



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Biologie-Santé
présentée par

Yanis Guenoune

Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR1085-IRSET
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail

Exposition aux bactéries
environnementales dans
l'habitat : Méthodes de
mesure et Impacts sur la
santé des occupants

Thèse soutenue à Rennes
le 21/12/2017

devant le jury composé de :

Anne-Marie POURCHER

Directrice de recherche, IRSTEA, Rennes,
Rapporteur

Jean Jacques GODON

Directeur de Recherche, INRA, Narbonne,
Rapporteur

Pierre Yves DONNIO

Professeur des Universités, Praticien
Hospitalier, CHU Rennes
Examineur

Pierre LE CANN

Professeur de l'Ecole des Hautes Etudes en
Santé Publique, Rennes, Directeur de thèse



THÈSE
UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
et L'ECOLE DES HAUTES ETUDES EN SANTÉ PUBLIQUE

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Biologie-Santé
présentée par

Yanis Guenoune

Préparée dans le cadre du Réseau doctoral en Santé Publique
à l'unité de recherche INSERM UMR 1085-IRSET
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail



Remerciements

Le travail présenté ici a été réalisé au Laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé (LÉRES) avec le soutien financier de la communauté d'établissements Sorbonne Paris Cité (USPC).

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Pierre Le Cann, je lui exprime toute ma reconnaissance ainsi que toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, sa grande disponibilité, ses précieux conseils, pour toutes nos discussions instructives et passionnantes, et surtout sa bienveillance durant ces trois années. Sa passion contagieuse, sa fine intuition et sa pertinence scientifique continueront à me guider à jamais.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse, Yves Andres, responsable du département systèmes énergétiques et environnement de l'Ecole des Mines de Nantes (EMN), ainsi que Latifa Boussarghin, Maître de Conférence de Microbiologie, EA1254 UFR de Pharmacie à l'Université de Rennes 1, pour leur soutien et leurs conseils avisés.

Je remercie du fond du cœur Olivier Thomas, Professeur émérite de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) et ancien Directeur du LÉRES, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour sa codirection au tout début de cette thèse.

J'exprime également ma reconnaissance à Philippe Quénel, Directeur du LÉRES, pour avoir mis à ma disposition toutes les ressources humaines et matérielles pour l'élaboration de ce travail.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'unité de microbiologie : Arlette, Marie-Claire, Sophie et Sylvie Binard, pour toute l'aide qu'elles m'ont apporté ainsi que pour leur gentillesse. Leurs nombreux conseils étaient d'une immense aide durant ces trois années.

Je remercie également Sylvie Hallier sans qui mes travaux n'auraient jamais été abouti ! Et bien sûr un grand merci à Anne Gérard, responsable de l'unité de microbiologie, pour ses conseils professionnels ainsi que pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

J'adresse également mes sincères remerciements à Karine Laboux, Sarah Kitar, et à tous les membres qui œuvrent au sein du Réseau doctoral de l'EHESP et qui m'ont permis de suivre des formations durant lesquelles j'ai pu acquérir des connaissances interdisciplinaires et de santé publique.

Je tiens à remercier Julien Lefebvre, analyste à l'Institut Technique Des Gaz et de l'Air (ITGA) qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous mes collègues du LÉRES pour leur soutien, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Mes derniers remerciements iront à toute ma famille pour le soutien sans faille qu'elle m'a toujours témoigné au cours de cette thèse, et plus particulièrement à ma maman, mon papa et mon Brother préféré. Une forte pensée à la mémoire de ma tante.

Enfin, un grand merci à toi Amel pour ton soutien, ton infinie patience et surtout l'équilibre que tu m'apportes tous les jours.

Table des matières

Remerciements	5
Lexique	7
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	13
I. Contexte	13
1. Exposition de l'Homme aux poussières	16
2. Les réactions de l'organisme face à l'inhalation de poussières	20
3. Les particules de poussières vectrices des aérosols en particulier les bioaérosols	21
a. Les bactéries	23
b. Les sources d'exposition aux bactéries en environnement intérieur	25
c. Les effets sur la santé associés aux bactéries	26
d. Un cas particulier : Les endotoxines	29
4. L'influence des facteurs environnementaux	31
II. Mesure de l'exposition bactérienne en environnement intérieur	33
1. Un constat majeur : Le besoin d'outils quantitatifs	33
2. Discussion sur les méthodes fréquemment utilisées	33
3. Revue de la littérature	35
III. Objectifs de la thèse	65
1. Contexte de la thèse	65
2. Objectifs	67
Résultats	68
Chapitre 2. La poussière intérieure comme un modèle pour évaluer la contamination des aérosols bactériens	69
Chapitre 3. Characterization of indoor dust bacterial microbiota in homes of asthma and non asthma patients: a pilot study using next generation sequencing	89
Discussion générale et Perspectives	109
Bibliographie	130
Annexe 1: Communications orales	143
Annexe 2: Communications affichées	144

Lexique

Allergène : toute substance capable d'entraîner une sensibilisation du système immunitaire et menant, lors des expositions subséquentes, à une réaction allergique et aux manifestations qui y sont associées.

Asthm'Child : exposition cumulée aux contaminants de l'air intérieur susceptibles d'induire des affections respiratoires chroniques de l'enfant.

Atopie : terme désignant certaines manifestations morbides allergiques locales survenant de manière apparemment spontanée chez un sujet prédisposé.

Bactérie : organisme vivant microscopique et procaryote présente dans tous les milieux. Le plus souvent unicellulaire, elle est parfois pluricellulaire (généralement filamenteuse) et peut également former des colonies dont les cellules restent agglutinées au sein d'un gel muqueux (biofilm).

Bioaérosols : particules d'origine microbienne, animale, ou végétale en suspension dans l'air.

β -1,3-glucanes : sucre complexe (polysaccharide), constituant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif.

Commensalisme : interaction durable entre des individus d'espèces différentes où l'un des partenaires tire un bénéfice de l'association tandis que l'autre n'y trouve ni avantage ni véritable inconvénient.

Composé organique volatil (COV) : molécule organique, à l'état de vapeur à la température et à la pression ambiantes.

Dysbiose : déséquilibre entre le microbiote et son hôte (par exemple, dysfonctionnement de la vie bactérienne dans l'intestin).

Endotoxine : toxine située dans la membrane externe de certaines bactéries à Gram négatif

Homéostasie : phénomène par lequel un facteur clé (par exemple, température) est maintenu autour d'une valeur bénéfique pour le système considéré, grâce à un processus de régulation.

Immunogène : qualifie le pouvoir de toute substance d'origine étrangère, reconnue comme telle par le sujet exposé, capable de provoquer une réaction immunitaire.

Métagénomique : science qui vise à étudier l'ensemble des génomes issus d'un même milieu ainsi que les interactions entre ces génomes.

Microbiome : ensemble des espèces qui prédominent ou sont durablement adaptées à la surface et à l'intérieur d'un organisme.

Microbiote : ensemble de micro-organismes vivant un environnement spécifique chez un hôte

Moléculaire : qui a un rapport aux molécules, notamment ici aux acides nucléiques.

Mutualisme : association symbiotique dans laquelle deux (ou plusieurs) organismes vivent ensemble, au bénéfice des deux.

Pathobiote : micro-organisme dont la communauté constitue un pathobiome.

Pathobiome : concept pour décrire un agent pathogène dans son environnement.

Pneumopathie : terme générique désignant les maladies du poumon.

Polysaccharides : polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques.

Rhinite : irritation et inflammation (aiguë ou chronique) des muqueuses de la cavité nasale.

Saprophyte : cellule (ici bactérie unicellulaire) qui vit dans l'organisme sans être pathogène, mais il peut le devenir (entraîner une maladie), ceci survient quand une personne présente un déficit immunitaire (une diminution des capacités de défense de son organisme).

Spore bactérienne : ou endospore, cellule généralement unicellulaire sous forme végétative métaboliquement active et potentiellement pathogène, ou métaboliquement inactive et non pathogène (forme sporulée).

Symbiote : organisme vivant en symbiose avec un autre d'une espèce différente.

Symbiose : association étroite de deux ou plusieurs organismes différents qui vivent ensemble ; comprend le parasitisme (nuisible pour un des organismes), le commensalisme (bénéfique pour l'un d'eux, sans importance pour l'autre), et le mutualisme (bénéfique pour les deux).

Ubiquiste : se dit d'un organisme à grande plasticité écologique, qui se rencontre dans des milieux très différents.

Liste des abréviations

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AEE : Agence Européenne pour l'Environnement

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

CEN : Centre Européen de Normalisation

CMEI : Conseiller Médical en Environnement Intérieur

COV : Composés Organiques Volatils

CSTB : Centre Scientifique et Technique du Bâtiment

DSET : Département Santé Environnement Travail

ECENVIR : Évaluation de l'efficacité des Conseillers en ENVIRONNEMENT intérieur chez les patients asthmatiques

EDC : Electrostatic Dust Collector

EHESP : École des Hautes Etudes en Santé Publique

EPA : Environmental Protection Agency, Agence de protection de l'environnement

RH : Relative Humidity, Humidité relative

IgE : Immunoglobuline de type E

INPES : Institut national de prévention et d'éducation pour la santé

IRSET : Institut de Recherche Santé, Environnement et Travail

ISO : International Organization for Standardization, Organisation internationale de normalisation

LÉRES : Laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé

LPS : Lipopolysaccharides

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OQAI : Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur

PCR : Polymerase Chain Reaction, Réaction de polymérisation en chaîne

PNSE : Plan National Santé-Environnement

PEC : Polymères Extracellulaires

QAI : Qualité de l'Air Intérieur

q-PCR : PCR quantitative

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism, Polymorphisme de longueur de fragment de restriction

TSA : Trypto-caséine soja

UE : Unité d'Endotoxines

UFC : Unité Formant Colonie, unité de mesure utilisée en microbiologie pour exprimer la quantité de micro-organismes présents dans un échantillon

UMR : Unité Mixte de Recherche

VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

Liste des figures

Figure 1. Budget espace-temps d'un citoyen (Adapté de Klepeis et al., 2001).	14
Figure 2. Granulométrie des particules en fonction de leurs sources d'émission (Air et climat - CITEPA, 2012).	17
Figure 3. Courbes conventionnelles CEN (Comité Européen de Normalisation) définissant les fractions de taille des particules exprimées en pourcentage en fonction du diamètre aérodynamique des particules en μm (Atmospheres, 1993).	18
Figure 4. Les particules de poussière et le système respiratoire humain (Adapté de Le Coq, 2006).	19
Figure 5. Pourcentage des particules déposées par rapport à celles qui sont inhalées chez un homme respirant majoritairement par le nez (ligne continue) ou par la bouche (pointillés). La région extra-thoracique va du nez et de la bouche jusqu'au larynx. La région trachéo-bronchique va de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. La région alvéolaire est l'endroit où se font les échanges gazeux. Total : pourcentage total des particules déposées dans les voies respiratoires (Riva et al., 2013).	20
Figure 6. Principaux bioaérosols retrouvés dans les environnements intérieurs (Adapté de www.hqe.guidenr.fr).	22
Figure 7. Structure schématique des parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif (Adapté de Desautay, 2011).	24
Figure 8. Facteurs de risque d'une colonisation microbienne des voies respiratoires basses et d'une infection (Léophonte, 2001).	28
Figure 9. Structure schématique des lipopolysaccharides (LPS) (Adapté de Reich et al., 2016).	29
Figure 10. Influence des agents pathogènes sur l'homéostasie (Round and Mazmanian, 2009).	124
Figure 11. Éléments influençant l'apparition ou le développement des pathologies.	125
Figure 12. Le concept de pathobiome (Vayssier-Taussat et al., 2014).	126

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

Dans ce premier chapitre, la problématique de l'exposition aux bactéries en environnement intérieur sera présentée, en s'intéressant particulièrement aux effets des bactéries sur la santé humaine et aux principaux enjeux de santé publique qui en découlent. Puis, un état de l'art sur la mesure de l'exposition aux bactéries sera effectué afin de décrire les méthodes utilisées dans différents environnements intérieurs depuis plus d'une décennie.

I. Contexte

La notion de pollution de l'air est synonyme, en général, de la pollution atmosphérique, de l'air extérieur ou encore de l'air intérieur. En, France, en 1996, la loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie a défini la pollution en ces termes : « L'introduction par l'Homme directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives » (Journal Officiel de la République Française, 1996).

Malgré la réduction globale de la pollution atmosphérique, à l'exception du dioxyde de carbone, il y a consensus parmi les scientifiques pour admettre qu'il demeure une relation statistique plausible, entre les différents constituants de la pollution atmosphérique d'une part, et certaines maladies respiratoires et cardio-vasculaires à court et long terme d'autre part. En 2013, l'Agence Européenne pour l'Environnement (AEE) a estimé globalement que la pollution atmosphérique est à l'origine de 100 millions de jours de congés maladie et de 467 000 décès prématurés par an dans 41 pays européens, pour un coût sanitaire entre 59 et 189 milliards d'euros par an (Guerreiro et al., 2016). De plus, des enquêtes épidémiologiques ont établi une corrélation entre la pollution atmosphérique et la genèse de problèmes de santé publique (Billionnet, 2012).

Après la pollution atmosphérique, la pollution de l'air intérieur est depuis quelques années une préoccupation majeure aussi bien pour les pouvoirs publics et les professionnels de santé que pour la population générale.

Dans les pays industrialisés, tel que la France, la population passe jusqu'à 90% (Figure 1) de son temps dans des espaces clos ou semi clos (habitat, locaux de travail, transports,

restaurants, etc.) où elle est exposée à une multitude de polluants de nature chimique, physique, et biologique.

Depuis les années 70, une politique d'économie énergétique s'est mise en place, notamment en isolant au mieux les bâtiments (Dor et al., 2010) et en développant de nouveaux matériaux. Malgré la légitimité de ces actions, le confinement des bâtiments qui en résulte entraîne une importante concentration des polluants dans l'air intérieur, et donc la dégradation de sa qualité. De plus, de nombreuses personnes travaillant dans des immeubles de bureaux se sont plaintes d'inconfort ou de symptômes particuliers. Une mauvaise qualité de l'air est donc le plus souvent à l'origine de ces plaintes. Pourtant, beaucoup de cas semblent avoir une origine plurifactorielle. Ainsi, un groupe de travail de l'OMS a décidé en 1983 d'introduire le SBS (Sick Building Syndrome - Syndrome des Bâtiments Malsains) pour qualifier ces pathologies sans cause attribuable.

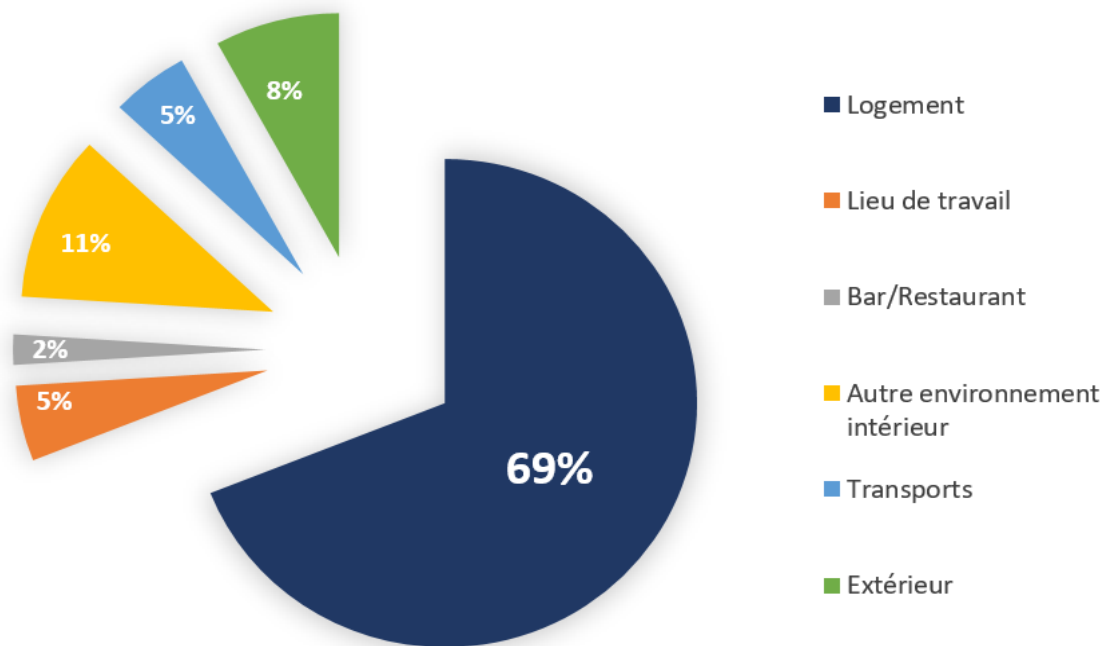


Figure 1. Budget espace-temps d'un citoyen (Adapté de Klepeis et al., 2001).

Parallèlement, depuis quelques années, une recrudescence des pathologies respiratoires est observée à travers le monde (Holland et al., 2014; Sethi et al., 2002). En 2013, d'après l'INSERM, l'ensemble des maladies allergiques (l'asthme, la rhinite, la conjonctivite, les allergies alimentaires) concernait 25 à 30 % de la population française et 7% pour la bronchite chronique (www.inserm.fr). Ce constat est d'autant plus inquiétant que l'asthme se place aujourd'hui au premier rang des pathologies de l'enfant dans les pays industrialisés (Heinrich, 2011). L'apparition ou l'aggravation de ces pathologies, considérées comme multifactorielles,

sont liées à l'existence de prédispositions génétiques mais pas seulement puisqu'elles restent également liées aux facteurs environnementaux (chimiques, physiques et biologiques). Aujourd'hui encore, une des problématiques de la recherche demeure ainsi l'identification de la part relative de chaque facteur dans ces pathologies respiratoires.

L'impact sanitaire de l'air intérieur est heureusement mieux pris en compte à présent. La création de l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) en 2001 en est un parfait témoignage. Les premiers composés participant au quotidien à une dégradation de la qualité de l'air intérieur sont de loin les particules dues aux combustions – tabagisme, équipements pour le chauffage et la cuisine – et les Composés Organiques Volatils (COV) émanant des produits ménagers. De plus, leurs effets néfastes par inhalation sur la santé humaine ne sont plus à démontrer (« Guide de la pollution de l'air intérieur », 2013). A l'heure actuelle, quelques valeurs guides concernant les polluants de l'air intérieur ont été proposées, mais seulement pour des contaminants chimiques. Par ailleurs, la responsabilité des contaminants biologiques dans l'apparition de troubles respiratoires en environnement professionnel est elle-aussi établie dans les milieux agricoles (Liebers et al., 2006; Williams et al., 2017). Ils sont de plus en plus incriminés dans le développement et l'aggravation de troubles touchant aux sphères ORL et broncho-respiratoires pour des expositions en air intérieur (Douwes et al., 2003). Au regard de la littérature scientifique, contrairement aux agents bactériens, l'impact sanitaire d'une exposition inhalée aux moisissures et à leurs composés est bien argumenté (Fischer and Dott, 2003).

Les maladies respiratoires représentent un coût considérable pour la société. En effet, rien qu'en France : le remboursement des traitements anti-asthmiques a enregistré une hausse de près de 60 % en moins de 7 ans, pour atteindre 970 millions d'euros en 2007 contre 608 millions en 2000. (Assurance Maladie, 2007).

En 2011, L'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) a estimé coût des effets d'une mauvaise qualité de l'air intérieur entre 12,8 et 38,4 milliards d'euros par an (Kirchner et al., 2011). L'Agence Nationale de Sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a récemment évalué le coût socio-économique de la pollution de l'air intérieur à environ 19 milliards d'euros par an et a montré que cette pollution peut causer 20 000 morts par an (Kopp, 2014).

Face à l'ampleur du phénomène et des coûts de prise en charge des pathologies respiratoires (en particulier de l'asthme : traitement, hospitalisation) que cela engendre, les pouvoirs publics ont, dans le cadre du PNSE 2, multiplié les Conseillers Médicaux en Environnement Intérieur (CMEI) pouvant se rendre au domicile des personnes souffrant de pathologies respiratoires sévères. Ces visites ont pour objectif de proposer aux patients des mesures ciblées destinées

à prévenir l'exposition aux facteurs de risque de ces pathologies (action n°23 ; article 40 de la loi du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en place du Grenelle de l'environnement). A ce propos, les interventions à domicile ont été initiées à Strasbourg en 1991 (De Blay et al., 2003) et consistent en la formulation de conseils : poser des housses anti-acariens, nettoyer la literie, supprimer/réduire le tabagisme, limiter l'accès aux animaux domestiques dans le logement, contrôler les moisissures murales, augmenter le taux de renouvellement de l'air. Ces mêmes auteurs ont argumenté le réel intérêt des CMEI : il s'agit d'un personnel compétent et formé pour repérer les risques, donner les conseils appropriés afin de les supprimer ou tout au moins les réduire, et capable de motiver les occupants à appliquer ces conseils. Les attentes sont d'autant plus grandes qu'une maladie comme l'asthme se place aujourd'hui au premier rang des pathologies de l'enfant dans les pays industrialisés (Heinrich, 2011).

Ces pathologies sont attribuées aux particules en suspension dans l'air qu'on respire et peuvent sédimenter sous forme de poussières et remisent en suspension par les activités dans l'habitat. La présence des poussières dans les environnements intérieurs, véritable substrat pouvant véhiculer des micro-organismes, est perçue par les occupants comme un manque d'hygiène et un abaissement de la qualité de l'air intérieur.

1. Exposition de l'Homme aux poussières

L'Homme de par son mode de vie, est exposé aux poussières véhiculées par l'air ambiant. La durée, la nature des particules, et autres caractéristiques déterminent les conséquences sur la santé de l'homme. Il est à rappeler que les poumons inhalent en moyenne 300 millions de litres au cours d'une vie et nous inspirons chaque jour, environ 12000 litres d'air (Silbernagl et al., 2000).

L'article R4222-3 du code de travail définit une poussière comme « une particule solide d'un diamètre aérodynamique au plus de 100 micromètres dont la vitesse de chute dans les conditions normales de températures, est au plus égale à 0,25 mètre par seconde ». Les particules de poussières sont caractérisées par 3 facteurs : le type de particules et leurs sources, le nombre ou la concentration des particules, la taille des particules (Choinière and Munroe, 1993).

Les particules sont des composés très hétérogènes du fait de leur diversité, composition chimique, de leur état (solide ou liquide) et de leur taille. La figure 2 illustre la taille des particules en fonction des sources d'émission.

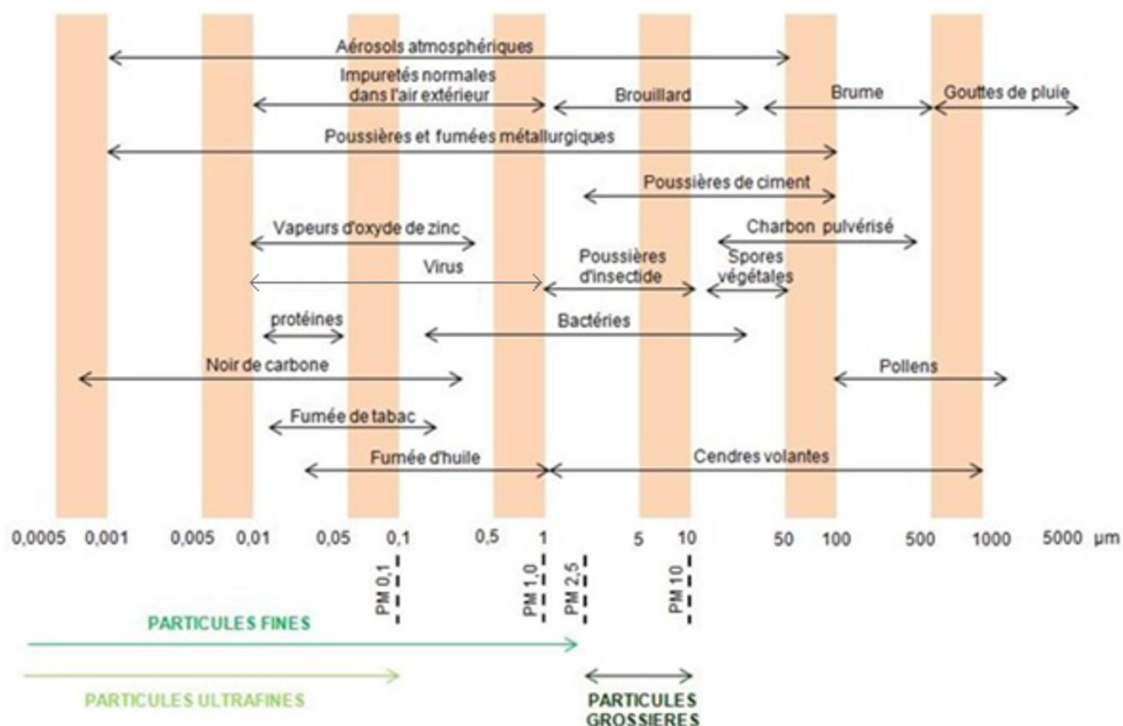


Figure 2. Granulométrie des particules en fonction de leurs sources d'émission (Air et climat - CITEPA, 2012).

La forme des particules est très variable. Certaines sont à peu près sphériques alors que d'autres forment des agrégats très irréguliers. C'est pourquoi on définit généralement la taille d'une particule par le diamètre d'une particule sphérique qui aurait les mêmes propriétés physiques. Ce n'est qu'une approximation dont le résultat dépend de la propriété physique retenue. Il n'existe pas une limite de taille claire entre les molécules et les particules les plus petites composées de quelques dizaines de molécules. La différence tient plutôt à leurs propriétés physiques. Par exemple, les particules ont généralement tendance à se fixer lorsqu'elles heurtent une surface solide alors que les molécules ont tendance à rebondir (Bâtiment, 2016).

Près du sol et dans les couches basses de l'atmosphère, les particules qui font entre 0,1 et 1 µm restent de quelques jours à quelques dizaines de jours dans l'air avant de se déposer. Récemment, Galès et al., (2015) ont étudié la distribution de taille de particules de microorganismes aéroportés émis dans les installations de compostage. Ils ont trouvé une prédominance des aérosols bactériens pouvant survivre plus longtemps dans l'air et être transportées sur de plus grandes distances par rapport à ceux se trouvant sur les débris. De plus, au vu de leur petite taille (allant de 0,6 µm à 1,6µm), la dynamique de leur dispersion dans l'atmosphère est comparable avec celle des particules de gaz. Ainsi, les mêmes modèles de dispersion peuvent y être appliqués.

Les particules sont entraînées par les mouvements de l'air dus aux différences de température (turbulences, convection, courants d'air) ou à un brassage mécanique (ventilation, déplacement des personnes). L'agitation thermique disperse les nanoparticules de façon homogène dans l'espace et les particules adhèrent aux parois lorsqu'elles les touchent. Pour les particules qui font plus de 1 μm , l'agitation thermique est contrebalancée par l'inertie qui favorise le dépôt sur place des particules. Les particules d'environ 0,3 μm restent longtemps en suspension car elles sont trop petites pour être sensibles à l'inertie et trop grosses pour être entraînées par l'agitation thermique (Bâtiment, 2016).

Selon la nature et la granulométrie des particules, il a été démontré leur rôle dans certaines atteintes fonctionnelles respiratoires, le déclenchement de crises d'asthme et même de décès pour cause respiratoire et cardio-vasculaire.

Les « grosses » particules ($> 10\mu\text{m}$), visibles à l'œil nu sont retenues par les voies aériennes supérieures (nez, gorge), elles ne pénètrent pas dans l'arbre respiratoire et peuvent être éliminés par la filtration des cils respiratoires et le réflexe de la toux.

Les particules « fines » ($< 2,5\mu\text{m}$) sont les plus dangereuses. Elles pénètrent au plus profond de l'arbre respiratoire et atteignent les voies aériennes terminales, se déposent et peuvent rejoindre le système sanguin. Selon Jones and Cookson (1983), 34 % des bactéries sont associées à la fraction « respirable » des particules ($D < 8 \mu\text{m}$). La figure 3 ci-dessus illustre les différentes fractions des particules et le niveau de pénétration après inhalation.

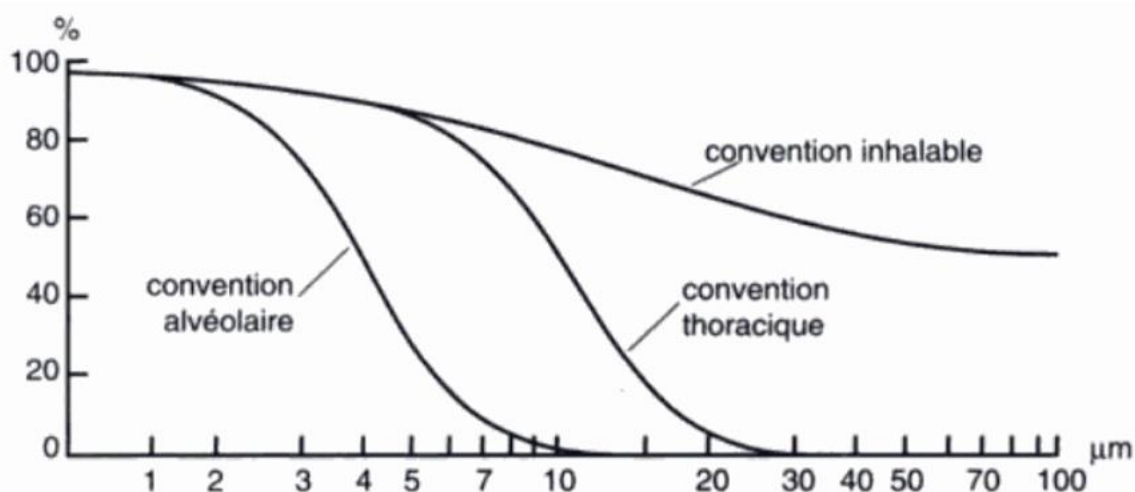


Figure 3. Courbes conventionnelles CEN (Comité Européen de Normalisation) définissant les fractions de taille des particules exprimées en pourcentage en fonction du diamètre aérodynamique des particules en μm (Atmospheres, 1993).

Ces particules peuvent véhiculer des composés toxiques, allergènes, composés cancérogènes et biologiques tels que les bactéries (Air et climat - CITEPA, 2012).

L'appareil respiratoire (figure 4) est constitué des voies aériennes supérieures : le nez, les voies nasales, la bouche et le pharynx jusqu'aux cordes vocales dans le larynx, et des voies aériennes inférieures : cordes vocales, trachée jusqu'aux alvéoles à l'extrémité de chacune des ramifications de l'arbre bronchique, comprenant notamment la trachée, les bronches et les bronchioles. Le système respiratoire comprend un certain nombre de filtres situés dans le nez et les voies respiratoires, servant à intercepter les particules de poussières avant qu'elles n'atteignent les bronches et les alvéoles pulmonaires.

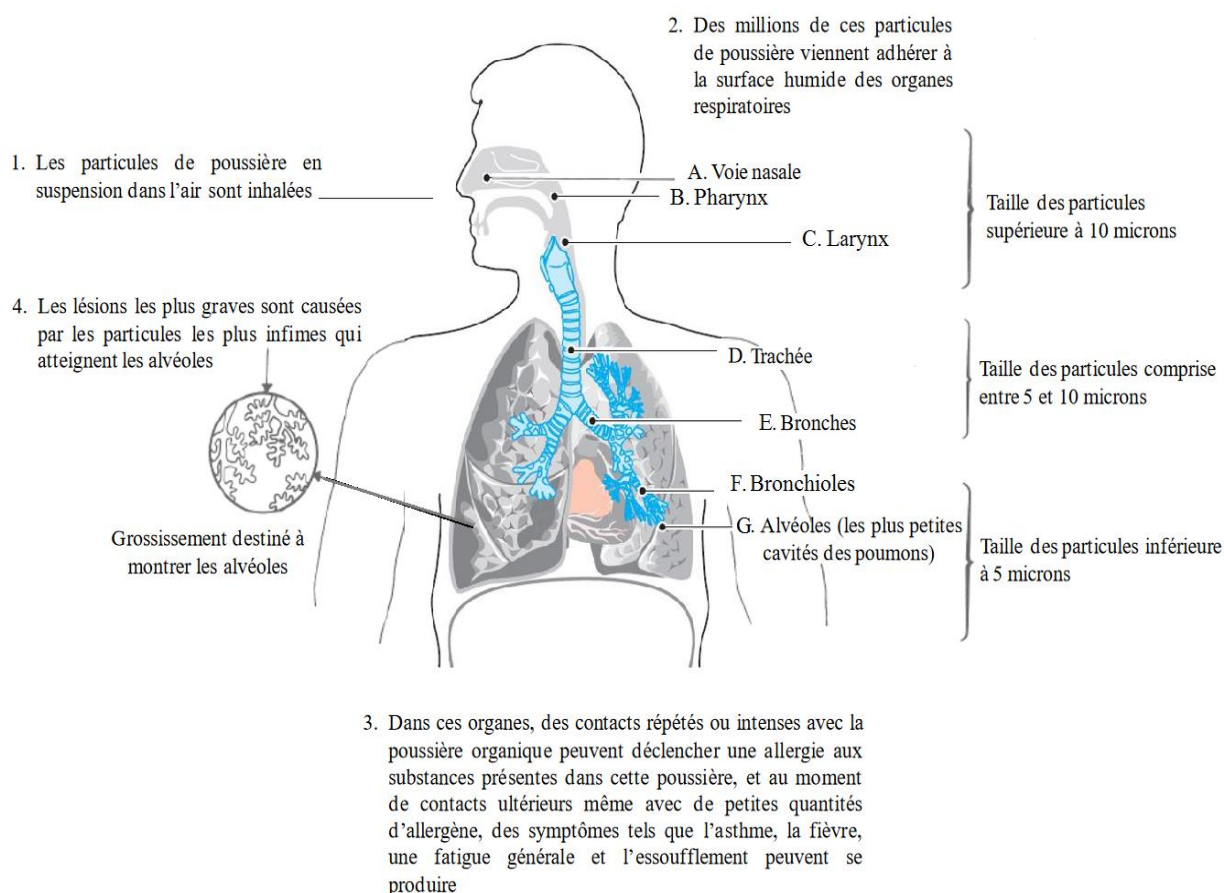


Figure 4. Les particules de poussière et le système respiratoire humain (Adapté de Le Coq, 2006).

L'inhalation constitue la voie d'exposition la plus importante dans les logements. Les particules de poussière qui pénètrent dans l'arbre respiratoire agissent comme une substance toxique sur les cellules avec lesquelles elles sont en contact, et sont perçues par le corps humain comme étant des corps étrangers contre lesquels celui-ci doit se défendre.

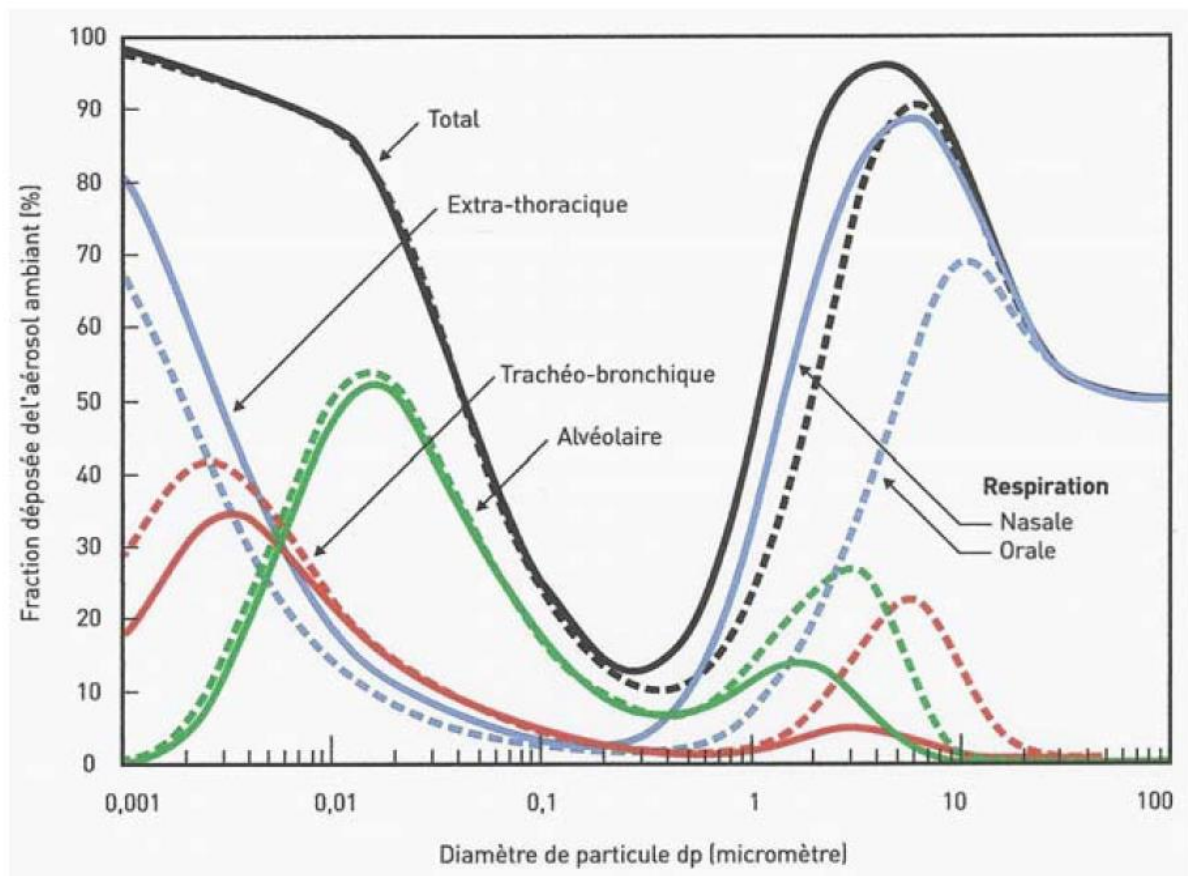


Figure 5. Pourcentage des particules déposées par rapport à celles qui sont inhalées chez un homme respirant majoritairement par le nez (ligne continue) ou par la bouche (pointillés). La région extra-thoracique va du nez et de la bouche jusqu'au larynx. La région trachéo-bronchique va de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. La région alvéolaire est l'endroit où se font les échanges gazeux. Total : pourcentage total des particules déposées dans les voies respiratoires (Riva et al., 2013).

2. Les réactions de l'organisme face à l'inhalation de poussières

Les principaux effets de la poussière sur la santé sont une réponse inflammatoire (irritation chronique) ou une réponse d'intoxication. On distingue deux types fondamentaux de réaction : les symptômes immédiats (irritation des yeux, congestion nasale ; écoulement nasal, ou irritation de la gorge), et les symptômes différés (maux de tête, étourdissements, nausées, essoufflement, fièvre, vomissements et toux). Les effets sur la santé vont se décliner en trois temps. En premier lieu, l'appareil respiratoire va subir des lésions temporaires qui disparaîtront au fil du temps lorsque la personne touchée cessera d'être en contact avec la poussière. Ensuite, l'appareil respiratoire peut être atteint de lésions insidieuses telles que la bronchite ou l'asthme à la suite d'un contact prolongé avec la poussière. La réaction n'a pas le caractère d'une réaction allergique mais se traduit par divers symptômes dont la diminution de la capacité pulmonaire. Cependant, chez les

personnes en contact avec la poussière pendant un temps donné et qui cessent d'être exposé, l'appareil respiratoire peut se rétablir complètement. En effet, la réaction de l'appareil respiratoire à l'inhalation de particules de poussière dépend dans une large mesure de la zone où elles se déposent. Par exemple, lorsque des particules de poussière irritantes se logent dans le nez, elles peuvent causer une rhinite. Par contre, si elles s'attaquent aux plus larges voies aériennes, elles peuvent engendrer une inflammation des muqueuses de la trachée (trachéite) ou des bronches (bronchites). Les réactions les plus importantes du poumon se produisent dans les parties les plus profondes de cet organe. Les particules qui ne sont pas éliminées par le nez ou par la gorge vont généralement se loger dans les sacs alvéolaires ou près des extrémités des voies aériennes. Cependant, une quantité excessive de poussière peut faire échec au mécanisme de défense assuré par les macrophages. Les particules de poussières et les macrophages chargés de poussière s'accumulent alors dans les tissus des poumons, causant des lésions pulmonaires. La quantité de poussière et le type de particules en cause influent sur la gravité des lésions pulmonaires (SST, 2017).

On connaît mal les mécanismes d'élimination des particules qui se déposent dans les poumons. En première approximation, on considère que :

- **les particules solubles** sont dissoutes et absorbées.
- **les particules insolubles** qui se sont déposées dans la région trachéo-bronchique sont mises en mouvement par les cils des cellules qui tapissent la surface des bronches et repoussées dans le tube digestif (99 % des particules sont éliminées au bout de 48 heures). Une couche de mucus facilite le transport jusqu'au tube digestif.
- **les particules insolubles** qui se sont déposées dans les alvéoles sont phagocytées puis éliminées. Les nanoparticules fibreuses qui sont trop longues pour être phagocytées forment des points d'inflammation chronique (amiante, grands nanotubes de carbone, etc.).

3. Les particules de poussières vectrices des aérosols en particulier les bioaérosols

Les aérosols sont constitués de particules inertes, solides ou liquides, en suspension dans l'air pour autant que leur taille le leur permette (Sherertz, 1993). Certaines d'entre-elles véhiculent des micro-organismes (bactéries, moisissures, virus) mais aussi pollens, algues et acariens, leurs fragments ou leurs sous-produits. Ces particules biologiques, isolées ou en agrégats, vivantes ou inertes, s'appellent des bioaérosols (Sherertz, 1993).

Les bioaérosols sont des micro-organismes aéroportés omniprésents dans notre environnement. L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) définit les bioaérosols comme étant des particules aéroportées constituées d'organismes vivants, tels que des micro-organismes (bactéries, moisissures, virus, protozoaires), ou provenant d'organismes vivants (toxines, micro-organismes morts ou fragments microbiens) (Macher, 1999). Ces structures biologiques complexes peuvent être aéroportées et/ou aérodéposées à l'intérieur d'un habitat, véhiculées par les courants d'air dus à la ventilation naturelle ou mécanique (Salthammer, 1999). Leur transport et leur destination sont liés à leurs propriétés physiques (taille, densité, forme) et aux facteurs environnementaux (température et humidité relative) dans lesquels elles évoluent.

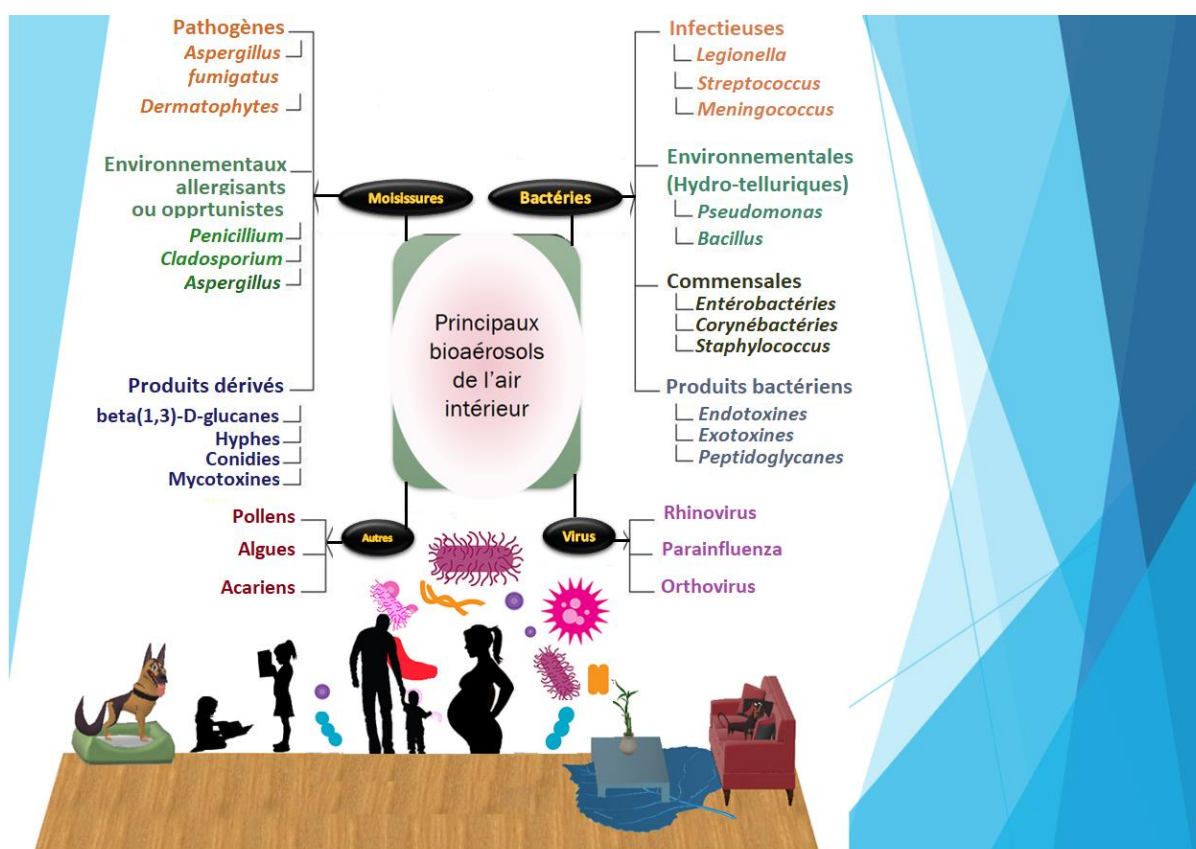


Figure 6. Principaux bioaérosols retrouvés dans les environnements intérieurs (Adapté de www.hqe.guidenr.fr).

La majorité des bioaérosols sont de dimensions respirables de 0,02 à 1 micromètre pour les virus, 0,2 à 5 µm pour les bactéries et de 1 à 50 µm pour la majorité des moisissures et levures.

Certains types de bioaérosols ne sont que peu influencés par les conditions extérieures. Ils bénéficient alors de structures qui les protègent des stress dus à leur environnement comme la sécheresse, de fortes températures, de la présence des rayons U.V. ou de radiations solaires, et de certains composés chimiques et ioniques dans l'air. Il s'agit des formes

sporulées des bactéries ou des spores de champignons, ainsi que de certains virus : tous sont protégés par une enveloppe lipidique très résistante (Batterman and Burge, 1995).

L'intérêt pour les bioaérosols s'est ainsi considérablement accru ces dernières années. Il est désormais prouvé que des expositions trop importantes ou trop longues à des agents biologiques dans les espaces intérieurs peuvent être associées à des problèmes de santé d'une grande variabilité (Douwes et al., 2003).

Le rôle des moisissures a été établi dans la survenue de troubles respiratoires en particulier dans l'exacerbation de l'asthme, mais aussi les effets allergisants, toxiques et infectieux (Fisk et al., 2010; Reboux et al., 2010). L'Organisation Mondiale de la Santé a d'ailleurs défini des lignes directrices en matière de qualité en environnement intérieur pour les moisissures dans les logements (Nasir et al., 2012). Ce n'est que récemment que la communauté internationale s'est intéressée aux bactéries ambiantes. Les bioaérosols bactériens peuvent varier en nature et en charge en fonction du milieu considéré (Johansson et al., 2011), des paramètres telles que la température, l'humidité, les conditions météorologiques ou la saison (Nasir et al., 2012) de l'occupation des locaux et du renouvellement de l'air (Madsen et al., 2012). Les populations bactériennes des habitations sont ainsi différenciées en fonction de ces caractéristiques (Dannemiller et al., 2016).

a. Les bactéries

Les bactéries appartiennent au vaste ensemble des micro-organismes qui comprennent également les virus, les champignons et les parasites. Ce sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire.

Elles contiennent un seul chromosome qui se présente sous la forme d'un long filament d'ADN pelotonné sur lui-même. On trouve dans le cytoplasme de petits fragments d'ADN circulaires, les plasmides.

Les bactéries sont rangées en plusieurs catégories selon leur forme et leur type de mobilité : spirochètes qui sont de longues bactéries fines (0,1 à 3 μm sur 5 à 250 μm) en forme d'hélice souple, les bacilles et les coques, vibroïdes et hélicoïdales, incurvées, pédonculées, filamenteuses, mycéliennes, etc.

Leur multiplication se fait par fission binaire (une bactérie donne deux bactéries filles), d'où une multiplication exponentielle. Le temps de génération varie de 20 min à 24 h ou plus, selon l'espèce considérée.

La paroi bactérienne est une structure rigide, appelée peptidoglycane, macromolécule réticulée faite de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts peptides, responsable de la forme des bactéries, et leur permettant de résister à la lyse osmotique. Elle est présente chez toutes les bactéries, à l'exception des mycoplasmes. Sa structure varie selon les bactéries et conditionne leur aspect après la coloration de Gram. Les bactéries dont la paroi résiste à l'alcool restent colorées par le violet de gentiane et sont dites à Gram positif. Les bactéries dont la paroi est perméable à l'alcool perdent leur coloration par le violet de gentiane et sont colorées en rose par la fuchsine, ce sont les bactéries à Gram négatif.

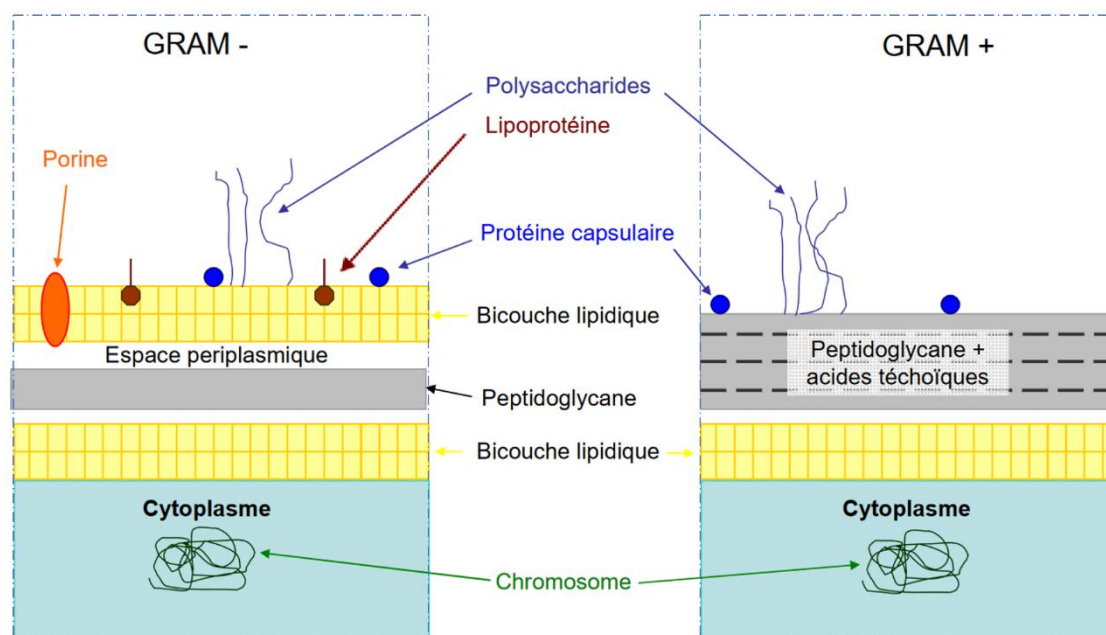


Figure 7. Structure schématique des parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif (Adapté de Desaunay, 2011).

Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est mince et la paroi a une structure plus complexe. A l'extérieur du peptidoglycane se trouve une structure appelée membrane externe. Son feuillet externe porte des molécules de lipopolysaccharide. Le lipopolysaccharide est composé d'une partie lipidique qui possède des propriétés toxiques et d'une partie polysaccharidique qui porte des spécificités antigéniques.

Les bactéries à Gram négatif peuvent survivre pendant les périodes dont la durée est fonction de la grosseur des gouttelettes projetées, de la température de l'air, de son humidité relative et de la présence d'un substrat pour voyager.

Selon les conditions environnementales, les bactéries peuvent s'entourer d'enveloppes supplémentaires plus ou moins structurées ou diffuses. De très nombreuses bactéries sont

capables de synthétiser des polymères extracellulaires (EPS) à leur surface qui peuvent, éventuellement, être libérés dans le milieu. Ces polymères sont élaborés de manière préférentielle lorsque les bactéries sont dans un milieu hostile car ils apportent une protection ou un moyen de coloniser l'environnement dans lequel elles sont confrontées. Parmi les polysaccharides de surface, on peut distinguer la capsule et les couches muqueuses ou slime. La capsule correspond à une structure bien organisée, facilement mise en évidence par des techniques simples alors que le slime correspond à des constituants polysaccharidiques plus ou moins libérés dans le milieu et ne constituant plus une véritable entité morphologique. Ces structures sont très réactives et leur développement conduit à la formation d'un assemblage, complexe, stable, structuré et très réactif appelé biofilm. Ces derniers sont très répandus dans les milieux naturels et permettent aux bactéries de se protéger des environnements hostiles (Desaunay, 2011).

Certaines espèces de bactéries à Gram positif ont la capacité de sporuler dans des conditions de stress. Les spores bactériennes (endospores) présentent une incroyable capacité de résistance à la chaleur, la dessiccation et aux composés chimiques et parviennent parfois à survivre pendant des centaines d'années.

Dans ce cas, les spores bactériennes sont incapables de se diviser, ont un contenu en eau très faible et disposent de niveaux de charge énergétique potentielle très faible. Lorsque le milieu sera à nouveau favorable la cellule germera et pourra encore se diviser et reprendre une activité normale.

Les bactéries Gram négatif ont une paroi cellulaire plus fragile qui supporte mal une déshydratation notamment lors d'un passage prolongé dans l'air (Goyer et al., 2001).

b. Les sources d'exposition aux bactéries en environnement intérieur

Les sources potentielles d'exposition directe pour les occupants à des spores ou à des fragments bactériens incluent principalement :

- Les occupants eux-mêmes et leurs activités au sein de leur habitat (Hospodsky et al., 2012),
- La prolifération des bactéries dans les systèmes de chauffage, ventilation et de climatisation (CVC), par lesquels les produits bactériens tels que les spores peuvent pénétrer dans l'environnement intérieur (Meadow et al., 2014).
- Les spores et les fragments bactériens retransmis dans la poussière des moquettes et des planchers, qui peuvent se disperser dans l'air intérieur et dans les poussières

domestiques quand ils sont soulevés par les occupants ou après l'utilisation d'aspirateurs.

- Les animaux de compagnie, les chats et les chiens en général sont considérés comme des sources potentielles de contamination biologique à l'intérieur de l'habitat (Scherer et al., 2016).
- L'air extérieur est une source pour toutes les particules qui peuvent pénétrer à l'intérieur des maisons, et que l'on ne peut pas négliger (Adams et al., 2015).

c. Les effets sur la santé associés aux bactéries

Malgré l'introduction de nouvelles générations d'antibiotiques, les infections des voies respiratoires demeurent une cause importante de morbidité et de mortalité. En effet selon l'OMS, ces infections constituent la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde (à l'origine de 3,2 millions de décès en 2015).

Les voies respiratoires sont particulièrement exposées aux infections. Des agents microbiens en suspension dans l'air, tels que les bactéries, sont inhalés en permanence ou aspirés à partir des sécrétions colonisées ou infectées de la cavité buccale (Léophonte, 2011). Le processus pathologique (Figure 8) est engendré par l'inhalation de particules contaminées, la diminution des défenses naturelles favorisées par le froid, le tabagisme, la mucoviscidose et l'immunosuppression.

Les effets sur la santé liés aux bactéries sont surtout connus pour les pathologies infectieuses qu'elles induisent en se développant dans l'organisme. Selon la nature des bactéries, le type de transmission et l'état de santé des personnes exposées, les effets seront très différents.

Certaines bactéries peuvent synthétiser des substances ou être constituées de composés qui peuvent présenter des caractéristiques toxiques pour l'organisme (par exemple : endotoxines). Les atteintes à la santé par inhalation sont parfois documentées comme pour les endotoxines, mais actuellement, peu de données scientifiques existent concernant les effets toxiques liés à une exposition par inhalation aux bactéries ou à leurs produits.

Des effets immuno-allergiques sont également possibles liés à une réaction du système immunitaire à des antigènes portés ou issus des bactéries. Les protéines ou glycoprotéines solubles qui entrent dans la constitution des bactéries, ou qui sont des sous-produits de leur métabolisme, constituent des allergènes potentiels chez un individu exposé.

Certaines bactéries, comme les actinomycètes thermophiles (compost), ou certaines bactéries à Gram négatif comme *Erwinia herbicola* (végétaux en décomposition), ou certaines bactéries

pour être à l'origine de pathologies respiratoires allergiques. De plus, elles peuvent être à l'origine de pneumopathies d'hypersensibilité, beaucoup plus rarement d'asthme, voire des deux affections intriquées.

Les bactéries peuvent être dissimulées à l'intérieur des édifices et provoquer des maladies. Les effets sur la santé respiratoire humaine de la contamination biologique de l'air intérieur ont fait l'objet de recommandations internationales (WHO, 2009).

Récemment, des travaux ont montré qu'une source de bactéries dans l'habitat était liée à la fréquentation des occupants eux-mêmes que ce soit l'homme ou les animaux (Madsen et al., 2012). Toutefois, il n'a pas été identifié de genres bactériens susceptibles d'être à l'origine des pathologies respiratoires, même si une étude récente suggère un lien entre la présence de *Stenotrophomonas* et les troubles respiratoires (Kettleson et al., 2013).

Les bactéries retrouvées, lors de précédentes études en air intérieur, sont pourtant proches d'espèces très pathogènes dans la sphère ORL et respiratoire (Xu and Yao, 2013), comme le genre *Mycobacterium* par exemple (Täubel et al., 2011). De plus, la potentielle pathogénicité de certaines familles bactériennes environnementales a été établie.

Les effets pro-inflammatoires des Archaea ont été démontrés lors d'une étude *in vivo* (Lecours et al., 2011). Identifiées à l'origine dans des milieux extrêmes tels que les sources d'eau chaude, ces bactéries ont été mises en évidence dans les atmosphères d'élevages (Nehmé et al., 2009). Les propriétés pro-inflammatoires du genre *Streptomyces*, genre bactérien très étudié en environnement intérieur, sont également reconnues (Rintala et al., 2004).

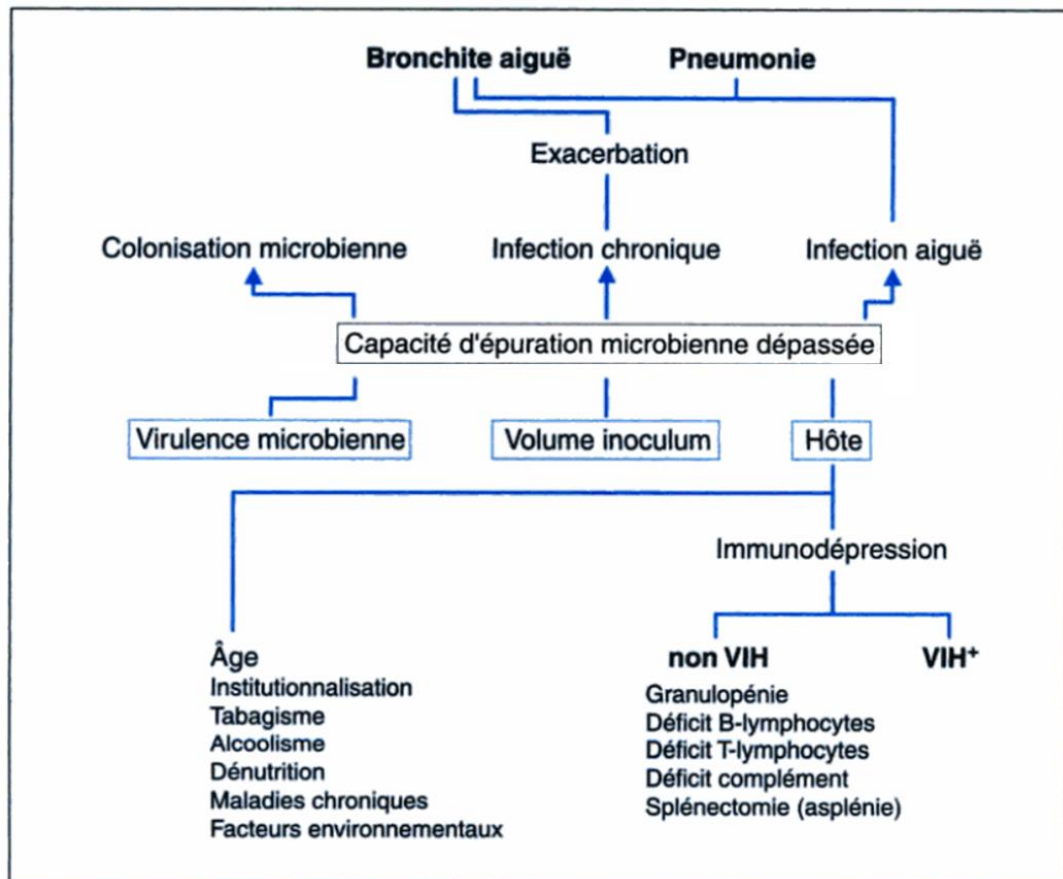


Figure 8. Facteurs de risque d'une colonisation microbienne des voies respiratoires basses et d'une infection (Léophonte, 2001).

La symptomatologie respiratoire se manifeste par les principales réactions suivantes (Persoons et al., 2010) :

- **Des réactions inflammatoires** (bronchites chroniques).
- **Des réactions allergiques** ou réactions immuno-allergiques (rhinites, sinusites, asthme allergique).
- **Des risques toxiques** peuvent également être liés à des composants de micro-organismes et sont susceptibles d'engendrer des problèmes respiratoires (voir plus bas)
- **Des symptômes aigus**, tels que : toux sèche, dyspnée, accompagnés par une fonction réduite de l'activité pulmonaire, de la fièvre et un malaise général. Après plusieurs heures, les symptômes suivants peuvent se développer : broncho constriction, maux de tête et des douleurs articulaires.

Même si le rôle des bactéries dans le développement ou l'aggravation de pathologies respiratoires reste à confirmer, une étude a montré un lien statistiquement significatif entre

l'apparition de troubles respiratoires tous confondus et la charge bactérienne de l'air intérieur (Flores et al., 2009).

d. Un cas particulier : Les endotoxines

Les endotoxines (du grec : endon = intérieur et toxicon = poison), sont des substances biologiques toxiques (toxines). Ce sont des éléments constitutifs de la paroi de toutes les bactéries Gram négatif et de certaines algues bleues ou vertes (Lei and Morrison, 1988). Cette paroi est constituée de trois couches : Une membrane interne ou cytoplasmique qui sert de barrière osmotique, une membrane intermédiaire à base de peptidoglycanes, qui maintient l'intégrité de la structure et de la forme caractéristique de la bactérie et une membrane externe contenant les lipopolysaccharides (LPS), identifiés dans toutes les bactéries Gram négatif responsables d'une partie de l'activité biologique (Duquenne et al., 2011).

Les endotoxines peuvent être libérées lors de la lyse cellulaire, et à moindre degré lors de leur multiplication, et être présentes dans les bioaérosols. Elles sont connues en santé publique, en raison des effets toxiques déclenchés lors des infections graves aux bactéries Gram négatif ou lors de l'utilisation de produits médicaux contaminés (soluté de perfusion, liquide de dialyse, etc.) (Brade, 1999). Les LPS (Figure 9), parties biologiquement actives des endotoxines, sont eux-mêmes constituées de deux parties : une partie polysaccharidique et une partie phospholipidique, le lipide A, siège de l'activité pro-inflammatoire.

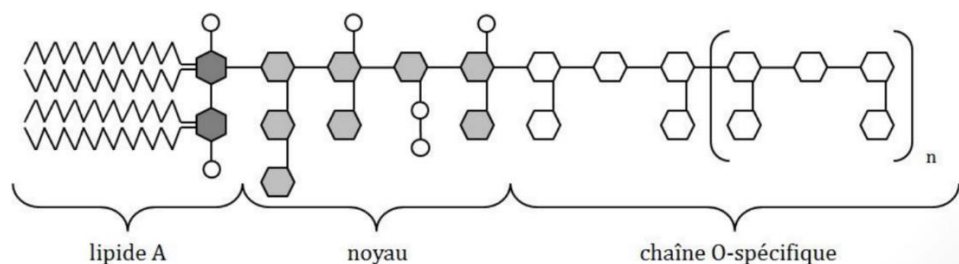


Figure 9. Structure schématique des lipopolysaccharides (LPS) (Adapté de Reich et al., 2016).

Lors d'une infection bactérienne, les LPS jouent un rôle important dans l'activation du système immunitaire et, en conséquence, dans le contrôle de l'infection. Toutefois, ils peuvent devenir toxiques pour l'hôte, notamment lorsqu'ils induisent une production excessive de cytokines. Au cours du processus infectieux, les LPS participent au développement de l'inflammation tissulaire en activant le système du complément, ce qui

entraîne une production importante du composant C3b deviennent alors la cible des cellules phagocytaires.

Au sein des logements, les concentrations les plus élevées en endotoxines sont retrouvées au niveau des poussières sédimentées pour des valeurs comprises entre 10 et 200 UE/m³ selon les sources (Frankel et al., 2012). Le risque endotoxinique en relation avec des troubles respiratoires en air intérieur peut provenir des endotoxines présentes dans l'air ou de celles remises en suspension à partir des poussières sédimentées (Adhikari et al., 2010; Wang et al., 2012). Par ailleurs, autre constat inquiétant, la majeure proportion des endotoxines retrouvées dans l'air serait associée à des particules < 1 µm, c'est-à-dire un diamètre leur permettant d'atteindre l'ensemble des voies respiratoires (Kujundzic et al., 2006). Une exposition à des concentrations doublées en endotoxines se traduirait par une augmentation significative du nombre d'épisodes pathologiques respiratoires chez les enfants de moins de deux ans (Dales et al., 2006).

Les suspicions portées sur ces composés membranaires bactériens ont amené les autorités sanitaires néerlandaises à fixer une limite d'exposition professionnelle à 90 UE/m³ (Health Council of the Netherlands, 2010). Cette Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) fut ensuite reprise de manière consensuelle dans la littérature. De plus, le Centre Européen de Normalisation (CEN) a développé des lignes directrices pour l'évaluation de l'exposition aux endotoxines (Spaan et al., 2007). Le risque endotoxinique est donc reconnu en milieu professionnel, mais qu'en est-il du risque pour les expositions chroniques à des concentrations faibles au sein de l'habitat ? (Preller et al., 1995).

Les concentrations en endotoxines dans l'air ambiant d'une pièce semblent dépendre de la présence ou non d'enfants, de la présence ou d'animaux domestiques, du nombre de résidents, de la prise de repas (Thorne et al., 2009), de l'occupation des lieux (Madsen et al., 2012). Au niveau des poussières, les concentrations en endotoxines ont été démontrées significativement augmentées en présence d'enfants (Waser et al., 2004) et d'animaux domestiques (Casas et al., 2013), et lorsque la fréquence des tâches ménagères est faible (Ownby et al., 2013). Au contraire, le tabagisme n'aurait aucune incidence sur la concentration en endotoxines retrouvée dans les poussières. Ces différents critères pourraient être perçus comme des prédicteurs de la contamination de l'environnement intérieur en endotoxines (Giovannangelo et al., 2007; Thorne et al., 2009).

Mais les endotoxines ne sont pas les seuls composés bactériens à être mis en relation avec des troubles respiratoires. Les β(1→3)-D-glucanes sont également suggérés dans la littérature comme un facteur aggravant des troubles respiratoires (Douwes, 2005). Des études suggèrent un phénomène d'hypersensibilité impliquant une synthèse

d'immunoglobulines de type E (IgE) anti- $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanes (Douwes et al., 2000; Mandryk et al., 1999) ont mis en évidence une diminution du débit expiratoire de pointe chez les enfants asthmatiques par les $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanes. Contrairement aux endotoxines, les concentrations mesurées dans l'air en $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanes sont comparables à celles retrouvées au sein des poussières domestiques sédimentées, voire supérieures (Adhikari et al., 2010). Les parts respectives de responsabilité dans la survenue de troubles respiratoires à attribuer aux endotoxines et aux $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanes sont difficiles à déterminer, notamment dans le cadre d'études épidémiologiques, car les expositions aux endotoxines et aux $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanes sont souvent concomitantes, pour des effets physiopathologiques similaires (Douwes, 2005).

4. L'influence des facteurs environnementaux

A une température normale, la survie des agents pathogènes dans les bioaérosols et en particulier des bactéries, dépend de l'humidité de l'air. Le critère important est l'humidité absolue (la quantité de vapeur d'eau dans l'atmosphère) et pas l'humidité relative (la quantité actuelle de vapeur d'eau par rapport à la quantité maximale possible à cette température). L'humidité absolue maximale décroît très vite lorsque la température diminue.

Les effets de l'humidité sont complexes dans le cas des bactéries. Ils dépendent notamment de l'état physiologique des bactéries au moment où se forme l'aérosol. De plus, les résultats des expériences varient selon la façon de mesurer la survie des bactéries (certaines bactéries restent infectieuses alors qu'on ne peut plus les cultiver dans les conditions habituelles).

Certains types de bactéries se retrouvent dans les humidificateurs contaminés des systèmes de ventilation. Elles causeraient le syndrome appelé « fièvre des humidificateurs ». Ce syndrome est une réponse à des allergènes transportés qui comprennent les endotoxines d'un bon nombre de bactéries gram négatif. Le contact direct avec l'environnement et l'exposition permanente aux micro-organismes en suspension dans l'air que l'homme respire, permettent d'expliquer la fréquence de ces infections. Certains de ces micro-organismes sont particulièrement pathogènes et peuvent atteindre des sujets sains même à partir de faibles concentrations (Schachter, 1999).

II. Mesure de l'exposition bactérienne en environnement intérieur

L'exposition aux bactéries en environnement intérieur est à l'origine de plusieurs enjeux de santé publique. Au cours de cette thèse, une revue critique de la littérature a permis de faire la synthèse des méthodes fréquemment utilisées pour évaluer l'exposition bactérienne les logements et des besoins identifiés (Article 1).

1. Un constat majeur : Le besoin d'outils quantitatifs

A l'heure actuelle, l'étude des bactéries en environnements intérieurs demeure au second plan dans les démarches entreprises pour l'évaluation la qualité de l'air intérieur par rapport aux différentes méthodes de mesures développées pour détecter des spores ou des composés fongiques. Et lorsque ces démarches ont lieu, seule une mesure de la concentration de la flore bactérienne cultivable est effectuée, sans chercher à en évaluer la diversité (Chan et al., 2009).

De plus, les techniques existantes ne sont généralement pas totalement caractérisées et un effort de standardisation est encore nécessaire pour pouvoir comparer les résultats obtenus par différents opérateurs avec une même technique (Huang et al., 2017). Ainsi, plusieurs rapports concluent que davantage de recherche est nécessaire pour mettre au point des méthodes de mesures quantitatives de l'exposition aux bactéries (Nazaroff, 2016).

2. Discussion sur les méthodes fréquemment utilisées

La mesure de l'exposition aux bactéries correspond à une étape d'échantillonnage, puis à une étape d'analyse pour caractériser et/ou quantifier la flore bactérienne et ses composés bactériens. Des méthodes communes ont été identifiées dans ce travail bibliographique, mais certaines pratiques sont spécifiques aux environnements étudiés (Revue de littérature).

Historiquement, les outils les plus utilisés pour mettre en évidence les bioaérosols sont basés sur la culture car elle est facile à mettre en œuvre et peu onéreuse (Peccia and Hernandez, 2006). La culture permet de mettre en évidence la viabilité et l'infectiosité des bactéries identifiées et c'est pour cette raison qu'elle continue à être utilisée en particulier dans les situations où il est important de connaître cette viabilité. Cependant, la culture ne permet de mettre en évidence qu'environ 1% des agents (Pace, 1997).

De plus, la méthode culturale est l'approche traditionnelle pour quantifier les bactéries quel que soit l'environnement investigué. Le type de milieu de culture et les conditions d'incubation

diffèrent néanmoins selon les études. Au cours des dernières décennies, les techniques d'analyses ont bénéficié de l'essor général des techniques microbiologiques. Ainsi, les micro-organismes ne sont plus seulement dénombrés au microscope ou après culture, mais quantifiés au moyen de techniques moléculaires, immunologiques et biochimiques.

Les techniques basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), ont rapidement montré leur intérêt pour mettre en évidence les bactéries non cultivables (Alvarez et al., 1994; Nehme et al., 2008; Oppliger et al., 2008) grâce à l'utilisation du gène codant pour l'ARN 16S en particulier.

Les outils métagénomiques se sont intéressés aux communautés bactériennes, en particulier les microbiotes du tube digestif et de la peau humains (Grice and Segre, 2011) mais peu aux communautés de l'environnement intérieur. Elles ont simplement été utilisées récemment pour décrire les populations bactériennes sur les surfaces dans les habitats (Flores et al., 2013; D. Hospodsky et al., 2012; Sordillo et al., 2011) et une autre étude s'est intéressée à l'air dans un musée (Gaüzère et al., 2014).

Trois grands types de prélèvements peuvent être réalisés en environnement intérieur (Frankel et al., 2012):

- Les prélèvements d'air peuvent être effectués par différents systèmes de collecte (systèmes à impaction, collecteurs cycloniques, systèmes de filtration). Les volumes d'air prélevés doivent être adaptés au niveau de contamination attendu de l'environnement (très chargé dans les élevages agricoles à très propres à l'hôpital) et l'objectif de l'étude (prélèvement ponctuel dans le cadre d'une surveillance environnementale, ou mesurage représentatif d'une exposition sur le long terme, voire étude de l'exposition individuelle).
- Les prélèvements de surface utilisant des boîtes de contact gélosées ou des écouvillons sont souvent utilisés dans le domaine hospitalier ou dans les laboratoires pour vérifier l'efficacité des mesures de prévention et de nettoyage-désinfection. Incidemment, l'application directe d'un ruban adhésif peut être utilisée si une tâche suspecte est repérée dans un bâtiment pour en caractériser l'origine.
- Les poussières sont fréquemment prélevées sur des surfaces horizontales des logements ou des lieux de travail. Elles ont l'avantage de représenter une exposition cumulée sur une certaine période. Elles peuvent être collectées par prélèvement actif par aspirateur ou passif par collecte sur lingette électrostatique. L'avantage des lingettes réside dans leur simplicité d'utilisation et surtout le fait que, dans le cadre d'études de la contamination des logements en bioaérosols, elles peuvent être facilement disposées directement par l'occupant. De plus, une expédition postale vers le laboratoire d'analyse permet de diminuer, de façon très

importante, les coûts de prélèvement souvent rédhibitoires dans ce type d'études (Noss et al., 2008, 2010).

Il est à noter que le type de prélèvement doit être adapté en fonction de ce qui doit être mis en évidence. Si l'on veut détecter des légionelles dans un aérosol, il vaut mieux utiliser un prélèvement en milieu liquide qui préservera davantage l'intégrité de la bactérie. Par contre, si l'on cherche à mettre en évidence des spores bactériennes, un prélèvement de poussière, cumulatif, sera plus judicieux.

3. Revue de la littérature

Indoor bioaerosols: a focus on bacteria exposure, health risks and measurement methods

Indoor bioaerosols: a focus on bacteria exposure, health risks and measurement methods

Yanis Guenoune^{1,2,3*} and Pierre Le Cann^{1,2,3}

¹EHESP School of Public Health, Rennes, France

²Inserm UMR 1085-IRSET, Rennes, France

³University Sorbonne Paris Cité, Paris

**Corresponding author:*

Yanis Guenoune, Environmental and Health Laboratory, EHESP School of Public Health, Avenue
Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 RENNES Cedex, France

yanis.guenoune@ehesp.fr, +33 (0)2 99 02 26 51

Abstract

Environmental factors are among the major determinants of health. These factors generate the degradation of air quality which lead to diverse and various respiratory pathologies including simple discomforts, allergies, asthma exacerbation, and more severe respiratory diseases which may become cardiovascular disease.

Besides the extensive studies of atmospheric pollution, indoor air pollution is a recent public health concern. As the general population spend almost 90% of their time indoor, bioaerosols may play an important role in these pathologies.

Although the World Health Organization has defined indoor environmental quality guidelines for monitoring mold contamination, the role of bacteria in health respiratory disease is still largely misunderstood.

This article is a review of the recent scientific literature on the impact of bioaerosol on health, and focus on the origin of bacteria indoor and the technical challenges to rely the presence of bacteria to health troubles.

Keywords: Environmental health, Indoor, Microbial contamination, Bioaerosols, Exposure.

Introduction

The concept of air pollution is usually accepted as pollution from outside, streets, cities, and that which is prompt in the workplace. Moreover, to establish a correlation between air pollution and the genesis of diseases including respiratory, epidemiological investigations have focused on the measurement of outdoor contaminants to buildings.

But in recent years, there has been a growing interest in the quality of indoor air. So, many scientists have shown that the air inside homes and buildings could be heavily polluted or even more than the outdoor air.

In modern societies, people spend 80-90% of their time indoors. Monitoring the quality of the indoor air found that adults spend an average of only one hour a day outside, and the rest of the time in a closed environment (home, work, and transport). Time spent indoors is even more important for certain categories of vulnerable people, such as children, the elderly and the sick. The exposure time is longer and the risk to health becomes more important.

Numerous pollutants contaminate the indoor environment: chemical, gaseous or particulate, allergens and other microbiological contaminants including molds, bacteria, and viruses whose concentrations are variable in time and space. Materials, temperature, humidity, ventilation, air exchange between outside and inside, but also human activities and the presence of animals, are emission sources and influence concentrations of pollutants and contaminants.

In addition, the energy saving measures has increased the insulation of air space and renewal and inadequate ventilation.

In this review, after describing the bioaerosols and their formation, we will discuss their pathological effects and focus on the methods to collect and analyze the bacteria indoor needed to assess their role in respiratory diseases.

The bioaerosols

Aerosols consist of inert particles of solid or liquid suspended in the air if their size allows them to do.¹ Some of them carry the microorganisms (bacteria, fungi, viruses) but also pollens, algae and mites, their fragments, or their byproducts (Figure 1). These isolated biological particles or aggregates, living or inert are called bioaerosols.^{2,3}

Bioaerosols (short of biological aerosols) are defined by Douwes et al.,⁴ as aerosols or particulate matter of microbial, plant or animal origin that is often used synonymously with organic dust. The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) defines organic aerosols as airborne particles consisting of living organisms, such as micro-organisms (bacteria, fungi, viruses, protozoa) or from living organisms (toxins, dead microorganisms or fragments of microorganisms).^{5,6} These complex biological structures can be airborne and aero-settled inside a building, carried by air currents caused by natural or mechanical ventilation.⁷ Transport and destination are linked to their physical properties (density size, shape) and environmental parameters (temperature and relative humidity) in which they operate. The particulate in a bioaerosol is generally 0.3 – 100 microns in

diameter; however, the respirable size fraction of 1-10 microns is of primary concern,⁸ as this fraction can reach the alveoli.

A microorganism that is found in the air has a very uncertain future. The drying agent itself or its aqueous carrier is the main cause of the inactivation of airborne microorganisms. However, certain types of bioaerosols are only slightly influenced by external conditions. They enjoy structures that protect them from stress due to their environment such as drought, high temperatures in the presence of UV or solar radiation, and certain chemical and ionic compounds in the air. There are sporulated forms of bacteria or fungal spores, and certain viruses.

Role of moisture and temperature in indoor environments

Water is the main actor in the survival of microbial aerosol, but it can also influence the resilience of the bioaerosol. The relative humidity (RH percentage) and temperature are critical both during aerosolization in the survival of microbial aerosols.

In 2005, a study highlights over a period of observation of 1 to 3 days, increased resistance of *Legionella pneumophila* in a dry environment.⁹ Survival revealed by membrane integrity decreases from 4 hours of residence time in a 95% relative humidity environment. In contrast, cell functions are maintained and optimal at 30% relative humidity. After 70 hours, there was less than 20% of the initial active biomass in humid conditions.⁹

The impact of bacterial bioaerosols on human respiratory health

The bioaerosol exposure can cause respiratory problems and have a major impact on human health. A high rate of morbidity and mortality has been reported by the National Institute Occupational Safety and Health in workers exposed to bioaerosols.¹⁰

The contamination is very strong in the barns of workers and dairy farms due to the high concentration of bioaerosols in these environments. For example, at the end of a working day, a pork producer can inhale up to 10¹⁰ bacteria per working day.^{11,12}

However, some factors influence the impact of bioaerosols on health. The susceptibility of the host, particularly genetics and his health in general, the nature of biological particles, their immunogenicity, their concentration in the air, the size of these particles as well as the site of their deposition in respiratory tree are decisive in causing respiratory problems.

The respiratory tree consists of a nasopharyngeal section gathering upper respiratory tract (nose, mouth, larynx, and pharynx) of a tracheo-bronchial section composed of the lower airways of the trachea to the bronchioles terminal and finally, pulmonary section, the cells in which are gas exchanges.

Furthermore, respiratory infections and other noninfectious disorders depend on the nature of the offending microorganism: only viable microorganisms can cause a respiratory infection. Non-viable

components of bioaerosols are not infectious but can cause allergic or hypersensitivity reaction in the respiratory tract due to their toxic or antigenic properties.

The deposition of inhaled bioaerosols and impact on health are based on their aerodynamic diameter and specific natural defenses at each level of the respiratory tree. They are deposited in the upper airway particles with diameters less than 100 microns. Those having a diameter of about 10 microns are deposited in the larynx and bronchi. The most dangerous particles, causing respiratory disorders, are those who present a diameter of about 3.5 microns. They can be deposited in the terminal bronchioles and alveoli where their removal is difficult due to the absence of mucus. Some of these particles can be phagocytosed by macrophages, but the removal process will take time, months or even years.¹¹

The number of visits made by physicians for respiratory infections is superior to all the others combined consultations patterns. Direct contact with the environment and the permanent exposure to airborne microorganisms in the air that man breathes help explain the frequency of these infections. Some of these are particularly pathogenic microorganisms and reach healthy subjects even at low concentrations.¹³ The airways are particularly vulnerable to infections. Microbial agents suspended in the air expelled by infected patients can subsequently be inhaled or aspirated in the oral cavity of uninfected people.¹¹ The inhalation of contaminated particles causes the pathological process, decreasing natural defenses favored by cold, smoking, asthma, and cystic fibrosis immunosuppression. Respiratory symptoms due to bacterial bioaerosols are cough, sputum, irritation of the nose and throat, runny nose, sneezing, breathing difficulties, chest pain. It can also manifest as rhinitis and allergic bronchitis and asthma.¹⁴

The origin of the airborne bacterial contaminants

We almost know that the outdoor air content impacts on the composition of indoor air. Recently Adams et al.,¹⁵ compared settled dust within homes (indoor) to settled dust on a balcony (outdoor) they showed that the bacterial species richness was higher outdoors than within a home. However, what was also noted was that the bacteria present within the indoor samples predominantly came from the inhabitants residing within the home. The outdoor bacterial taxa were present within the indoor samples; for all that the reciprocal is not true.¹⁵

Indoor occupants

In modern societies, most of people are more likely to spend their time indoors.¹⁶ Every person is known to maintain their own microbial “fingerprint”.¹⁷ This “fingerprint” is then shed to the indoor environment through skin surface contact, skin shedding and respiratory activity.¹⁸ In fact, humans carry 10¹² microorganisms on their epidermis, 10¹⁴ microorganisms in their alimentary tract, and many of bacteria in their respiratory tract and saliva, so humans might be one of the main sources of bioaerosols in the indoor environment particularly in poorly ventilated or densely occupied environments.^{19,20,21} Respiratory activity and daily skin shedding cells contribute to load bioaerosols in the built environment. Occupants can impact indoor environments through the simple presence of their bodies and person can influence the indoor microbial content in several ways.²² Firstly, humans act as a vehicle that tracks in

organisms that are found within soil or plant material and outdoor surfaces with their shoes, clothing and hair.^{23,24} Secondly, the routine activities, such as opening windows, cleaning and using air ventilation systems, will have an impact on the indoor microbiome. Lastly, the human microflora serves as a reservoir that can contribute to the indoor microbial content via body fluids and body surfaces.²⁵ The skin is among the most dominant source of the human body and can highly contribute to the indoor microbiome. Furthermore, human skin can be colonized by many aerobic viable bacteria (approximately 10^4 different viable aerobic bacteria), it can be continuously undergoing renewal, and being shed everyday as flakes, thereby releasing the skin colonizing bacteria into the environment.²¹ Recently, Qian et al.,²⁶ proceeded to the quantification of microorganism emission rates and they found 3.7×10^7 bacterial genome copies emitted per person-hour. The estimation of mass emission rate was ~30mg per person-hour.²⁷ Barberán et al.,²⁸ concluded that the composition of the bacterial communities found in indoor dust is more strongly influenced by the number and types of occupants living in the homes.

Human presence is not the only element that affects the total airborne bacterial load; it additionally affects the community structure.^{29,23,30} Furthermore, Meadow et al.,³⁰ concluded that ventilation and occupancy influence significantly the indoor air microbial communities.

In fact, where we may think that community structure in indoor was scrupulously intertwined with that of outdoor air, the abundance of human –associated bacteria was over two times more important in an occupied indoor environment.

Human flora is described in Table 1. As reported by Barberán et al.,²⁸ males and females may have a distinct role in the distribution of airborne bacteria in indoor environments. In fact, according to the female/male ratio their occupancy generates different airborne bacterial strains inside homes.

³¹A study showed that the microbial agents presents on hands, feet and in noses of occupants appear like the microbial agents found in their homes.³¹ Other studies showed that an increase in bacterial biochemical markers in the dust collected from an occupied classroom was due to the presence of school children.³² Furthermore, dominant bacterial species such as *Propionibacteria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Corynebacterium* were identified in dust from nursing homes.²⁵ One study investigated the comparison between the bacteria diversity from unoccupied homes to that of occupied homes. The results revealed that the settled dust present within unoccupied homes was dominated by Gram-negative bacteria, especially Proteobacteria (predominantly found in outdoor environments).³³ Conversely, the indoor microbial communities present within the occupied homes were dominated by Gram-positive bacteria (Predominantly from the phyla Actinobacteria and Firmicutes).

Indoor pets

The presence of pets (in particular, the presence of cats and dogs) influence the indoor dust bacterial contaminants.³³ Pets track in outdoor materials like soil, water, plant material, and faeces, They act as

vehicles and are considered themselves as reservoirs, where the bacteria and the fungi associated with the animal is shed within the indoor environment.²⁵

Various studies have shown that bioaerosols and dust particles emitted by dogs and cats are healthful to infant.^{34,35,36,37} Barberán et al.,³⁸ investigated the role of dogs and cats in the manner to elaborate the indoor microbiome (Table 1). The authors could determine, with DNA sequence based-methods, that certain house dust communities were associated with pet ownership.³⁹ This study revealed that either animal behaviour, or animal owner behaviour in the context of movement between indoor and outdoor environments, may be a contributing factor when studying the indoor bacterial environment. In fact, pets' responsibility to increase the exposure to resuspended dust simply by their different movement is no excluded.

Studies have shown that there is a proportional relationship between the presence of pets (cats or dogs) and the increase on endotoxin levels within several homes.⁴⁰ The bedroom and living room floors were associated with the higher concentrations.⁴¹ These results were like those of Thorne et al.,⁴² Few studies have used molecular techniques to measure the impact that pets have on the indoor environment.^{39,43} However, animal fecal material, hair as well as skin could possibly contribute to the indoor bacterial environment.¹⁸

Dust resuspension in indoor air

Indoor air is made up of more than 60% of dust resuspension.^{44,45} Dust is described as the dispersed distribution of solid material in the gas phase, especially in air. It is found almost everywhere in residence. House dust is very heterogeneous because of its varying sources and consists of variety of organic and inorganic particles such as fibers of different sizes. Microorganisms have been found at highly variable concentrations in household dust ranging from undetectable to 10^9 cells.g⁻¹.²⁵ Recent studies have reported a significant diversity of bacterial communities in house dust. Gram positive and skin-associated bacteria are the main dominating and including 112.10^3 phylotypes (across samples from ~1200 locations). Actually, most abundant bacterial found in household dust are *Actinobacteria*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Firmicutes*, and *Lactococcus*.^{46,47,25,38,28}

Due to their higher settling velocities, certain bacteria tend to be associated with larger vehicle particles and therefore can be enriched in dust. While, the probability of the resuspension of bacteria that are associated with the vehicle particles of smaller size remains highly important.

Occupants can cause the fact of dust resuspension just by walking.⁴⁸ A study has shown that, when two people were walking in a same room, the resuspension emission rates of PM_{2.5} and PM₅ were as high as 0.5 and 1.4 mg.min⁻¹ respectively.⁴⁹ Qian and Ferro⁴⁸ reported high dependent relationship between resuspension rates and flooring types. They concluded that vinyl tiles show significantly smaller particle resuspension rates than a carpet. Additionally, there are many activities that produce and increase resuspended particles including bacteria eventually, such as making the bed, vacuuming and folding clothes. According to Knibbs et al.,⁵⁰ 4.10^4 bacterial genome copies per minute were define as a median emission rate from measurements of 21 vacuum cleaners. Vacuum cleaner bags can also transmit

considerable amounts of bioaerosols, especially airborne bacteria. Therefore, they constitute a significant source that is often misrepresented. However, this source should be highlighted by assessments of cases of allergies, asthma or infectious diseases.⁵¹

Even being asleep, occupants can generate resuspended bacteria. In fact, they spend more than 30% of their time sleeping on a mattress which contains abundant bacterial agents and other microorganisms.⁵² As reported by Cohen and Positano ⁵³ dirty clothing has a significantly higher dust resuspension rate than clean clothing. Briefly, after the deposition of airborne bacteria on surfaces, it would be difficult to assume that they have been permanently removed from the indoor air because there is great probability whether resuspended in the air. In fact, Tringe et al.,¹⁸ showed that the bacteria living on the skin of individuals inhabiting a particular space define the microbial community observed in air samples taken from that same space. Given that, the average human sheds approximately 1,5 million skin cells an hour, carrying with them approximately 15 million bacterial cells, humans clearly contribute to indoor microbial diversity.³⁹ Although few molecular studies have directly investigated the impact of pets, it is expected that animal skin, hair, fecal material, even saliva and possibly fleas all may contribute significantly to microbial communities associated with indoor surfaces and air.³⁹

Outdoor air: Contributor of bacterial house dust

Outdoor particulate matter (PM) can be found in indoor air. Although, most human exposure to these PM of outdoor origin happens in indoor environments.⁵⁴ Thereby, outdoor PM could have certain influence on indoor PM.^{55,56} Furthermore, distribution risks of airborne bacteria in the indoor environments increase in naturally ventilated homes. In this regard, we cannot assume all bioaerosols moving through the eventual pathways that may borrow to reach indoors, eventually in through open windows and doors.

The collection and analysis of bacterial aerosols

The study of bioaerosols is subjected to the constraints of collection systems and the associated analytical tools. Although the techniques of sampling have no difficulty of use a priori in other environments (the soil or the water), it remains a key step when it comes to study the air and especially the air in indoor environments, which makes the study of its health impact difficult.

Culture on agar plate has long been the standard for the study of microbial air content method. It does not require the collection of large volumes of air while providing access to both quantitative and qualitative information but provides access to only a tiny fraction of the bacterial diversity. However, using of molecular tools for the analysis, collection must allow sampling of larger volumes. In addition, sampling of large volumes of air also allows obtaining a representative part of the indoor environment investigated. Moreover, it is difficult to see if bacteria are naturally present in the air or if it is a transient population not adapted to oligotrophic environment in which it is located, since, in general, the culture media commonly used for the measurement of cultivable microorganisms contain a thousand times more carbon per unit volume that can generally find in most environments tend to oligotrophic (1-15

mgC.l⁻¹).^{57,39} A common alternative is to use a diluted form of conventional media to search for oligotrophic organisms.⁵⁸

Usually, the study of bacterial aerosols begins with the collection. Many techniques have been evaluated and developed to collect, identify, and focus microbial aerosols. There are common parameters to be considered in the collection and analysis to achieve later. This is the biological effectiveness (for methods of culture) and the cut-off diameter (d₅₀) which is defined as the particle diameter at which there is a 50% collection efficiency.⁵⁹

The collection efficiency for small particles increases as the cut-off diameter decreases. This parameter is essential both from the analysis by culture or during molecular studies.

To sample bacteria in the air, there are several methods. There are four broad categories based collection device : impaction on solid medium, impaction on liquid medium or "impingement", the filtration, and the dust collection (vacuuming).

Sampling by impaction on solid medium

The impaction aims to separate the particles from the gas in which they are contained, thanks to the inertial properties of the latter but also the physical characteristics of the device used. In this kind of sample, air is drawn through a gate which may be comprised of calibrated orifices (10 µm) which allows the acceleration of the flow and then directed onto a surface target (collection or carrier medium agar).^{60,61} The impaction occurs when the particle due to its inertia away from the power line and hits the nutrient medium. A compromise is necessary to have sufficient speed to collect the smallest particles, while ensuring the maintenance of the viability of the bacterial cells. The particles which are sufficiently resistant to the rate of change then come to impact on the target surface.

The exhaust air flow rejects the particles of low inertia. Most often, this media collection can be a solid or semi-solid agar contained in a petri dish, but other areas may be considered for further analysis, for example, a slide for microscopic observation. The agar used obviously depends on what type of bacteria should be detected. Usually, for bacteria detection, impactors may consist of a single-stage impinger which, as their name suggests, are formed of a single set grid / collection medium.

In addition, the impaction can cause an underestimation of the number of colonies counted on the environment. Indeed, many microorganisms can overlap or get aggregated on the Petri dish and thus form colonies combined. Thus, the correction factor of Feller can be applied. This factor is applied as a few colonies can cross the same hole of the grid whereas other holes will not be crossed by any microorganisms.

Sampling by impaction on liquid medium or "impingement"

When sampling by impactors liquid medium (also referred Impinger), air sucked through a tube is propelled into a liquid medium or on its surface. The solutions for fluid collection are diverse; it may be sterile water only as a physiological solution added with agents to protect bacteria from various attacks suffered by sampling. In other cases, it may even be nutrient media. Bacteria pass into the

collection fluid, which can be directly spread on the nutrient media or can be filtered. The filter is then cultured to enumerate colonies formed. This method limits the stress due to mechanical shocks that may induce impaction or filtration systems even if the impaction on the liquid surface can affect the integrity of the bacteria. That is reason cyclonic collectors were developed for driving the microorganisms in a cyclone limiting the deleterious effects of the impact on air/water interface. However, as with the previous method, the presence of cell aggregates, dispersed or not, do not achieve by growing a representative estimate of the number of microorganisms. The use of a fluid collection limits the sampling time. Indeed, it is possible to show the phenomena of re-aerosolization and multiplication of microorganisms, and a loss of cell viability.⁶² In the literature, several types of bio-collectors are described including the Coriolis μ (Bertin Technologies, France) which has a lateral air inlet disposed at the end of a stick. During sampling, the air induces a cyclonic movement of the collection medium contained in the collection tube. By centrifugal force, the air contained in the compounds is directed towards the walls of the manifold, thus leaving the gas phase to concentrate in the liquid medium. Different collection mediums can be tested: the one provided by the manufacturer, phosphate buffered saline added of Tween 20, medium based on Triton X-100. Tween 20 and Triton X -100 are surface active agents which will increase the dispersion of the bacteria in the medium. Thus, the efficiency of sampling and homogeneity of the sample obtained is improved.⁶³

The collection efficiency is also dependent on the speed and the suction time, and the diameter of the suction port. The recommended maximum sampling speed by the manufacturer is 300 l min⁻¹. Sampling time can vary from 1 to 10 min for this type of device.

Filtration

This collection consists of passing air through a filter that will retain microorganisms.⁶⁴ The bacteria can then be retained on the surface or inside of the filter can be varied in nature depending on the desired analysis (in soluble gelatin filters, glass fiber, polycarbonate, polyvinylchloride, cellulose, fiber filter glass ...), and the pore size depending on the microorganisms to collect (0.2 microns for bacteria). The membrane used is based on the analysis to be performed. For example, for analysis by epifluorescence microscopy, the choice will be a black polycarbonate membrane while a glass fiber membrane is used for a determination of endotoxins. Moreover, the analysis can be performed directly on the membrane or after the microorganisms retained by thereof have been unhooked.

Nevertheless, it has been shown that the composition of the filter influences the cultivability; it is the same for sampling time, if it is too long, increases the drying, reducing the viability of species susceptible to stress.⁶⁵ For these reasons, this technique is rarely used for analysis by culture.

Dust collection

Dust can be analyzed to determine the presence of bacteria that have accumulated over time, and that may have been airborne. Furthermore, different techniques can analyze dust.

Dust found in livestock buildings is composed of a multitude of organic substances, and sizes of various shapes. This organic dust consists of food fragments of dried feces, hair, feathers, insects, skin cells, pollen, mold, viruses, and bacteria. Endotoxins produced by bacteria, are generally potent allergens causing immediate or delayed reactions bronchopulmonary level, causing breathing problems.

Indoor, dust is usually collected with vacuum cleaner, but this collection is dependent from the type of carpet, humidity and the characteristics of the house.⁶⁶ But, the time of accumulation of dust is usually not known, neither the amount of dust that can be inhaled after resuspension. To be more representative of the inhaled fraction of dust, passive airborne dust collection methods, such as electrostatic dust collectors, may thus be a low-cost means of assessing long-term bacterial exposure in standardizing the time and the surface of dust accumulation.⁵

Sampling strategies are different and specific of each indoor environment. At hospital, surface and air sampling are generally used to assess the contamination. They have also been useful in dwellings to assess the exposure and evaluate the biodiversity. Nowadays, air sampling is the most commonly used technique in indoor environments, as it provides a better characterization of the airway exposure.^{67,68}

Table 2 presents the advantages and limitations of the different collection techniques.

Analysis of samples by culture

Before the low diversity of morphologies observed in microorganisms, the limits of microscopic observations appeared very quickly. In 1881, Robert Koch (1843-1910) overthrew microbiology by developing techniques for isolation on solid medium, thus improving the identification of bacteria. Methods based on culture can identify bacteria with known growth requirements. Indeed, they are based on the ability of microorganisms to grow on artificial medium under nutritional conditions (organic matter, minerals ...) and physical (temperature, relative humidity, pH ...) previously identified.

The major advantage of these methods is the demonstration of the viability of the microorganisms in the environment. This approach generally involves a step of isolating pure cultures, sometimes preceded by an enrichment phase to foster the growth of a particular microorganism. Morphological and physiological characteristics of the strains isolated by culture are references on phenotypic capabilities of non-isolated species phylogenetically close to these strains. The description and classification of microorganisms based on their phenotype (morphology, physiological activities, composition of ecological niches occupied or walls) provide little information about the evolutionary relationships linking them.⁶⁹

Although traditionally used for the study of microorganisms, culture techniques on Petri dishes have, as microscopic observations, their limits. Indeed, number of studies show significant differences between the results of culture and microscopy counts.⁷⁰ The development of molecular tools has led microbiologists to reconsider their view of the microbial world. In fact, classical microbiology techniques lead to a partial view of the microbial communities of an ecosystem promoting compliance

cultivable microorganisms, this suggests that a clear majority of the "real" diversity could be ignored if one focuses exclusively on culture methods. These differences can be explained by: 1) the difficulty in reproducing the exact conditions of a medium, including the relationship between microorganisms (parasitism, synergy, commensalism ...) and / or with all environmental parameters,⁷¹ 2) the presence in any habitat, microorganisms present in a dormant state, also called non-culturable viable state. This is made of cells that have lost their ability to multiply but still have a cellular activity.⁷² These cells may in appropriate circumstances be newly culturable.⁷³ Many studies have shown that most pathogenic bacterial species to humans (eg *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*...) could exist as viable bacteria but not culturable.^{74,75,76}

In contrast to methods of culture, there are molecular tools to detect these viable non-culturable microorganisms. However, culture is defined as the foundation of the foundations of our knowledge. It remains the reference technique for the study of microorganisms in the environment; it is preferably used in the regulatory framework.

Molecular tools

Despite the development of molecular tools for over 30 years, few studies have focused on the diversity of indoor air bacteria (bacteria of indoor air environments) by independent culturability methods.

Polymerase Chain Reaction

Following the development of molecular biology tools in the years 1960-1970, molecular methods have become essential for the identification of microorganisms.

The targeted amplification of DNA in vitro by PCR (Polymerase Chain Reaction) permits access to the genes and their nucleotide sequence. This enzymatic reaction allows amplification of multiple copies of a DNA sequence (in general a specific gene or gene portion). PCR is the easiest and fastest way to get sufficient amount of DNA template. The key step is the design of primers because they will target the DNA sequence of a specific microorganism, a microbial group or a gene function.⁷⁷

The primers used for PCR detection of bacteria are of two types: universal when targeted one of the three domains of life (Bacteria and Archaea) or specific when targeting a gene whose sequence is conserved among a "group", a "genus" or "species" as phylogenetic terms.

The use of PCR overcomes the bias associated with the culture of microorganisms. It allows the development of several tools especially with the use of the 16S rRNA as a molecular marker of the present case.

However, it is not free of bias. Among them, we can distinguish: 1) the possible contamination of reagents and amplification of contaminating DNA,⁷⁸ and so the detection of false positives,^{79,80} 2) the preferential amplification of some sequences including those related to the copy number of the

operon,^{81,82,83} 3) the pseudo universal primers^{84,85} 4) the risk of false negatives associated with the presence of inhibitors of the polymerases present in the sample.⁸⁶

A careful examination of the results must be performed to avoid these biases.^{87,88} Moreover, as the culture media condition the detection of certain microorganisms, the primers are made from known sequences and directly influence the detection of new sequences.

Often, PCR is only a preliminary step. The amplification products may be stored and used in the identification or quantitation of one or more microorganisms or in population analysis by using nucleic acid probes, molecular fingerprinting techniques, or molecular inventories.

Quantitative real-time PCR

Quantitative PCR (QPCR) is a variation of the PCR. Unlike “classic” PCR, it allows through a fluorescent probe to measure in real time the amplification of a DNA fragment, and thus to quantify the presence of the initial DNA in the sample. Increasingly applications are developed using this technique especially in the medical field, but also in microbial ecology or its sensitivity and reproducibility represent certain advantages.

Quantitative PCR represents a method of choice for a quantitative view of airborne microorganisms and especially bacteria from indoor air.^{89,90} Nevertheless, there are few global analysis of bacteria in the air, especially in indoor environments.^{91,92} It is therefore difficult to make comparisons with the data we already have by culture. Although quantitative PCR has been widely used in other environments (water, soil) or on clinical studies,⁹³ in the air its use has been limited to the detection and quantification of microbial genera (*Aspergillus*, *Penicillium* ...),^{94,95} or species of interest to public health (*Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Aspergillus fumigatus*, *Stachybotris chartarum*, *Alternaria alternata*, *Salmonella* ...),^{96,97,98} By cons, it is often cited, combined with molecular analyzes including in the collection of large volumes of air needed for microbiome studies.^{99,84,18} Some recent studies have been performed on samples of air from various types of industries. Two studies published in 2008 have focused on quantifying the total bacteria concentration in the air of several treatment plants as well as in poultry.^{91,92} The concentrations are higher in poultry (between $7,7 \cdot 10^7$ and $1,3 \cdot 10^9$ cells m^{-3}) than in the different treatment plants (between $2,8 \cdot 10^5$ and $3,2 \cdot 10^6$ cells m^{-3}). Cayer et al.,⁵¹ used quantitative PCR to estimate the concentrations of airborne Mycobacterium species in peat moss processing plants. More recently, Nehme et al.,¹¹ evaluated the total load of bacteria and archaea in pigsties. They obtained values of up to 10^8 bacteria m^{-3} and 10^8 copies of 16S rRNA m^{-3} of air for archaea.

If exposure to bioaerosols workers is the subject of some research, the study of airborne bacteria in indoor environments, particularly in habitats, on other hand is poorly documented.

Ribosomal RNA and NGS

The sequence of the ribosomal RNA (rRNA) is particularly useful for the identification of organisms due to its high level of information, its preserved nature and its presence in all types of prokaryotic microorganisms or archaea.¹⁰⁰ In addition, the ribosomal DNA (rDNA) 16S (in prokaryotes) had the most

appropriate size for the techniques used at the time. Moreover, the rRNA is essential for protein synthesis, their presence is universal. The rRNA is homologous in all organisms. Their function is retained, in addition to their sequence is large enough to achieve multiple phylogenetic analyzes. The pace of change is slow because the selection pressure exerted on rRNA is only slightly subject to changes in the environment. They consist of an alternation of highly conserved sequences and variable sequences.¹⁰¹

Currently, although there are other marker genes, the sequences of 16S rRNA are the most used in the case of microbial phylogeny analysis. Reference guide the prokaryotic taxonomy, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, adopted the 16S rDNA for classification of prokaryotes, replacing the traditional phenotypic characterization.¹⁰²

Development of culture independent methods based on 16S rRNA gene, used in combination with phylogenetic analyzes revealed a significant share of unknown or uncultivated microorganisms, including complete new divisions of bacteria. While, in 1987, the number of bacterial phylum was estimated at 12,¹⁰⁰ in 1998, 36 branches were identified,⁷⁰ and finally 52 in 2004. The first branch was based on analysis of cultured microorganisms (cyanobacteria, spirochetes, and gram-positive bacteria). However, there are limits to this approach. Phylogeny based on the study of the rRNA gene does not allow access to all the information, including those dealing with cellular functions or biochemical activity of microbial groups in the environment.^{15,40,24} These studies were used to show that human and animal occupancy is associated to the diversity and load of bacterial cells indoor.^{29,15,40,24}

Technical challenges and outlook

Culture of environmental bacteria

Most available culture systems for bacteria allow detection of aerobic gram positive or negative, but mostly detect gram positive bacteria. These bacteria are well growing on the culture medium used. Recently, molecular methods have shown that gram negative bacteria and especially faecal anaerobes are major components of bioaerosols in agricultural settings.^{103,11} These environments have been particularly studied due to professional risk of disease. Indeed, the potential impact of these bacteria on respiratory health is often underestimated, with many studies instead focusing on endotoxins, a well-described component of bioaerosols, known to be an aetiological factor of several bioaerosol-associated diseases.^{104,46,105} This suggests that culture mediums used to detect bacteria are not well suited to environmental bacteria and need to be adapted.

Non culturable bacteria: an underestimated health problem?

Over the past ten years, studies using molecular methods for the detection of airborne microorganisms have revealed that non culturable microorganisms are considerable constituents of bioaerosols. The importance of the application of these methods was illustrated when they were used in the discovery of significant amounts of archaea present indoor.¹⁰⁶ Newly described bioaerosols components such as

these could be a factor in several bioaerosols-related diseases with unknown.¹⁰⁷ For example, chronic bronchitis or chronic obstructive pneumonia disease are prevalent in people who work in swine barns or dairy farms,^{108,109} but the definitive cause has yet to be clearly identified. It is therefore important to use several detection approaches, and especially non-cultivable testing.

Next generation sequencing: the solution to identify the culprits?

Some studies have successfully applied pyrosequencing in talking various questions about indoor air microbial communities.^{29,110,111,112} The data obtained have demonstrated the presence of all microbial domains (Bacteria, Eukariya and Archaea). Examination of these data reveals a bacterial diversity which differs from that observed using culture methods: bacterial diversity is largely dominated by *Proteobacteria*. There appears to be a diversity specific to indoor air. In terms of the health risks associated with the presence of pathogenic species such as *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* or *Stenotrophomonas maltophilia*. The pathogenic species found in air are often associated with nosocomial infections (*Acinetobacter baumannii*, *Clostridium jeikeium*, etc.) and respiratory infections (*Mycobacterium spp*). Adverse health effects have also been associated to water damage and linked to poor ventilation or aeration.^{113,114} So, NGS may be used to identify the bacteriome associated to these health effects.

Conclusion

Extensive qualitative description of bioaerosol components in numerous indoor environments is necessary to better understand their health impacts on humans. If we are to have a better overall understanding of bioaerosols, particularly in indoor environments, it is necessary to conduct studies that characterize the entire population of bioaerosol communities, which requires careful selection of a range of detection methods.

Acknowledgements:

Yanis Guenoune received a doctoral fellowship from University of Sorbonne Paris Cité.

Conflict of interest:

The authors report no conflict of interest.

610

611

612 References

- 613 1. Sherertz P. *Bioaerosols*. Richemond, Virginie. Virginia Departement of Health, 1993.
- 614 2. Burge HA, Solomon WR, Muilenberg ML. Evaluation of indoor plantings as allergen
616 exposure sources. *J Allergy Clin Immun*; 70. Epub ahead of print 1982. DOI: 10.1016/0091-
617 6749(82)90236-6.
- 618 3. Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, et al. *Manual of Environmental Microbiology*. American
620 Society for Microbiology Press, 2007.
- 621 4. Douwes J, Thorne P, Pearce N, et al. Bioaerosol health effects and exposure assessment:
623 progress and prospects. *Ann Occup Hyg* 2003; 47: 187–200.
- 624 5. Macher JM. Review of methods to collect settled dust and isolate culturable microorganisms.
626 *Indoor Air* 2001; 11: 99–110.
- 627 6. Hygienists AC of GI. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and
629 biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists,
630 1995.
- 631 7. Salthammer T, Uhde E. *Organic indoor air pollutants: occurrence,
633 measurement, evaluation*. John Wiley & Sonshttp. (2009, accessed 18 May
634 2015).
- 635 8. Cox CS, Wathes CM. Bioaerosols in the environment. *Cox CS Wathes CM Bioaerosol Handb
637 CRC Lewis Publ Boca Raton* 1995; 11–14.
- 638 9. Jo W-K, Seo Y-J. Indoor and outdoor bioaerosol levels at recreation facilities, elementary
640 schools, and homes. *Chemosphere* 2005; 61: 1570–1579.
- 641 10. Pearson C, Littlewood E, Douglas P, et al. Exposures and Health Outcomes in Relation to
643 Bioaerosol Emissions From Composting Facilities: A Systematic Review of Occupational and
644 Community Studies. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2015; 18: 43–69.
- 645 11. Nehme B, Létourneau V, Forster RJ, et al. Culture-independent approach of the bacterial
647 bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the
648 seasonal effect. *Environ Microbiol* 2008; 10: 665–675.
- 649 12. Hinds WC. Aerosol Technology: Properties. *Behav Meas Airborne Part 2nd*.
- 650 13. Schachter J. Infection and disease epidemiology. *Chlamydia Intracell Biol Pathog Immun
652 ASM Press Wash DC* 1999; 139–169.
- 653 14. Baldacci S, Maio S, Cerrai S, et al. Allergy and asthma: Effects of the exposure to particulate
654 matter and biological allergens. *Respir Med* 2015; 109: 1089–1104.
- 655 15. Adams RI, Miletto M, Lindow SE, et al. Airborne bacterial communities in residences:
657 similarities and differences with fungi. *PLoS One* 2014; 9: e91283.
- 658 16. Dunn RR, Fierer N, Henley JB, et al. Home life: factors structuring the bacterial diversity
659 found within and between homes. *PLoS One*; 8. Epub ahead of print 2013. DOI:
660 10.1371/journal.pone.0064133.
- 661 17. Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, et al. Human occupancy as a source of indoor airborne
662 bacteria. *PloS One* 2012; 7: e34867.
- 663 18. Tringe SG, Zhang T, Liu X, et al. The airborne metagenome in an indoor urban environment.
664 *PloS One* 2008; 3: e1862.
- 665 19. Johnson G, Morawska L, Ristovski Z, et al. Modality of human expired aerosol size
666 distributions. *J Aerosol Sci*; 42. Epub ahead of print 2011. DOI:
667 10.1016/j.jaerosci.2011.07.009.
- 668 20. Adams RI, Bateman AC, Bik HM, et al. Microbiota of the indoor environment: a meta-
669 analysis. *Microbiome* 2015; 3: 49.
- 670 21. Nakanishi H, Ohmori T, Hara M, et al. Screening Test for Shed Skin Cells by Measuring the
671 Ratio of Human DNA to Staphylococcus epidermidis DNA. *J Forensic*

- Scihttp://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.13028/pdf (2016, accessed 30 September 2016).
22. Prussin II AJ, Vikram A, Bibby KJ, et al. Seasonal Dynamics of the Airborne Bacterial Community and Selected Viruses in a Children's Daycare Center. *PloS One* 2016; 11: e0151004.
 23. Kelley ST, Gilbert JA. Studying the microbiology of the indoor environment. *Genome Biol*; 14. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1186/gb-2013-14-2-202.
 24. Dannemiller KC, Gent JF, Leaderer BP, et al. Influence of housing characteristics on bacterial and fungal communities in homes of asthmatic children. *Indoor Air* 2016; 26: 179–192.
 25. Rintala H, Pitkäranta M, Täubel M. Microbial communities associated with house dust. *Adv Appl Microbiol*; 78. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-394805-2.00004-X.
 26. Qian J, Hospodsky D, Yamamoto N, et al. Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom. *Indoor Air*; 22. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0668.2012.00769.x.
 27. Weschler CJ. Roles of the human occupant in indoor chemistry. *Indoor Air* 2016; 26: 6–24.
 28. Barberan A, Ladau J, Leff JW, et al. Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci U A*; 112. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1073/pnas.1420815112.
 30. Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, et al. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One* 2012; 7: e34867.
 31. Meadow JF, Altrichter AE, Kembel SW, et al. Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air* 2014; 24: 41–48.
 32. Frankel M, Hansen EW, Madsen AM. Effect of relative humidity on the aerosolization and total inflammatory potential of fungal particles from dust-inoculated gypsum boards. *Indoor Air* 2014; 24: 16–28.
 33. Fox A, Harley W, Feigley C, et al. Increased levels of bacterial markers and CO₂ in occupied school rooms. *J Environ Monit* 2003; 5: 246–252.
 34. Giovannangelo M, Gehring U, Nordling E, et al. Determinants of house dust endotoxin in three European countries—the AIRALLERG study. *Indoor Air* 2007; 17: 70–79.
 35. Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA-J Am Med Assoc*; 288. Epub ahead of print 2002. DOI: 10.1001/jama.288.8.963.
 36. Maier RM, Palmer MW, Andersen GL, et al. Environmental determinants of and impact on childhood asthma by the bacterial community in household dust. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2663–2667.
 37. Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol*; 9. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1186/1710-1492-9-15.
 38. Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, et al. House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proc Natl Acad Sci U A*; 111. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1073/pnas.1310750111.
 39. Barberan A, Dunn RR, Reich BJ, et al. The ecology of microscopic life in household dust. *Proc R Soc B*; 282. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1098/rspb.2015.1139.
 40. Fujimura KE, Johnson CC, Ownby DR, et al. Man's best friend? The effect of pet ownership on house dust microbial communities. *J Allergy Clin Immunol*; 126. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.05.042.
 41. Prussin AJ, Marr LC. Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome* 2015; 3: 78.
 42. Wickens K, Douwes J, Siebers R, et al. Determinants of endotoxin levels in carpets in New Zealand homes. *Indoor Air* 2003; 13: 128–135.
 43. Thorne PS, Cohn RD, Mav D, et al. Predictors of endotoxin levels in US housing. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 763.

44. Kettleson E, Kumar S, Reponen T, et al. Stenotrophomonas, Mycobacterium, and Streptomyces in home dust and air: associations with moldiness and other home/family characteristics. *Indoor Air* 2013; 23: 387–396.
45. Alshitawi MS, Awbi HB. Measurement and prediction of the effect of students' activities on airborne particulate concentration in a classroom. *HVAC R Res*; 17.
46. Ocak Y, Kılıçvuran A, Eren AB, et al. Exposure to particulate matter in a mosque. *Atmos Env*; 56. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.04.007.
47. Bouillard L, Michel O, Dramaix M, et al. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12: 187–192.
48. Pakarinen J, Hyvärinen A, Salkinoja-Salonen M, et al. Predominance of Gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia. *Env Microbiol*; 10. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01723.x.
49. Qian J, Ferro AR. Resuspension of dust particles in a chamber and associated environmental factors. *Aerosol Sci Technol*; 42. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1080/02786820802220274.
50. Ferro AR, Kopperud RJ, Hildemann LM. Source strengths for indoor human activities that resuspend particulate matter. *Env Sci Technol*; 38. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1021/es0263893.
51. Knibbs LD, He C, Duchaine C, et al. Vacuum cleaner emissions as a source of indoor exposure to airborne particles and bacteria. *Env Sci Technol*; 46. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1021/es202946w.
52. Cayer M-P, Veillette M, Pageau P, et al. Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can J Microbiol* 2007; 53: 92–99.
53. Klepeis NE, Nelson WC, Ott WR, et al. The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2001; 11: 231.
54. Cohen BS, Positano R. Resuspension of dust from work clothing as a source of inhalation exposure. *Am Ind Hyg Assoc J*; 47. Epub ahead of print 1986. DOI: 10.1080/15298668691389739.
55. Chen C, Zhao B. Review of relationship between indoor and outdoor particles: I/O ratio, infiltration factor and penetration factor. *Atmos Env*; 45. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2010.09.048.
56. Fuller CH, Brugge D, Williams PL, et al. Indoor and outdoor measurements of particle number concentration in near-highway homes. *J Expo Sci Env Epid*; 23. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1038/jes.2012.116.
57. Wichmann J, Lind T, Nilsson M-. M, et al. PM_{2.5}, soot and NO₂ indoor–outdoor relationships at homes, pre-schools and schools in Stockholm, Sweden. *Atmos Env*; 44. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2010.08.023.
58. Amato P, Ménager M, Sancelme M, et al. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmos Environ* 2005; 39: 4143–4153.
59. Andreeva IS, Belan BD, Borodulin AI, et al. Variability of the content of live microorganisms in the atmospheric aerosol in southern regions of Western Siberia. In: *Doklady Biological Sciences*. Springer, pp. 530–534.
60. Renoux A, Boulaud D. *Les aérosols: physique et métrologie*. Tec/Doc-Lavoisier <http://www.bcin.ca/Interface/openbcin.cgi?submit=submit&Chinkey=175647> (1998, accessed 18 May 2015).
61. Jørgensen RB, Hanssen SO, Bakke JV, et al. Indoor Air Quality. In: *General, Applied and Systems Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470744307.gat090/abstract> (2009, accessed 17 February 2014).
62. Robertson LD. Monitoring viable fungal and bacterial bioaerosol concentrations to identify acceptable levels for common indoor environments. *Indoor Built Environ* 1997; 6: 295–300.

63. Hall RJ, Leblanc-Maridor M, Wang J, et al. Metagenomic detection of viruses in aerosol samples from workers in animal slaughterhouses. *PloS One* 2013; 8: e72226.
64. Douwes J, Versloot P, Hollander A, et al. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1763–1769.
65. Henningson EW, Ahlberg MS. Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review. *J Aerosol Sci* 1994; 25: 1459–1492.
66. DURAND KT, MUILENBERG ML, BURGE HA, et al. Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann Occup Hyg* 2002; 46: 113–118.
67. Noss I, Wouters IM, Visser M, et al. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 5621–5627.
68. Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011; 364: 701–709.
69. Frankel M, Bekö G, Timm M, et al. Seasonal variation of indoor microbial exposures and their relations to temperature, relative humidity and air exchange rates. *Appl Environ Microbiol* 2012; AEM–02069.
70. Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol* 1996; 14: 190–197.
71. Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 1998; 180: 366–376.
72. van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolters A, et al. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2000; 43: 133–151.
73. Aertsen A, Michiels CW. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol* 2004; 30: 263–273.
74. Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Kell DB, et al. Adoption of the transiently non-culturable state—a bacterial survival strategy? *Adv Microb Physiol* 2003; 47: 65–129.
75. Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can J Microbiol* 1984; 30: 334–338.
76. Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 1986; 52: 531–538.
77. Ozcakir O. Viable but non-culturable form of bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 477–484.
78. Peccia J, Hernandez M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmos Environ* 2006; 40: 3941–3961.
79. Grahm N, Olofsson M, Ellnebo-Svedlund K, et al. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 219: 87–91.
80. Hilali F, Saulnier P, Chachaty E, et al. Decontamination of polymerase chain reaction reagents for detection of low concentrations of 16S rRNA genes. *Mol Biotechnol* 1997; 7: 207–216.
81. Mohammadi T, Reesink HW, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 285–288.
82. Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2798–2801.
83. Johansen T, Carlson CR, Kolstø A-B. Variable numbers of rRNA gene operons in *Bacillus cereus* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 136: 325–328.
84. Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 625–630.
85. Angenent LT, Kelley ST, Amand AS, et al. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4860–4865.

86. Horz H-P, Rotthauwe J-H, Lukow T, et al. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *J Microbiol Methods* 2000; 39: 197–204.
87. Rintala H, Nevalainen A, Rönkä E, et al. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 337–347.
88. Hughes MS, Beck LA, Skuce RA. Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2007–2008.
89. Tanner MA, Goebel BM, Dojka MA, et al. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3110–3113.
90. Alvarez AJ, Buttner MP, Stetzenbach LD. PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3639–3644.
91. Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 170–174.
92. Oppliger A, Charrière N, Droz P-O, et al. Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann Occup Hyg* 2008; 52: 405–412.
93. Rinsoz T, Duquenne P, Greff-Mirguet G, et al. Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmos Environ* 2008; 42: 6767–6774.
94. Watzinger F, Suda M, Preuner S, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5189–5198.
95. Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, et al. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27: 198–210.
96. Morrison J, Yang C, Lin K-T, et al. Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building. *J Hosp Infect* 2004; 57: 85–87.
97. An HR, Mainelis G, White L. Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. *Atmos Environ* 2006; 40: 7924–7939.
98. Bellanger A-P, Reboux G, Roussel S, et al. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 260–266.
99. Fallschissel K, Kämpfer P, Jäckel U. Direct detection of salmonella cells in the air of livestock stables by real-time PCR. *Ann Occup Hyg* 2009; mep060.
100. Radosevich JL, Wilson WJ, Shinn JH, et al. Development of a high-volume aerosol collection system for the identification of air-borne micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 2002; 34: 162–167.
101. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 4576–4579.
102. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221.
103. Boone DR, Garrity GM, Brenner DJ, et al. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer Science & Business Media, 2001.
104. Gora A, Mackiewicz B, Krawczyk P, et al. Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2009; 16: 143–150.
105. Zejda JE, Barber E, Dosman JA, et al. Respiratory health status in swine producers relates to endotoxin exposure in the presence of low dust levels. *J Occup Environ Med* 1994; 36: 49–56.
106. Lawniczek-Walczyk A, Gorny RL, Golofit-Szymczak M, et al. Occupational exposure to airborne microorganisms, endotoxins and beta-glucans in poultry houses at different stages of the production cycle. *Ann Agric Environ Med*; 2013; <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-fe307148-c2cb-4b14-8e48-21b8cd3a84e4> (2013, accessed 15 June 2015).
107. Blais-Lecours P, Perrott P, Duchaine C. Non-culturable bioaerosols in indoor settings: Impact on health and molecular approaches for detection. *Atmos Environ* 2015; 110: 45–53.

- 976 108. Eduarda W, Heederik D. Methods for quantitative assessment of airborne levels of
977 noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. *Am Ind Hyg Assoc*
978 1998; 59: 113–127.
- 980 109. Sahlander K, Larsson K, Palmberg L. Daily exposure to dust alters innate immunity. *PloS One*
981 2012; 7: e31646.
- 983 110. Basinas I, Sigsgaard T, Erlandsen M, et al. Exposure-affecting factors of dairy farmers’
984 exposure to inhalable dust and endotoxin. *Ann Occup Hyg* 2014; 58: 707–723.
- 986 111. Kembel SW, Jones E, Kline J, et al. Architectural design influences the diversity and structure
987 of the built environment microbiome. *ISME J* 2012; 6: 1469–1479.
- 989 112. Meadow JF, Bateman AC, Herkert KM, et al. Significant changes in the skin microbiome
990 mediated by the sport of roller derby. *PeerJ* 2013; 1: e53.
- 992 113. Gaüzère C, Moletta-Denat M, Blanquart H, et al. Stability of airborne microbes in the Louvre
993 Museum over time. *Indoor Air* 2014; 24: 29–40.
- 995 114. Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, et al. Respiratory and allergic health effects of dampness,
996 mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health*
997 *Perspect* 2011; 119: 748.
- 999 115. Sundell J, Levin H, Nazaroff WW, et al. Ventilation rates and health: multidisciplinary review
1000 of the scientific literature. *Indoor Air* 2011; 21: 191–204.

1001
1002
1003

Table 1 : sources of bacterial aerosols

Sources	Indoor air bacterial aerosols species	References
Human	- <i>Staphylococcus spp</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12
- Oral cavity and skin shedding flora	- <i>Micrococcus spp</i>	
	- <i>Acinetobacter spp</i>	
	- <i>Streptomyces spp</i>	
	- <i>Bacillus spp</i>	
	- <i>Streptococcaceae spp</i>	
	- <i>Sphingopyxis spp</i>	
- Nasopharyngeal and oropharyngeal flora	- <i>Staphylococcaceae spp</i>	13,14,15,16,17
	- <i>Streptococcaceae spp</i>	
	- <i>Propionibacteriaceae spp</i>	
	- <i>Corynebacteriaceae spp</i>	
	- <i>Veillonellaceae spp</i>	
	- <i>Prevotellaceae spp</i>	
	- <i>Fusobacteriaceae spp</i>	
	- <i>Neisseriaceae spp</i>	
	- <i>Proteobacteria</i>	
	- <i>Actinobacteria</i>	
	- <i>Firmicutes</i>	
Pets	- <i>Arthrobacter spp</i>	18,13,14,19,20,21,22
- Dogs	- <i>Bacteroides spp</i>	
	- <i>Blautia spp</i>	
	- <i>Moraxella spp</i>	
	- <i>Neisseria spp</i>	
	- <i>Porphyromonas spp</i>	
	- <i>Verrucomicrobia</i>	
	- <i>Spirochaete</i>	
	- <i>Firmicutes</i>	
	- <i>Proteobacteria</i>	
	- <i>Actinobacteria</i>	
- Cats	- <i>Pasteurellaceae spp</i>	23,24,25,21,26,22
	- <i>Bifidobacterium spp</i>	
	- <i>Sporosarcina spp</i>	
	- <i>Moraxella spp</i>	
	- <i>Jeantgalicoccus spp</i>	
	- <i>Prevotella spp</i>	
Outdoor air	- <i>Acinetobacter spp</i>	27,28,29,30
	- <i>Bacillus spp</i>	
	- <i>Pseudomonas spp</i>	
	- <i>Acidobacter spp</i>	
	- <i>Cyanobacteria</i>	
	- <i>Alphaproteobacteria</i>	
	- <i>Gammaproteobacteria</i>	
	- <i>Betaproteobacteria</i>	
	- <i>Clostridia</i>	
	- <i>Deinococcus spp</i>	

1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010

References

1. Qian J, Ferro AR. Resuspension of dust particles in a chamber and associated environmental factors. *Aerosol Sci Technol*; 42. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1080/02786820802220274.

2. Weschler CJ. Roles of the human occupant in indoor chemistry. *Indoor Air* 2016; 26: 6–24.
3. Dannemiller KC, Gent JF, Leaderer BP, et al. Influence of housing characteristics on bacterial and fungal communities in homes of asthmatic children. *Indoor Air* 2016; 26: 179–192.
4. Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, et al. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One* 2012; 7: e34867.
5. Meadow JF, Bateman AC, Herkert KM, et al. Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby. *PeerJ* 2013; 1: e53.
6. Kelley ST, Gilbert JA. Studying the microbiology of the indoor environment. *Genome Biol*; 14. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1186/gb-2013-14-2-202.
7. Nakanishi H, Ohmori T, Hara M, et al. Screening Test for Shed Skin Cells by Measuring the Ratio of Human DNA to *Staphylococcus epidermidis* DNA. *J Forensic Sci* <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.13028/pdf> (2016, accessed 30 September 2016).
8. Prussin II AJ, Vikram A, Bibby KJ, et al. Seasonal Dynamics of the Airborne Bacterial Community and Selected Viruses in a Children’s Daycare Center. *PloS One* 2016; 11: e0151004.
9. Johnson G, Morawska L, Ristovski Z, et al. Modality of human expired aerosol size distributions. *J Aerosol Sci*; 42. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2011.07.009.
10. Tringe SG, Zhang T, Liu X, et al. The airborne metagenome in an indoor urban environment. *PloS One* 2008; 3: e1862.
11. Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 2014; 345: 1048–1052.
12. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol*; 30.
13. Rintala H, Pitkäranta M, Täubel M. Microbial communities associated with house dust. *Adv Appl Microbiol*; 78. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-394805-2.00004-X.
14. Barberan A, Ladau J, Leff JW, et al. Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci U A*; 112. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1073/pnas.1420815112.
15. Kembel SW, Jones E, Kline J, et al. Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome. *ISME J*; 6. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1038/ismej.2011.211.
16. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Resp Crit Care*; 184. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1164/rccm.201104-0655OC.
17. Bouillard L, Michel O, Dramaix M, et al. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12: 187–192.
18. Giovannangelo M, Gehring U, Nordling E, et al. Determinants of house dust endotoxin in three European countries—the AIRALLERG study. *Indoor Air* 2007; 17: 70–79.
19. Maier RM, Palmer MW, Andersen GL, et al. Environmental determinants of and impact on childhood asthma by the bacterial community in household dust. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2663–2667.
20. Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol*; 9. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1186/1710-1492-9-15.
21. Kettleson EM, Adhikari A, Vesper S, et al. Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes. *Environ Res* 2015; 138: 130–135.
22. Ownby DR, Peterson EL, Wegienka G, et al. Are cats and dogs the major source of endotoxin in homes? *Indoor Air* 2013; 23: 219–226.

- 1087
1088 23. Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, et al. House dust exposure mediates gut microbiome
1089 Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proc*
1090 *Natl Acad Sci U A*; 111. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1073/pnas.1310750111.
1091
1092 24. Heinrich J, Gehring U, Douwes J, et al. Pets and vermin are associated with high endotoxin
1093 levels in house dust. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1839–1845.
1094
1095 25. Thorne PS, Cohn RD, Mav D, et al. Predictors of endotoxin levels in US housing.
1096 *Environ Health Perspect* 2009; 117: 763.
1097
1098 26. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 244–253.
1099
1100 27. Park J, Ichijo T, Nasu M, et al. Investigation of bacterial effects of Asian dust events through
1101 comparison with seasonal variability in outdoor airborne bacterial community. *Sci Rep*; 6.
1102 Epub ahead of print 20 October 2016. DOI: 10.1038/srep35706.
1103
1104 28. Bowers RM, Clements N, Emerson JB, et al. Seasonal variability in bacterial and fungal
1105 diversity of the near-surface atmosphere. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 12097–12106.
1106
1107 29. Meadow JF, Altrichter AE, Kembel SW, et al. Indoor airborne bacterial communities are
1108 influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air* 2014; 24: 41–48.
1109
1110 30. Adams RI, Miletto M, Lindow SE, et al. Airborne bacterial communities in residences:
similarities and differences with fungi. *PLoS One* 2014; 9: e91283.

1111 **Table 2** : collection techniques
 1112
 1113

Collection techniques	Advantages	Limitations	References
Impaction on solid medium	- Economically feasible samplers due to their low costs. - Largely used due to their autonomy and their simplicity of use - Collect directly bioaerosols on agar media - No need of post-sampling processing - Sample analyses by culture assays provide data regarding the quantity of culturable bacteria - Several commercially impaction samplers are available for the inhalable fractions of bioaerosols	- Exclusive to culture-based methods - High risk of overloaded plates which make enumeration difficult due to the underestimation of overlap of colonies - When sampling, the air flow rate can influence efficiency	1,2,3,4,5,6,7
Impaction on liquid medium (Cyclone)	- Technique used frequently - Less overloaded plates - Less physical stress for the microorganisms	- Sampler must be sterilized after each sampling - High risk of loss due to the evaporation of the liquid - When sampling, the air flow rate can also influence efficiency	2,8,9,10
Filtration	- Technically simple and economically feasible - The enumeration is directly applied after the technique without any restriction	- The process of post-collection is essential for the quantification of colonies - High risk of overloaded filters in certain highly contaminated environments - High risk of dessication of microorganisms on the filters	11,12,13
Dust collection cost means of assessing	- Easy to use and low-cost means of assessing	- Less number of microorganisms comparable with those recovered using sampling methods	14,15,16,17,18,19
- Electrostatic dust collectors (EDCs) of dust accumulation comparable to other techniques	- long-term bacterial exposure in standardizing the time and the surface		

1129

- | | | | |
|---|---|--|-------|
| - Household vacuum cleaners with or without collection filter | - Easy to use
- Provides much load of bacteria | - Detect only settled bacteria
- Bacterial fate in dust is little known | 20,21 |
|---|---|--|-------|

1130

1131

1132

1133

References

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189

- Robertson LD. Monitoring viable fungal and bacterial bioaerosol concentrations to identify acceptable levels for common indoor environments. *Indoor Built Environ* 1997; 6: 295–300.
- Chang C-W, Wang L-J. Impact of culture media and sampling methods on *Staphylococcus aureus* aerosols. *Indoor Air* 2015; 25: 488–498.
- Cox CS, Wathes CM. Bioaerosols in the environment. *Cox CS Wathes CM Bioaerosol Handb CRC Lewis Publ Boca Raton* 1995; 11–14.
- Cartwright C, Horrocks S, Kirton J, et al. Review of methods to measure bioaerosols from composting sites. *Environ Agency SC040021SR3*.
- Sutton GHC. *Enumeration of Total Airborne Bacteria, Yeast and Mold Contaminants and Identification of Escherichia Coli O157: H7, Listeria Spp., Salmonella Spp., and Staphylococcus Spp. in a Beef and Pork Slaughter Facility*. University of Florida http://etd.fcla.edu/UF/UFE0006613/cosenza_g.pdf (2004, accessed 21 November 2016).
- Willeke K, Grinshpun SA, Donnelly J, et al. Physical and biological sampling efficiencies of bioaerosol samplers. *Indoor Air* 1993; 93: 131–136.
- Jensen PA, Schafer MP. Sampling and characterization of bioaerosols. *NIOSH Man Anal Methods* 1998; 1: 82–112.
- Douwes J, Versloot P, Hollander A, et al. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1763–1769.
- Terzieva S, Donnelly J, Ulevicius V, et al. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2264–2272.
- Yu K-P, Chen Y-P, Gong J-Y, et al. Improving the collection efficiency of the liquid impinger for ultrafine particles and viral aerosols by applying granular bed filtration. *J Aerosol Sci* 2016; 101: 133–143.
- DURAND KT, MUILENBERG ML, BURGE HA, et al. Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann Occup Hyg* 2002; 46: 113–118.
- Adhikari A, Yermakov M, Indugula R, et al. Culturability of *Bacillus* spores on aerosol collection filters exposed to airborne combustion products of Al, Mg, and B· Ti. *Environ Res* 2016; 147: 212–217.
- Henningson EW, Ahlberg MS. Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review. *J Aerosol Sci* 1994; 25: 1459–1492.
- Rocchi S, Reboux G, Frossard V, et al. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. *Sci Total Environ* 2015; 505: 1026–1035.
- Madsen AM, Matthiesen CB, Frederiksen MW, et al. Sampling, extraction and measurement of bacteria, endotoxin, fungi and inflammatory potential of settling indoor dust. *J Environ Monit* 2012; 14: 3230–3239.
- Jacobs J, Borràs-Santos A, Krop E, et al. Dampness, bacterial and fungal components in dust in primary schools and respiratory health in schoolchildren across Europe. *Occup Environ Med* 2014; 71: 704–712.
- Noss I, Doekes G, Sander I, et al. Passive airborne dust sampling with the electrostatic dustfall collector: optimization of storage and extraction procedures for endotoxin and glucan measurement. *Ann Occup Hyg* 2010; 54: 651–658.
- Krop EJ, Jacobs JH, Sander I, et al. Allergens and β -glucans in dutch homes and schools: characterizing airborne levels. *PLoS One* 2014; 9: e88871.
- Macher JM. Review of methods to collect settled dust and isolate culturable microorganisms. *Indoor Air* 2001; 11: 99–110.

20. Normand A-C, Vacheyrou M, Sudre B, et al. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7617–7623.
21. Frankel M, Bekö G, Timm M, et al. Seasonal variation of indoor microbial exposures and their relations to temperature, relative humidity and air exchange rates. *Appl Environ Microbiol* 2012; AEM–02069.

Table 3 : analyses of bacterial aerosols

Analyses	Advantages	Limitations	References
Culture-based methods	- Low cost and easy to use. - Requires little technical equipment - Can be used to identify specific taxa of micro organisms	- Will only identify viable and culturable microorganisms. - Non-viable cells (most those likely to be present in the bioaerosol) will not be detected - Not representative of the microorganisms in the bioaerosol - Poor precision of measurement	1,2,3
q-PCR-based molecular methods	- Highly sensitive and quantitative - Fast and accurate gene quantification - Considered « gold standard » - Can detect as few as 5 molecules - Excellent dynamic range linear over several orders of magnitude - Without strict conditions of transport, medium and duration of conservation	- Need sequence information of the bacteria to detect - Potential presence of inhibitors of polymerase in dust - Risk of contamination - No possibility to obtain information about the viability of microorganisms	4,5,6
Next Generation Sequencing (NGS) technologies	- Highly informative - High throughput	- Expensive technique - Not quantitative - Need reliable sequence database - Need high qualified bio-computer scientists	7,8,9,10

References

1. Cartwright C, Horrocks S, Kirton J, et al. Review of methods to measure bioaerosols from composting sites. *Environ Agency SC040021SR3*.
2. McLain JE, Cytryn E, Durso LM, et al. Culture-based methods for detection of antibiotic resistance in agroecosystems: Advantages, challenges, and gaps in knowledge. *J Environ Qual* 2016; 45: 432–440.
3. Melendez JH, Frankel YM, An AT, et al. Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1762–1769.
4. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; 67: 6–20.
5. Douterelo I, Boxall JB, Deines P, et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Res* 2014; 65: 134–156.

1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244

6. Ho GY, Windsor HM. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: polymerase chain reaction tests. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 903–915.

7. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 333–351.

8. Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31–46.

9. Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB, et al. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem* 2011; 83: 4327–4341.

10. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Res Int*; 2012<http://downloads.hindawi.com/journals/biomed/2012/251364.pdf> (2012, accessed 9 January 2017).

III. Objectifs de la thèse

1. Contexte de la thèse

Comme indiqué plus haut, l'exposition aux bactéries en environnement intérieur semble être associée à l'aggravation des pathologies respiratoires.

Un premier travail de master 2 a été consacré à « débroussailler » le sujet par la comparaison de deux outils de collecte d'air : le Samplair (AES Laboratoires, Bruz, France), impacteur sur milieu gélosé et le Coriolis (Bertin Technologies, Paris, France), impacteur cyclonique en milieu liquide. Trois types d'analyses ont également été évalués en parallèle : la culture, la qPCR et le séquençage haut débit.

Les deux biocollecteurs ont présenté la même efficacité de collecte. En effet, les concentrations en flore cultivable évaluées par Coriolis μ se sont révélées fortement corrélées à celles obtenues par Sampl'air, redémontrant ainsi son efficacité de collecte (Méheust *et al.*, 2012). Cependant, les résultats obtenus avec l'impacteur en milieu gélosé ont montré une prédominance des bactéries à Gram positif dans la composition de la flore cultivable sur gélose ordinaire, comme décrit dans la littérature (Madsen *et al.*, 2012). La présence de microcoques a été constatée dans tous les prélèvements après incubation. L'espèce *Micrococcus luteus* (Gram +) était la plus importante en nombre parmi la flore bactérienne cultivable pour les essais au laboratoire. Les genres *Pseudomonas* et *Staphylococcus* ont également été retrouvés dans tous les prélèvements d'air. De nombreuses espèces composant la flore retrouvée dans l'air intérieur sont d'origine commensale (Madsen *et al.*, 2012). Une technique PCR en temps réel (q-PCR) de type SYBR Green a été développée pour la quantification de la flore totale bactérienne dans l'air. Elle repose sur l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S des bactéries. Cependant les premiers essais se sont avérés décevants avec une limite de quantification haute entraînant un nombre important de résultats inférieurs à cette limite. Il faut cependant noter que, pour les valeurs élevées de contamination, il a été possible de déterminer un coefficient de corrélation moyen entre la détection par qPCR et par culture de 18, soit de l'ordre d'un log décimal ce qui est assez souvent retrouvé dans la littérature (Ervin *et al.*, 2013).

Une première analyse par pyroséquençage a également été réalisée. Pour ce faire, dix-sept aliquots d'ADN obtenus à partir d'échantillons de prélèvement d'air par Coriolis au sein des logements ont été séquencés. Les résultats montrent une fréquence élevée de *Burkholderia* (pratiquement 50% des séquences détectées dans 7 logements analysés), et moindre pour

Pseudomonas, *Micrococcus*, *Staphylococcus* and *Ralstonia* (proche de *Burkholderia*). *Stenotrophomonas* un important pathogène a été détecté dans plus de la moitié des logements de même que *Acinetobacter baumannii* détecté dans 3 logements. À noter qu'une étude parue récemment (Gaüzère et al., 2014) a montré la stabilité de la population bactérienne de l'air intérieur dans un environnement particulier : le musée du Louvre. Elle démontre une prépondérance des actinobactéries, alphaprotéobactéries, gammaprotéobactéries et Firmicutes. Lee et al., (2010) avaient recensé une diversité équivalente en mettant en évidence une prédominance de *Proteobacteria*, d'*Actinobacteria*, de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* par analyse RFLP.

Considérant la difficulté de l'utilisation des prélèvements d'air pour déterminer la flore bactérienne de l'habitat, nous nous sommes intéressés aux poussières comme matrice accumulant la contamination bactérienne.

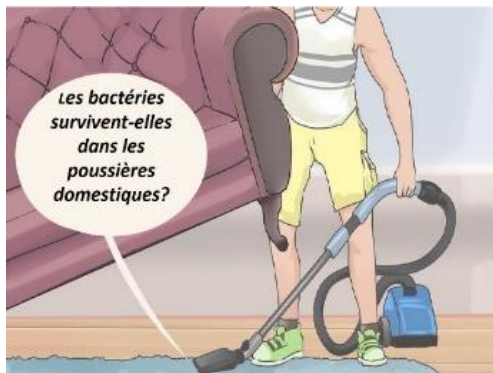
Un deuxième travail de master 2 s'est alors focalisé sur l'utilisation de lingettes électrostatiques comme outil de prélèvement, et en particulier à la phase de récupération des bactéries adsorbées sur les lingettes. L'optimisation du traitement des échantillons générés a été menée en plusieurs étapes durant lesquelles 3 paramètres ont été testés : la composition du tampon d'extraction et le mode d'extraction des bactéries à partir des lingettes ainsi que la marque de lingettes électrostatiques utilisée. L'utilisation des souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* a permis de travailler avec des concentrations de référence. Les résultats quantitatifs obtenus, dans un premier temps par culture puis vérifiés par PCR quantitative SYBR Green® ciblant un gène spécifique à chaque espèce, ont permis de montrer la difficulté de décrocher les bactéries des lingettes et donc l'intérêt limité d'utiliser cet outil de collecte.

Par contre, la collecte active de poussières par aspirateur mérite d'être investiguée. D'autant plus que le laboratoire participe à deux projets de recherche pour lesquels des échantillons de poussières ont été collectés pour analyse de moisissures et d'allergènes. Le projet Asthm'Child a pour but d'étudier les déterminants de l'asthme dans une cohorte d'enfants, avec prélèvement de 150 échantillons de poussières dans les logements. Le projet ECENVIR a pour objectif d'évaluer l'action des conseillers médicaux en environnement intérieur mais aussi de compléter leur intervention en utilisant les résultats des mesurages environnementaux réalisés pour améliorer la qualité de vie des patients asthmatiques sévères et proposer des mesures d'éviction ciblées sur les polluants identifiés. Le recrutement des cent quarante patients est en cours ainsi que la collecte d'échantillons de poussière à leur domicile.

2. Objectifs

L'objectif principal de la thèse est d'étudier les moyens d'évaluer l'exposition aux bactéries en environnement intérieur pour comprendre leur rôle dans les pathologies respiratoires. Pour cela, il s'agira de :

- améliorer les conditions d'analyse des poussières en laboratoire.
- étudier la contamination bactérienne des poussières récoltées dans les projets Asthm'Child et ECENVIR en lien avec le statut respiratoire des occupants et les caractéristiques des logements.



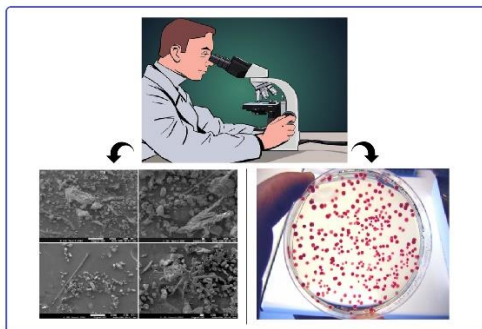
Exposition aux bactéries environnementales dans l'habitat

Chapitre 2 :

La poussière domestique comme un modèle pour évaluer la contamination bactérienne dans l'habitat

Chapitre 3 :

Caractérisation du microbiome de poussière domestique de patients asthmatiques sévères et de patients contrôlés non-asthmatiques : une étude pilote utilisant le séquençage de nouvelle génération



Résultats

Les travaux de thèse ont donné lieu à la rédaction de ces articles :

Article 2 : Indoor dust as a template to assess indoor aerosol bacteria contamination.

Article 3 : Characterization of indoor dust bacterial microbiota in homes of asthma and non asthma patients: a pilot study using next generation sequencing.

Chapitre 2. La poussière intérieure comme un modèle pour évaluer la contamination des aérosols bactériens

Introduction

Comme discuté précédemment, pour évaluer le niveau de contamination bactérienne dans les environnements intérieurs, il est possible d'échantillonner l'air mais cela reste représentatif seulement du temps et des conditions auxquelles l'échantillon est collecté. Pour remédier à cela, des auteurs ont proposé de collecter la poussière de maison comme accumulant pendant des heures la contamination bactérienne et observer si elle peut être plus représentative de cette contamination à l'intérieur des habitats.

La littérature ne rapporte que peu de travaux sur la survie des aérosols bactériens dans les poussières domestiques. Nos travaux ont pour objet l'étude de la survie des bactéries déposées et accumulées dans les poussières domestiques.

Dans l'article 2, l'étude a porté sur le développement d'une technique de contamination au laboratoire des poussières de maison avec la flore bactérienne en laboratoire afin d'apporter des informations sur le temps de survie et de quantifier les cellules viables présentes dans des échantillons environnementaux résidentiels.

Résultats et Discussion

Dans cette étude, un protocole d'évaluation de survie de la flore bactérienne dans les poussières de maison a été testé (Figure2).

Pour se rapprocher de la contamination naturelle de poussières avec des bactéries, deux bactéries susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement (*Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis*) ont été cultivées sur le milieu de culture Trypticase Soja Agar (TSA), mélangées avec la poussière et séchées sur un filtre de polycarbonate sous des conditions d'asepsie générales. Deux types de poussières ont été comparés : stériles et non-stériles, pour évaluer le rôle possible d'autres bactéries et la matière organique sur la survie de bactéries. Le premier point à mentionner est le fait que cette poussière a un effet protecteur sur des bactéries puisque les bactéries mises en contact avec la poussière survivent plus longtemps que celles qui ne le sont pas. L'effet protecteur de poussière contre la lumière et en particulier le rayonnement UV peut jouer un rôle important et peut influencer les niveaux de survie des bactéries aéroportées choisies (Tang, 2009). Le deuxième point nous renseigne sur le fait que cette survie est meilleure dans la poussière non-stérile par rapport à la poussière stérile. On peut l'expliquer par la présence de matière organique comme la source de

substance nutritive qui peut être dégradée par la stérilisation. Le contenu de la matière organique et inorganique varie d'une poussière de maison à une autre. Le troisième point consiste en ce que les allures des courbes de survie sont les mêmes entre *Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis*. Cette similitude est étonnante car on aurait pu supposer que les bactéries de type coques sont plus résistants aux conditions environnementales défavorables en raison de la composition de leur paroi cellulaire. Un autre point nous renseigne du temps de survie des deux souches bactériennes et qui est moins de 7 heures. Ceci est probablement dû au taux d'humidité très faible des poussières, il n'est que de 6%. La capacité pour résister aux humidités relatives différentes (RH) change d'un genre bactérien à un autre. Par exemple, *Escherichia coli* survit mieux à une importante humidité relative (90 %), tandis que *Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis* sont capables de survivre à un RH de 40 % (Nevalainen, 1989). La relation entre la survie de *Serratia marcescens* et RH a été étudiée et les auteurs ont trouvé une réduction du taux de mortalité naturelle avec l'augmentation RH, ce qui démontre bien le besoin d'humidité pour la survie des bactéries, même environnementales (Lighthart et al., 1971).

Indoor dust as a template to assess indoor aerosol bacteria contamination

Yanis Guenoune^{1,2*} and Pierre Le Cann^{1,2}

¹EHESP, Rennes, 35000, France

²IRSET- INSERM UMR 1085, Rennes, 35000, France

**Corresponding author:*

Yanis Guenoune, Environmental and Health Laboratory, EHESP School of Public Health, Avenue
Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 RENNES Cedex, France

yanis.guenoune@ehesp.fr, +33 (0)2 99 02 26 51

Abstract

The exposure of occupants of housing to indoor air pollutants has increased in recent decades.

But among microbiological contaminants, bacterial aerosols remain poorly studied and their role in respiratory problems needs to be studied.

Scientific literature demonstrates the link between bacterial aerosol contamination and dust bacterial contamination. As house dust can accumulate bacterial contamination and is easy to collect we were wondering of the fate of bacteria on this matrix.

To address this issue, we selected a model of environmental Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria and study the fate of *Serratia marcescens* and *Staphylococcus epidermidis* in sterilized or non-sterilized household dust. Dust samples were contaminated by bacteria and let drying on polycarbonate filters. In 2 hours 84% of the initial *Serratia* died in sterilized dust but only 36% of non-sterilized dust. For *Staphylococci*, 66% of *Staphylococcus* died in sterilized dust but only 48% of non-sterilized dust, showing a better survival of cocci than bacilli. Bacterial fate was also studied directly in air, without dust. 92% of *Serratia* and 88% died in 1h.

Bacteria can survive in dust for a longer period than in the air. This could be due to the presence of water and organic matter in dust, but also the protection of bacteria to UV by dust. In conclusion, to study bacterial contamination indoor it is more interesting to investigate their presence in dust as this matrix support a more important survival of bacteria than air and can also accumulate the contamination over time.

Keywords: Indoor air quality, Bacterial aerosols, Household dust, Environmental health.

Introduction

Indoor air quality is closely related to human health since most people spend nearly 90% of lifetime in the indoor environment [1].

Airborne biological agents or bioaerosols constitute a very important problem of public health. As part of the study of biological indoor air pollution and the occurrence of respiratory disorders, the bioaerosols were the object of a lot of interest from scientists and public authorities [2]. Moreover, as we spend most of our time in the indoor environments, we undergo continuous exposure to these bacterial aerosols communities and we have a limited understanding of their impact on human respiratory health. The bacterial aerosols can vary in kind and in load according to the considered environment [3], environmental settings such as the temperature, the humidity, the weather conditions or the season [4], the presence or absence of the occupants and pets and the rate of air change in dwellings [5]. However, the presence of an environmental reservoir has not been linked with respiratory illnesses. It has not been clearly identified either any airborne bacterial genera likely to be at the origin of these pathologies.

The presence of culturable Gram-positive bacteria is much more abundant than Gram-negative species when it comes to indoor air. The total bacteria in indoor air that can be cultured is relatively small; for example, Flannigan B, McCabe E, Jupe S [6] found that < 1% of the total bacteria burden in a set of houses was culturable [6]. From another point of view, number of research studies concerned the issue of the fate of the bacterial aerosols, but we do not know the mechanism of their determinants yet.

To assess the level of bacterial contamination indoor, one can sample air but this is representative only of the time and the conditions at which the sample is collected. To address this, authors proposed to collect dust which can accumulate bacterial contamination overtime and so can be more representative of the indoor bacterial contamination.

As there is scarce literature on the survival of bacteria on dust, our study deals with the assessment of the survivability of bacterial deposited on household dust. *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* were used as models as they are both environmental bacteria. In contrary to most of the studies which focus on the survival of bacteria on dust in liquid conditions, we set up an artificial way of contamination of dust by mixing dust with bacterial culture and let them dry on polycarbonate filters to mimic natural contamination of dust. To

help to understand the survivability of bacteria in dust, we characterized the dust by its physico-chemical composition and observed it by scanning electronic microscope.

Materials and Methods

Floor dust collection

500 g of dust was collected in personal vacuum cleaner bag (the vacuum cleaner was used at home). Household dust was sieved in a 425 µm mesh metallic filter and stored at 4°C. For further experiments, 50 g of dust were sterilized at 121°C for 20 minutes.

Physicochemical characterization of house dust

Dry residue at 105°C

The dry matter content is expressed as a percentage relative to the weight of the sample. The measurement method consists in placing a sample dust in an oven at 105°C, until a constant mass is obtained.

After initial experiments, it has been found preferable to dry a quantity of 3g of sterilized and non-sterilized household dust that were incubated in triplicate each in silica capsules for 24h at 105°C in incubator StabiliTherm EU 2-118 (Thermo Electron Industries SAS, France).

Capsules were then weighed on a Sartorius balance (Sartorius, France) accurate to 10^{-5} g, and calibrated annually.

Ash contained at 550°C

Dehydrated dust samples were then placed in a temperature-controlled oven manufactured by Nabertherm (Nabertherm, GmbH model: L9/11/ B180, Germany) for two hours at 550°C to obtain the ashes residue.

Elementary analysis of carbon, hydrogen, nitrogen, sulphur and oxygen

CHNS-O elemental analysers provide a means for the rapid determination of the composition of dust samples in carbon, hydrogen, nitrogen sulphur and oxygen in organic matrices and other types of materials. The direct analysis of C, H, N, S, and O was carried out in triplicate on about 1 mg of sterilized or non-sterilized dust by elemental analyser (Flash EA 1112, ThermoScientific, France).

Semi Quantitative chemical composition of the house dust

Energy dispersive X-ray fluorescence analyses (EDX) were performed to determine the semi quantitative chemical composition of the dust samples (Rayny series EDX-800HS spectrometer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Scanning electronic microscopy analysis

The samples were observed using scanning electron microscopy (SEM) JSM-7610F (JEOL, Japan). JSM-7610F is an ultra-high resolution Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope which has semi-in-lens objective lens. The JSM-7610F has a magnification of x 1,000,000 with a resolution of 1nm.

Samples of dust were plotted on stubs coated with carbon and observed without any further treatment.

Bacterial strains and culture conditions

The environmental Gram-negative bacteria *Serratia marcescens* ATCC 14990 and Gram-positive bacteria: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 13880 were grown on Trypticase Soja Agar (TSA), (Biomérieux, France) at 37°C.

The bacteria were cultivated overnight in 500 mL of TSA to obtain about 10^8 CFU mL⁻¹. The average density of the suspension of bacteria (inoculum which was loaded on the polycarbonate filter) ranged from 3.0×10^8 to 5.2×10^8 CFU mL⁻¹ depending on the strains. To enumerate the suspensions, 100 µL of tenfold dilutions were titrated and plated on TSA and incubated overnight at 37°C. Plates were then counted and the survival time of each bacterial strain was determined.

Set-up for artificial filter contamination

A filtration set-up was developed and validated for the study to contaminate polycarbonate filters with the selected bacterial strains. Firstly, 500 µL of bacterial suspension were added to a 15 mL tube and 10 mg of dust were added to the tube, then 200 µL of suspension and finally 20 mg of household dust (figure 1). After 10 minutes of contact between the bacterial dilution and the household dust sample, the suspension was transferred in triplicate to a polycarbonate filter with a porosity of 0.45 µm. The polycarbonate filters were transferred on empty plates then let dried for 10 min, 30 min, 60 min, 120 min (2 hours), 300 min (5 hours), 420 min (7 hours), and 540 min (9 hours) under microbiological safety cabinet. All filters were transferred to agar plates and incubated at 37°C overnight (figure 2). The number of bacteria

was determined (CFU sample⁻¹) using the plate count method. The survival rate (S) of the environmental bacteria samples (Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci) was determined by the formula:

$$S = (N_t/N_0) \times 100\%,$$

Where N_0 is the number of bacteria present on the polycarbonate filter at the time $t = 0$ h (CFU sample⁻¹), and N_t is the number of bacteria present on the polycarbonate filter after 24h of incubation (CFU sample⁻¹) at 37°C.

Results

Physicochemical characterization of the household dust

The dry residue at 105°C of sterilized dust is at 950 g/kg, while it is at 940g/kg for the non-sterilized dust samples.

The dry residue at 550°C of sterilized dust is at 696g/kg, while it is at 671g/kg for the non-sterilized dust samples.

Chemical composition of dust

The average composition of the sterilized dust is 1,54% of nitrogen, 14,18% of carbon, 1,85% of hydrogen, 1,26% of sulphur, and 6% of oxygen.

The average composition of non-sterilized dust is 1,86% of nitrogen, 17% of carbon, 2,22% of hydrogen 1,11% of sulphur, and 3% of oxygen.

The organic matter represents on average 19% of sterilized dust whereas it represents 22% of non-sterilized dust.

Semi Quantitative chemical composition of non-sterilized or sterilized dust is almost the same. The major minerals in the household dust are silice (SiO₂: 36,84% versus 38,24% respectively), carbon (C: 17% versus 14,2% respectively), calcium oxide (CaO: 14,89% versus 15,33% respectively), sulphur trioxide (SO₃: 9,35% versus 9,3% respectively), aluminium oxide (Al₂O₃: 8,64% versus 9,5% respectively), haematite (Fe₂O₃: 6,27% versus 5,77% respectively), potassium oxide (K₂O: 3% versus 2,99% respectively), and titanium dioxide (TiO₂: 2,6% versus 2,62% respectively).

It is not possible to make the difference between sterilized dust to non-sterilized dust. Fibers and quartz particles are visible. Dust is composed of minerals of different size. It is not

possible to distinguish elements that suggest the presence of bacteria in non-sterilized dust. However, it is possible to see a star-shaped structure which is probably a seed.

Artificial contamination of household dust

For this study, triplicates were conducted and the mean of the viability of bacteria was calculated. The viability is defined as the fraction of the number of viable i.e. culturable microbes at time t over the number of viable microbes at $t = 0$.

The percentage of survival *Serratia marcescens* over the exposure time showed that from 0 to 10 minutes, there is a very small loss of viability on control samples but on exposed to dust samples the loss of viability was 10%. From 10 minutes to 2 hours; 80% of viability was lost in 30 minutes in control samples, whereas in exposed samples 2 hours are needed to reach the same result.

After 2 hours of exposition, a gradual loss of viability was observed to reach the death of all bacteria after 7 hours.

The percentage of survival *Staphylococcus epidermidis* over the exposure time:

From 0 to 10 minutes, viability is very little affected.

In two hours, there is a difference in viability since about 83% of bacteria are dead in control samples whereas only 30% of bacteria associated to dust. This difference decreases to reach a minimum in 7 hours.

From 0 to 10 minutes, in sterilized dust, there is a high loss of viability (76%) of *Serratia marcescens* without dust whereas when bacteria are in contact with dust the loss of viability is only 22%. In one hour, the difference is even higher (95% versus 40%).

After 5h there is no more difference.

In non-sterilized dust, the difference between bacteria exposed to dust vs non-exposed is less important, since in one hour, only 21% of control bacteria are viable vs 72% of the exposed to dust bacteria. After 5h, for both control and exposed samples, the rates of viability were under 10%.

Discussion

Bacteria may play a role in respiratory diseases acquired indoor. Certain studies showed that dust can accumulate microbial contamination indoor over time [7-9]. House dust is a complex mixture of particulate material of outdoor, indoor, anthropogenic, and natural origin. As dust is supposed to be dry, this study explored the survival of bacteria on this matrix using an artificial system of contamination. The objective of the study was to explore the possibility of using the dust as an accumulator to assess bacterial contamination indoor by the mean of culture experiments. To assess the possibility of bacteria to survive on dust it is important to characterize its composition. There is a significant variation between particles in size and composition [10]. Dust was sieved in a 425 µm mesh metallic filter to eliminate big debris. The dry residue at 105°C of sterilized dust showed that water content of dust is 5%, while it is at 6% for the non-sterilized dust samples. It is in the same range than observed by Molhave (2.5+/- 1%) and the organic fraction range from 19% in sterilized dust to 22% in non-sterilized dust. This is different from the 33% obtained by Molhave in samples collected in seven Danish buildings [11], but if we add oxygen to the result we found 30 and 33% respectively. The mineral composition of dust is reflecting the presence of soil and rock debris as seen in scanning electronic microscopy, but also fibers and seeds. But we were not able to see bacteria in non-sterilized dust. This may be due to the treatment of the sample that is not able to maintain the structure of bacteria. A large diversity of size of the particles is observed showing the heterogeneity of the samples. The major minerals in the household dust are silica highly common in soils, calcium oxide, sulphur trioxide, aluminium oxide, haematite, potassium oxide, and titanium dioxide. According to Fergusson [12], 45-50% of house dust comes from soil and street dust, about 2-3% comes from tyre wear, cement and car emissions.

To mimic natural contamination of dust with bacteria, two strains of environmental bacteria (*Serratia marcescens* and *Staphylococcus epidermidis*) were grown on trypticase soja medium, mixed with dust and let them dry on polycarbonate filter under biosafety microbial cabinet. Two types of dust were compared: natural and sterilized vacuum collected dust to assess the possible role of other bacteria and organic matter on the survival of bacteria. The first fact to mention is that dust has a protective effect on bacteria since bacteria in contact with dust survive longer. The protective effect of dust against UV light can play an important role and may influence the survival levels of the selected airborne bacteria [13]. The second point is that

survival is better in non-sterilized dust. This point can be explained by the availability of organic matter as source of nutrient which can be degraded by sterilization. The content of the organic and inorganic material varies from dust house to another. The house dust from kindergartens frequently consists almost completely of inorganic materials such as sand, loam, and clay from sand pits. House dust from the residences of animal owners, also having heavy abrasion of carpets, can consist almost exclusively of organic material [10].

The third point is there is no difference of survival between *Serratia* and *Staphylococcus*. This is surprising as one can suppose that cocci are more resistant to adverse environmental conditions due to the composition of their cell wall.

Another point is that bacterial survival is low since it is less than 7 hours. This can be explained by the dryness of the dust (94%). The capacity to resist to different relative humidities (RH) changes from a bacterial genus to another one. For example, *Escherichia coli* survives better at high RH (up to 90%), whereas *Serratia marcescens* and *Staphylococci* survive best at a RH below 40% [14]. The relation between survivability of *Serratia marcescens* and RH has been studied and the authors found a reduction in natural death rate with increasing RH, reaching exceedingly low values at humidities above 80% [15], which is observed in this study.

Finally, survival of *Serratia marcescens* is better than the one of *Staphylococcus epidermidis*. This is surprising as Hirai [16] studied the fate of different bacteria of nosocomial origin on glass plate and cotton lint. He found that survival of *Staphylococcus* is more than 25 days and that 50% of gram negative cells were viable after 7h incubation in dry conditions. Survival of *Salmonella* in vacuum dust has also be studied by Haysom and Sharp [17]. They found that *Salmonella* can survive for 60 days in dust but their experiment was carried out by mixing dust with liquid medium which is very different to what really happen in the vacuum cleaner. But an interesting point was that they could isolate *Salmonella* from dust collected in vacuum cleaner bags, suggesting that it is able to survive in dry conditions. It was the same for *E. coli* which was also collected in dust [18].

Survival has been defined as maintenance of viability under numerous factors. Less clear is what constitutes « viability » and what constitutes « numerous factors » [19]. Historically, Valentine R, Bradfield J [20] proposed the term « viable » to describe cells capable of multiplying and forming colonies, but suggested the term « live » for cells showing signs of viability, like respiration, even if the cells were unable to divide under the prevailing conditions. This might lead one to consider that viable cells are not alive, which is obviously not so.

Jannasch HW [21] suggested that, below certain threshold concentrations of substrate, two strategies for survival were observed: (i) the ability to grow at low substrate concentrations and (ii) the ability to become temporarily inactive (nonculturable) but to survive. Living metabolically active, bacterial populations exist that do not form colonies on agar plates *in vitro* and therefore exhibit no « viable count ». The viable but nonculturable bacterial populations cannot be enumerated by currently employed culturing methods, because the populations do not grow on conventional culture media, but their quantification is possible by methods that do not require culturing [22].

In conclusion, this study showed that viability of bacteria in dust is short. That means that to study the composition of bacterial flora indoor, especially if dust is used as an accumulator of bacteria, it would be better to use molecular approach like QPCR or next generation sequencing.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Université Sorbonne Paris Cité. We would like to thank Julien Lefebvre from Institut Technique des Gaz et de l'Air, in Rennes for scanning electronic microscopy.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Klepeis NE, Nelson WC, Ott WR, Robinson JP, Tsang AM, Switzer P, *et al.* 2001. The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. **11**: 231.
2. Flannigan B, Samson RA, Miller JD. 2016. *Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control*, pp. Ed. CRC Press.
3. Johansson E, Vesper S, Levin L, LeMasters G, Grinshpun S, Reponen T. 2011. Streptomycetes in house dust: associations with housing characteristics and endotoxin. *Indoor air*. **21**: 300-310.
4. Nasir ZA, Colbeck I, Sultan S, Ahmed S. 2012. Bioaerosols in residential micro-environments in low income countries: a case study from Pakistan. *Environmental pollution*. **168**: 15-22.
5. Madsen AM, Matthiesen CB, Frederiksen MW, Frederiksen M, Frankel M, Spilak M, *et al.* 2012. Sampling, extraction and measurement of bacteria, endotoxin, fungi and inflammatory potential of settling indoor dust. *Journal of Environmental Monitoring*. **14**: 3230-3239.
6. Flannigan B, McCabe E, Jupe S. 1996. Quantification of air-and dust-borne deteriorogenic microorganisms in homes. *DECHEMA MONOGRAPHIEN*. 377-384.

8. Dales R, Liu L, Wheeler AJ, Gilbert NL. 2008. Quality of indoor residential air and health. *Canadian Medical Association Journal*. **179**: 147-152.
9. Fernández LC, Alvarez RF, González-Barcala FJ, Portal JAR. 2013. Indoor air contaminants and their impact on respiratory pathologies. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*. **49**: 22-27.
10. Horick N, Weller E, Milton DK, Gold DR, Li R, Spiegelman D. 2006. Home endotoxin exposure and wheeze in infants: correction for bias due to exposure measurement error. *Environmental health perspectives*. **114**: 135.
11. Morawska L, Salthammer T. 2006. *Indoor environment: airborne particles and settled dust*, pp. Ed. John Wiley & Sons.
12. Mølhave L, Schneider T, Kjaergaard S, Larsen L, Norn S, Jørgensen O. 2000. House dust in seven Danish offices. *Atmospheric Environment*. **34**: 4767-4779.
13. Fergusson JE, Forbes EA, Schroeder RJ, Ryan DE. 1986. The elemental composition and sources of house dust and street dust. *Science of the total environment*. **50**: 217-221.
14. Tang JW. 2009. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *Journal of the Royal Society Interface*. rsif20090227.
15. Nevalainen A. 1989. *Bacterial aerosols in indoor air*, pp. Ed. Kansanterveyslaitos KTL.
16. Lighthart B, Hiatt VE, Rossano Jr AT. 1971. The survival of airborne *Serratia marcescens* in urban concentrations of sulfur dioxide. *Journal of the Air Pollution Control Association*. **21**: 639-642.
17. Hirai Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*. **19**: 191-200.
18. Haysom I, Sharp K. 2003. The survival and recovery of bacteria in vacuum cleaner dust. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. **123**: 39-45.
19. Rosas I, Salinas E, Yela A, Calva E, Eslava C, Cravioto A. 1997. *Escherichia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico City. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4093-4095.
20. Stevenson LH. 1977. A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbial ecology*. **4**: 127-133.
21. Valentine R, Bradfield J. 1954. The urea method for bacterial viability counts with the electron microscope and its relation to other viability counting methods. *Microbiology*. **11**: 349-357.
22. Jannasch HW. 1967. Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. *Limnology and Oceanography*. **12**: 264-271.
23. Roszak D, Colwell R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*. **51**: 365.

Figure legends

Figure 1. Protocol showing a combination that ensures maximum contamination of dust matrices.

Figure 2. Protocol showing the survival time of bacterial strains.

Figure 3. Comparison between the dry residue at 105°C and the dry residue at 550°C of sterilized and non-sterilized house dust samples.

Figure 4. Scanning electron micrograph showing composition of sterilized (up) and non-sterilized (down) dust.

Figure 5. Comparison of the percentage of survival *Serratia marcescens* between control (bacterial suspension) and exposed (bacterial suspension with sterilized and non-sterilized dust) samples over time using Wilcoxon test ; there is a significant statistical difference between sterilized dust and control ($p= 0,046$) ; between non-sterilized dust and control ($p= 0,028$), and between non-sterilized and sterilized dust ($p < 10^{-3}$).

Figure 6. Comparison of the percentage of survival *Staphylococcus epidermidis* between control (bacterial suspension) and exposed (bacterial suspension with sterilized and non-sterilized dust) samples over time using Wilcoxon test ; there is a significant statistical difference between sterilized dust and control ($p= 0,017$) ; between non-sterilized dust and control ($p= 0,035$), and there is no significant statistical difference between non-sterilized and sterilized dust ($p= 0,109$).

Table 1. Chemical composition and elementary analysis CHNS – O of the sterilized and non-sterilized house dust

Table 2. Semi Quantitative chemical composition of dust

Figures

Fig. 1

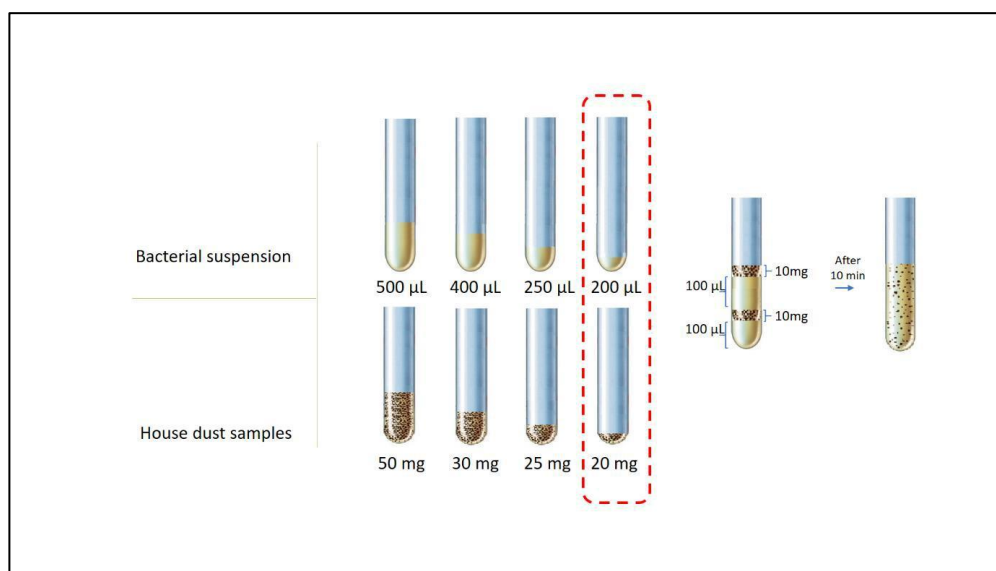


Fig. 2

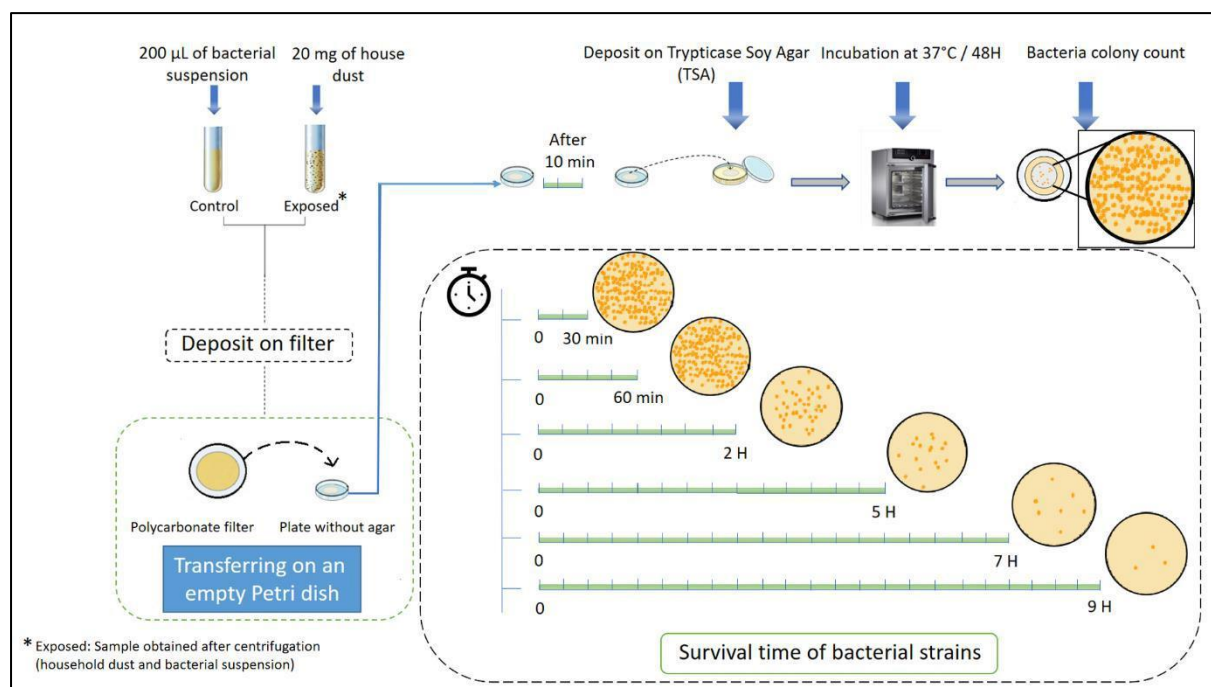


Fig. 3

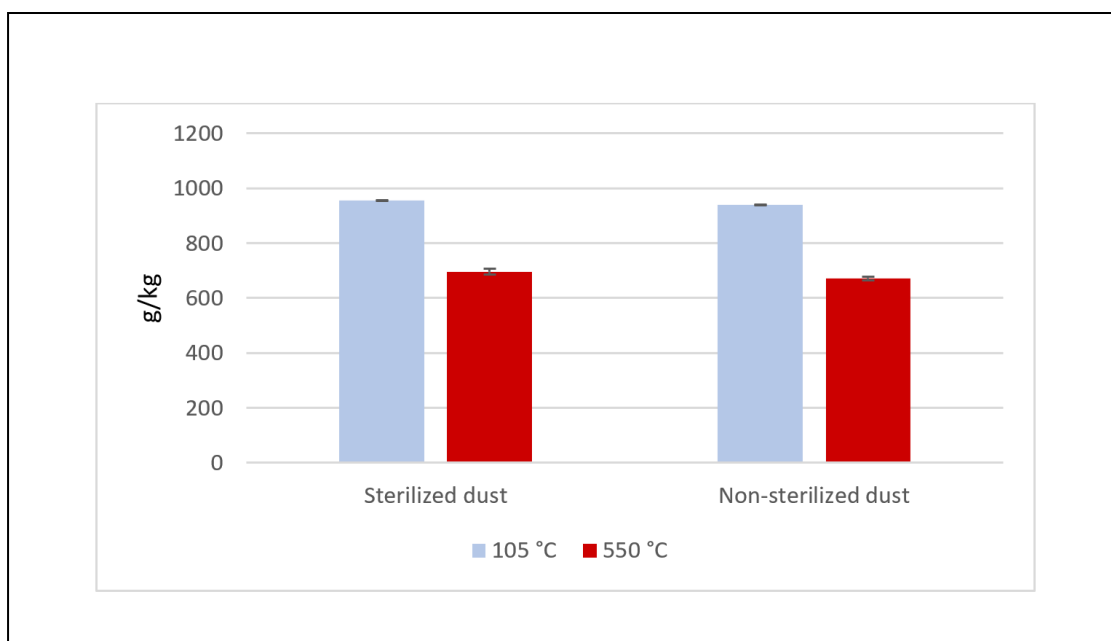


Fig. 4

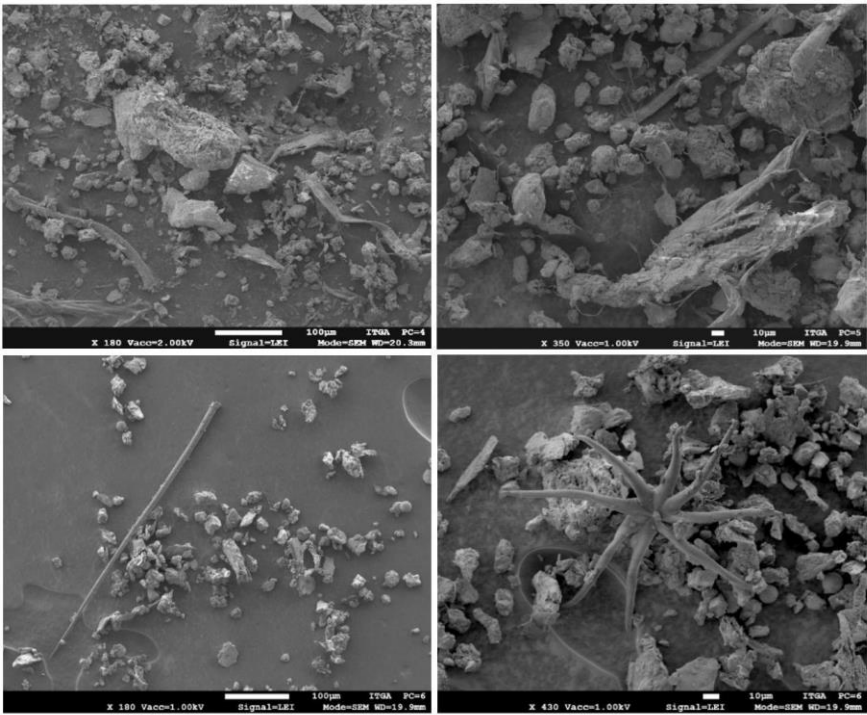


Fig. 5

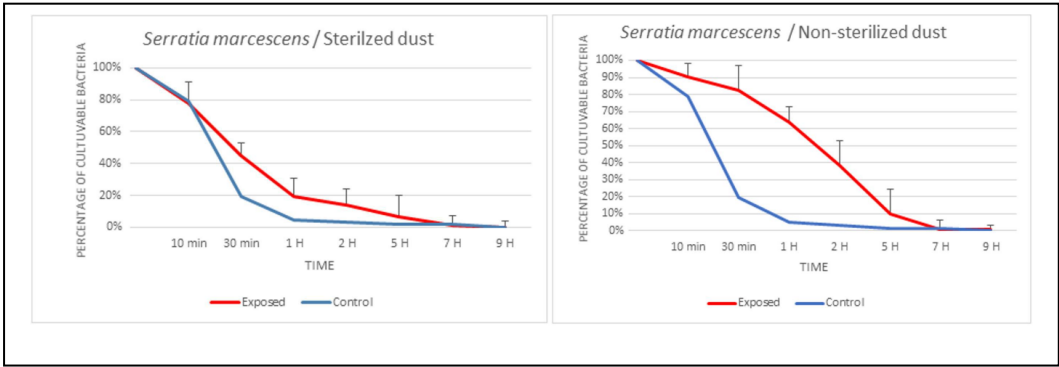
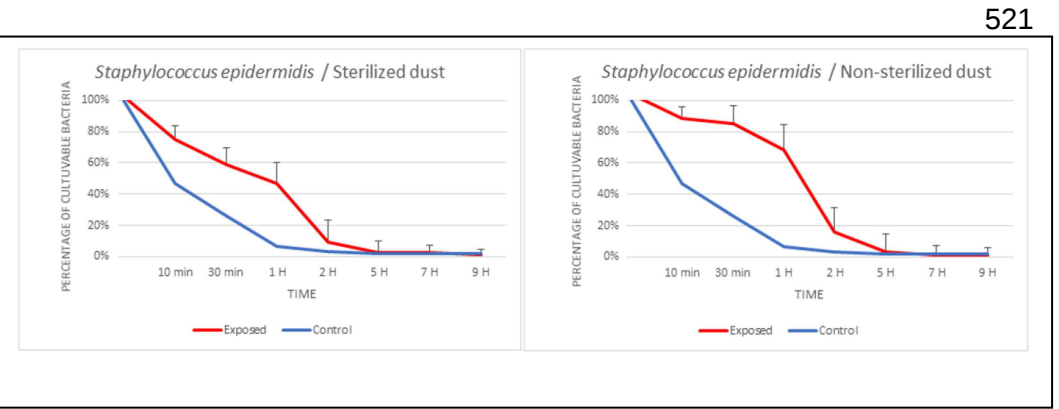


Fig. 6



523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536

Tables

Table 1. Chemical composition and elementary analysis CHNS – O of the sterilized and non-sterilized house dust

<i>Designation</i>	<i>Test sample (mg)</i>	<i>% N</i>	<i>% C</i>	<i>% H</i>	<i>% S</i>	<i>% O</i>	<i>% Organic matter</i>	<i>% Ashes</i>	<i>Total</i>
Non-sterilized dust	0,9513	1,86	17,00	2,22	1,11	8,18	22,18	69,63	100,00
SD	0,0938	0,11	1,36	0,15	0,08				
Sterilized dust	1,0196	1,54	14,18	1,85	1,26	14,00	18,83	67,17	100,00
SD	0,4625	0,32	2,02	0,27	0,43				

LOD < 0,06 % on CHNS-O

LOQ < 0,2 % on CHNS-O

537
538
539
540
541

Table 2. Semi Quantitative chemical composition of dust

Analyte	Non-sterilized dust (%)	Sterilized dust (%)
SiO ₂	36.843	38.238
CaO	14.889	15.333
SO ₃	9.353	9.29
Al ₂ O ₃	8.644	9.493
Fe ₂ O ₃	6.272	5.771
K ₂ O	2.987	2.914
TiO ₂	2.591	2.628
P ₂ O ₅	1.352	2.096
Cl	0.811	0.778
ZnO	0.394	0.383
C	17.000	14.180

Chapitre 3. Characterization of indoor dust bacterial microbiota in homes of asthma and non asthma patients: a pilot study using next generation sequencing

Introduction

L'exposition des occupants aux contaminants des environnements intérieurs a augmenté de manière significative durant ces dernières décennies. Son impact sur la santé respiratoire, en particulier, le développement et l'exacerbation de la maladie asthmatique est bien établi. Cependant, la difficulté de la caractérisation et de l'identification des communautés bactériennes réside, non seulement dans sa diversité, mais aussi dans la présence des facteurs influençant leur prolifération.

Dans l'article 3, nous nous sommes intéressés la caractérisation du microbiome domestique en analysant 30 échantillons de poussières de sol de séjour recueillies dans des logements de deux cohortes composées de personnes asthmatiques et non-asthmatiques. Ces analyses métagénomiques ont été effectuées à l'aide de la technique moléculaire dite du Next-Generation Sequencing (NGS). Les méthodes culturelles traditionnelles étant limitées, elles n'apportent pas assez d'informations sur la composition de la flore bactérienne dans l'habitat. En effet, les milieux utilisés au laboratoire, en général, n'ont pas été développés pour l'étude des bactéries environnementales. Le NGS permet de recueillir des informations sur la structure des communautés microbiennes par l'extraction de l'ADN et le séquençage des cibles des gènes phylogénétiques (16S ARNr) des échantillons environnementaux (Caporaso et al., 2011).

Notre étude pilote s'est déroulée sur deux cohortes : la cohorte ECENVIR, composée de personnes asthmatiques sévères, et la cohorte Asthm'Child, composée de personnes non-asthmatiques.

La cohorte ECENVIR : patients asthmatiques sévères

La cohorte ECENVIR a pour objectifs l'évaluation clinique et l'étude de l'impact économique de l'intervention de Conseillers Médicaux en Environnement Intérieur (CMEI) au domicile des patients asthmatiques sévères. Cette étude a commencé en automne-hiver 2013-2014 et se terminera en 2020. La dernière visite du dernier patient inclus aura lieu en décembre 2018. Plus de 100 patients devront être inclus, tous étant asthmatiques, et âgé entre 7 et 60 ans. Les patients inclus ont répondu à un questionnaire, remplis par le CMEI, regroupant un grand ensemble de données sur leur logement. Les patients ont bénéficié de l'évaluation de leur asthme selon le score GINA et trois bilans sont disponibles. Le premier a lieu lors de la première visite du CMEI et le dernier lors d'une deuxième et dernière visite, un an après. 6

mois après la première visite un autre bilan est effectué lors d'un rendez-vous médical. Des prélèvements de poussières ont été réalisés dans la chambre, le séjour et sur le matelas à l'aide d'un dispositif de prélèvement Dustream®.

La cohorte Asthm'Child : patients contrôlés non-asthmatiques

L'étude Asthm'Child concerne un échantillon de la cohorte mère-enfants Pélagie qui suit 3500 femmes enceintes incluses entre 2002-2005 en Bretagne. Le projet Asthm'Child vise à évaluer l'exposition à des polluants chimiques et biologiques dans l'environnement intérieur pouvant impacter la santé respiratoire des enfants. A l'occasion du suivi des enfants de la cohorte Pélagie à l'âge de 6 ans, 150 familles ont rempli un questionnaire détaillé sur les caractéristiques du logement occupé et leurs habitudes de vie et des prélèvements de poussières au sol ont été réalisés dans le cadre du projet Asthm'Child.

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus après l'analyse métagénomique des échantillons de poussières domestiques, montrent une diversité importante des communautés bactériennes dans les deux cohortes étudiées. 882 genres bactériens différents ont été identifiés. Les principaux phylums bactériens identifiés avec plus de 89% des séquences analysées, il s'agit de : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*.

Au vu de la détection des communautés bactériennes dans les logements des deux cohortes (personnes asthmatiques, et non-asthmatiques), l'impact de l'environnement intérieur sur la santé ne peut être évalué simplement en considérant l'effet de l'exposition microbienne intérieure. Les discussions porteront sur l'identification de facteurs potentiellement impliqués dans le développement de l'asthme, tels que les interactions entre les agents bactériens, le microbiome de l'occupant, et les caractéristiques du logement lui-même.

L'utilisation de la technique NGS s'est révélée intéressante dans l'identification et la recherche de la diversité bactérienne dans les échantillons de poussières domestiques.

Characterization of indoor dust bacterial microbiota in homes of asthma and non asthma patients: a pilot study using next generation sequencing

Yanis Guenoune^{1,2*} Pierre Lemire¹ Jean Pierre Gangneux^{2,3} and Pierre Le Cann^{1,2}

¹EHESP, Rennes, 35000, France

²IRSET- INSERM UMR 1085, Rennes, 35000, France

³Université Rennes 1, Rennes, 35000 France

**Corresponding email: Pierre.Lecann@ehesp.fr*

Abstract

The exposure of occupants of housing to indoor air pollutants has increased in recent decades. But among microbiological contaminants, bacterial aerosols remain poorly studied and their role in respiratory troubles needs to be studied. Facing the outbreak of chronic respiratory diseases, the need for understanding the influence of the indoor microbial exposure on the exacerbation of asthma is important. This study aimed to assess the diversity of indoor microbial communities in relationship with the health occupants. Measurements were taken from dwellings of 2 cohorts in Brittany (western France), one with children without any pathology and the other with children and adults with asthma. Thirty dust samples were analyzed by next generation sequencing to evaluate the feasibility of the investigation of the role of indoor microbial communities in the development of health effects especially asthma. House dust microbiome analysis using 16S ribosomal RNA sequencing identified 882 prokaryotic genera in the homes of children with asthma. The four main bacterial phyla were identified: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* with more than 89% of all sequences. No bacterial genera were significantly associated with asthma severity among children. Regarding at the genus level, only *Massilia* was significantly more frequent in non-asthmatic people. Using unsupervised hierarchical complete linkage cluster analysis on bacterial genera relative abundancies, we were able to define two clusters that almost correspond to the asthmatic status and to distinguish housing characteristics in each group. Thus, increasing the number of samples could warrant to identify specific composition of the microbiota and housing characteristics associated with the development of respiratory symptoms during asthma.

Keywords: Indoor air quality, Asthma, Microbiota, Next Generation Sequencing, Household dust, Environmental health.

Introduction

Asthma is a common chronic inflammatory airway disease in children and adults in developed countries. In France, it affects more than 10% of children and 6 % of adults (Delmas and Fuhrman, 2010).

Asthma is a very complex disease characterized by enhanced bronchial reactivity leading to airway obstruction and respiratory difficulties (Martinez and Vercelli, 2013). Exposure to environmental chemical or biological factors can lead to exacerbation of asthma and prevention measures are still needed (Beasley et al., 2015). As an example, indoor fungal exposure has been associated to the development of asthma (Chen et al., 2014). But, according to (Ege et al., 2011) children who grow up in the environments that afford them a wide range of microbial exposures, like the farming environments, are more likely protected from childhood asthma and atopy than urban children. (Feng et al., 2016) reported that parental allergic diseases, atopy, diet and early life exposures might explain the lower prevalence of asthma in the rural environment. Also, there is a complex interplay between genetic predisposition and environmental exposures, including microbes and allergens (Anderson and Jackson, 2017).

Among biological agents, bacteria have been less studied even if endotoxins produced by gram negative bacteria have been significantly correlated with wheezing in children (Horick et al., 2006). Furthermore, numerous studies have suggested that exposure to LPS, in non-rural environments, is a risk factor for increased asthma prevalence and severity (Thorne et al., 2005).

Culture-based studies are designed for a long time for the detection of various bacteria indoor (Rintala et al., 2008, 2012). However, while culture isolation focuses on the presence of particular bacteria, next generation sequencing (NGS) studies uncover microbial communities comprising thousands of uncultured microbes. Recent advances in microbiological methods show promise in determining whether the microbes recovered during indoor sampling campaigns may in fact be causative agents as such, or only surrogates of an underlying harmful or beneficial exposure. Given the lack of knowledge on the specificities of the relevant

exposures, assessments at this stage need to be kept broad and comprehensive (Mensah-Attipoe et al., 2017).

According to (Singanayagam et al., 2017) who underlined the role of microbes in the exacerbation of asthma, the emergence of next-generation molecular sequencing techniques to characterize the microbiota has facilitated renewed interest. They concluded that longitudinal studies that characterize the changes in lower respiratory tract microbiota from birth up to development of asthma are currently unavailable. Additionally, few studies have focused on the interactions between bacteria and the immune system in driving development of nonatopic asthma phenotypes.

Thus, despite the recognition of the importance of microbial exposure for human health, the precise role of microbes and particularly bacteria in the development and exacerbation of respiratory symptoms and allergies remains poorly understood.

The objective of our study was to use 16S rRNA sequencing approaches to characterize and identify indoor bacterial communities that may be associated with the exacerbation of asthma. This pilot study compared two cohorts of asthmatic and non-asthmatic people's dwellings.

2. Materials and Methods

2.2 Study population and home visit

30 dust samples were collected from dwellings of 2 cohorts and were analyzed by next generation sequencing:

(i) 15 dwellings from ECENVIR (E) cohort, which aims to evaluate the clinical and the economic impact of Indoor Environment Counselor (IEC) on the symptoms of severe asthma. Patients answered a questionnaire during an interview with the IEC on dwellings characteristics (localization in cities or rural, apartment or house, ...) and cleaning habits of patients. Asthma was graded with the GINA scale and patients had three clinical check-ups.

(ii) 15 control dwellings from the Pélagie AC cohort (AC), which follows more than 3,500 pregnant women in Brittany. The AC project aims to assess the effects on children respiratory health of chemicals and biological pollutants exposure. One of the check-up of Pélagie AC cohort occurs once the children are 6 years old. A subset of families without asthma answered a detailed questionnaire about their dwellings characteristics and life for the AC study.

2.3 Dust collection

Dust samples were collected by vacuuming the floor in the child's bedroom using a Dustream Collector (Indoor biotechnologies, United Kingdom) sampler-fitted vacuum cleaner (40 µm mesh nylon filter, domestic vacuum cleaner) as described by (Dallongeville et al., 2015). Briefly, sampling was preferentially carried out on the carpets (when available) or on hard surface floors until filling at least 2/3 of the filter-sampler, in order to ensure collection of at least 10 mg of fine dust. Collected dust was sieved at 300 µm to discard debris, and 10 mg of fine dust were resuspended in 1 mL of PBS-Tween (0.05%) buffer, shaken at 800 rpm for 1 h and stored at -20°C until analyzed.

2.4 DNA extraction, sequencing, and analysis

Total DNA was extracted from dust suspensions according to the method developed by Godon et al., (1997). A fragment of the 16S rRNA was amplified by PCR using the barcoded, universal primer set (515WF/918WR) (Wang et al., 2009). PCR reactions were performed using AccuStart II PCR ToughMix kit (Quantabio, Beverly, USA), cleaned (HighPrep PCR beads, Mokascience, France) and then sequenced on Illumina Hiseq2000 instrument at GeT-PlaGe (Auzeville, France). Negative controls for DNA extraction kits and PCR reagents were also performed to ensure that materials were not contaminated. Sequences were analysed using Mothur (version 1.33.1) according to MiSeq SOP pipeline (Schloss et al., 2009). Barcodes, primers, and sequences showing homopolymers of more than 8bp have been discarded. Sequences showing 100% homology were grouped in unique sequences, then in operational taxonomic unit (OTUs, based on 97% homology). Sequences were next assigned to match to a sequence in SILVA (version 123) database for prokaryotes, to identify the genus level. We considered assigned sequences with relative abundance (RA) higher than 0.002 %

2.5 Statistical analyses

A non-parametric median comparison test was used between groups. The Agricolae R package (R version 3.1.2, Agricolae version 1.2-3) was used for bacterial phylum relative abundancies comparison. Stata (version 13.1) was used for bacterial generas relative abundancies comparison and for the unsupervised hierarchical complete linkage cluster analysis on bacterial generas relative abundancies. Stata was also used to perform a one-sided Fischer test to compare the identified clusters.

3. Results

Using the NGS methodology, we analyzed bacterial composition of dusts collected in the 30 dwellings from the two cohorts E (Asthmatics) and AC (non asthmatics) described in the material and methods part. A total of 408,273 prokaryote sequences have been analyzed for the twenty five samples which gave sequences (no sequence was obtained for three of them and two gave aberrant data), with 6,296 to 21,728 sequences per sample. The number of Operational Taxonomic Units (OTUs) varies from 376 to 1,256 (mean 780, standard deviation 332) in E samples and 512 to 1,235 (mean 774, standard deviation 206) in AC samples. Figure 1 shows that, within the domain “Bacteria”, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* are the four main phyla whose sequences represent more than 89% of the total bacterial DNA sequences. However, the relative abundance levels (RA) of these phyla markedly differed within dust samples. Indeed, *Proteobacteria* was usually (19 out of 25 samples) the most abundant phylum of all samples (mean 43% in E and mean 39.4% in AC), respectively (Table 1). Besides, *Firmicutes* were less present (mean 21.7% in E and mean 29.7 % in AC). The 2 following represented phyla were *Bacteroidetes* (mean 16.4% in E and mean 12.9% in AC) and *Actinobacteria* (mean 11.9% in E and mean 13.3% in AC) of the total sequences related to these four phyla. Consequently, the rest of samples were mainly composed by other minor organisms with the respective means of 5% and mean 4.6% in E and AC (table 1).

To assess the differences of occurrence of the different phyla in the two groups (E and AC) we used a non-parametric median comparison test from the R package and found that there was no statistical difference for *Proteobacteria* ($p=0.16$), *Firmicutes* ($p=0.07$), *Bacteroidetes* ($p=0.16$), *Actinobacteria* ($p=0.54$) (table 1).

Among the 10 most abundant genera, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Massilia*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* belong to *Proteobacteria* phylum. *Lactobacillus* and *Staphylococcus* belong to *Firmicutes* phylum and *Hymenobacter* to *Bacteroidetes*.

From a genus point of view, *Staphylococcus* present on normal skin and mucosa varies from 6.4% to 7.7% in E and AC, respectively. *Acinetobacter*, which is commonly present in soil and water as free-living saprophyte and can be isolated from the skin, throat, conjunctiva, saliva, and vaginal secretions of healthy people (Bergogne-Berezin et al., 1987), varies from 3.7% to 5.1% in AC and E, respectively. *Pseudomonas* varies from 2.6 % to 2.7 % in E and AC, respectively. *Sphingomonas* is an environmental bacteria isolated from many different land and water habitats, as well as from plant root systems and varies from 1.3% E to 2.1% AC, *Prevotella*, *Streptococcus*, and *Corynebacterium*, these genera vary from 1.3% E to 1.8% AC,

and from 1.8% in E to 4.1% in AC, and from 2.2% in E to 5% in AC respectively. *Lactococcus* that is associated to milk products but can also be found in the gut varies from 1.4% in AC to 2.4% in E. *Pedobacter* is the less abundant genus and varies from 0.5% to 1.1% in AC and E, respectively. Many other genera were also detected in the different dust samples at low frequencies in both E and AC, like *Massilia*.

As it was not possible to identify the bacteria at the species level, usual pathogenic strains for humans as *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* for example could not be specified.

However, among the genera with RA > 2 % and displaying classical pathogenic species, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* were identified in most dust samples.

When applying Stata (version 13.1) package for bacterial genera relative abundancies comparison (Figure 2), only the *Massilia* genus was found significantly different ($p < 0,05$) between the two cohorts.

To identify correlations between the populations of bacteria, the asthma condition, the habits of the occupants and the characteristics of the dwellings, an unsupervised hierarchical complete linkage cluster analysis was carried out on bacterial genera. The aim of this test was to compare the relative abundancies of genera among each sample. The clustering was realized in complete chaining on the basis of data containing the bacterial genera, without standardization. This was chosen to give more importance of the data that are highly contrasted. Applying the algorithm of clusterisation, a dendrogram was built (data not shown) and two clusters were defined which almost correspond to the asthmatic status except for two people.

Table 2 summarizes the housing and health characteristics for the two groups defined by the clusterization, with the p-values of Fisher's exact one-tailed test. There are two main groups: one with a high proportion of people with an asthmatic condition (64%) and another with very few (20%). Only these two groups seem to be interpretable, with caution because their numbers are reduced (11 and 10 respectively, ie almost 84% of the total workforce). An exact Fisher test was performed on 2x2 tables representing the population of a health status variable or dwelling in the whole sample or in a cluster.

However, the small number of samples per cluster and in general did not show any significant differences between the groups and all the samples on all the variables. If we accept a p of more tolerant significance, variable-cluster couples emerge. Only groups 1 and 2 were tested. Group 1

is thus different from the set of samples concerning the variable "mechanical ventilation" with a p in unilateral test at 0.121. Similarly for group 2 with the variables: "presence of cat" (p=0.155), "use of insecticide" (p=0.140) and especially "asthmatic status" (p=0.087). The presence of difference between the two clusters was also investigated, cluster 1 has a strong tendency to present more severe asthmatics (p=0.056), less use of insecticides (p at 0.055), less equipped with mechanical ventilation (p=0.056) and has a lower tendency not to have a cat (p=0.135) compared to group 2. Since these groups have been clustered only on the NGS bacterial genus variables, it is interesting that these groups have discriminated against these 4 variables even if it is not possible to distinguish the variables cat and asthma (indeed, none of the asthmatics declared having a cat).

Thus, by clustering on the NGS bacterial genus variables, 2 main clusters were defined with certain trends compared to the general sample, the first having buildings without mechanical ventilation and the second having cats, using more insecticide and being less asthmatic. The links mentioned in the literature between the different variables (mechanical ventilation and humidity for example) are not visible during the clustering on the bacterial genes detected by NGS, may be due to the low number of samples.

4. Discussion

Indoor air hosted highly variable bacterial communities assembled from complex interactions between physical, environmental, and ecological characteristics of the indoor environments (Emerson et al., 2017). Microbiome sequencing provides assessment of microorganisms in the indoor environment that offers the capability to identify both culturable and non-culturable as well as live or dead microbes that exist indoors and may influence human health (Hanson et al., 2016).

According to (Karvonen et al., 2014), the quantity of microbial exposure predicted asthma better than single microbial markers independently of microbial diversity and amount of dust.

In our pilot study, we aimed to characterize the indoor microbiome of two types of dwellings depending on the status of occupants: healthy people and asthmatic people. Microbiome was obtained from dust samples collected by vacuuming as this matrix has been shown to accumulate biological contaminants indoor. Afterwards we tried to find difference of composition of microbiome between the two groups and correlate this to the characteristics of

the dwellings. The number of dwellings in each group was small and showed interesting tendencies but unfortunately without statistically significant differences.

First of all, our results showed that major bacterial phyla found in home are similar to those found in other studies on the indoor environment (Aydogdu et al., 2010; Hoisington et al., 2014; Jeon et al., 2013; Kembel et al., 2012; Konya et al., 2014; Lee et al., 2007; McManus and Kelley, 2005; Rintala et al., 2008), or in studies dealing with the composition of the indoor air microbiome, its relationship with the inhabitants and its impact on the human microbiome (Adams et al., 2015; Kelley and Gilbert, 2013; Kembel et al., 2012). Comparing our results to previously published high-throughput 16S rRNA amplicon studies of other indoor environments, the composition of our samples were similar to typical building microbiome samples which were dominated by four bacterial phyla (Bacteroides, Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria) (Hewitt et al., 2012). We also found that Proteobacteria and Firmicutes tended to be the most abundant organisms indoor.

When we looked at the genus abundance between asthma and non-asthma population no statistical difference was observed even if much Proteobacteria were detected in asthma population as previously described (Ciaccio et al., 2015). This was associated with a higher abundance of Proteobacteria in airways microbiota of asthmatic people (Hilty et al., 2010). It is very difficult to compare the studies because usually the populations studied are different (sometimes urban, sometimes rural, etc...). For example, in our study, there are more rural dwellings in the Pélagie-AC (non-asthmatics) than ECENVIR (asthmatics) cohort but due to the low number of samples we were not able to adjust the comparison on this criterion.

Streptococcus which is a human commensal bacterial genus, is present in a commensal way on the animal mucous membranes, and is also pathogenic for human being, especially the respiratory tracts (Krzyściak et al., 2013). However, the important abundance of this genus in the non-asthmatic patients was already described in the bacterial flora of the superior respiratory tract (Park et al., 2014). *Streptococcus* belongs to the genera which are the most represented in the above gingival plates (Xiao et al., 2016), evoking a particular profile of bacterial contamination of the oral flora. *Streptococcus* can be associated with otitis and tonsillitis but also with respiratory tract infections (Nygaard and Charnock, 2017).

Sphingomonas and *Pedobacter* are two environmental bacterial genera. The first genus was previously described as pathogenic human, and the family of *Sphingomonadaceae* more

frequently found in the bronchial flora of badly controlled asthmatic patients (Huang et al., 2011).

Environmental exposures influence asthma severity, including exposures to microbes. In the study of Dannemiller et al., (2016), increased bacterial richness (number of unique bacterial OTUs) was associated with increased asthma severity ($p=0.046$), and there was a trend toward increased severity with increased endotoxin exposure ($p=0.052$). There was less variation in community composition in homes of children with severe asthma. No bacterial genera were significantly associated with asthma severity among children. As the study of Ciaccio et al., (2015), we did not find any significant difference in bacterial richness between the two groups and any significant difference in the larger groups of bacteria. Only genus *Massilia* was more frequent in non-asthmatic people. But as mentioned above, this genus is poorly described and has never been associated with respiratory disease. It was isolated in 1998 in the blood of an immunocompromised patient (La Scola et al., 1998) and was found in soil (Lee et al., 2017) and air (Orthová et al., 2015; Weon et al., 2010). It has also been found in eye infections (Ballesterio-Téllez et al., 2016; Chiquet et al., 2015) and ear (Park and Shin, 2013).

Even if the number of samples was small, we tried to correlate the characteristics of the dwellings of the patients with the environmental microbiome. In a previous study on the Pélagie-AC cohort (Dallongeville et al., 2015), microbial contamination of dwellings was studied regarding the characteristics of the dwellings. For example, having pets was significantly associated with increased concentrations of *Cladosporium*, but this study did not investigate the presence of bacteria. In our study, a trend of negative correlation between having cats and asthma is observed. This has to be linked with the fact that usually people having asthma know that allergens from cats can exacerbate asthma. An inverse trend between having asthma and the presence of mechanical ventilation is also observed. This is in accordance with the study of Lajoie et al., (2015), which showed that increasing ventilation in dwellings of asthmatics reduce the episodes of wheezing.

A very recent study found a potential protective effect of gram positive bacteria in the development of asthma but these are preliminary results and need to be confirmed (Valkonen et al., 2017). However, we did not distinguish gram positive to gram negative bacteria in our study. This should be of concern in a more powerful study.

A limitation of our study was that we investigated two cohorts, one with children without any pathology and the other with children and adults with asthma. To investigate the relationship

between the microbiome and the exacerbation of asthma it would be preferable to compare two categories of people of the same cohort.

5. Conclusion

Controversial papers showed the importance of studying indoor microbial exposure as adverse health effects have been evidenced especially in case in mold development but also benefits if children live in farm environments (Mensah-Attipoe et al., 2017). This paradox has to be understood and for these epidemiological studies have to be conducted. Next generation sequencing will help to progress in the understanding of the role of indoor microbial communities in the development of health effects especially respiratory disease like asthma.

Our findings provide evidence that dust samples harbor a high diversity, especially of human-associated bacteria, and demonstrate the utility of molecular methods for identifying and tracking this bacterial diversity in dust samples which can contribute to the development of asthma. Our study demonstrates the feasibility of the use of the NGS to investigate the relationship between the presence of bacteria and the risk of respiratory symptoms during asthma. Using unsupervised hierarchical complete linkage cluster analysis on bacterial genera relative abundancies, we were able, in this pilot study, to define two clusters that almost correspond to the asthmatic status and to distinguish different housing characteristics in each group. Thus, increasing the number of samples could warrant identifying specific composition of the microbiota and housing characteristics associated with the development of respiratory symptoms during asthma.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Adams, R.I., Bhangar, S., Pasut, W., Arens, E.A., Taylor, J.W., Lindow, S.E., Nazaroff, W.W., Bruns, T.D., 2015. Chamber bioaerosol study: outdoor air and human occupants as sources of indoor airborne microbes. *PloS One* 10, e0128022.
- Anderson, H.M., Jackson, D.J., 2017. Microbes, allergic sensitization, and the natural history of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 17, 116–122.
- Aydogdu, H., Asan, A., Otkun, M.T., 2010. Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of

- 311 meteorological factors. *Environ. Monit. Assess.* 164, 53–66. doi:10.1007/s10661-009-
312 0874-0
313
- 314 Ballester-Téllez, M., Laborda, G.T., Batista, D.N., Pascual, H.Á., 2016. First reported case
315 of a corneal abscess caused by *Massilia timonae*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34,
316 212.
317
- 318 Beasley, R., Semprini, A., Mitchell, E.A., 2015. Risk factors for asthma: is prevention
319 possible? *The Lancet* 386, 1075–1085.
320
- 321 Bergogne-Berezin, E., Joly-Guillou, M.L., Vieu, J.F., 1987. Epidemiology of nosocomial
322 infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Hosp. Infect.* 10, 105–113.
- 323 Chen, C.-H., Chao, H.J., Chan, C.-C., Chen, B.-Y., Guo, Y.L., 2014. Current asthma in
324 schoolchildren is related to fungal spores in classrooms. *CHEST J.* 146, 123–134.
- 325 Chiquet, C., Boisset, S., Pechinot, A., Creuzot-Garcher, C., Aptel, F., Bron, A.M., 2015.
326 *Massilia timonae* as cause of chronic endophthalmitis following cataract surgery. *J.*
327 *Cataract Refract. Surg.* 41, 1778–1780.
- 328 Ciaccio, C.E., Barnes, C., Kennedy, K., Chan, M., Portnoy, J., Rosenwasser, L., 2015. Home
329 dust microbiota is disordered in homes of low-income asthmatic children. *J. Asthma*
330 52, 873–880.
- 331 Dallongeville, A., Le Cann, P., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I.,
332 Blanchard, O., 2015. Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air
333 and house dust of French dwellings. *Sci. Total Environ.* 536, 964–972.
- 334 Dannemiller, K.C., Gent, J.F., Leaderer, B.P., Peccia, J., 2016. Indoor microbial communities:
335 influence on asthma severity in atopic and nonatopic children. *J. Allergy Clin. Immunol.*
336 138, 76–83.
- 337 Delmas, M.-C., Fuhrman, C., 2010. L’asthme en France: synthèse des données
338 épidémiologiques descriptives. *Rev. Mal. Respir.* 27, 151–159.
- 339 Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W.O., Braun-Fahrlander,
340 C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E., 2011. Exposure to environmental
341 microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.* 364, 701–709.
- 342 Emerson, J.B., Keady, P.B., Clements, N., Morgan, E.E., Awerbuch, J., Miller, S.L., Fierer,
343 N., 2017. High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance
344 inside single-family residences. *Indoor Air* 27, 576–586.
- 345 Feng, M., Yang, Z., Pan, L., Lai, X., Xian, M., Huang, X., Chen, Y., Schröder, P.C.,
346 Roponen, M., Schaub, B., others, 2016. Associations of early life exposures and
347 environmental factors with asthma among children in rural and urban areas of
348 Guangdong, China. *CHEST J.* 149, 1030–1041.

- 349 Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial
350 diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence
351 analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2802–2813.
- 352 Hanson, B., Zhou, Y., Bautista, E.J., Urch, B., Speck, M., Silverman, F., Muilenberg, M.,
353 Phipatanakul, W., Weinstock, G., Sodergren, E., others, 2016. Characterization of the
354 bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study.
355 *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 713–724.
- 356 Hewitt, K.M., Gerba, C.P., Maxwell, S.L., Kelley, S.T., 2012. Office space bacterial
357 abundance and diversity in three metropolitan areas. *PloS One* 7, e37849.
- 358 Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A.,
359 Poulter, L., Pachter, L., others, 2010. Disordered microbial communities in asthmatic
360 airways. *PloS One* 5, e8578.
- 361 Hoisington, A.J., Maestre, J.P., King, M.D., Siegel, J.A., Kinney, K.A., 2014. Impact of
362 sampler selection on the characterization of the indoor microbiome via high-
363 throughput sequencing. *Build. Environ.* 80, 274–282.
- 364 Horick, N., Weller, E., Milton, D.K., Gold, D.R., Li, R., Spiegelman, D., 2006. Home
365 endotoxin exposure and wheeze in infants: correction for bias due to exposure
366 measurement error. *Environ. Health Perspect.* 135–140.
- 367 Huang, Y.J., Nelson, C.E., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Baek, M.S., Liu, J., Woyke, T.,
368 Allgaier, M., Bristow, J., Wiener-Kronish, J.P., others, 2011. Airway microbiota and
369 bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J.*
370 *Allergy Clin. Immunol.* 127, 372–381.
- 371 Jeon, Y.-S., Chun, J., Kim, B.-S., 2013. Identification of household bacterial community and
372 analysis of species shared with human microbiome. *Curr. Microbiol.* 67, 557–563.
- 373 Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Rintala, H., Korppi, M., Täubel, M., Doekes, G., Gehring,
374 U., Renz, H., Pfefferle, P.I., Genuneit, J., others, 2014. Quantity and diversity of
375 environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study.
376 *Allergy* 69, 1092–1101.
- 377 Kelley, S.T., Gilbert, J.A., 2013. Studying the microbiology of the indoor environment.
378 *Genome Biol.* 14, 202.
- 379 Kembel, S.W., Jones, E., Kline, J., Northcutt, D., Stenson, J., Womack, A.M., Bohannon, B.J.,
380 Brown, G.Z., Green, J.L., 2012. Architectural design influences the diversity and
381 structure of the built environment microbiome. *ISME J.* 6, 1469–1479.
- 382 Konya, T., Koster, B., Maughan, H., Escobar, M., Azad, M., Guttman, D., 2014. Associations
383 between bacterial communities of house dust and infant gut. *Env. Res* 131.
384 doi:10.1016/j.envres.2014.02.005
- 385 Krzyściak, W., Pluskwa, K.K., Jurczak, A., Kościelniak, D., 2013. The pathogenicity of the
386 *Streptococcus* genus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1361–1376.
- 387 La Scola, B., Birtles, R.J., Mallet, M.-N., Raoult, D., 1998. *Massilia timonae* gen. nov., sp.
388 nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions.

- 389 J. Clin. Microbiol. 36, 2847–2852.
- 390 Lajoie, P., Aubin, D., Gingras, V., Daigneault, P., Ducharme, F., Gauvin, D., Fugler, D., Leclerc,
391 J.-M., Won, D., Courteau, M., 2015. The IVAIRE project—a randomized controlled study
392 of the impact of ventilation on indoor air quality and the respiratory symptoms of
393 asthmatic children in single family homes. *Indoor Air* 25, 582–597.
- 394 Lee, H., Kim, D.-U., Park, S., Yoon, J.-H., Ka, J.-O., 2017. *Massilia chloroacetimidivorans*
395 sp. nov., a chloroacetamide herbicide-degrading bacterium isolated from soil. *Antonie*
396 *Van Leeuwenhoek* 110, 751–758.
- 397 Lee, L., Tin, S., Kelley, S.T., 2007. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a
398 child-care facility. *BMC Microbiol.* 7, 27.
- 399 Martinez, F.D., Vercelli, D., 2013. Asthma. *The Lancet* 382, 1360–1372. doi:10.1016/S0140-
400 6736(13)61536-6
- 401 McManus, C.J., Kelley, S.T., 2005. Molecular survey of aeroplane bacterial contamination. *J.*
402 *Appl. Microbiol.* 99, 502–508.
- 403 Mensah-Attipoe, J., Täubel, M., Hernandez, M., Pitkäranta, M., Reponen, T., 2017. An
404 emerging paradox: Toward a better understanding of the potential benefits and
405 adversity of microbe exposures in the indoor environment. *Indoor Air* 27, 3–5.
- 406 Nygaard, A.B., Charnock, C., 2017. The bacterial composition of ventilation filter dust in
407 Norwegian pre-school nurseries. *Indoor Built Environ.* 1420326X17713831.
- 408 Orthová, I., Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Kaden, R., Busse, H.-J., 2015. *Massilia*
409 *norwichensis* sp. nov., isolated from an air sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 56–64.
- 410 Park, H., Shin, J.W., Park, S.-G., Kim, W., 2014. Microbial communities in the upper
411 respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease.
412 *PloS One* 9, e109710.
- 413 Park, M.K., Shin, H.B., 2013. *Massilia* sp. isolated from otitis media. *Int. J. Pediatr.*
414 *Otorhinolaryngol.* 77, 303–305.
- 415 Rintala, H., Pitkäranta, M., Täubel, M., 2012. Microbial communities associated with house
416 dust. *Adv Appl Microbiol* 78. doi:10.1016/B978-0-12-394805-2.00004-X
- 417 Rintala, H., Pitkäranta, M., Toivola, M., Paulin, L., Nevalainen, A., 2008. Diversity and
418 seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol* 8.
419 doi:10.1186/1471-2180-8-56
- 420 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B.,
421 Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., others, 2009.
422 Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported
423 software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ.*
424 *Microbiol.* 75, 7537–7541.
- 425 Singanayagam, A., Ritchie, A.I., Johnston, S.L., 2017. Role of microbiome in the
426 pathophysiology and disease course of asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 23, 41–47.

- Thorne, P.S., Kulhánková, K., Yin, M., Cohn, R., Arbes Jr, S.J., Zeldin, D.C., 2005. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1371–1377.
- Valkonen, M., Täubel, M., Pekkanen, J., Tischler, C., Rintala, H., Zock, J.-P., Casas, L., Probst-Hensch, N., Forsberg, B., Holm, M., Janson, C., Pin, I., Gislason, T., Jarvis, D., Heinrich, J., Hyvärinen, A., 2017. “Microbial characteristics in homes of asthmatic and non-asthmatic adults in the ECRHS cohort.” *Indoor Air*. doi:10.1111/ina.12427
- Wang, Z., Tollervy, J., Briesse, M., Turner, D., Ule, J., 2009. CLIP: construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins in vivo. *Methods* 48, 287–293.
- Weon, H.-Y., Yoo, S.-H., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Anandham, R., Kwon, S.-W., 2010. *Massilia jejuensis* sp. nov. and *Naxibacter suwonensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1938–1943.
- Xiao, C., Ran, S., Huang, Z., Liang, J., 2016. Bacterial diversity and community structure of supragingival plaques in adults with dental health or caries revealed by 16S pyrosequencing. *Front. Microbiol.* 7.

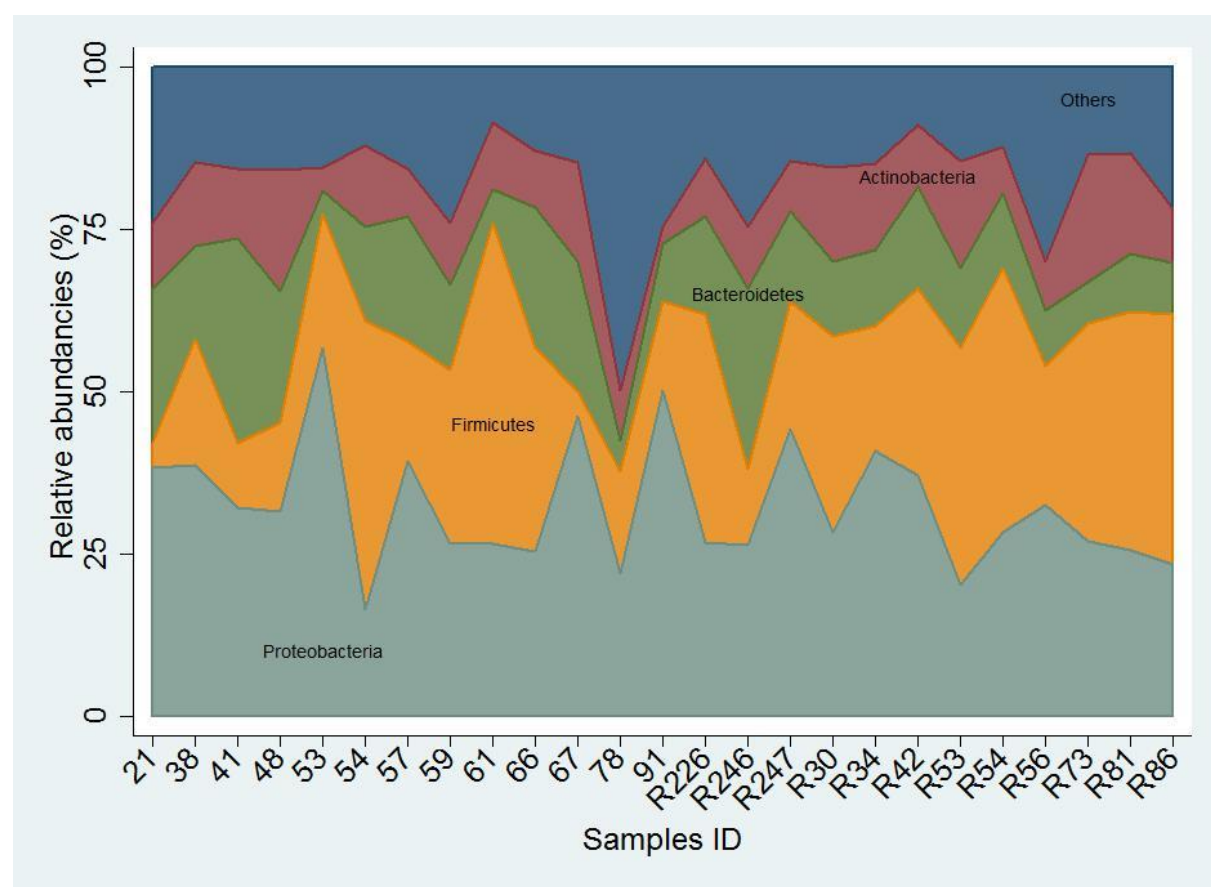


Fig 1: Relative abundance of the most abundant bacterial taxa identified at the phylum level in indoor dust. Sample ID with letters are from Pélagie cohort (non-asthmatic).

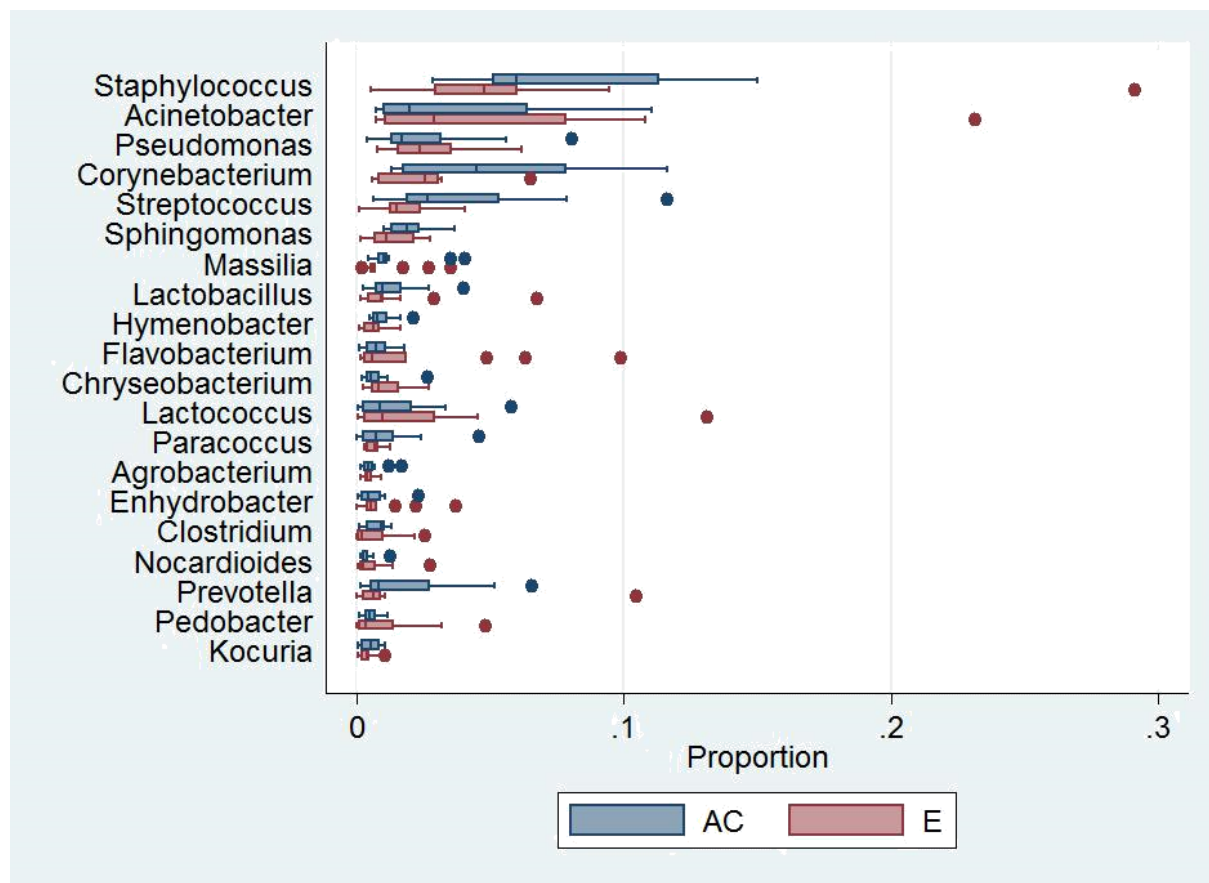


Fig 2 : Bar charts representation of the relative abundancies in the dust samples for the 20 first top-ranked bacterial generas. Bacteria were ranked according to their relative abundancies across the samples. Only the *Massilia* genera was found significantly different ($p < 0,05$) between the two cohorts using a non parametric median comparison test.

Table 1: Phylum composition of microbiome in dust samples.

Phylum	E (asthmatics)				AC (non-asthmatics)				
	min	max	mean	SD	min	max	mean	SD	
Proteobacteria	22.2%	73.4%	43.0%	14.5%	23.9%	56.6%	39.4%	9.0%	p=0.16
Firmicutes	4%	49.4%	21.7%	14.2%	11.9%	38.9%	29.7 %	9.3%	p=0.07
Bacteriodes	2.1%	33.3%	16.4%	9.7%	6.5%	27.9%	12.9 %	5.5%	p=0.16
Actinobacteria	3.1%	21.8%	11.9%	5.5%	8.1%	20.6%	13.3%	4.5%	p=0.54
Other	0.68%	10.4%	5.01%	3.1%	2.4%	8.5%	4.6%	2.0%	NT

Table 2: Statistical correlation between the two groups obtained by unsupervised hierarchical complete linkage cluster analysis on bacterial generas relative abundancies. Different characteristics were tested.

Groups	1	2	p
# in the group	11	10	
Housing type : appartement	1	2	0,462
Building year >1970	4	5	0,425
Presence of at least 1 dog	2	4	0,268
Presence of at least 1 cat	4	7	0,135
Bedding of an animal in the bedroom	2	4	0,367
Passive smoking	2	2	0,669
Mechanical ventilation	4	8	0,056*
Humidity signs	7	5	0,425

Bleach using for cleaning	4	2	0,367
Use of deodorant or candle or incense or electric diffuser	7	6	0,608
Use of insecticide	0	4	0,055*
Asthmatic status	7	2	0,056*

494 **almost significant*

Discussion générale et Perspectives

L'air que nous respirons influe directement sur notre confort et notre santé. Il est aujourd'hui essentiel de se préoccuper de sa qualité pour maîtriser les risques liés à sa dégradation. Malgré le progrès technologique et l'évolution de la science dans le domaine de la qualité de l'air intérieur, les connaissances demeurent limitées lorsqu'il s'agit de l'exposition à la flore bactérienne dans les environnements intérieurs, et de son impact sur la santé humaine.

Au cours de nos travaux de recherche, différentes approches ont été mises en œuvre afin de mesurer l'exposition aux bactéries des environnements intérieurs. Notre discussion portera sur :

- Les dispositifs de prélèvement d'aérosol en environnement intérieur.
- La survie des bactéries dans les poussières *in vitro*.
- Les techniques moléculaires pour l'identification et la mesure de la contamination bactérienne des poussières issues des deux études ECENVIR et Asthm'Child.

Par la suite, des perspectives seront abordées afin d'étudier l'impact des bactéries en environnement intérieur sur la santé humaine.

Dispositifs de prélèvement d'aérosol en environnement intérieur : Principes, typologie, et limites.

Lors de notre recherche bibliographique nous avons constaté que les prélèvements d'air, de surface, et de poussières sont les principales matrices environnementales étudiées dans les espaces clos. Comme un précédent travail de Master réalisé au sein du LERES a porté sur l'étude de la contamination des surfaces des environnements intérieurs en lien avec les bactéries respiratoires, nous nous sommes intéressés sur deux types de matrices d'exposition : l'air et les poussières domestiques.

L'échantillonnage d'un aérosol est l'opération qui nous permet d'obtenir un échantillon de matière dispersée dans l'air sous forme de particules solides ou liquides. Ici, il s'agit des aérosols bactériens (ou bactéries aérosolisées). L'objectif étant d'évaluer l'exposition des occupants d'habitat aux bactéries aérosolisées. L'évaluation de l'exposition implique dans ce cas l'utilisation des méthodes individuelles de mesurage qui sont fondées principalement sur l'emploi de matériels portatifs permettant de réaliser une mesure dans la zone respiratoire. Ces dispositifs dit « de prélèvement individuel » diffèrent de ceux que l'on utilise pour effectuer des prélèvements dit « à point fixe » (www.inrs.fr).

Un dispositif de prélèvement d'aérosol comprend généralement plusieurs parties distinctes ayant chacune leur fonction. Lors de son aspiration, l'aérosol passe à travers un orifice ou une fente, celle-ci assure sa capture et le conduit jusqu'à atteindre un étage sélecteur afin de trier les particules captées selon leur taille. L'étage sélecteur n'est présent que dans les dispositifs sélectifs ayant pour fonction d'échantillonner une fraction particulière de l'aérosol, généralement une sous-fraction conventionnelle inhalable (Chapitre 1). Une fois l'aérosol retenu, il est transporté jusqu'à ce qu'il atteigne un étage collecteur ou bien un filtre. En règle générale, l'aérosol collecté correspond aux particules impactées sur ce support de collecte final.

Lors de leur transport, les aérosols subissent depuis l'air intérieur jusqu'à l'étage collecteur, une série d'événements qui peuvent influencer sur leur probabilité d'être échantillonnés d'une manière efficiente sur le support final. Le mouvement des particules d'aérosols au voisinage et à l'intérieur d'un dispositif de prélèvement, dépend des paramètres physiques liés à ces particules (taille, forme, densité), à la géométrie de l'échantillonneur, et aux différentes conditions aérauliques de son environnement immédiat (vitesse de l'air extérieur, intensité de la turbulence, etc.). L'aspiration des particules étant elle-même sélective ; l'entrée des particules s'effectue dans l'échantillonneur à travers l'orifice qui dépend en partie des forces de gravité (donc de leur poids) mais aussi des forces d'inertie liées à leur masse et à leur vitesse relative par rapport à la vitesse locale de l'air, où s'effectue le prélèvement. Dans le cas d'un prélèvement individuel, au cours duquel l'échantillonneur est positionné près des voies respiratoires supérieures d'une personne, la présence de la personne elle-même, en particulier son thorax, peuvent modifier le champ et le flux de vitesse de l'air au voisinage de l'échantillonneur. D'ailleurs, des études ont montré que cette modification n'altère pas les vitesses d'air qui sont inférieures à 0,3 m/s (Görner et al., 2010; Sajjadi et al., 2016). Par conséquent, un dispositif conçu pour prélever une fraction inhalable en étant porté par une personne peut engendrer des résultats différents que lorsqu'il est par exemple utilisé pour un prélèvement depuis un point fixe isolé de toutes personnes.

Le fait d'aspirer les particules d'aérosols peut mener à une sous ou une surévaluation de leur concentration. Les bords de l'orifice peuvent impacter l'aspiration des particules solides en raison des phénomènes de rebond direct des particules qui y ont été précipitées au cours du flux d'aspiration dû à leur impaction et au réentrainement des particules déjà déposées (Grinshpun et al., 1997; Vincent, 1989). Dans ce cas, la capture des particules par l'échantillonneur est issue de deux phénomènes indissociables ; l'aspiration et les effets de bord (ou de paroi).

Bien que les mesures individuelles représentent mieux le risque lié à l'exposition par inhalation que les mesures environnementales effectuées depuis un point fixe, il n'est pas toujours évident de les utiliser essentiellement pour des raisons économiques et de praticité.

Aujourd'hui, la détection des bioaérosols dans l'habitat est ciblée principalement sur les moisissures selon les recommandations de la norme NF ISO 16000-17 intitulée « Détection des moisissures – méthodes par culture ». Cette méthode a depuis défini les conditions de prélèvement représentatives de l'exposition des individus aux particules d'aérosols. Elle préconise de réaliser au moins quatre prélèvements à la suite de volumes distincts par collecteurs à impaction en des points proches situés au milieu de la pièce et de réaliser par la suite une analyse par culture. A partir de ces données, nous nous sommes intéressés à un type de collecteurs appelés également impacteurs sur milieu solide (comme le Sampl'air).

Avec un débit de prélèvement élevé (100 L/min), ce type de bio-collecteur permet la réalisation de prélèvements d'air sur des durées très courtes, et pourrait donc être utilisé dans le cadre des visites effectuées par les CMEI chez les patients asthmatiques.

Les impacteurs sur milieu solide peuvent apporter des informations en termes de cultivabilité de la flore bactérienne sur une gélose ordinaire. Ils montrent une prédominance des bactéries à Gram positif (Madsen et al., 2012). En effet, l'impaction sur gélose entraîne une sélection des bactéries à Gram positif, par opposition à la culture des bactéries à Gram négatif, qui est effectivement délicate lorsqu'elles sont déposées par impaction sur le milieu de croissance, même s'il s'agit d'un milieu préférentiel pour ces bactéries (Hwang et al., 2013). En effet, leur structure (paroi monocouche) peut expliquer leur plus grande vulnérabilité à l'impaction. Récemment, d'autres études ont rapporté que les espèces *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, et *Micrococcus luteus* sont les plus retrouvées parmi la flore bactérienne des prélèvements d'air intérieur et des conduits de ventilation et ce, grâce à l'utilisation des impacteurs sur gélose (Lai et al., 2016; Mandal and Brandl, 2011). De plus, de nombreuses espèces composant la flore bactérienne retrouvée dans l'air intérieur sont d'origine commensale (Hwang et al., 2013).

Les composés bactériens sur lesquels se posent le plus d'interrogations sont de loin les endotoxines, présentées comme pro-inflammatoires dans la littérature scientifique et incriminées dans le développement ou l'aggravation de l'asthme, elles peuvent être également impliquées dans la genèse du syndrome des bâtiments malsains et peuvent induire des réactions somatiques indépendamment du sujet exposé. Une mesure de l'exposition aux endotoxines semble recommandée dans le cadre d'une étude de l'exposition aux bioaérosols en air intérieur en relation avec la survenue ou l'aggravation de troubles respiratoires.

Or les endotoxines sont des constituants spécifiques membranaires des bactéries à Gram négatif. Les réponses apportées par la culture bactérienne, de par une évaluation de la contamination de l'air restreinte à la flore cultivable conjuguée à une sous-estimation des bactéries à Gram négatif peut guère être considérée comme satisfaisante (Tringe and Hugenholtz, 2008).

Face à ce constat, nous nous sommes intéressés à un second type de bio-collecteur qui permet une analyse par biologie moléculaire des bactéries collectées et un dosage des endotoxines à partir du milieu de collecte. Les impacteurs cycloniques contrairement aux impacteurs sur gélose, sont dotés d'une technologie d'impaction de particules en milieu liquide. Cela permet de concentrer l'air prélevé vers un milieu de collecte liquide en mouvement cyclonique tout en préservant leur intégrité. Avec une vitesse de prélèvement allant de 150 à 300 L/min, les impacteurs cycloniques (comme le Coriolis μ , Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux) correspondent parfaitement au champ d'application des CMEI, en offrant, de par la composition d'un échantillon liquide, de larges perspectives analytiques. De plus, les méthodes cycloniques permettent la mise en œuvre des différentes techniques d'analyses, simultanées ou non, telles que les méthodes culturales, les méthodes par détection au microscope optique après coloration, et les méthodes d'identification de biologie moléculaire tels que la PCR.

Un troisième type de prélèvement basé sur le principe de filtration consiste à aspirer une quantité d'air déterminée à une vitesse de filtration continue et connue, à travers un média filtrant d'un diamètre conséquent (Guey, 2003). Cependant, les méthodes de filtration imposent de s'assurer que les conditions de filtration n'affectent pas la viabilité des particules biologiques et que la membrane est facilement transposable, aseptiquement, sur le milieu de culture.

L'échantillonnage de l'air ayant montré ses limites sur sa représentativité de la contamination de l'environnement intérieur, les scientifiques se sont intéressés aux poussières. Les échantillons de poussières prélevés sur le sol permettent la détection des micro-organismes qui se sont accumulés au cours du temps (Emerson et al., 2017; Li et al., 2016; Nygaard and Charnock, 2017). Ils sont donc représentatifs d'une partie de la flore bactérienne présente auparavant dans l'air. Cette approche, n'étant pas sujette aux différentes variations temporelles comme c'est le cas avec des prélèvements d'air, permet l'évaluation de l'exposition et la mesure de l'accumulation des bactéries sur de longues périodes. Les poussières en suspension sont aussi susceptibles de véhiculer les micro-organismes en particulier les bactéries.

Au cours de ces dernières années, des dispositifs, visant à évaluer la contamination des poussières domestiques, se sont développées, tels que les collecteurs électrostatiques de poussières appelés Electrostatic Dust fall Collector (EDC), qui ont fait leur apparition afin de combiner certains avantages des prélèvements d'air intérieur et de poussières domestiques (Frankel et al., 2012; Normand et al., 2009; Noss et al., 2008; Roussel et al., 2012). En règle générale, les particules de poussières, une fois prélevées du sol, ne peuvent plus être aérosolisées en raison de leur composés particulaires plus au moins lourds. Les EDC étant des dispositifs passifs et peu coûteux, permettent de façon quantitative, de collecter les poussières aéroportées et/ou aérodéposées sur une longue durée (allant de plusieurs jours à plusieurs mois). Ces dispositifs sont généralement placés sur une étagère à 1,5 m du sol et peuvent ainsi récupérer les poussières sédimentées. N'étant pas affecté par les variations temporelles des concentrations dans l'air, ce dispositif permet de standardiser la surface de collecte et le temps de d'accumulation des poussières domestiques. A noter qu'il faut prendre en compte la quantité de poussière recueillie qui risque de ne pas être suffisante pour établir plusieurs analyses avec un seul et même échantillon collecté. Cependant, ce type de dispositif facile d'utilisation requiert encore des étapes de validation pour en faire un outil standardisé de mesure en environnement intérieur à part entière (Rocchi et al., 2017).

Les aspirateurs sont connus depuis longtemps pour leur contribution à la charge des aérosols bactériens dans les habitats principalement à travers la re-suspension des bactéries se trouvant déjà au sol (Bodanis, 1988) .

Afin de mieux comprendre le rôle des rejets de bactéries provenant de sacs de poussière d'aspirateurs dans l'exposition humaine, Knibbs et al., (2011) ont recueilli des échantillons de poussière issus de 21 sacs à poussière d'aspirateurs. Étonnamment, ils n'ont trouvé aucun lien entre l'importance de ces rejets et la quantité de bactéries contenues dans les sacs à poussière. De même, le type d'aspirateur, le prix et l'âge de l'appareil n'influencent pas fortement l'ampleur des rejets de bactéries. De plus, Cette étude démontre aussi que les émissions d'aspirateurs peuvent être considérées comme étant une source d'exposition, parmi d'autres, en environnement intérieur.

Dans une étude sur la survie et la récupération des bactéries dans la poussière d'aspirateur, les espèces de *Salmonella* ont pu être isolées des poussières d'aspirateurs des occupants, démontrant ainsi que les aspirateurs sont des collecteurs efficaces et des réservoirs de contamination bactérienne et que ces contaminants peuvent survivre jusqu'à deux mois. Les poussières d'aspirateur pourraient donc être un indicateur utile de la contamination de l'environnement dans la maison (Haysom and Sharp, 2003).

D'après Veillette et al., (2013) les émissions de bactéries rejetées par les sacs de poussière d'aspirateurs peuvent atteindre les 700.000 équivalents de cellules bactériennes/g.

Aussi, il n'a jamais été démontré que les aspirateurs participent à la diffusion de bactéries pathogènes.

La survie des bactéries dans les poussières domestiques *in vitro*

En environnement intérieur, les poussières sont composées généralement des particules de nature chimique et/ou biologique.

Le développement, la survie ou la reproduction de micro-organismes, pathogènes ou non-pathogènes, est lié généralement à la présence de la matière organique mais aussi à de nombreux facteurs environnementaux (température et humidité relative, ...).

Plusieurs études ont montré la diversité des micro-organismes accumulés au cours du temps dans les poussières domestiques (Rintala et al., 2012) mais qu'en est-il des bactéries ? Survivent-elles assez longtemps dans les poussières domestiques pour qu'en puisse parler de « modèle d'exposition indicateur de contamination bactérienne » dans les environnements intérieurs ?

Quelques études se sont intéressées à la caractérisation des communautés bactériennes et fongiques dans les poussières domestiques mais peu d'entre elles se sont focalisées seulement sur l'étude des communautés bactériennes présentes dans les poussières domestiques et ce, de façon séparée à celle des moisissures (Haysom and Sharp, 2003; Lidwell and Lowbury, 1950a, 1950b, 1950c, 1950d). Cela peut être expliqué par la coexistence entre ces deux communautés microbiennes dans un même contexte environnemental, en l'occurrence, la poussière domestique (Al-Hunaiti et al., 2017; Barberán et al., 2015; Hanson et al., 2016).

A l'heure actuelle, il n'existe que très peu de données disponibles permettant d'évaluer la survie de la flore bactérienne présente dans les poussières des environnements intérieurs.

Ceci constitue un enjeu majeur auquel nous nous sommes intéressés lors de nos travaux (Article 2).

Il est à noter que les techniques utilisées pour contaminer artificiellement les poussières domestiques avec des souches bactériennes environnementales sont très peu documentées.

Notre démarche expérimentale (Article 2) a consisté à développer puis à proposer un protocole visant à contaminer des échantillons de poussières (naturelles et stérilisées) par des bactéries environnementales afin d'imiter la contamination des particules de poussières domestiques et de s'approcher le plus possible des conditions réelles des environnements intérieurs, en particulier, de l'habitat. Cette technique, réalisée *in vitro*, a nécessité l'adoption d'une méthodologie qui consiste à contaminer des échantillons de poussières issues d'environnement intérieur et le recours à des outils analytiques et de culture microbienne mis en œuvre dans les conditions expérimentales. Ensuite, nous avons évalué la survie de deux espèces bactériennes (*Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis*) considérées comme étant des modèles de bactéries retrouvées dans l'environnement des espaces clos.

Ce travail apporte une nouvelle approche de la bactériologie des environnements intérieurs, en particulier, des poussières domestiques à travers une meilleure connaissance de l'évaluation de la survie des agents bactériens présents dans ces poussières. Il a permis donc d'étudier la viabilité des deux souches bactériennes testées lors de la contamination artificielle des échantillons de poussières.

Cette viabilité (ou temps de survie) est plus importante lorsqu'il s'agit des poussières naturelles à l'opposé des poussières stérilisées. Cela pourrait être expliqué par la présence de matière organique. Cette présence a été confirmée par une caractérisation physico-chimique de nos échantillons de poussières naturelles. De plus, des taux d'humidités relatives ont été observés lors de la caractérisation sur l'ensemble des échantillons de poussières (naturelles et stérilisées). Par ailleurs, la survie des bactéries testées lors de phase d'expérimentation a été probablement influencée par l'effet protecteur des poussières naturelles vis-à-vis les rayons UV (Article 2).

Une étude faite au Japon a révélé que les bactéries échantillonnées dans l'air conditionné en été peuvent survivre en hiver et ce, en exploitant l'humidité provenant des climatiseurs installés au sein des résidences (Hatayama et al., 2017).

D'autres études ont démontré l'influence de la température sur les différences de survie de l'espèce *Staphylococcus aureus* placée sur des supports inertes et sur la peau humaine (Lacey et al., 1970; Pettit and Lowbury, 1968).

Quel niveau d'information sur la flore bactérienne ?

Deux techniques d'analyses de la flore bactérienne ont été utilisées lors de ces travaux de recherche : les techniques culturales et les techniques de biologie moléculaire.

Techniques Culturelles

Actuellement, les méthodes basées sur la culture des micro-organismes sont les plus répandues ; elles mesurent seulement la fraction viable et cultivable des bioaérosols, c'est-à-dire les micro-organismes vivants, aptes à se développer et à être en compétition avec les autres organismes présents. Le choix du milieu de culture et des conditions de croissance sont les premiers éléments déterminants dans l'analyse des aérosols bactériens, en fonction de l'objectif visé.

Un grand nombre de milieux nutritifs sont disponibles ; certains, d'utilisation générale, permettent la croissance d'une large variété de micro-organismes, d'autres sont sélectifs ou différentiels. Un milieu sélectif fournit un avantage nutritif pour des micro-organismes ciblés, alors qu'un milieu différentiel contient des ingrédients qui produisent des différences dans leur apparence et facilitent leur identification. Les milieux à large spectre sont ceux qui sont habituellement utilisés pour mettre en évidence la flore bactérienne cultivable totale.

Techniques moléculaires

Une étude menée par une équipe canadienne basée sur l'utilisation des approches moléculaires par PCR quantitative en temps réel a montré la présence des communautés d'archéobactéries dans les poussières domestiques et que celles-ci dépendent des activités des occupants et aux caractéristiques des logements (Pakpour et al., 2016).

La q-PCR en temps réel avait précédemment été utilisée afin de détecter le genre *Streptomyces* dans les poussières domestiques, les résultats ont affirmé la spécificité, la rapidité, l'efficacité, et la reproductibilité, vis-à-vis des échantillons environnementaux, de cette technique analytique (Rintala and Nevalainen, 2006).

Ces différentes approches ont leurs propres limites et ne permettent de caractériser qu'une partie de la flore bactérienne (flore cultivable, flore viable, micro-organismes sélectionnés de manière spécifique par la PCR). A titre d'exemple, Pietarinen et al., (2008) ont constaté une différence de 10 à 100 entre les concentrations de *Streptomyces* obtenues par les méthodes de culture et par les méthodes de biologie moléculaire qPCR. Le choix de la technique utilisée est non seulement lié à l'objectif requis pour l'étude à réaliser, mais aussi des limites techniques et économiques. L'étude de la flore bactérienne implique toutefois des variables qui défient les méthodes traditionnelles. Cette difficulté d'analyse et d'évaluation partagée, avec l'insuffisance d'outils et de procédés moléculaires, la responsabilité des retards qu'a connus le domaine de la microbiologie des environnements intérieurs.

Cependant, les techniques de séquençage haut débit développées récemment ont permis une grande avancée dans la caractérisation des communautés bactériennes en environnement intérieur.

Elles sont en grande partie composées de quatre phylums bactériens principaux qui sont *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria* (Madsen et al., 2015).

Dans nos travaux (Article 3) relatifs aux deux études ECENVIR et Asthm'Child, les mêmes phylums bactériens ont été mis en évidence dans la grande majorité (90%) des séquences détectées. Ces résultats rejoignent ceux des autres études menées par des équipes d'Asie et d'Europe (Ciaccio et al., 2015; Fujimura et al., 2010).

Récemment, une étude sur l'identification de la communauté bactérienne présente dans l'habitat les quatre phylums bactériens ont été détectés à plus de 98% (Jeon et al., 2013).

Dans une autre étude sur l'influence des animaux de compagnie sur la diversité des communautés microbiennes dans les poussières domestiques, les quatre phylums bactériens, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*, sont également largement représentés (Fujimura et al., 2010).

Ces résultats rejoignent ceux d'une étude qui a porté sur l'utilisation des techniques de pyroséquençage afin d'identifier la flore bactérienne présente dans les poussières domestiques dû à l'humidité, avec un taux de détection de plus de 93% (Kettleson et al., 2015).

Une autre étude a révélé les liens entre le microbiome bactérien dans les poussières des maisons de fumeurs en comparaison avec des maisons non-fumeurs et des maisons où y'avait une présence animalière en comparaisons avec des maisons sans présence animalière ; Les quatre phylums bactériens (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*) demeurent les plus dominants (Akin et al., 2017).

Outre les quatre phylums (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*) retrouvés de façon abondante, un cinquième phylum (*Cyanobacterium*) avait été détecté dans le cadre d'une étude menée afin de caractériser la flore bactérienne présente dans les maisons d'enfants asthmatiques et non-asthmatiques (Ciaccio et al., 2015).

Récemment, une étude norvégienne portant sur la composition de la flore bactérienne présente dans les poussières de filtres de ventilation au sein des crèches ; 96% des séquences détectées lors de cette étude appartenaient à ces cinq phylums ; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Cyanobacterium* (Nygaard and Charnock, 2017).

D'après une étude récente, qui a porté sur la diversité des communautés bactériennes présentes dans les climatiseurs installés au sein de bâtiments résidentiels au Japon, lorsqu'une structure de communauté bactérienne est analysée en utilisant le séquençage NGS, le biais associé avec la PCR peut modifier la composition de la communauté bactérienne, en favorisant certains genres bactériens. Cette même étude a révélé qu'il était possible que la diversité de la flore bactérienne se trouvant dans les climatiseurs pourrait être affectée par la contamination d'une autre flore bactérienne provenant des sols de ces bâtiments (Hatayama et al., 2017).

Par ailleurs, une étude a fait l'objet d'une caractérisation des changements qui peuvent survenir dans les communautés bactériennes présentes dans les poussières domestiques après l'utilisation des biocides ; Trois phylums (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*) ont été détectés à plus de 97%. Par contre, le phylum *Bacteroidetes* n'avait pas été détecté (Yamamoto, 2015). Aussi, dans une étude autre qui a décrit les effets des biocides sur les bactéries présentes dans les poussières domestiques, les deux phylums *Firmicutes* et *Proteobacteria* ont été détectés à 81%, alors que les phylums *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* n'ont pas été détectés (Xu et al., 2016).

Les quatre phylums bactériens retrouvés dans la majorité des études qui ont porté sur la caractérisation de la flore bactérienne en environnement intérieur, en particulier, dans les poussières domestiques nous interpellent sur leur pathogénicité et leur contribution dans l'apparition ou l'aggravation des affections respiratoires, tel que l'asthme, chez les occupants. Peu d'études ont porté sur le lien entre microbiome et pathologies respiratoires mais la communauté scientifique commence à s'y intéresser plus particulièrement. Par exemple une étude récente a mis en évidence les liens qui existent entre la diversité microbienne des voies respiratoires et le développement de l'asthme au début de l'enfance ; la classification taxonomique a montré une forte prévalence (89%) des quatre phylums ; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (Chiu et al., 2017). Hilty et al., (2010) ont montré que la communauté microbienne était modifiée au niveau des voies respiratoires chez les asthmatiques avec notamment une modification de la composition en protéobactéries. Cette différence de diversités de souches observée au niveau des voies respiratoires se retrouve-t-elle au niveau du microbiome environnemental ou est-ce le microbiome environnemental qui influence le microbiome respiratoire. Il est trop tôt pour répondre même si des travaux donnent des éléments de réponse. Dannemiller et al., (2016) ont montré que la sévérité de l'asthme était associée avec la richesse bactérienne chez les enfants atopiques et avec la composition bactérienne chez les enfants non atopiques.

La lutte contre la pollution des environnements intérieurs nécessite de relever le défi qui réside dans l'élaboration d'une méthodologie et la production d'outils permettant la caractérisation de la flore bactérienne présente dans ces environnements afin d'étudier son lien avec les pathologies respiratoires.

Perspectives pour évaluer l'exposition bactérienne dans les logements

La problématique de l'exposition des occupants aux bactéries environnementales représente un axe central dans nos travaux (Article 2 et 3). Cette exposition, quoique difficile à mettre en évidence, est réelle et permanente.

A l'heure actuelle, de nombreuses incertitudes demeurent pour décrire la relation entre l'exposition aux bactéries environnementales et les effets sur la santé humaine, et ce en l'absence de standardisation de méthodes de mesures et de valeurs guides objectivant le risque d'exposition. Aussi, l'interprétation des résultats observés dans les études épidémiologiques portant sur le sujet, est généralement limitée en raison de la difficulté d'établir des mesures objectives des niveaux d'exposition. De plus, les mécanismes d'interaction entre les bactéries et les particules de poussières domestiques sont complexes et encore mal connus.

Nos travaux (Article 3) mettent en évidence plusieurs caractéristiques (l'âge du logement, la présence de la ventilation, la présence d'animaux domestiques, etc.) et des facteurs environnementaux (la température, l'humidité ...) influençant le développement de la flore bactérienne au sein des habitats. Par ailleurs, certains de ces paramètres, en particulier l'humidité, élément vital pour la prolifération de la flore bactérienne, ne peuvent être éliminés complètement.

Afin de caractériser les différentes communautés de la flore bactérienne présente dans les poussières domestiques, il serait intéressant pour les travaux à venir, d'utiliser les techniques NGS pour avoir des niveaux d'informations comparables. L'enjeu futur sera de déterminer la pathogénicité de ces communautés. Néanmoins, une standardisation des outils ainsi qu'une méthodologie devront être définies et validées au préalable.

Récemment, Rocchi et Reboux (2017) ont proposé de mettre en place une métrologie de l'exposition microbiologique unique mais aussi multifactorielle, en intégrant des données quantitatives et qui devra être mise en parallèle avec des données cliniques fondées sur les mêmes critères (Caractéristiques de logements). De même, les prélèvements de poussières ont été reconnus comme plus intégrateurs de l'exposition des enfants sur une période plus longue que les prélèvements d'air, qui sont effectués d'une façon ponctuelle et permettent

d'évaluer l'exposition des enfants. Par contre, l'utilisation de la poussière récoltée sur le sol comme indicateur de l'exposition et l'inhalation des allergènes semble être biaisée notamment par l'apport de poussières venant l'extérieur par les chaussures et la ventilation (Rocchi and Reboux, 2017). Il est à relever dans cette étude que les prélèvements de poussières sont considérés comme intégrateurs et non pas comme indicateurs de l'exposition de enfants. Cependant, l'étude a porté sur les allergènes, sans évoquer la flore bactérienne présente dans ces prélèvements. Il serait donc intéressant de faire une extrapolation des résultats de cette étude spécifiquement pour les bactéries.

Par ailleurs, afin de réduire le plus possible les biais d'interprétation, un consensus international sur les critères de logements à échantillonner et sur les facteurs influençant la prolifération bactérienne, devra être établi pour toute recherche dans le domaine de l'exposition et de la caractérisation de la flore bactérienne dans les environnements intérieurs. De plus, La dernière génération de séquenceurs promet de réelles avancées dans le domaine de la santé environnementale (Eduard et al., 2012).

La nécessité d'une démarche globale de santé publique

La démarche en santé publique requiert un raisonnement logique, un état d'esprit, et une approche multidisciplinaire pour toute préoccupation pouvant avoir un impact sur la santé des populations, en particulier, la santé environnementale. Une approche globale est nécessaire tenant en compte la multitude des déterminants (critères de logements et facteurs environnementaux) mais aussi des activités de l'homme. De plus, l'absence de méthodologie clairement établie et de valeurs guides d'exposition à certains contaminants, tels que les bactéries, rendent difficile la déclinaison d'une démarche de santé publique en programmes d'action.

En 1994, dans une conférence sur l'environnement et la santé à Helsinki (Finlande), l'OMS a défini la santé environnementale comme étant le domaine qui « fait référence aux aspects de la santé humaine, y compris de la qualité de vie, qui sont déterminés par les facteurs physiques, chimiques, biologiques, sociaux, psychologiques et esthétiques de notre environnement » (WHO, 1994). En France, le sujet a été porté sur la scène politique avec la prise de conscience des pouvoirs politiques pour intégrer cette orientation au cœur des politiques de santé et ce, avec la publication du premier Plan National Santé Environnement (PNSE 2004 – 2008). Les PNSE2 (2009-2013) et PNSE3 (2015-2019) sont publiés par la suite et ont porté notamment sur l'identification des jeunes enfants ainsi que les femmes enceintes comme étant des populations vulnérables.

Par ailleurs, afin de proposer des mesures d'éviction globales des polluants et d'optimiser la prise en charge de l'environnement intérieur, il a fallu créer et développer la profession de CMEI. Cette profession s'inscrit dans les PNSE 1, 2, et 3. De plus, la validation clinique de l'action des CMEI a été obtenue par le travail de l'équipe de Morgan et al., (2004). Depuis 2007, une licence professionnelle des métiers de santé et de l'environnement a été créée, la filière métrologie-environnement est réservée aux CMEI.

La société de Pneumologie de langue française et la société française d'allergologie recommandent l'éviction la plus globale possible des enfants asthmatiques dans leurs recommandations pour le diagnostic, la prise en charge et le traitement de l'asthme en 2008, mais aussi, ces deux sociétés recommandent de faire appel aux CMEI. De plus, il est probable que l'efficacité de l'éviction des polluants variera en fonction du type d'asthme mais aussi du type de polluant retrouvé dans l'habitat (Ott and de Blay, 2017).

De même, le conseil Habitat-santé a été soutenu par le ministère de l'Environnement (Rocchi and Reboux, 2017). Par ailleurs, aux Etats-Unis, l'Environnement Protection Agency (EPA) recommande le développement du métier de CMEI.

Cependant, Il serait intéressant de proposer aux CMEI, pour les futures études, l'évaluation de l'exposition aux bactéries présentes en environnements intérieurs en plus des nombreux polluants recherchés par ces professionnels. Néanmoins, l'efficacité des visites des CMEI sur la santé des occupants devra être évaluée. C'est l'objet du programme de recherche ECENVIR.

Par ailleurs, des études ont porté sur l'impact des mesures visant à résoudre les problèmes d'humidité et de moisissures sur la santé des occupants (Méheust et al., 2014). Néanmoins, l'évaluation des mesures portant sur les problèmes d'humidité sur les bactéries et par voie de conséquence sur la santé des occupants restent très peu abordées.

La problématique de l'air intérieur dans les habitats appelle à une contribution active des occupants. Une transformation des pratiques et des activités individuelles est nécessaire. Les individus sont incités à « gérer » rationnellement leur « environnement immédiat » à partir de l'adoption d'une série de comportements tels qu'aérer au moins 10 minutes par jour, éviter les encens et parfums d'ambiance, les animaux domestiques, de fumer, de bricoler dans des espaces mal ventilés, etc. (www.prevention-maison.fr). La part relative à l'information, la sensibilisation générale, et l'éducation pour la santé est à développer. L'Institut National de Promotion et d'Education pour la Santé (INPES), maintenant Santé Publique France recommande les mesures à adopter dans le cadre de la prévention et la réduction des effets

de l'exposition aux contaminants des environnements intérieurs. (www.inpes.santepubliquefrance.fr).

Sur le plan pratique, et dans le but d'assurer un air sain dans l'habitat, la lutte contre l'exposition aux poussières ambiantes est permanente.

Afin de réduire les émissions provenant de l'extérieur, l'équipement des maisons par des systèmes de filtration des particules entrantes en les piégeant sur des supports capables de les retenir et les collecter grâce aux charges électrostatiques, sous réserve d'une maintenance régulière, est une piste de recherche pouvant intéresser les professionnels du bâtiment. Par ailleurs, il serait intéressant d'assurer une aération contrôlée en intégrant une entrée d'air dénuée de toutes particules. A ce propos, un système de purification d'air intégré aux fenêtres a été développé par une entreprise allemande (Schüco, Hausberge, Allemagne). Ce purificateur dénommé « VentoLIFE », en phase de test, fait office de système de ventilation et laisse passer l'air en éliminant 99,5% des contaminants allant jusqu'à 0,1 micron (notamment le pollen, les bactéries et les squames d'animaux). De plus, la fenêtre, même fermée, débarrasse l'air aspiré à l'extérieur et à l'intérieur de ses polluants. Son volet motorisé oriente la prise vers l'épuration d'air extérieur ou intérieur, en fonction des informations de diverses sondes internes et externes sur la qualité de l'air. D'autres fenêtres permettent de ventiler et de déshumidifier l'air, sans aucune intervention des occupants du logement. Aussi, un système innovant permet leur ouverture automatique et assure le renouvellement de l'air en fonction de la température ambiante et des niveaux de CO₂ captés dans l'habitat (www.schueco.com/web2/fr/particuliers/fenetres). Ces fenêtres bénéficient d'une certification NF220-EP5 du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB).

La réduction des émissions provenant de l'intérieur doit passer par la lutte contre les conditions favorables au dépôt et à l'accumulation de la poussière au sein de l'habitat.

L'exposition aux micro-organismes est augmentée du fait du chauffage par radiateurs soufflants qui favorise la mise en suspension des poussières, la présence de revêtements de sol (tapis, moquette, parquet mal jointoyé, etc.), de teintures murales, rideaux, tissus et papiers qui entraînent l'émission de fibres et de particules dans l'air et créent des conditions favorables au dépôt et à l'accumulation de poussières au sein de l'habitat. De plus, l'utilisation d'aspirateurs qui ne sont pas étanches entre le sac à poussières et le tuyau flexible, ce qui a pour effet de rejeter une grande partie des poussières aspirées dans l'air intérieur. A ce propos, l'amélioration des aspirateurs, en particulier, les sacs à poussière, permet de leur conférer une capacité de filtration afin de mieux piéger les poussières (sur cassettes) ne laissant passer que le flux d'air exempt de poussière.

La recherche et le développement de nouveaux matériaux de revêtement des sols des environnements intérieurs et constitue un axe majeur pouvant contribuer à la réduction de l'accumulation des poussières domestiques déposées.

Par ailleurs, les meubles sont également mis à contribution pour assainir nos logements. A l'exemple du projet développé en 2016 par la start-up (l'Atelier Climatique, Paris, France) qui crée des meubles dépolluants. La gamme comprend trois meubles : une table de chevet, un objet décoratif et un siège. Chaque meuble renferme une boîte à air, constituée de trois couches de filtres empilées de type G4 et F7 (AFNOR NF EN 779). La première couche, composée de filtres grossiers de type G4, arrête jusqu'à 90% des poussières. La deuxième est composée de filtres fins de type F7 (AFNOR NF EN 779). Elle retient jusqu'à 90% des particules de 0,4 micromètres. La dernière s'occupe de filtrer les gaz et les odeurs par charbon actif : les composés organiques volatiles (COV), gaz d'échappements, cigarettes, odeurs de cuisine, etc. Le dispositif renferme aussi un ventilateur (Sunon, Kaohsiung, Taiwan) silencieux (moins de 22 dB), d'une puissance de 20 watts. Selon les concepteurs, ces meubles dépolluent une pièce contaminée à la fumée de cigarette à 90%. Sans pollution particulière, l'épuration de l'air est effectuée en 30 minutes à moins d'un mètre de la sortie d'air.

Très récemment, une autre start-up (BioOrg, Belgique) a développé une nouvelle technologie de dépollution de l'air des environnements intérieurs. Cette technique consiste à projeter dans l'air des « organismes positifs sains pour la santé humaine » et appelés : Tectobiotics®, afin de rétablir l'équilibre dans l'air ambiant, sans utiliser de produits chimiques. Selon les développeurs, ces organismes positifs auraient un effet curatif et préventif.

Le rôle de l'occupant est tout aussi important dans le contrôle des facteurs influençant la prolifération des micro-organismes (la présence de chaleur, de l'humidité et le manque d'aération et de ventilation, etc.). La place de l'information et de la sensibilisation de la population générale n'est plus à démontrer. L'élargissement des études sur de plus grandes cohortes et identiques est indispensable pour le recueil des données nécessaires pour approfondir les connaissances et mettre en œuvre les solutions les plus appropriées dans une démarche globale de santé publique.

Microbe-homme et homéostasie : jusqu'où va la symbiose ?

Les micro-organismes sont connus pour jouer un rôle crucial dans la physiologie humaine et le développement, tels que métaboliser les glucides et les graisses digestibles, produisant ainsi des vitamines essentielles, tout en contribuant au maintien de notre système immunitaire. Il est établi que de nombreux agents pathogènes vivent et interagissent avec de vastes communautés microbiennes (microbiome). La définition du microbiome a été donnée par

(Lederberg and McCray, 2001) comme « la communauté écologique de microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui partagent littéralement l'espace de notre corps », et a ensuite été élargie à tous les micro-organismes associés aux humains (Turnbaugh et al., 2007) et englobe maintenant l'ensemble des micro-organismes dans un endroit donné (Gilbert et al., 2010).

Des preuves de plus en plus croissantes suggèrent que cette composition est essentielle, et tout déséquilibre (figure 10) dans cette composition microbienne (dysbiose) peut provoquer une grande variété de pathologies, telles que les troubles de la santé néonatale, les troubles gastro-intestinaux, l'arthrite rhumatoïde, les pathologies associées à l'épiderme, au poumon, au foie, au tractus urogénital, les troubles neurologiques, le cancer, et les pathologies chroniques telles que l'obésité et le diabète. C'est la raison pour laquelle de nombreux projets scientifiques d'envergure ont été créés partout dans le monde, à l'exemple du « projet du microbiome humain » (NIH HMP Working Group et al., 2009), le projet américain Gut (www.microbio.me/americangut/) lancé en 2013, et qui offre des opportunités de participation pour le grand public, le projet britannique Gut (www.britishgut.org/), le « consortium international du microbiome humain » (www.human-microbiome.org) qui regroupe 12 pays, le projet chinois « Initiative dans la peau et le microbiome oral » (iMicroCare), etc.

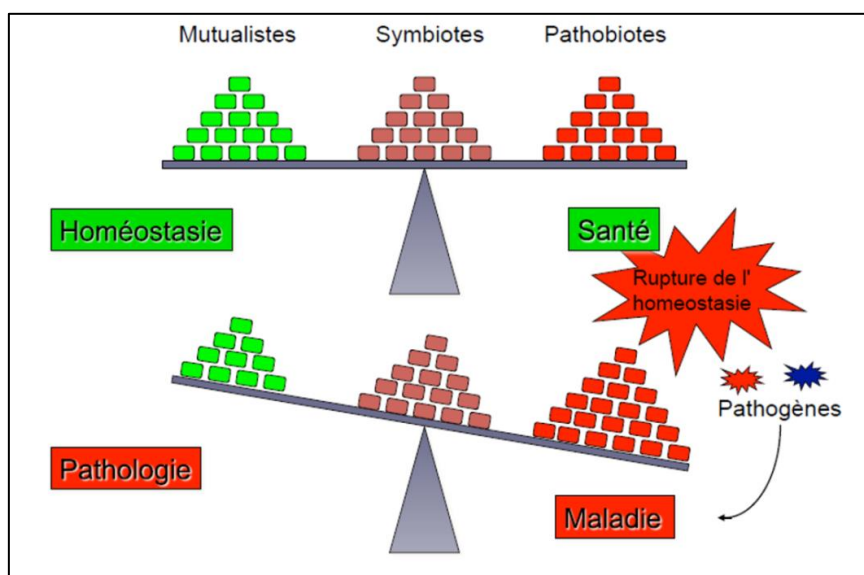


Figure 10. Influence des agents pathogènes sur l'homéostasie (Round and Mazmanian, 2009).

L'interaction complexe qui résulte de la cohabitation « environnement-occupant » peut influencer ou conduire à l'apparition d'un état infectieux (Chow et al., 2011; Rogers, 2012). Des actions, telles que le transfert horizontal de gènes entre bactéries commensales et bactéries pathogènes (Stecher et al., 2012), ou la prise d'antibiotiques, peuvent être à l'origine des changements dans la composition du microbiome.

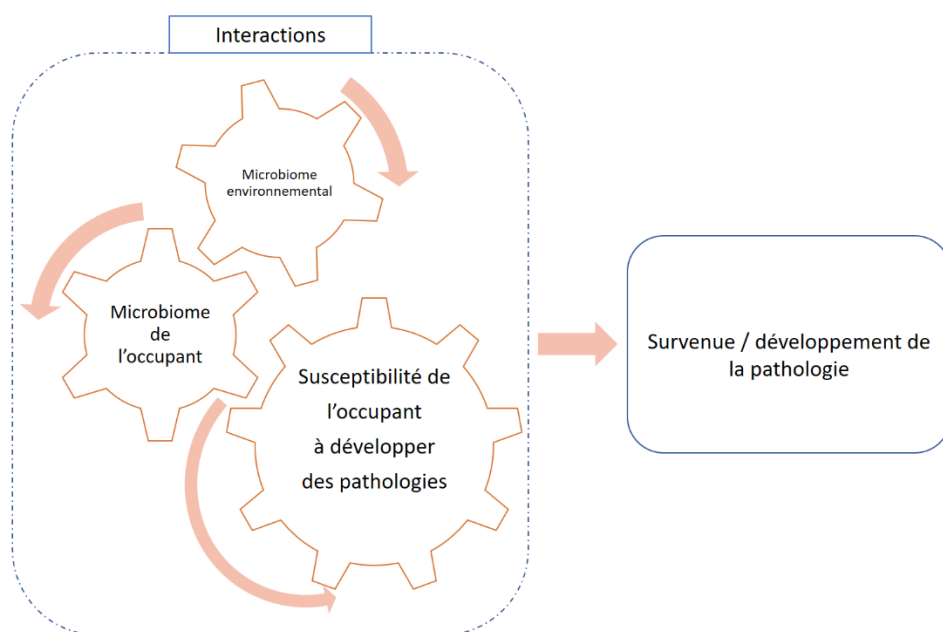


Figure 11. Éléments influençant l'apparition ou le développement des pathologies.

Les interactions entre le microbiome environnemental et le microbiome de l'occupant sont multiples et complexes. Des études dans ce domaine pourraient apporter des éléments de réponse quant à la nature de ces interactions. Le microbiome de l'occupant est assemblé à la naissance, se développe avec son hôte et est fortement influencé par des facteurs environnementaux. Plusieurs facteurs, à la fois intrinsèques et extrinsèques, comme la génétique, les habitudes alimentaires, l'âge, la situation géographique, l'origine ethnique, l'environnement, contribuent au façonnage du soi. De plus, la variation génétique humaine influe également sur la comptabilisation des différences interpersonnelles dans les microbiomes pouvant ainsi influencer directement la santé en favorisant un microbiome bénéfique. Il serait donc intéressant de comprendre l'implication et le rôle du microbiome environnemental et dans la prédisposition de l'occupant à développer des pathologies (figure 11). Des études sur des personnes obèses et sur d'autres personnes obèses ayant subi un traitement chirurgical, ont effectivement montré une diminution de la prédominance des bactéries du genre *Bacteroides* et la réduction de la population Archaea qui sont endémiques des environnements intérieurs. Ces observations fournissent la preuve de l'association entre la composition microbienne intestinale et diverses pathologies, tout en ouvrant des pistes pour le traitement. Récemment, Goodrich et al., (2017) ont proposé que le microbiome soit incorporé dans des études qui quantifient les interactions entre le génotype, l'environnement et le microbiome afin de prédire la susceptibilité aux pathologies.

Dans ce contexte, l'intégration d'un agent pathogène dans son environnement biotique est définie comme pathobiome. La connaissance précise de la communauté microbienne, son effet sur la survenue des pathologies, l'étude de la dynamique des agents pathogènes, et l'identification des facteurs biotiques et abiotiques influençant le pathobiome (figure 12) et pouvant provoquer des maladies chez l'homme, sont nécessaires pour sa compréhension.

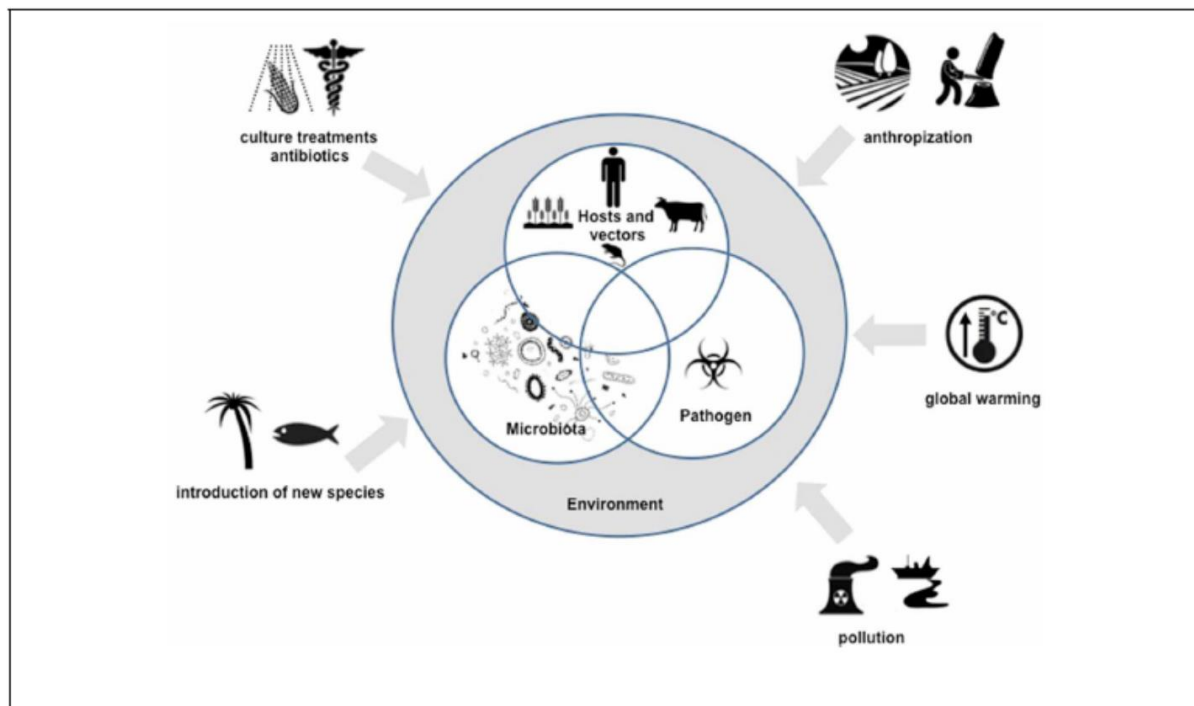


Figure 12. Le concept de pathobiome (Vayssier-Taussat et al., 2014).

Ces questions complexes demeurent, aujourd'hui, des sujets de recherche auxquelles les scientifiques s'atteleront, plus particulièrement, en développant des outils pour mieux comprendre les pathobiomes qui nécessitent des approches de métagénomique.

Conclusion

La pollution des environnements intérieurs est une préoccupation majeure de santé publique comme l'atteste les différentes études et l'augmentation de prévalence des pathologies respiratoires.

La majorité des études ont porté sur l'exposition aux moisissures, dans les environnements intérieurs. Cependant, la part relative à l'exposition aux bactéries dans ces environnements reste peu étudiée. De plus, leur contribution à la génèse des pathologies respiratoires est à démontrer.

L'objectif principal de nos travaux a porté sur l'exposition aux bactéries environnementales de l'habitat à travers une étude des moyens d'évaluation de cette exposition ainsi qu'une approche visant leur implication potentielle dans les pathologies respiratoires.

Cet objectif a débouché sur la réalisation d'une revue de la littérature internationale sur les méthodes de prélèvements et d'analyse des bactéries en environnement intérieur, une approche technique sur l'amélioration des conditions d'analyse de poussières en laboratoire, et enfin, nous nous sommes intéressés à la contamination bactérienne des poussières récoltées dans les projets Asthm'Child et ECENVIR.

Les résultats de nos travaux ont permis de prendre connaissance de l'ensemble des méthodes utilisées dans l'échantillonnage et l'analyse des bactéries en environnement intérieur, tels que les méthodes d'impaction, cycloniques, et de filtration. Le choix de la méthode est tributaire de l'environnement considéré. Notre proposition concernant l'approche technique relative à l'évaluation de la matrice poussière comme étant un modèle indicateur de l'exposition a consisté à sélectionner un modèle de bactéries environnementales gram négatif et des bactéries gram positif à savoir *Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis*, afin de déterminer leur temps de survie dans les poussières domestiques stériles et non stériles.

Les bactéries peuvent survivre en présence de la poussière pendant une plus longue période que dans l'air. Cette survie est meilleure dans les poussières non stériles que celles stériles.

Ces résultats nous incitent à introduire les techniques moléculaires afin d'approfondir les analyses visant à déterminer la survie des souches bactériennes testées, mais aussi d'élargir l'étude en intégrant les deux projets ECENVIR et Asthm'Child pour déterminer le rôle potentiel des bactéries dans la génèse des pathologies respiratoires, en particulier, l'asthme. De même, ces résultats constituent une piste de réflexion pour développer les mesures d'éviction.

Concernant les deux projets ECENVIR et Asthm'Child, l'étude est basée sur des échantillons de poussière prélevés dans les logements de deux cohortes pour l'une sont asthmatiques participant à une recherche sur l'intervention des CMEI, et pour l'autre non-asthmatiques participant à un programme de recherche sur le rôle de l'environnement dans le développement des enfants. 4 phylums bactériens, à savoir, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*, dominent la flore bactérienne des logements des personnes asthmatiques.

La lutte contre l'exposition aux bactéries des environnements intérieurs est un vaste chantier nécessitant, un approfondissement des connaissances, un plus fort engagement des pouvoirs publics, une sensibilisation de la population générale dans le cadre d'une approche globale de santé publique. La communauté scientifique est appelée à élaborer une méthodologie et

standardiser les techniques de mesure de l'exposition aux bactéries en environnement intérieur.

Bibliographie

- Adams, R.I., Bhargava, S., Pasut, W., Arens, E.A., Taylor, J.W., Lindow, S.E., Nazaroff, W.W., Bruns, T.D., 2015. Chamber bioaerosol study: outdoor air and human occupants as sources of indoor airborne microbes. *PloS One* 10, e0128022.
- Adhikari, A., Lewis, J.S., Reponen, T., DeGrasse, E.C., Grimsley, L.F., Chew, G.L., Iossifova, Y., Grinshpun, S.A., 2010. Exposure matrices of endotoxin, (1→3)- β -D-glucan, fungi, and dust mite allergens in flood-affected homes of New Orleans. *Sci. Total Environ.* 408, 5489–5498. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.087
- AFNOR NF EN 779 Septembre 2012. Filtrés à air de ventilation générale pour l'élimination des particules - Détermination des performances de filtration.
- Air et climat - CITEPA [WWW Document], n.d. URL <https://www.citepa.org/fr/air-et-climat/32-polluant-et-ges/poussieres-en-suspension>.
- Akin, R.D., Heruth, D.P., Ye, S.Q., Portnoy, J.M., Ciaccio, C.E., Xiong, M., Barnes, C.S., 2017. House Dust Bacterial Microbiome in Smoking and Pet Owning Homes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, AB86.
- Al-Hunaiti, A., Arar, S., Täubel, M., Wraith, D., Maragkidou, A., Hyvärinen, A., Hussein, T., 2017. Floor dust bacteria and fungi and their coexistence with PAHs in Jordanian indoor environments. *Sci. Total Environ.* 601, 940–945.
- Alvarez, A.J., Buttner, M.P., Toranzos, G.A., Dvorsky, E.A., Toro, A., Heikes, T.B., Mertikas-Pifer, L.E., Stetzenbach, L.D., 1994. Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 374–376.
- Assurance_maladie, 2007, http://www.ffpneumologie.org/wpcontent/uploads/2016/12/CNAMT_S_DP_Asthme_sept-08-1.pdf.
- Atmospheres, C.W., 1993. Size Fractions—Definition Procedures for Measurement of Airborne Particles. *Bruss. Com. Eur. Norm.*
- Barberán, A., Dunn, R.R., Reich, B.J., Pacifici, K., Laber, E.B., Menninger, H.L., Morton, J.M., Henley, J.B., Leff, J.W., Miller, S.L., others, 2015. The ecology of microscopic life in household dust, in: *Proc. R. Soc. B. The Royal Society*, p. 20151139.
- Bâtiment, H.Q.E., 2016. Haute Qualité Environnementale. 13-jan-2016. Site web: <http://Assohqe.OrghqeLinks>.
- Batterman, S.A., Burge, H., 1995. HVAC systems as emission sources affecting indoor air quality: a critical review. *HVAC R Res* 1. doi:10.1080/10789669.1995.10391309
- Billionnet, C., 2012. Pollution de l'air intérieur et santé respiratoire: prise en compte de la multi-pollution. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

- Bodanis, D., 1988. The secret house: 24 hours in the strange and unexpected world in which we spend our nights and days. Touchstone Books.
- Brade, H., 1999. Endotoxin in health and disease. CRC Press.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4516–4522.
- Casas, L., Tischer, C., Wouters, I.M., Valkonen, M., Gehring, U., Doekes, G., Torrent, M., Pekkanen, J., Garcia-Esteban, R., Hyvärinen, A., others, 2013. Endotoxin, extracellular polysaccharides, and β (1-3)-glucan concentrations in dust and their determinants in four European birth cohorts: results from the HITEA project. *Indoor Air* 23, 208–218.
- Chan, P.L., Yu, P.H.F., Cheng, Y.W., Chan, C.Y., Wong, P.K., 2009. Comprehensive characterization of indoor airborne bacterial profile. *J. Environ. Sci.* 21, 1148–1152.
- Chiu, C.-Y., Chan, Y.-L., Tsai, Y.-S., Chen, S.-A., Wang, C.-J., Chen, K.-F., Chung, I.-F., 2017. Airway Microbial Diversity is Inversely Associated with Mite-Sensitized Rhinitis and Asthma in Early Childhood. *Sci. Rep.* 7, 1820.
- Choinière, Y., Munroe, J.A., 1993. Conséquences de la qualité de l'air sur la santé des personnes qui travaillent dans les bâtiments d'élevage. *Can. Serv. Plans M* 9708.
- Chow, J., Tang, H., Mazmanian, S.K., 2011. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 473–480.
- Ciaccio, C.E., Barnes, C., Kennedy, K., Chan, M., Portnoy, J., Rosenwasser, L., 2015. Home dust microbiota is disordered in homes of low-income asthmatic children. *J. Asthma* 52, 873–880.
- CSHPF, 2006. Contaminations fongiques en milieux intérieurs : Diagnostic, Effets sur la santé respiratoire, Conduite à tenir.
- Dales, R., Miller, D., Ruest, K., Guay, M., Judek, S., 2006. Airborne endotoxin is associated with respiratory illness in the first 2 years of life. *Environ. Health Perspect.* 114, 610.
- Dannemiller, K.C., Gent, J.F., Leaderer, B.P., Peccia, J., 2016. Influence of housing characteristics on bacterial and fungal communities in homes of asthmatic children. *Indoor Air* 26, 179–192.
- De Blay, F., Fourgaut, G., Hedelin, G., Vervloet, D., Michel, F.-B., Godard, P., Charpin, D., Pauli, G., 2003. Medical Indoor Environment Counselor (MIEC): role in compliance with advice on mite allergen avoidance and on mite allergen exposure. *Allergy* 58, 27–33.
- Desaunay, A., 2011. Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. *Appl. Au Transf. Cadmium Zinc Seuls Ou En Mélange Par Escherichia Coli Cupriavidus Met. En Colonnes Sable D'Hostun PhD Joseph Fourier Univ.*
- Dor, F., Mandin, C., Kirchner, S., 2010. La qualité de l'air intérieur: une thématique en dynamique. *Arch. Mal. Prof. Environ.* 71, 806–812.

- Douwes, J., 2005. (1→ 3)- β -D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* 15, 160–169.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47, 187–200.
- Douwes, J., Zuidhof, A., Doekes, G., van der ZEE, S., Wouters, I., Marika Boezen, H., Brunekreef, B., 2000. (1→ 3)- β -D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1348–1354.
- Duquenne, P., Greff-Mirguet, G., 2005. L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. *Hygiène Sécurité Trav.* 198, 23–28.
- Duquenne, P., Marchand, G., Duchaine, C., 2011. Mesure des endotoxines dans les aérosols biologiques aux postes de travail. Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).
- Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C., Green, B.J., 2012. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J. Environ. Monit.* 14, 334–339.
- Emerson, J.B., Keady, P.B., Clements, N., Morgan, E.E., Awerbuch, J., Miller, S.L., Fierer, N., 2017. High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance inside single-family residences. *Indoor Air* 27, 576–586.
- Fischer, G., Dott, W., 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch. Microbiol.* 179, 75–82.
- Fisk, W.J., Eliseeva, E.A., Mendell, M.J., 2010. Association of residential dampness and mold with respiratory tract infections and bronchitis: a meta-analysis. *Environ. Health* 9, 72.
- Flores, C.M., Mota, L.C., Green, C.F., Mena, K.D., Gibbs, S.G., 2009. Evaluation of respiratory symptoms and their possible association with residential indoor bioaerosol concentrations and other environmental influences. *J. Environ. Health* 72, 8.
- Flores, G.E., Bates, S.T., Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Leff, J.W., Knight, R., Fierer, N., 2013. Diversity, distribution and sources of bacteria in residential kitchens. *Environ. Microbiol.* 15, 588–596.
- Frankel, M., Bekö, G., Timm, M., Gustavsen, S., Hansen, E.W., Madsen, A.M., 2012. Seasonal variation of indoor microbial exposures and their relations to temperature, relative humidity and air exchange rates. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM–02069. doi:10.1128/AEM.02069-12
- Fujimura, K.E., Johnson, C.C., Ownby, D.R., Cox, M.J., Brodie, E.L., Havstad, S.L., Zoratti, E.M., Woodcroft, K.J., Bobbitt, K.R., Wegienka, G., others, 2010. Man's best friend? The effect of pet ownership on house dust microbial communities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 410.

- Galès, A., Bru-Adan, V., Godon, J.-J., Delabre, K., Catala, P., Ponthieux, A., Chevallier, M., Birot, E., Steyer, J.-P., Wéry, N., 2015. Predominance of single bacterial cells in composting bioaerosols. *Atmos. Environ.* 107, 225–232.
- Gaüzère, C., Moletta-Denat, M., Blanquart, H., Ferreira, S., Moularat, S., Godon, J.-J., Robine, E., 2014. Stability of airborne microbes in the Louvre Museum over time. *Indoor Air* 24, 29–40. doi:10.1111/ina.12053
- Gilbert, J.A., Field, D., Swift, P., Thomas, S., Cummings, D., Temperton, B., Weynberg, K., Huse, S., Hughes, M., Joint, I., others, 2010. The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: a 'multi-omic' study of seasonal and diel temporal variation. *PloS One* 5, e15545.
- Giovannangelo, M., Gehring, U., Nordling, E., Oldenwening, M., Terpstra, G., Bellander, T., Hoek, G., Heinrich, J., Brunekreef, B., 2007. Determinants of house dust endotoxin in three European countries—the AIRALLERG study. *Indoor Air* 17, 70–79.
- Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Clark, A.G., Ley, R.E., 2017. The Relationship Between the Human Genome and Microbiome Comes into View. *Annu. Rev. Genet.* doi:10.1146/annurev-genet-110711-155532
- Görner, P., Simon, X., Wrobel, R., Kauffer, E., Witschger, O., 2010. Laboratory study of selected personal inhalable aerosol samplers. *Ann. Occup. Hyg.* 54, 165–187.
- Goyer, N., Lavoie, J., Lazure, L., Marchand, G., 2001. Les bioaérosols en milieu du travail: guide d'évaluation, de contrôle et de prévention, Programme de soutien analytique. IRSST T-23.
- Grice, E.A., Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244–253.
- Grinshpun, S.A., Willeke, K., Ulevicius, V., Juozaitis, A., Terzieva, S., Donnelly, J., Stelma, G.N., Brenner, K.P., 1997. Effect of impaction, bounce and reaerosolization on the collection efficiency of impingers. *Aerosol Sci. Technol.* 26, 326–342.
- Guerreiro, C., Ortiz, A.G., de Leeuw, F., Viana, M., Horálek, J., 2016. Air Quality in Europe-2016 Report. Publications Office of the European Union.
- Guey, A., 2003. Salles propres et environnements maîtrises apparentes. *INTER BLOC* 22, 193–194.
- GuidEnR HQE > Les infections nosocomiales contractées [WWW Document], n.d. URL <http://www.hqe.guidenr.fr/cible-13-hqe/infections-nosocomiale-contractees.php>.
- Hanson, B., Zhou, Y., Bautista, E.J., Urch, B., Speck, M., Silverman, F., Muilenberg, M., Phipatanakul, W., Weinstock, G., Sodergren, E., others, 2016. Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 713–724.
- Hatayama, K., Oikawa, Y., Ito, H., 2017. Bacterial community structures in air conditioners installed in Japanese residential buildings. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1–9.

- Haysom, I.W., Sharp, K., 2003. The survival and recovery of bacteria in vacuum cleaner dust. *J. R. Soc. Promot. Health* 123, 39–45.
- Health Council of the Netherlands, 2010. Endotoxins. Health based recommended occupational exposure limit. The Hague : Health Council of the Netherlands.
- Heinrich, J., 2011. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 1–25.
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., others, 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS One* 5, e8578.
- Holland, A.E., Spruit, M.A., Troosters, T., Puhan, M.A., Pepin, V., Saey, D., McCormack, M.C., Carlin, B.W., Sciurba, F.C., Pitta, F., others, 2014. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease. *Eur Respiratory Soc.*
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W.W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., 2012. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034867
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W.W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., Peccia, J., 2012. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One* 7, e34867.
- Huang, H.-L., Lee, M.-K., Shih, H.-W., 2017. Assessment of Indoor Bioaerosols in Public Spaces by Real-Time Measured Airborne Particles. *Aerosol Air Qual. Res.* 17, 2276–2288.
- Hwang, S.H., Lee, I.M., Yoon, C.S., 2013. Levels of Total Airborne Bacteria, Gram-Negative Bacteria, and Endotoxin According to Biosafety Levels in Korean Biosafety Laboratories. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 19, 1576–1585.
- Hygienists, A.C. of G.I., 1995. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Jeon, Y.-S., Chun, J., Kim, B.-S., 2013. Identification of household bacterial community and analysis of species shared with human microbiome. *Curr. Microbiol.* 67, 557–563.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 919–934.
- Journal Officiel de la République Française, 1996. LOI n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, 96-1236.

- Kärkkäinen, P.M., Valkonen, M., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Rintala, H., 2010. Determination of bacterial load in house dust using qPCR, chemical markers and culture. *J. Environ. Monit.* 12, 759–768.
- Kettleson, E., Kumar, S., Reponen, T., Vesper, S., Méheust, D., Grinshpun, S.A., Adhikari, A., 2013. *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, and *Streptomyces* in home dust and air: associations with moldiness and other home/family characteristics. *Indoor Air* 23, 387–396.
- Kettleson, E.M., Adhikari, A., Vesper, S., Coombs, K., Indugula, R., Reponen, T., 2015. Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes. *Environ. Res.* 138, 130–135.
- Kirchner, S., Buchmann, A., Cochet, C., Dassonville, C., Derbez, M., Leers, Y., Lucas, J.-P., Mandin, C., Ouattara, M., Ramalho, O., others, 2011. Qualité d'air intérieur, qualité de vie. 10 ans de recherche pour mieux respirer. Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB).
- Klepeis, N.E., Nelson, W.C., Ott, W.R., Robinson, J.P., Tsang, A.M., Switzer, P., Behar, J.V., Hern, S.C., Engelmann, W.H., 2001. The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 11, 231.
- Knibbs, L.D., He, C., Duchaine, C., Morawska, L., 2011. Vacuum cleaner emissions as a source of indoor exposure to airborne particles and bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 46, 534–542.
- Kopp, P., 2014. Étude exploratoire du coût socio-économique des polluants de l'air intérieur. Téléchargeable.
- Krahn, M., Lévy, N., Bartoli, M., 2016. Le séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, ou NGS) appliqué au diagnostic de maladies monogéniques hétérogènes-Notions essentielles pour le dialogue entre cliniciens et généticiens. *Cah. Myol.* 31–33.
- Kujundzic, E., Hernandez, M., Miller, S.L., 2006. Particle size distributions and concentrations of airborne endotoxin using novel collection methods in homes during the winter and summer seasons. *Indoor Air* 16, 216–226.
- Lacey, R.W., Alder, V.G., Gillespie, W.A., 1970. The survival of *Staphylococcus aureus* on human skin: an investigation using mixed cultures. *Br. J. Exp. Pathol.* 51, 305.
- Lai, A.C.K., Cheung, A.C.T., Wong, M.M.L., Li, W.S., 2016. Evaluation of cold plasma inactivation efficacy against different airborne bacteria in ventilation duct flow. *Build. Environ.* 98, 39–46.
- LE COQ Laurence, 2006. Élimination des particules. *Tech. Ing. Trait. Air base documentaire : TIB600*.

- Lecours, P.B., Duchaine, C., Taillefer, M., Tremblay, C., Veillette, M., Cormier, Y., Marsolais, D., 2011. Immunogenic properties of archaeal species found in bioaerosols. *PLoS One* 6, e23326.
- Lederberg, J., McCray, A.T., 2001. Ome SweetOmics—A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 15, 8–8.
- Lee, S.-H., Lee, H.-J., Kim, S.-J., Lee, H.M., Kang, H., Kim, Y.P., 2010. Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by T-RFLP analysis and quantitative real-time PCR. *Sci. Total Environ.* 408, 1349–1357.
- Lei, M.G., Morrison, D.C., 1988. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations. *J. Immunol.* 141, 996–1005.
- Li, A., Xiong, J., Yao, L., Gou, L., Zhang, W., 2016. Determination of dust and microorganism accumulation in different designs of AHU system in Shaanxi History Museum. *Build. Environ.* 104, 232–242.
- Lidwell, O.M., Lowbury, E.J., 1950a. The survival of bacteria in dust. I. The distribution of bacteria in floor dust. *Epidemiol. Infect.* 48, 6–20.
- Lidwell, O.M., Lowbury, E.J., 1950b. The survival of bacteria in dust. II. The effect of atmospheric humidity on the survival of bacteria in dust. *Epidemiol. Infect.* 48, 21–27.
- Lidwell, O.M., Lowbury, E.J., 1950c. The survival of bacteria in dust. III. The effect of light on the survival of bacteria in dust. *Epidemiol. Infect.* 48, 28–37.
- Lidwell, O.M., Lowbury, E.J., 1950d. The survival of bacterial in dust. IV. Atmospheric humidity and the bactericidal action of ultra-violet irradiation. *Epidemiol. Infect.* 48, 38–43.
- Liebers, V., Brüning, T., Raulf-Heimsoth, M., 2006. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *Am. J. Ind. Med.* 49, 474–491.
- Lighthart, B., Hiatt, V.E., Rossano Jr, A.T., 1971. The survival of airborne *Serratia marcescens* in urban concentrations of sulfur dioxide. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 21, 639–642.
- Macher, J., 1999. Bioaerosols: assessment and control. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).
- Madsen, A.M., Matthiesen, C.B., Frederiksen, M.W., Frederiksen, M., Frankel, M., Spilak, M., Gunnarsen, L., Timm, M., 2012. Sampling, extraction and measurement of bacteria, endotoxin, fungi and inflammatory potential of settling indoor dust. *J. Environ. Monit.* 14, 3230–3239.
- Madsen, A.M., Zervas, A., Tendal, K., Nielsen, J.L., 2015. Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODS compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF. *Environ. Res.* 140, 255–267.
- Mandal, J., Brandl, H., 2011. Bioaerosols in indoor environment-a review with special reference to residential and occupational locations. *Open Environ. Biol. Monit. J.* 4.

- Mandryk, J., Alwis, K.U., Hocking, A.D., others, 1999. Work-related symptoms and dose-response relationships for personal exposures and pulmonary function among woodworkers. *Am. J. Ind. Med.* 35, 481–490.
- Meadow, J.F., Altrichter, A.E., Kembel, S.W., Kline, J., Mhuireach, G., Moriyama, M., Northcutt, D., O'Connor, T.K., Womack, A.M., Brown, G.Z., Green, J.L., Bohannon, B.J.M., 2014. Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air* 24, 41–48. doi:10.1111/ina.12047
- Méheust, D., Le Cann, P., Reboux, G., Millon, L., Gangneux, J.-P., 2014. Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 248–260.
- Morgan, W.J., Crain, E.F., Gruchalla, R.S., O'Connor, G.T., Kattan, M., Evans III, R., Stout, J., Malindzak, G., Smartt, E., Plaut, M., others, 2004. Results of a home-based environmental intervention among urban children with asthma. *N. Engl. J. Med.* 351, 1068–1080.
- Nasir, Z.A., Colbeck, I., Sultan, S., Ahmed, S., 2012. Bioaerosols in residential micro-environments in low income countries: a case study from Pakistan. *Environ. Pollut.* 168, 15–22.
- National Academy of Engineering, 2017. Microbiomes of the Built Environment: A Research Agenda for Indoor Microbiology, Human Health, and Buildings. The National Academies Press, Washington, DC. doi:10.17226/23647
- Nazaroff, W.W., 2016. Indoor bioaerosol dynamics. *Indoor Air* 26, 61–78.
- Nehmé, B., Gilbert, Y., Létourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Villemur, R., Duchaine, C., 2009. Culture-independent characterization of archaeal biodiversity in swine confinement building bioaerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5445–5450.
- Nehme, B., Létourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Duchaine, C., 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, 665–675.
- Nevalainen, A., 1989. Bacterial aerosols in indoor air. Kuopio.
- NF220-EP5. <http://www.cstb.fr/pdf/certifications/nf220/nf220L.pdf>
- NIH HMP Working Group, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., 2009. The NIH human microbiome project. *Genome Res* 19, 2317–2323.
- Normand, A.-C., Vacheyrou, M., Sudre, B., Heederik, D.J., Piarroux, R., 2009. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7617–7623.
- Noss, I., Doekes, G., Sander, I., Heederik, D.J., Thorne, P.S., Wouters, I.M., 2010. Passive airborne dust sampling with the electrostatic dustfall collector: optimization of storage

- and extraction procedures for endotoxin and glucan measurement. *Ann. Occup. Hyg.* 54, 651–658.
- Noss, I., Wouters, I.M., Visser, M., Heederik, D.J., Thorne, P.S., Brunekreef, B., Doekes, G., 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5621–5627.
- Nygaard, A.B., Charnock, C., 2017. The bacterial composition of ventilation filter dust in Norwegian pre-school nurseries. *Indoor Built Environ.* 1420326X17713831.
- Oppliger, A., Charrière, 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. *Ann. Occup. Hyg.* 52, 405–412.
- Ott, M., de Blay, F., 2017. L'expérience des conseillers médicaux en environnement intérieur (CMEI). *Rev. Fr. Allergol.* 57, 216–218.
- Ownby, D.R., Peterson, E.L., Wegienka, G., Woodcroft, K.J., Nicholas, C., Zoratti, E., Johnson, C.C., 2013. Are cats and dogs the major source of endotoxin in homes? *Indoor Air* 23, 219–226.
- Pace, N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734–740.
- Pakpour, S., Scott, J.A., Turvey, S.E., Brook, J.R., Takaro, T.K., Sears, M.R., Klironomos, J., 2016. Presence of Archaea in the Indoor Environment and Their Relationships with Housing Characteristics. *Microb. Ecol.* 72, 305–312.
- Peccia, J., Hernandez, M., 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmos. Environ.* 40, 3941–3961.
- 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. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 338–347.
- Pettit, F., Lowbury, E.J.L., 1968. Survival of wound pathogens under different environmental conditions. *Epidemiol. Infect.* 66, 393–406.
- Pietarinen, V.-M., Rintala, H., Hyvärinen, A., Lignell, U., Kärkkäinen, P., Nevalainen, A., 2008. Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. *J. Environ. Monit.* 10, 655–663.
- Preller, L., Heederik, D., Kromhout, H., Boleij, J.S., Tielen, M.J., 1995. Determinants of dust and endotoxin exposure of pig farmers: development of a control strategy using empirical modelling. *Ann. Occup. Hyg.* 39, 545–557.
- Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Millon, L., 2010. Moulds in dwellings: health risks and involved species. *Rev. Mal. Respir.* 27, 169–179.

- Reich, J., Lang, P., Grallert, H., Motschmann, H., 2016. Masking of endotoxin in surfactant samples: Effects on Limulus-based detection systems. *Biologicals* 44, 417–422.
- Rintala, H., Hyvärinen, A., Paulin, L., Nevalainen, A., 2004. Detection of streptomyces in house dust—comparison of culture and PCR methods. *Indoor Air* 14, 112–119.
- Rintala, H., Nevalainen, A., 2006. Quantitative measurement of streptomyces using real-time PCR. *J. Environ. Monit.* 8, 745–749.
- Rintala, H., Pitkäranta, M., Täubel, M., 2012. 4 Microbial Communities Associated with House Dust. *Adv. Appl. Microbiol.* 78, 75.
- Riva, G., Michielsen, N., Ollivier, E., Delorme, M.-O., Daugeron, D., Ferloni, P., Taravella, G., Hénaut, A., n.d. Pollution de l'air et santé: il s'agit avant tout d'un problème de particules en suspension.
- Rocchi, S., Reboux, G., 2017. Cohortes de naissances européennes: exposition aux micro-organismes et impact sanitaire. *Rev. Mal. Respir.* 34, 635–644.
- Rocchi, S., Valot, B., Reboux, G., Millon, L., 2017. DNA metabarcoding to assess indoor fungal communities: Electrostatic dust collectors and Illumina sequencing. *J. Microbiol. Methods*.
- Rogers, A.B., 2012. Gastric *Helicobacter* spp. in animal models: pathogenesis and modulation by extragastric coinfections. *Helicobacter Species Methods Protoc.* 175–188.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313.
- Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M.-D., Boudih, S., Skana, F., Delaforge, M., Rakotonirainy, M.S., 2012. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air* 22, 514–522.
- Sajjadi, H., Tavakoli, B., Ahmadi, G., Dhaniyala, S., Harner, T., Holsen, T.M., 2016. Computational fluid dynamics (CFD) simulation of a newly designed passive particle sampler. *Environ. Pollut.* 214, 410–418.
- Salthammer, T., 1999. Organic indoor air pollutants. *actinomyces* 260, 268.
- Schachter, J., 1999. Infection and disease epidemiology. *Chlamydia Intracell. Biol. Pathog. Immun.* ASM Press Wash. DC 139–169.
- Scherer, E., Valot, B., Vacheyrou, M., Naegelé, A., Knapp, J., Rocchi, S., Roussel, S., Millon, L., Reboux, G., 2016. Assessment of pets (cats and dogs) in homes using electrostatic dust collectors and QPCR: new tools to evaluate exposure and risk of allergies. *Int. J. Environ. Health Res.* 26, 589–599.
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B.J., Murphy, T.F., 2002. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 465–471.
- Sherertz, P., 1993. Bioaerosols, Richmond, Virginia. ed. Virginia Department of Health.

- Silbernagl, S., Lang, F., Duval, D., Gay, R., 2000. Atlas de poche de physiopathologie. Flammarion médecine-sciences.
- Sordillo, J.E., Alwis, U.K., Hoffman, E., Gold, D.R., Milton, D.K., 2011. Home characteristics as predictors of bacterial and fungal microbial biomarkers in house dust. *Environ. Health Perspect.* 119, 189.
- Spaan, S., Heederik, D.J., Thorne, P.S., Wouters, I.M., 2007. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions, and storage of samples and extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6134–6143.
- SST, Q. sont les effets de la poussière sur les poumons? : R., 2017. Quels sont les effets de la poussière sur les poumons?: Réponses SST [WWW Document]. URL http://www.cchst.com/oshanswers/chemicals/lungs_dust.html.
- Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M.J., Pickard, D.J., Barthel, M., Westendorf, A.M., Krogfelt, K.A., Walker, A.W., others, 2012. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1269–1274.
- Tang, J.W., 2009. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface* rsif20090227.
- Täubel, M., Sulyok, M., Vishwanath, V., Bloom, E., Turunen, M., Järvi, K., Kauhanen, E., Krska, R., Hyvärinen, A., Larsson, L., others, 2011. Co-occurrence of toxic bacterial and fungal secondary metabolites in moisture-damaged indoor environments. *Indoor Air* 21, 368–375.
- Thorne, P.S., Cohn, R.D., Mav, D., Arbes, S.J., Zeldin, D.C., 2009. Predictors of endotoxin levels in US housing. *Environ. Health Perspect.* 117, 763.
- Tringe, S.G., Hugenholtz, P., 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 442–446.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 449, 804.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., others, 2014. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Veillette, M., Knibbs, L.D., Pelletier, A., Charlebois, R., Lecours, P.B., He, C., Morawska, L., Duchaine, C., 2013. Microbial contents of vacuum cleaner bag dust and emitted bioaerosols and their implications for human exposure indoors. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6331–6336.

- Vincent, J.H., 1989. Aerosol sampling. Science and practice. JOHN WILEY SONS LTD N. Y. NYUSA 1989.
- Wang, Z., Shalat, S.L., Black, K., Lioy, P.J., Stambler, A.A., Emoekpere, O.H., Hernandez, M., Han, T., Ramagopal, M., Mainelis, G., 2012. Use of a robotic sampling platform to assess young children's exposure to indoor bioaerosols. *Indoor Air* 22, 159–169.
- WHO, 2009. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. 2009. ISBN 978, 890.
- WHO, 1994. Plan d'action en faveur de l'environnement et de la santé dans la Région européenne: deuxième conférence européenne sur l'environnement et la santé, Helsinki, Finlande, 20-22 juin 1994, in: Plan d'action En Faveur de l'environnement et de La Santé Dans La Région Européenne: Deuxième Conférence Européenne Sur l'environnement et La Santé, Helsinki, Finlande, 20-22 Juin 1994. pp. 98–98.
- Williams, B., Hayes, E., Nasir, Z., Rolph, C., Jackson, S., KHERA, S., BENNETT, A., GLADDING, T., DREW, G., TYRREL, S., 2017. The challenges, uncertainties, and opportunities of bioaerosol dispersion modelling from open composting facilities. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 211, 51–59.
- Xu, S., An, C., Kim, S., Lee, S., Lee, K., Yamamoto, N., 2016. Effects of the biocides on the culturable house dust-borne bacterial compositions and diversities. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 22, 1133–1146.
- Xu, Z., Yao, M., 2013. Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3993–4003.
- Yamamoto, 2015. Characterization of changes in cultured house dust-borne bacterial communities and diversities by biocides application. School of public health of the national University of Seoul.

Annexe 1: Communications orales

Conférence internationale

Guenoune Y., Le Cann P. *Indoor dust as a matrice to assess indoor aerosol bacterial contamination*. Healthy Buildings 2017 Europe, Lublin, Poland, 02 – 05, 2017.

Conférences nationales

Guenoune Y., Gerard., A., Le Cann P. *Exposure to environmental bacteria in dwellings: methods of measurement and impact on the occupant's health*. 7^{es} Rencontres Scientifiques du Réseau doctoral en Santé Publique, Paris, France, 22 - 23 mars 2016.

Guenoune Y., Le Cann P. *Exposure to environmental bacteria in dwellings: methods of measurement and impact on the occupant's health*. 3rd European Doctoral College on Environment and Health (EDCEH), Rennes, France, 23 - 25 juin 2014.

Guenoune Y., Le Cann P. *Indoor dust as a template to assess indoor aerosol bacteria contamination*. 4th European Doctoral College on Environment and Health (EDCEH), Rennes, France, 06 - 08 juin 2016.

Guenoune Y., Le Cann P. *Exposure to environmental bacteria in dwellings : methods of measurement and impact on the occupant's health*, 5^{ème} édition de la journée des jeunes chercheurs de l'IRSET, Rennes, France, 01 décembre 2016.

Annexe 2: Communications affichées

Guenoune Y., Le Cann P., *Indoor dust as a template to assess indoor bacterial contamination*. European Aerosol Conference 2016 (EAC 2016), Tours, France, 4-9 septembre 2016.

Guenoune Y., Le Cann P., *Exposure to environmental bacteria in dwellings : methods of measurement and impact on the occupant's health*. 3rd European Doctoral College on Environment and Health (EDCEH), Rennes, France, 23 - 25 juin 2014.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Biologie-Santé
présentée par

Yanis Guenoune

Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR1085-IRSET
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail

Résumé : La qualité de l'air des environnements intérieurs est essentielle pour la santé. Le manque de renouvellement d'air et l'humidité dans les habitats favorise la prolifération microbienne. Les effets sur la santé sont multiples et souvent associés à des maladies chroniques respiratoires, tel que l'asthme. Ces effets sont plus ou moins graves selon le niveau d'exposition et la vulnérabilité des occupants et le rôle des moisissures est pointé. Cependant, le manque d'outils valides permettant d'évaluer quantitativement l'exposition aux bactéries environnementales constitue une des principales difficultés pour mieux appréhender leur impact sur la santé humaine. Un protocole expérimental basé sur les techniques culturales a été développé et testé au laboratoire pour mesurer la survie des bactéries dans des poussières domestiques collectées au sol. L'analyse de ces poussières a permis de déterminer le temps de survie des bactéries testées. Cependant, les méthodes culturales actuelles sont limitées et n'apportent pas assez d'informations sur la composition de la flore bactérienne dans l'habitat. L'utilisation des méthodes moléculaires, tel que le séquençage haut débit, est nécessaire pour y remédier. Par ailleurs, les poussières domestiques pourraient constituer un substrat intégrateur de l'exposition chronique des occupants. Outre le développement, la standardisation, et la validation d'outils de mesure, une approche globale de sensibilisation et de prévention du risque d'exposition aux contaminants des environnements intérieurs est recommandée, en particulier chez les populations vulnérables.

Mots clés : bactéries, poussières, effets sur la santé, méthodes de mesure, environnement intérieur.

Abstract : Indoor air quality is essential for health. Lack of ventilation and presence of humidity in habitats promotes microbial growth. The health effects are multiple and often associated with chronic respiratory diseases, such as asthma. These effects are more or less serious depending on the level of exposure and the vulnerability of occupants and the role of mold is pointed out. However, the lack of valid tools for quantitatively assessing exposure to environmental bacteria is one of the main difficulties in better understanding their impact on human health. An experimental protocol based on cultural techniques was developed and tested in the laboratory to measure the survival of bacteria in domestic dust collected on the ground. The analysis of these dusts made it possible to determine the survival time of the bacteria tested. However, current culture methods are limited and do not provide enough information on the composition of the bacterial flora in the habitat. The use of molecular methods, such as high throughput sequencing, is needed to address this. In addition, domestic dust could be an integrating substrate for chronic occupant exposure. In addition to the development, standardization, and validation of measurement tools, a comprehensive approach to raising awareness and preventing the risk of indoor exposure to contaminants is recommended, particularly for vulnerable populations.

Keywords : bacteria, dusts, health effects, detection techniques, indoor environment.