0,1n_2)} \pm \frac{1,96\sqrt{\sum N}}{v(n_1+0,1n_2)} \right] \text{ (Équation 10)}$$

où $\sum N$, v , n_1 et n_2 représentent les mêmes paramètres que vus ci-dessus.

ANNEXE III. DÉNOMBREMENT DES CELLULES PAR MICROSCOPIE À ÉPIFLUORESCENCE

Ce chapitre décrit les modalités mises en œuvre afin de dénombrer tous microorganismes (morts ou vivants) présents dans une suspension par marquage à l'aide d'un fluorochrome. Là aussi, ce mode opératoire peut s'appliquer aussi bien à une suspension microbienne issue d'un échantillon d'air (échantillon environnemental ou artificiel) ou préparée à partir d'une culture microbienne.

III.i PROTOCOLE DE MARQUAGE DES CELLULES

L'analyse s'effectue généralement sur un volume de 10 mL d'échantillon. Ce volume de travail est alors mis en contact avec un volume de solution de DAPI (Sigma) telle que sa concentration finale soit de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Après vortexage, l'échantillon est laissé à température ambiante et à l'obscurité durant un minimum de 10 min. L'échantillon marqué est à nouveau vortexé puis, est filtré à travers une membrane en polycarbonate, noire, de diamètre 25 mm et de pores $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore Isopore) montée sur une unité de filtration individuelle. La membrane est ensuite rincée par filtration de deux volumes d'eau ultrapure stérile (10 mL puis 5 mL). La membrane est alors récupérée et placée sur une lame de microscopie. Elle est séchée à l'air ambiant et à l'obscurité puis est montée entre lame et lamelle avec de l'huile de paraffine. Les lames peuvent être conservées à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ et à l'obscurité 15 jours maximum, si elles ne sont pas lues immédiatement. Les cellules sont observées au microscope (Leica DM2500) à l'objectif x100 à immersion (avec un pic d'excitation à 372 nm dans l'ultra-violet, le DAPI réémet dans le bleu avec un pic d'émission à 456 nm) et le microscope est équipé d'une caméra (Qicam Qimaging Fast1394). Un exemple d'observation microscopique est présenté en Figure 80.

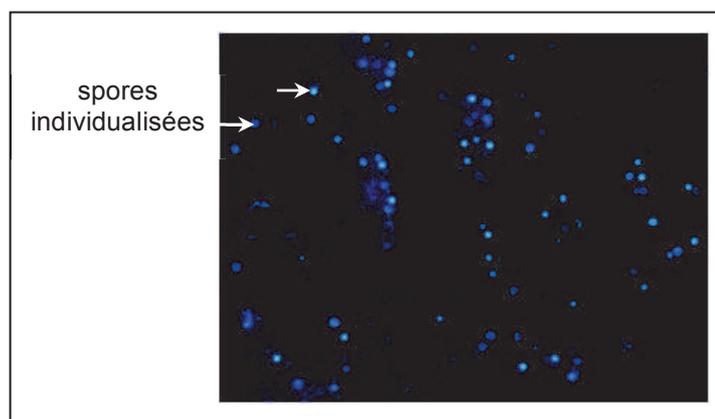


Figure 80. Photo de spores de *Thermoactinomyces vulgaris* observées par microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI [© Laetitia Betelli / INRS].

III.ii CONCENTRATION EN MICROORGANISMES TOTAUX

L'évaluation de la concentration totale en microorganismes est réalisée par comptage du nombre de cellules présentes sur un champ d'observation donné (sélectionné au hasard sur la lame), via le logiciel Histolab version 7.4.0 (Microvision Instruments). Le nombre de cellules dénombrées par champ doit être, si possible, compris entre 10 et 200 éléments, auquel cas il est nécessaire de refaire l'analyse avec le

même échantillon plus concentré ou, au contraire, dilué. De plus, 20 champs (choisis au hasard) sont dénombrés au total par lame en veillant à balayer toute la membrane ; en revanche, si le nombre total de microorganismes est inférieur à 400, le dénombrement se fait alors sur 30 champs. La concentration totale en microorganismes, appelée C_s et exprimée en cellules par millilitre de suspension, est calculée selon la formule suivante :

$$C_s = \frac{\bar{n}_C \times S_F \times D}{S_C \times v} \quad (\text{Équation 11})$$

où :

\bar{n}_C est le nombre moyen de cellules par champ ;

S_F est la surface de filtration (en cm^2) ; dans le cas de l'étude, elle est de $2,01 \text{ cm}^2$;

D est le facteur de dilution appliqué à l'échantillon ;

S_C est la surface du champ (en cm^2) ; dans le cas de l'étude, elle est de $5,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$;

et v est le volume d'échantillon analysé (en mL).

Si l'échantillon de départ est un échantillon d'air (généré artificiellement ou prélevé en condition réelle d'exposition), ces résultats, exprimés en cellules par mL de suspension, peuvent être ensuite ramenés en cellules par m^3 d'air prélevé selon la formule :

$$C'_s = \frac{C_s \times 1000}{V_A} \quad (\text{Équation 12})$$

où :

C_s est la concentration calculée précédemment et exprimée en cellules.mL^{-1} ;

et V_A est le volume d'air prélevé (en L).

III.iii INTERVALLE DE CONFIANCE ASSOCIÉ

Afin d'estimer la validité du résultat, il est possible là aussi de calculer un intervalle de confiance associé au nombre moyen de cellules par champ. Avec une probabilité associée de 95 %, l'intervalle de confiance δ (qui caractérise la répartition et donc la dispersion des microorganismes dans l'échantillon) est calculé selon l'équation suivante :

$$\delta = \left[\bar{n}_C \pm \frac{1,96 \times \sigma}{\sqrt{n}} \right] \quad (\text{Équation 13})$$

où :

\bar{n}_C est le nombre moyen de cellules par champ ;

σ est l'écart-type associé à cette moyenne ;

et n est le nombre de champ dénombré sur la lame (généralement, 20 ou 30).

ANNEXE IV. QUANTIFICATION DE L'ADN PAR PCR TEMPS RÉEL

Ce chapitre décrit les modalités mises en œuvre afin de quantifier l'ADN, modalités mises en place grâce à de nombreux essais de développement et d'optimisation décrits dans le Chapitre 2. Ces protocoles sont spécifiques et s'appliquent à la recherche des espèces *Thermoactinomyces vulgaris* (par le biais des oligos Tvu F751-824/S776), *Thermobifida fusca* ou *Thermobifida alba* (Tfu F374-R472/S419) et *Streptomyces* sp. mésophiles (SM fw8-rev9/p6). Ces modes opératoires peuvent s'appliquer aussi bien à une suspension microbienne issue d'un échantillon d'air (échantillon environnemental ou expérimental) ou préparée à partir d'une culture microbienne. Ce protocole se base sur les essais de développement et d'optimisation de la technique PCR temps réel décrits dans le Chapitre 2.

IV.i EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction de l'ADN des microorganismes contenus dans un échantillon est l'étape préalable à toute PCR. Dans le cas des travaux de la thèse, elle repose sur l'utilisation d'un kit commercialisé, le FastDNA® SPIN kit for soil (MP Biomedicals). Son choix a fait l'objet d'une étude à part entière dont les résultats sont présentés dans le Chapitre 2 (2.2.5). Les extractions d'ADN sont réalisées à partir de 500 µL d'échantillon grâce à ce kit développé pour l'extraction et la purification d'ADN notamment à partir d'échantillons de sol et basé sur l'utilisation d'un broyeur à cellules, le FastPrep automated homogenizer (MP Biomedicals), L'ADN est extrait et purifié avec les Lysing Matrix E, selon les instructions du fournisseur. Pour chaque échantillon, 100 µL d'extrait d'ADN sont obtenus après élution finale, à partir de 500 µL de suspension initiale.

IV.ii AMPLIFICATION DE L'ADN

Les extraits d'ADN sont ensuite analysés par PCR temps réel. Pour ce faire, un mix PCR est préalablement réalisé sachant qu'une réaction PCR se compose des éléments suivants (les volumes donnés sont ceux correspondant à un échantillon étudié) :

- 12,5 µL d' iQ™ supermix (Bio-Rad®) à 1 X final
- 1 µL de chaque amorce à 300 nM final
- 1 µL de sonde à 200 nM final
- 7,5 µL d'eau ultrapure pour biologie moléculaire
- 2,0 µL d'extrait d'ADN (échantillon à étudier)

Les concentrations en amorces et en sonde sont celles définies après une étude d'optimisation présentée dans le paragraphe 2.2.4.3. Les cycles PCR sont réalisés sur le système de détection PCR temps réel CFX96™ (Bio-Rad®) selon le protocole suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles d'une dénaturation de 15 sec à 95 °C et d'une étape hybridation-élongation de 1 min à 58 °C (pour les amplifications réalisées avec les oligonucléotides Tvu ou SM) ou de 1 min à 63,3 °C (pour les oligos Tfu).

Pour chaque run PCR, une gamme étalon est ajoutée en triplicat. Un minimum de 5 points par gamme est exigé sachant que cette gamme doit englober toutes les concentrations (de la minimale à la maximale) des échantillons étudiés. La gamme utilisée, préalablement étudiée dans le paragraphe 2.2.3, sera, en fonction de l'espèce ou du groupe recherché, la gamme '*Thermoactinomyces vulgaris*' (portion du gène codant la sous unité B de l'ADN gyrase de *T. vulgaris*), la gamme '*Thermobifida fusca*' (portion

du gène codant le facteur ecf de *T. fusca*) ou la gamme '*Streptomyces californicus*' (portion du gène codant le 23S de *S. californicus*). À noter que la détection de la PCR temps réel que nous avons développée s'est faite par le biais d'une sonde d'hydrolyse de type Taqman®. Elle porte sur son extrémité 5' un fluorophore ou molécule reporter (ici le FAM) et sur son extrémité 3', un quencher (le Dark Quencher®).

IV.iii EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont analysés, dans le cas de nos essais, grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 1.0.1035.131 (Bio-Rad®). La Figure 81 est un exemple des résultats pouvant être obtenus avec le graphique représentant l'amplification (graphique du haut) et le graphique représentant la gamme étalon (graphique du bas). Le graphique de l'amplification, pouvant également être représenté en échelle logarithmique, est représenté par la quantité de fluorescence émise en unités de fluorescence relative (RFU) en fonction du nombre de cycles PCR. Une courbe sigmoïde, représentative d'un échantillon donné reflétant la cinétique d'amplification de l'ADN cycle par cycle se découpe en quatre parties :

- la baseline, correspondant au bruit de fond et définit comme de faibles changements du signal de fluorescence pour les cycles PCR initiaux
- la partie exponentielle
- la phase linéaire
- et enfin le plateau, correspondant à une baisse progressive de la fluorescence pouvant être dû à un épuisement des différents réactifs de la PCR (amorces, sonde...)

Un élément très important de ce graphique à ne pas négliger est le 'threshold', droite dont l'intersection avec les courbes d'amplification définit sur l'axe des abscisses le 'threshold cycle' (C_T) pour chacune d'elles. Cette droite doit se situer au dessus de la baseline (bruit de fond) mais suffisamment basse pour être en dessous de la région exponentielle de la courbe d'amplification. Ajustable, nous avons choisi arbitrairement de toujours utiliser la droite autocalculée par le logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 1.0.1035.131 (Bio-Rad®), pour une homogénéité des résultats. Cette droite est en effet très importante puisque c'est grâce à elle que sont définis les C_T de chaque échantillon et donc, par extension, les concentrations en ADN.

Est corrélé à ce graphique celui de la gamme étalon (graphique du bas) représentant le C_T en fonction de la concentration logarithmique en ADN. Trois paramètres y sont associés : l'efficacité de PCR symbolisée par la lettre E, le coefficient de corrélation r^2 de la droite ainsi que sa pente. Les deux premiers paramètres ne peuvent pas prendre n'importe quelles valeurs et au vue des nombreuses PCR réalisées et des résultats obtenus, nous avons décidé qu'une PCR ne serait validée que si E était comprise entre 80 et 120 %, r^2 était supérieure à 0,98 et que les répliquats donnaient des C_T similaires, très proches. Ces conditions sont bien évidemment discutables notamment les valeurs de E mais elles ont été définies au vu des résultats obtenus au fur et à mesure des nombreux essais réalisés, dans des conditions PCR qui étaient bien spécifiques. À noter que la droite 'threshold', autocalculée par le logiciel, est ajustée de manière à conjuguer les meilleures valeurs de E et de r^2 associées.

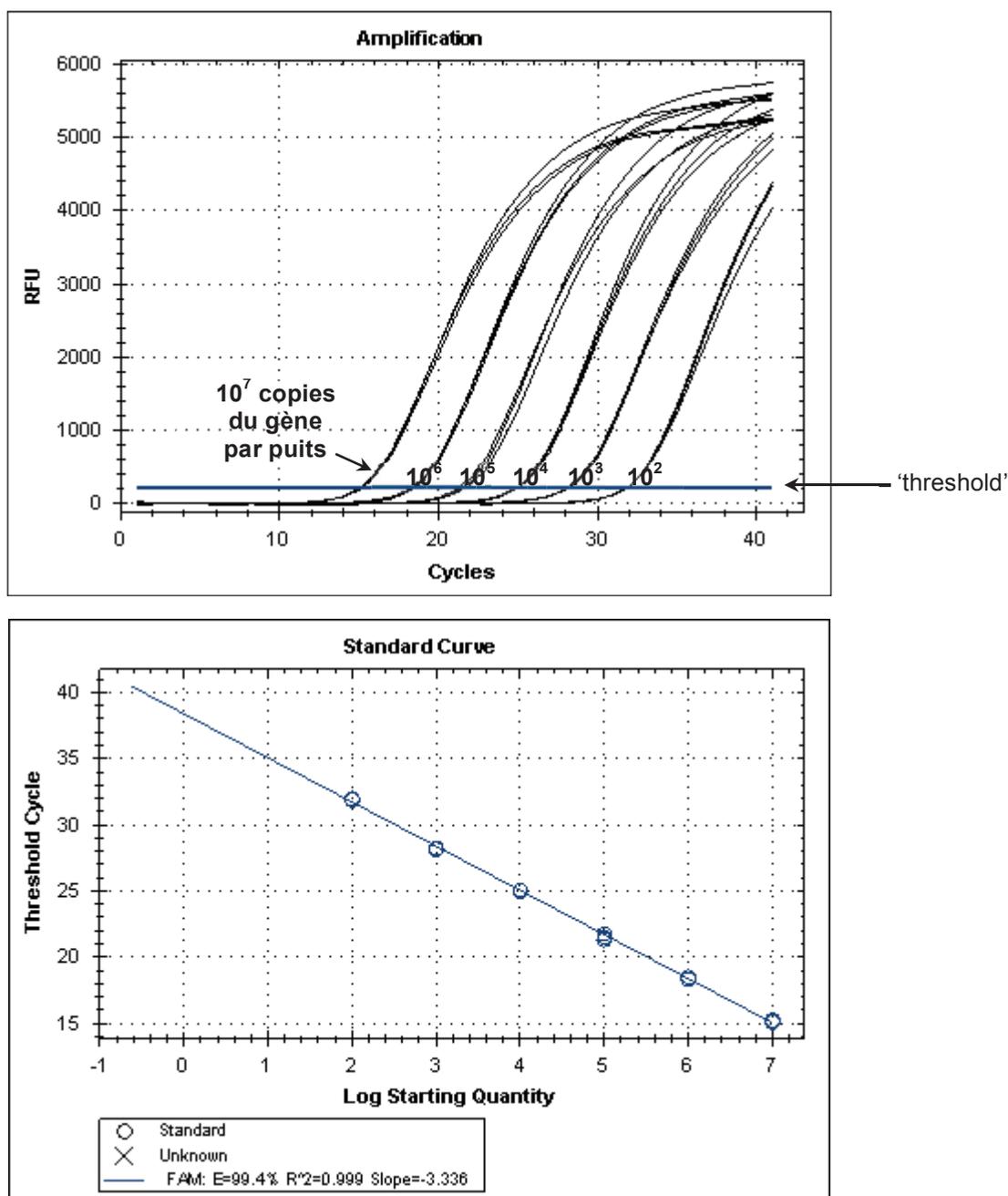


Figure 81. Exemple de courbes d'amplification qPCR (graphe de gauche) et gamme étalon correspondante (graphe de droite), obtenues ici pour 6 points de gamme, répliqués 3 fois. Les échantillons sont des extraits d'ADN plasmidique purifiés issus du clonage moléculaire de la portion de gène codant le facteur ecf de *Thermobifida fusca*.

Une fois la gamme étalon établie, le logiciel fournit alors la valeur N_P , soit la quantité d'ADN contenue dans un puits. La concentration en ADN d'un échantillon, appelée C_{ADN} et exprimée en nombre de copies de gène par millilitre de suspension, est calculée selon la formule suivante :

$$C_{ADN} = \frac{N_P \times V_{\text{éluat}}}{V_{\text{qPCR}} \times V_{\text{ext}}} \quad (\text{Équation 14})$$

où :

N_P est la quantité d'ADN dans le puits de réaction (en nombre de copies de gène) ;

$V_{\text{éluat}}$ est le volume d'éluat obtenu après extraction d'ADN (en μL) ;

V_{qPCR} est le volume d'extrait d'ADN passé en qPCR (en μL) ;
et V_{ext} est le volume d'échantillon ayant servi à l'extraction d'ADN (en mL).

Si l'échantillon de départ est un échantillon d'air (généralisé artificiellement ou prélevé en condition réelle d'exposition), ces résultats, exprimés en nombre de copies de gène par mL de suspension, peuvent être ensuite ramenés en copies de gène par m^3 d'air prélevé selon la formule :

$$C'_{ADN} = \frac{C_{ADN} \times V_T \times 1000}{V_A} \text{ (Équation 3)}$$

où :

V_T est le volume d'échantillon total (en mL) ;

et V_A est le volume d'air prélevé (en L).

ANNEXE V. ÉCHANTILLONNAGE EN CASSETTES DE PRÉLÈVEMENT

Cette annexe présente et décrit l'outil de prélèvement qu'est la cassette fermée, utilisée pour l'échantillonnage individuel des aérosols.

V.i MONTAGE D'UNE CASSETTE

Une cassette est constituée de 3 pièces en polystyrène entre lesquelles sont insérés un préfiltre en cellulose ou « absorbent pad » (Millipore®) et une membrane Nuclepore™ en polycarbonate de 37 mm de diamètre et de pores 0,8 µm (Whatman®). Ces divers composants sont présentés sur la Figure 82. Les membranes ici utilisées sont spécifiques de l'échantillonnage d'un bioaérosol bactérien mais peuvent varier en fonction du type d'aérosol collecté. Les cassettes sont préparées (ajout des membranes), assemblées (montage des trois parties) et pré-serrées sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) avec des gants pour éviter toute contamination. Seul le serrage final sous presse (à pression de 2 bars) n'est pas réalisé en conditions stériles.

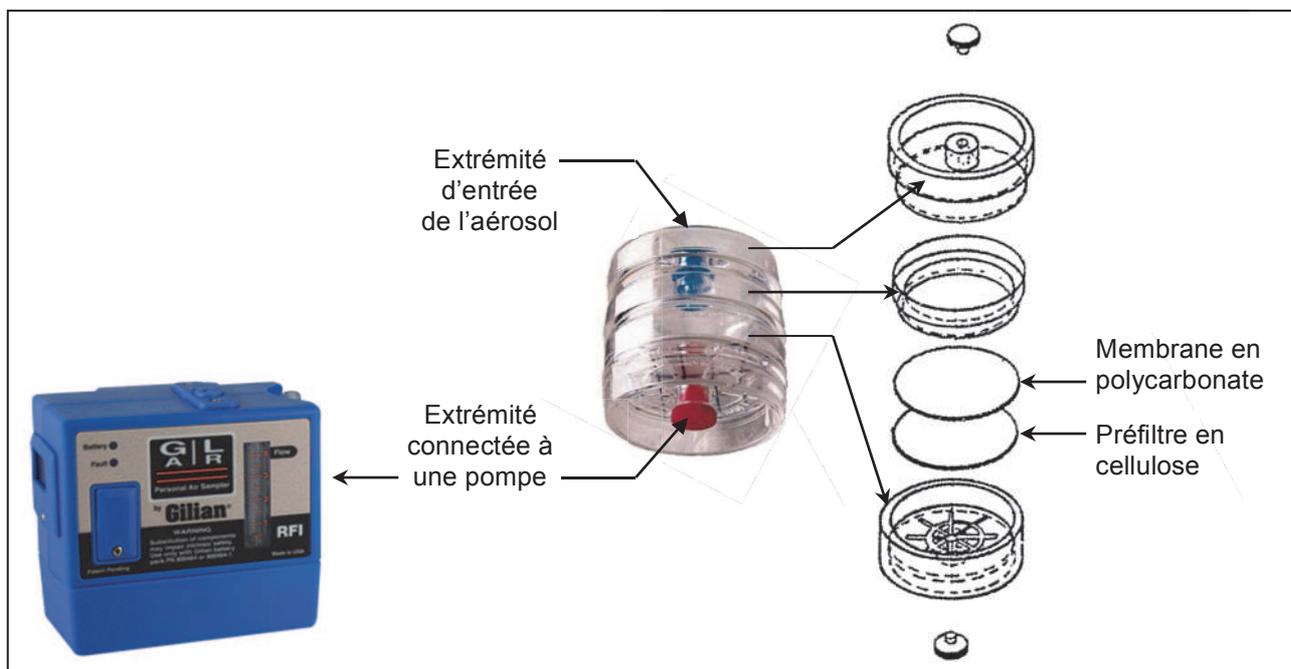


Figure 82. Présentation des différentes parties d'une cassette de prélèvement fermée, vue de la cassette montée et photo de la pompe permettant le prélèvement [photos issues du site <http://www.sensidyne.com> / schéma issu du site <http://www.osha.gov>].

V.ii UTILISATION

Pour nos essais, ces cassettes ont été utilisées de trois manières différentes. Tout d'abord le prélèvement a pu s'effectuer pour l'échantillonnage de bioaérosols expérimentaux et de ce fait, en sortie de l'enceinte de génération. La cassette est alors connectée sur sa partie supérieure (orifice d'entrée de diamètre 4 mm) à une des six sondes de la zone terminale de l'enceinte de prélèvement, via un tuyau flexible. À côté de cela, le prélèvement a également pu s'effectuer en conditions réelles d'exposition, c'est-à-dire en plate-forme de compostage. Dans ce cas, la cassette est positionnée à l'aide de trépieds à hauteur des voies respiratoires (environ 1,70 mètres du sol) l'ouverture de l'extrémité supérieure étant

placée de manière à capter le plus efficacement le bioaérosol d'intérêt (Figure 83). Dans les deux cas, la cassette est connectée sur sa partie inférieure à une pompe individuelle de prélèvement Gilian® GilAir-3 ou GilAir-5 (Sensidyne®) par le biais d'un tuyau flexible, ces pompes assurant un débit nominal de 2 L.min⁻¹. Le débit de la pompe est mesuré avant et après chaque prélèvement à l'aide d'un débitmètre Gilibrator (Sensidyne®), la moyenne étant ensuite prise en compte pour les calculs de concentration. Le troisième cas de figure concerne le prélèvement en condition terrain (sur plate-forme de compostage) mais sur cassettes ouvertes. La cassette est alors reliée à une pompe de débit nominal 25 L.min⁻¹ (General Electrics, models 1531-176A-G445-X et -G629-X) et une des trois parties de la cassette, la partie supérieure plus précisément, est retirée le temps de l'échantillonnage avant d'être remise une fois le prélèvement terminé.

La différence entre cassettes ouvertes et cassettes fermées réside dans le type de fraction étudiée. En cassette fermée, la fraction collectée par le biocollecteur est la fraction inhalable alors que pour la cassette ouverte, c'est la fraction totale qui est récoltée.



Figure 83. Photographie d'un prélèvement d'air effectué en plate-forme de compostage sur deux cassettes fermées [© Laetitia Betelli / INRS].

V.iii EXTRACTION DE LA FLORE CONTENUE DANS LES CASSETTES

Une fois collectés, les échantillons sont conservés à 4 °C en attendant leur analyse (le temps entre prélèvement et analyse doit être le plus court possible). Et avant quelque analyse, l'échantillon doit tout d'abord subir une étape d'extraction, ceci afin d'extraire les microorganismes récoltés sur la membrane enchâssée dans la cassette. Pour cette extraction, 10 ml d'une solution d'extraction sont introduits dans la cassette, cette solution étant préparée par mélange de Tween 80 (Prolabo) à 0,1 g/L soit 0,01 %, de peptone (Oxoid) à 1 g/L soit 0,1 % et d'eau ultrapure stérile. La cassette est ensuite agitée pendant 20 min à 2 000 rpm (Multi-Reax®, Heidolph). La solution contenue dans la cassette (solution d'extraction et microorganismes remis en suspension) est ensuite récupérée à l'aide d'une seringue stérile et transférée dans un tube à centrifuger. La suspension est alors prête à être analysée.

ANNEXE VI. ÉCHANTILLONNAGE AVEC L'IMPACTEUR EN CASCADE SIOUTAS

Cette annexe présente et décrit l'outil d'échantillonnage qu'est l'impacteur en cascade Sioutas, utilisé pour l'échantillonnage individuel des aérosols et la séparation des particules qui les composent en différentes classes de diamètres aérodynamiques.

VI.i FONCTIONNEMENT DU SIOUTAS

L'impacteur en cascade Sioutas se compose de 4 étages d'impaction ainsi que d'un étage terminal. Chacun de ces étages est formé de deux pièces : une première pièce métallique comprenant une fente et une deuxième pièce placée dessous sur laquelle est montée une membrane. Les 4 étages d'impaction sont montés avec une membrane en polycarbonate de 25 mm de diamètre et de pores $0,8 \mu\text{m}$ (Whatman™) alors que l'étage final renferme une membrane en PVC de 37 mm de diamètre et de pores $5,0 \mu\text{m}$ (Pall corp.). Les différents constituants de l'impacteur sont présentés sur la Figure 84.

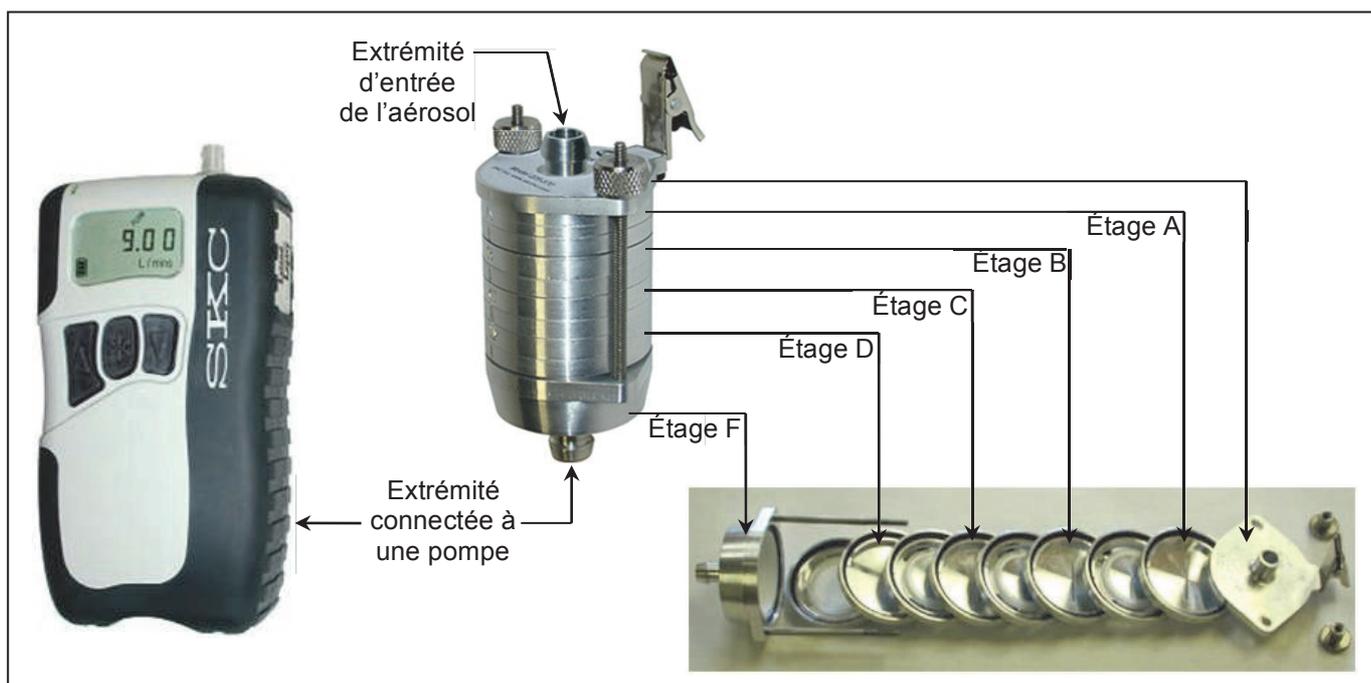


Figure 84. Présentation des différentes parties d'un impacteur en cascade Sioutas, vue de l'impacteur monté et photo de la pompe permettant le prélèvement [photos issues des sites <http://www.weber.hu>, <http://chromservis.cz> et <http://www.skcinc.com>].

L'impacteur étant relié à une pompe assurant un débit nominal de $9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (SKC, Leland Legacy®), l'aérosol va être aspiré à travers une série d'orifices servant d'accélérateurs du flux d'air et les particules vont s'impacter sur la membrane placée sur le trajet du flux d'air. Les particules sont donc sélectionnées et collectées sur chacun des étages en fonction de leurs propriétés aérodynamiques : les particules de

taille supérieure au diamètre de coupure de l'étage considéré entrent en collision avec la plaque alors que les particules de diamètres inférieurs et de vitesses plus élevées continuent leurs trajectoires jusqu'aux étages inférieurs.

Cet impacteur permet ainsi d'établir une distribution granulométrique de l'aérosol selon 5 classes de diamètres :

- les particules de diamètre aérodynamique supérieur à 2,5 μm (étage A)
- celles de diamètre compris entre 2,5 μm et 1,0 μm (étage B)
- celles de diamètre compris entre 1,0 μm et 0,5 μm (étage C)
- celles de diamètre compris entre 0,5 μm et 0,25 μm (étage D)
- et celles de diamètre aérodynamique inférieur à 0,25 μm (étage terminal)

VI.ii EXTRACTION DE LA FLORE IMPACTÉE

Une fois le prélèvement effectué, le Sioutas est soigneusement démonté sous PSM en conditions aseptiques et chaque membrane est une à une récupérée dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL. La flore est alors extraite par ajout dans chacun des tubes de 10 ml d'une solution d'extraction (composition décrite dans l'Annexe V, paragraphe V.iii). Les tubes sont mis à agiter 20 min à 2 000 rpm (Multi-Reax[®], Heildolph). La solution contenue dans ces tubes (solution d'extraction et microorganismes remis en suspension) est alors prête à être analysée.

ANNEXE VII. ÉCHANTILLONNAGE AVEC L'IMPACTEUR EN CASCADE MARPLE

Cette annexe présente et décrit l'échantillonneur Marple, qui, tout comme le Sioutas, est un impacteur en cascade utilisé pour l'échantillonnage individuel des aérosols et la séparation des particules qui les composent en différentes classes de diamètres aérodynamiques.

VII.i FONCTIONNEMENT DU MARPLE

L'impacteur en cascade Marple se compose de 8 étages d'impaction ainsi que d'un étage terminal. Chacun de ces étages est formé de deux pièces : une première pièce métallique comprenant 6 fentes radiales et une deuxième pièce placée dessous sur laquelle est montée une membrane. Les 8 étages d'impaction sont montés avec des disques d'impaction ajourés de type Mylar, de 34 mm de diamètre alors que l'étage final renferme une membrane en PVC de pores 5,0 μm . Les différents constituants de l'impacteur sont présentés sur la Figure 85.

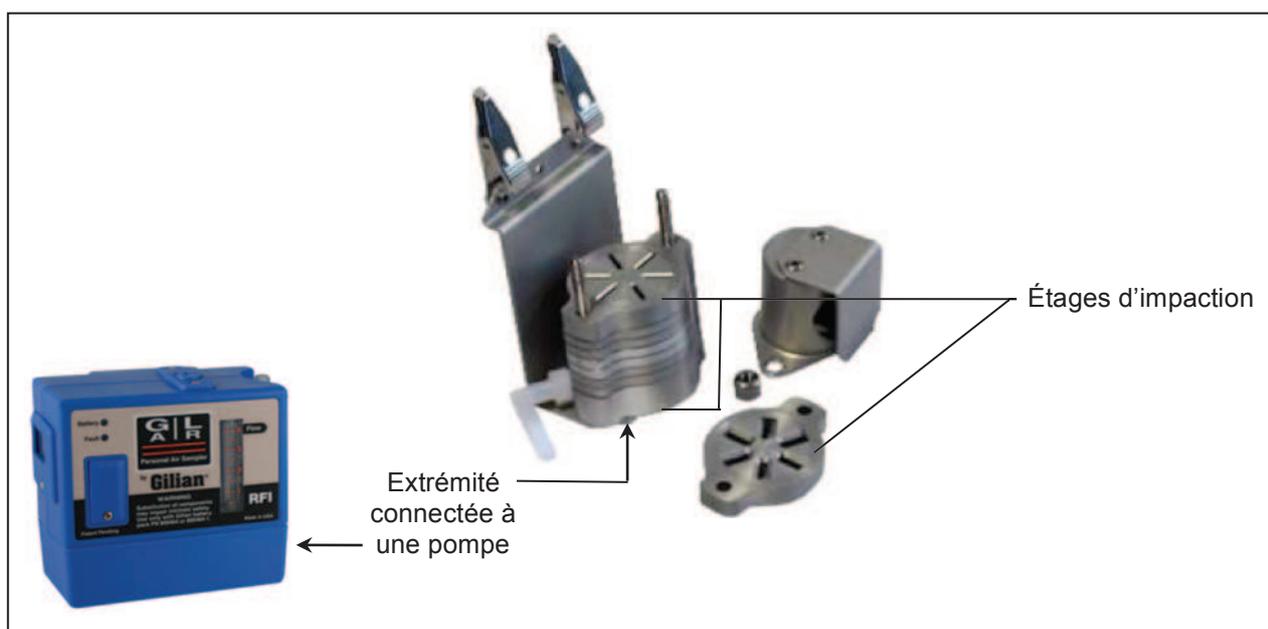


Figure 85. Présentation de l'impacteur en cascade Marple et photo de la pompe permettant le prélèvement [photos issues des sites <http://www.sensidyne.com> / et <http://www.envcoglobal.com>].

Le mode de fonctionnement du Marple est presque identique à celui du Sioutas. Les deux différences majeures concernent le flux d'air aspiré et les classes de diamètres définies. Là où l'impacteur Sioutas est relié à une pompe de débit de 9 L.min⁻¹, le Marple est relié à une pompe assurant un débit nominal de 2 L.min⁻¹ (Gilian® GilAir-3 ou GilAir-5, Sensidyne®). De plus, cet impacteur permet d'établir une distribution granulométrique de l'aérosol selon 9 classes de diamètres :

- les particules de diamètre aérodynamique compris entre 40,0 et 21,3 μm
- celles de diamètre compris entre 21,3 μm et 14,8 μm
- celles de diamètre compris entre 14,8 μm et 9,8 μm

- celles de diamètre compris entre 9,8 µm et 6,0 µm
- celles de diamètre compris entre 6,0 µm et 3,5 µm
- celles de diamètre compris entre 3,5 µm et 1,55 µm
- celles de diamètre compris entre 1,55 µm et 0,93 µm
- celles de diamètre compris entre 0,93 µm et 0,52 µm
- et celles de diamètre aérodynamique compris entre 0,52 et 0,10 µm (étage terminal)

VII.ii EXTRACTION DE LA FLORE IMPACTÉE

Une fois le prélèvement effectué, le Marple est soigneusement démonté sous PSM en conditions aseptiques et chaque membrane est une à une récupérée dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL. La flore est alors extraite par ajout dans chacun des tubes de 10 ml d'une solution d'extraction (composition décrite dans l'Annexe V, paragraphe V.iii). Les tubes sont mis à agiter 20 min à 2 000 rpm (Multi-Reax[®], Heildolph). La solution contenue dans ces tubes (solution d'extraction et microorganismes remis en suspension) est alors prête à être analysée.

ANNEXE VIII. ÉCHANTILLONNAGE AVEC LE PRÉLEVEUR HAUT DÉBIT CORIOLIS

Cette dernière annexe décrit les modalités de prélèvement avec l'échantillonneur haut débit qu'est le Coriolis μ .

VIII.i FONCTIONNEMENT DU CORIOLIS μ

Le Coriolis μ est un biocollecteur portable, à haut débit et qui permet la collecte d'un bioaérosol en milieu liquide grâce à son principe de collecte cyclonique (Carvalho *et al.*, 2008; Philippe, 2009). L'air, pouvant être aspiré jusqu'à un débit de $300 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, est récolté dans un cône stérile contenant 15 mL d'un liquide de collecte Figure 86. Par souci d'homogénéité des méthodes et afin de ne pas introduire de biais dans le prélèvement, nous avons utilisé la solution d'extraction décrite dans les annexes précédentes (préparée à base de Tween 80, de peptone et d'eau ultrapure stérile) comme liquide de collecte.

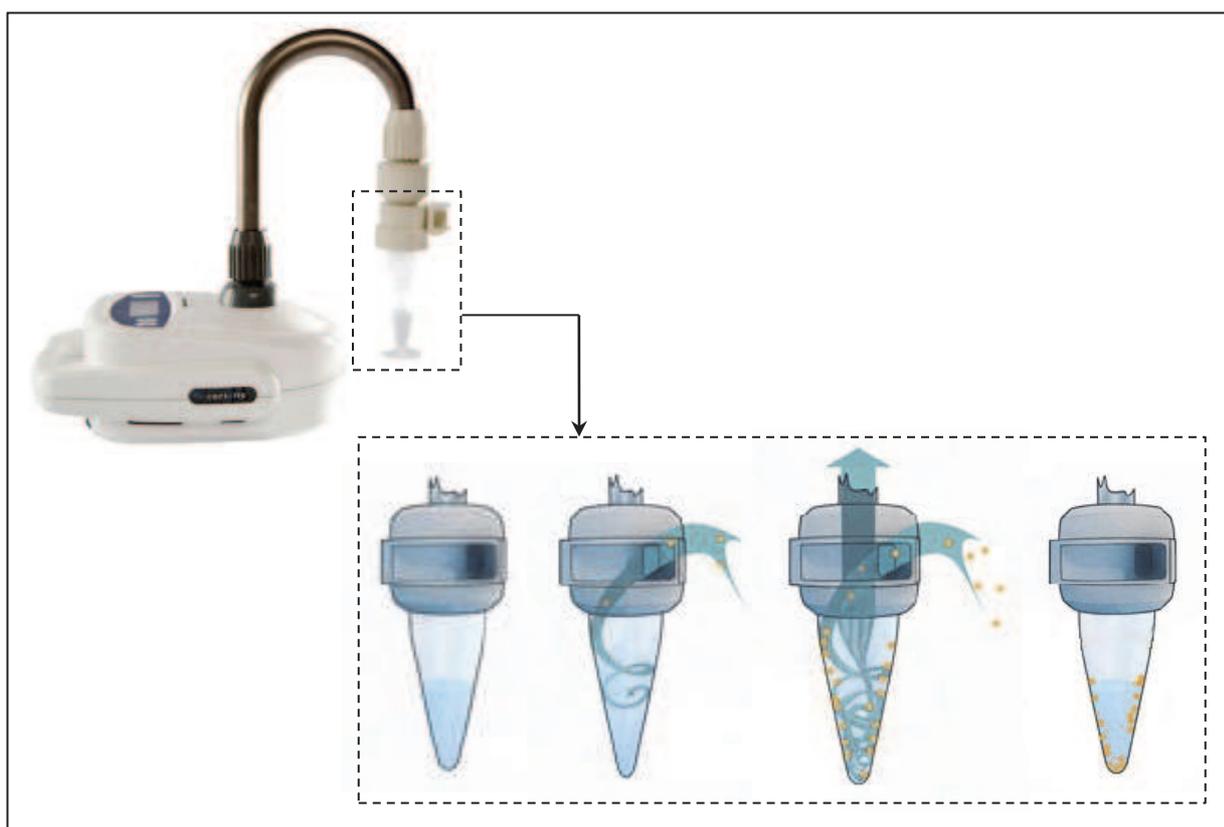


Figure 86. Photo du Coriolis μ et zoom sur le cône contenant le liquide de collecte avec schématisation du processus d'échantillonnage de l'air [photo et schémas provenant respectivement des sites www.coriolis-air sampler.com et bioamerica-inc.com].

La solution ainsi récupérée, contenant les particules collectées et conditionnée dans le cône rebouché, est alors prête à être analysée.

