



Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables

Alexis Simons

► To cite this version:

Alexis Simons. Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables. Mycologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30246 . tel-02366368

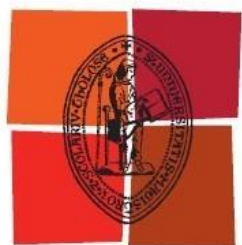
HAL Id: tel-02366368

<https://theses.hal.science/tel-02366368>

Submitted on 15 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Alexis SIMONS

Le mercredi 4 avril 2018

Titre :

Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique / Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions

Directeur(s) de Thèse :

Mme Christine ROQUES
Mme Alexandra BERTRON

Rapporteurs :

Mme Sophie GANGLOFF, Professeure à l'Université de Reims Champagne-Ardenne
Mr Marc BUEE, Directeur de Recherche à l'INRA de Nancy

Autre(s) membre(s) du jury :

Mme Isabelle PAIC-LACAZE, Ingénieur de Recherche au CSTB Marne-La-Vallée - Examinatrice
Mr Jean-Emmanuel AUBERT, Professeur à l'Université Toulouse 3 - Examineur
Mme Christine ROQUES, Professeure à l'Université Toulouse 3 - Directrice de thèse
Mme Alexandra BERTRON, Professeure à l'INSA de Toulouse - Co-directrice de thèse

Remerciements

Avant de présenter ces travaux, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont été impliquées dans leur réalisation et qui m'ont accompagné.

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement mes deux directrices de thèse. Merci à Alexandra Bertron pour son encadrement et son implication tout au long de ces années. Je te remercie de m'avoir permis de participer à tous ces congrès et conférences, que ça soit pour présenter mes travaux ou dans l'organisation, et de m'avoir poussé à aller toujours plus loin dans le métier de chercheur. Je tiens également à remercier chaleureusement Christine Roques pour ses conseils toujours extrêmement judicieux et intéressants, sa bienveillance et la confiance qu'elle m'a portée. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, de m'avoir donné envie de réaliser cette thèse et de poursuivre dans cette voie. Je vous remercie sincèrement toutes les deux, j'ai été extrêmement bien guidé et épaulé durant ces travaux et vous avez été de fantastiques encadrantes. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

J'exprime ma gratitude à Sophie Gangloff et Marc Buée pour avoir accepté d'évaluer ces travaux en qualité de rapporteurs et pour leurs échanges particulièrement enrichissants lors de la soutenance. Je souhaite également remercier Isabelle Lacaze pour avoir participé à mon jury de thèse et pour ses retours sur ces travaux. Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à Jean Emmanuel Aubert, à la fois pour sa présidence du jury lors de ma soutenance, mais également pour sa collaboration à ma thèse et pour son partage de la passion de la terre crue. Je garde de très bons souvenirs des campagnes de prélèvements effectuées ensemble.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Christophe Roux pour son encadrement dans ces travaux, et en particulier ceux concernant le metabarcoding. Je te remercie sincèrement pour ta disponibilité, tes analyses et conseils scientifiques pertinents et toute ton implication au cours de ce projet. Ce fut enrichissant de travailler avec toi.

Je remercie bien entendu l'ensemble des chercheurs, post-docs, doctorants et stagiaires du LGC que j'ai pu cotoyer ou avec qui j'ai pu travailler. Je salue tous les post-docs, thésards et techniciens croisés durant ma thèse pour leur sympathie, leur enthousiasme et leur dynamisme : Aurélie, Julien, Célestine, Manon, Pierre, Paul, Nadège, Poe, Alain et tant d'autres. Merci à Marie-Carmen pour ta joie et ton dynamisme communicatif, à Barbora, à Fatima, et à tous autres les chercheurs du LGC Pharma. Enfin, j'exprime mon amitié à Sophie Pécastaings, ma collègue de bureau, pour m'avoir supporté durant ces années. Nos discussions, qu'elles soient scientifiques ou non, vont me manquer, c'est certain !

De même, je remercie l'ensemble du personnel de la FONDEREPHAR pour leur sympathie et leur disponibilité. Un merci sincère à Cathy, Sylvie, Céline, Delphine, Sandra, Jocelyne, Haouaria, Laïla, Elizabeth et Marie.

Je souhaite également remercier les personnes des autres laboratoires que j'ai pu côtoyer durant ces années. Tout d'abord merci à Aurélie Laborel-Preneron. Nous avons fait nos thèses en parallèle sur ce projet, et c'était agréable de découvrir et de progresser ensemble vers le métier de chercheur. Je remercie les autres membres du LMDC avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin : Kouka, Thomas, Mathieu. De même, je remercie les chercheurs et doctorants du LRSV, et plus particulièrement de l'équipe Myco, pour m'avoir accueilli pour tous ces essais de séquençage. Merci aux collègues de bureau Laurent, Francis et Loïc, mais également à Arthur, Nicolas, Morgane, Dominique, Elise et tous les autres.

Je tiens à remercier l'Agence National de la Recherche pour avoir financé cette thèse, ainsi que l'ensemble du projet ANR Bioterra.

J'exprime également ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont accepté de participer à cette étude, qui nous ont prêté gracieusement leurs murs pour qu'on vienne y gratter un peu et qui ont fait preuve d'une grande gentillesse et hospitalité.

Pour conclure ces remerciements, je souhaite remercier chaleureusement tous mes amis et ma famille qui m'ont soutenu durant cette thèse. C'est toujours une période très prenante et on n'a pas toujours la possibilité de passer le temps qu'on voudrait avec les proches, mais je vous suis reconnaissant pour votre compréhension et vos encouragements.

Enfin, je terminerai par remercier ma chérie, Elise. Merci de ton mon cœur pour ton soutien sans faille durant toutes ces années. Tu as dû faire face avec moi à tous ces moments où ça n'a pas été facile, où les nuits étaient courtes et l'emploi du temps trop chargé mais tu as su faire du mieux possible pour m'aider à tout moment. Je ne te remercierai jamais assez pour cela.

Je vous remercie tous chaleureusement pour votre implication et vos soutiens, qui m'ont permis de rédiger le manuscrit qui suit.

Table des matières

Abréviations	8
Chapitre 1 - Introduction	11
Chapitre 2 - Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue.....	17
2.1. La terre crue : diversité des constructions et origine du regain d'intérêt.....	19
2.1.1. L'Histoire de la terre crue en France.....	19
2.1.2. Quel type de terre est utilisé en construction ?.....	21
2.1.2.1. Formation du sol	21
2.1.2.2. Composition du sol.....	23
2.1.2.3. Sélection du type de terre pour utilisation en terre crue dans la construction	24
2.1.2.4. Ajouts à la terre crue	25
2.1.3. Différentes techniques de construction en terre crue	26
2.1.3.1. Le pisé	27
2.1.3.2. La bauge	28
2.1.3.3. L'adobe.....	28
2.1.3.4. Le torchis	29
2.1.3.5. Les enduits de protection	30
2.1.4. Intérêts de la terre crue dans le bâtiment.....	31
2.2. Méthodes d'évaluation et de caractérisation des flores environnementales	34
2.2.1. Généralités sur les microorganismes.....	34
2.2.1.1. Les champignons.....	34
2.2.1.2. Les bactéries.....	35
2.2.2. Méthodes de prélèvements	36
2.2.2.1. Prélèvements de surface	37
2.2.2.2. Prélèvement de l'air.....	40
2.2.3. Méthodes d'analyses des communautés microbiennes	42
2.2.3.1. Méthodes phénotypiques	43
2.2.3.2. Méthodes d'identification par détection des composés chimiques/biochimiques	47
2.2.3.3. Méthodes de biologie moléculaire	49
2.2.3.3.1. Extraction d'ADN	50
2.2.3.3.2. Méthodes d'analyse par empreinte génétique.....	53
2.2.3.3.3. Méthodes d'analyse par hybridation génétique	55
2.2.3.3.4. Méthodes d'analyse par séquençage génétique	57
2.2.3.3.4.1. Techniques de séquençage.....	58
2.2.3.3.4.2. Sélection du marqueur génétique	68
2.2.3.3.4.3. Analyses des données de séquençage.....	72
2.3. Etude des flores environnementales	77

2.3.1.	Flore microbienne du sol.....	78
2.3.2.	Flore microbienne associée à l'habitat	82
2.3.2.1.	Origines des microorganismes à l'intérieur des habitats	82
2.3.2.2.	Flores microbiennes dans les habitats sains.....	86
2.3.2.3.	Flore microbienne dans les habitats humides	93
2.3.3.	Qualité de l'air et impacts sanitaires	96
2.3.3.1.	Enjeux de la qualité de l'air	96
2.3.3.2.	Typologie de la pollution intérieure	97
2.3.3.3.	Développement microbien et pollution de l'air intérieur	99
2.3.3.3.1.	Conditions environnementales de prolifération des microorganismes au sein du bâtiment 100	
2.3.3.3.2.	Impact des matériaux de construction sur la prolifération des microorganismes	104
2.3.3.4.	Impacts de la détérioration de la qualité de l'air intérieur par les microorganismes sur la santé des occupants	106
2.4.	Biocontrôle de la prolifération fongique.....	110
2.5.	Objectifs de la thèse.....	113
Chapitre 3 - Etude par culture de la flore microbienne des matériaux biosourcés		115
3.1.	Matériaux et sites de prélèvement étudiés	117
3.1.1.	Matériaux étudiés	118
3.1.2.	Sites de prélèvements	119
3.2.	Mise au point du protocole d'isolement des microorganismes	125
3.2.1.	Matériels et méthodes.....	125
3.2.1.1.	Méthode de récupération des microorganismes à partir des prélèvements	125
3.2.1.2.	Méthode de prélèvement par adhésif.....	126
3.2.1.3.	Outils statistiques	127
3.2.2.	Résultats	127
3.2.2.1.	Optimisation de la méthode de récupération des microorganismes pour une mise en culture 128	
3.2.2.2.	Optimisation de la récupération des spores fongiques à partir du film adhésif	131
3.2.3.	Discussion	132
3.3.	Caractérisation par culture des flores microbiennes <i>in situ</i>	134
3.3.1.	Matériels et méthodes.....	134
3.3.1.1.	Prélèvements à la surface et à l'intérieur des éprouvettes manufacturées.....	134
3.3.1.2.	Evaluation de la cinétique développement de moisissures sur des éprouvettes manufacturées 135	
3.3.1.3.	Mise en culture des prélèvements sur matériaux <i>in situ</i>	136
3.3.1.4.	Caractérisation des microorganismes isolés	136
3.3.2.	Résultats	137
3.3.2.1.	Microorganismes issus des matières premières	138

3.3.2.2.	Prélèvements et quantification sur des éprouvettes manufacturées	140
3.3.2.3.	Observation du développement microbien en condition de forte humidité en laboratoire sur éprouvettes manufacturées.....	141
3.3.2.4.	Quantification et identification des microorganismes des prélèvements <i>in situ</i>	143
3.3.3.	Discussion	147
3.4.	Approche de biocontrôle de la flore fongique des matériaux biosourcés <i>via</i> une flore bactérienne antagoniste.....	153
3.4.1.	Matériels et méthodes.....	153
3.4.1.1.	Souches fongiques et isolats <i>in situ</i> étudiés.....	154
3.4.1.2.	Méthode d'évaluation de l'activité antifongique par double-couche.....	155
3.4.1.3.	Méthode d'évaluation de l'activité antifongique sur membrane	155
3.4.2.	Résultats	155
3.4.2.1.	Méthode par double-couche.....	156
3.4.2.2.	Méthode par inoculation sur membrane	159
3.4.3.	Discussion	160
Chapitre 4 - Analyse des communautés microbiennes par méthodes moléculaires.....		165
4.1.	Matériels et méthodes	167
4.1.1.	Extraction d'ADN	167
4.1.2.	Amplification PCR et séquençage.....	168
4.1.3.	Traitements des données de séquençage	170
4.1.4.	Statistiques	171
4.2.	Résultats.....	172
4.2.1.	Alpha diversité ou richesse spécifique	172
4.2.2.	Beta diversité ou différentiel de diversité.....	178
4.2.3.	Assignment taxonomique	182
4.3.	Discussion.....	189
4.4.	Mise en perspective des résultats obtenus par culture et par biologie moléculaire .	202
Chapitre 5 - Conclusion		207
Bibliographie.....		215
Table des Figures.....		251
Liste des Tableaux		254
Annexes		257
Liste des publications et communications		260
Résumé		264

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

API : Analytical Profile Index

ARISA : Analyse automatisée de l'espace
intergénique de l'ADN ribosomal

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomal

a_w : activité de l'eau

BTC : Blocs de Terre Comprimée

Cm : Chloramphénicol

COV : Composé Organique Volatil

DG18 : Dichloran-Glycérol Agar

DGGE : Électrophorèse sur Gel en
Gradient Dénaturant

ddNTP : didésoxyribonucléotides

DO : Densité Optique

dNTP : désoxyribonucléotides

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent
Assay

FAC : Fines Argilo-Calcaires

HR : Humidité Relative

ITS : Espace Interne Transcrit

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser
Desorption Ionisation - Time of Flight

MEA : Malt Extract Agar

NGS : séquençage nouvelle génération

NMDS : Positionnement

Multidimensionnel Non-Métrique

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

pb : paires de bases

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

PERMANOVA : Analyse de la variance
par permutation

qPCR : PCR quantitative

PBS : Tampon Phosphate Salin

PCA : Plate Count Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

R2A : Reasoner's 2A Agar

RFLP : Polymorphisme de Longueur des
Fragments de Restriction

SBM : Syndrome du Bâtiment Malsain

SSCP : Polymorphisme de conformation
des simples brins

T-RFLP : Polymorphisme de Longueur des
Fragments de Restriction Terminaux

TSA : Tryptone Soy Agar

UFC : Unité Formant Colonie

UG : Unité Génome

V8 : V8 agar

Glossaire

Adobe : brique de terre crue, pouvant contenir des fibres végétales ou non.

Amorce : court brin d'ADN (20 à 40 nucléotides) s'hybridant sur une région ciblée d'une séquence d'ADN lors d'une PCR.

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

Bauge : terre crue mélangée à des fibres végétales et empilée.

PCR : duplication par une enzyme (polymérase) en un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN encadrée par une paire d'amorces.

Pisé : mode de construction à base de terre crue comprimée dans un coffrage en bois.

Séquençage : lecture des séquences d'ADN des différents brins contenus dans un échantillon.

Séquence d'ADN : succession des nucléotides qui constituent le brin d'ADN (A, T, C, G).

Taxon : entité d'êtres vivants regroupés en groupe par proximité phylogénétique (famille, genre, espèce, etc.).

Torchis : remplissage d'ossatures en bois par de la terre crue mélangée à des fibres.

Unité Génome : unité correspondant à une mesure du nombre de génome dans un échantillon.

Variant : séquence d'ADN ayant connu une ou des mutations par rapport à une séquence de référence.

Chapitre 1 - Introduction

Actuellement, le développement durable et l'impact de la construction sur l'environnement et sur la santé des occupants sont devenus des problématiques majeures. Afin de répondre aux nouvelles attentes dans le domaine du bâtiment, de nombreux aspects sont étudiés, comme l'optimisation de la consommation énergétique de l'habitat ou l'utilisation de matériaux écologiques. Parmi eux, la terre crue connaît ainsi un fort regain d'intérêt, et ce, pour de nombreuses raisons environnementales, économiques et patrimoniales. Ce matériau de construction ancestral est utilisé à travers le monde, et fut populaire jusqu'à la moitié du XXème siècle en France. Sa capacité thermique (stockage et restitution de chaleur) et ses propriétés de régulation de l'humidité de l'air intérieur sont intéressantes (Minke, 2006; Pacheco-Torgal and Jalali, 2012), permettant ainsi d'assurer un confort intérieur avec un environnement tempéré et frais. De plus, la terre crue peut être associée à des fibres végétales (paille, chanvre, etc.) afin de concevoir des matériaux biosourcés avec de très bonnes performances en matière d'isolation thermique (Binici et al., 2007; Laborel-Préneron et al., 2016). En supplément des propriétés énergétiques et de confort, ce matériau ne nécessite pas de transformation industrielle et est généralement issu directement du sol à proximité du lieu de construction, ce qui lui confère un impact environnemental quasi-nul (González and García Navarro, 2006) et en fait un matériau peu onéreux (Williams et al., 2010).

Toutefois, la terre crue reste sensible à l'eau et peut être altérée lors d'intempéries, de ruissellements ou de dégâts des eaux. De plus, une des problématiques associées aux fortes humidités intérieures est le développement de microorganismes dans l'habitat. La terre crue ayant besoin d'être humidifiée pour sa mise en place, la prolifération de moisissures à la surface de matériaux avec inclusion biosourcée a déjà pu être observée (Flament, 2013; Marcom, 2011). Les risques de prolifération sur les matériaux de construction à base de terre crue restent assez mal caractérisés, malgré les enjeux qu'ils représentent en termes de maintien de la qualité de l'air intérieur.

En effet, l'homme est plus de 80 % du temps à l'intérieur, et son exposition aux particules présentes dans l'air des bâtiments est particulièrement importante (Brasche and Bischof, 2005). Depuis plusieurs décennies, une prise de conscience des problématiques sanitaires et économiques liée à la pollution de l'air intérieur a lieu. En 2014, une étude menée par l'ANSES¹, l'OQAI² et le CSTB³ a évalué le coût de la pollution intérieure par différents

¹ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

² Observatoire de la qualité de l'air intérieur

³ Centre Scientifique et Technique du Bâtiment

composants (benzène, radon, monoxyde de carbone, etc.) à près de 20 milliards d'euros, notamment en se basant sur les coûts de mortalité, de qualité de vie ou encore de perte de productivité. De nombreux composants sont impliqués dans la détérioration de la qualité de l'air (monoxyde de carbone, amiante, etc.), et parmi eux les polluants biologiques produits lors de la prolifération fongique et bactérienne (COV, allergènes, toxines, etc.) (ASEF, 2012). En effet, lorsque des conditions environnementales particulières sont atteintes (humidité, température, nutriments), certains microorganismes peuvent se développer de manière importante (Andersson et al., 1997; Gravesen et al., 1999), émettant alors de nombreux composés nocifs dans l'air intérieur (Kirchner et al., 2011). L'OMS⁴ a établi en 2009 qu'il y avait suffisamment de résultats confirmant l'impact de l'occupation d'un bâtiment humide et/ou avec présence de moisissures sur le développement de nombreuses maladies tels que des allergies, des irritations voir des pathologies plus graves comme des infections. Le nombre d'habitations touchées par ces développements fongiques serait particulièrement élevé, de l'ordre de 10 à 50 % suivant les pays.

Les matériaux de construction étant un support de développement et prolifération des microorganismes, il est important de mieux appréhender leur comportement dans les conditions hygrothermiques (normales et accidentelles) rencontrées dans les bâtiments. De nombreuses études se sont ainsi intéressées au développement bactérien et fongique sur les matériaux conventionnels (plâtre, béton, etc.), afin d'identifier les conditions environnementales nécessaires à leur croissance sur ces supports. Toutefois, peu d'études se sont intéressées aux supports en terre crue et à leur sensibilité au risque fongique et bactérien, ainsi qu'à l'impact de l'ajout de fibres végétales sur ces risques. Les flores bactériennes et fongiques présentes dans les habitats conventionnels ont été caractérisées et reliées à différents facteurs (géographie, saison, etc.) (Adams et al., 2013a, 2014; Dunn et al., 2013; Lax et al., 2014), que cela soit dans des conditions normales ou suite à des accidents hydriques. Mais celles présentes *in situ* sur les matériaux à base de terre ne sont pas connues, et un inventaire des microorganismes présents au sein d'habitations en terre se révèle nécessaire pour appréhender les éventuels risques de développement.

Le projet ANR BIOTERRA (2014-2018) a pour but d'identifier et de caractériser la prolifération microbienne sur des produits de construction biosourcés, et de proposer des solutions pour réduire ou inhiber ces proliférations, dans la perspective de mettre en œuvre

⁴ Organisation Mondiale pour la Santé

des bâtiments sains et durables. Ces travaux de thèse, intégrés dans ce projet ANR, ont eu pour objectif plus particulièrement de caractériser et d'identifier les flores fongiques et bactériennes présentes sur les matériaux en terre crue, à la fois dans des matières premières et sur des murs dans des constructions du patrimoine. Pour cela, des méthodes de prélèvement et d'analyse par biologie moléculaire des flores microbiennes présentes sur ces matériaux ont été développées et mises en place. La présence de microorganismes dans des matériaux, biosourcés ou non, a également été évaluée au fil du processus de fabrication, ainsi que lorsque les matériaux ont été soumis à des conditions d'humidité extrême. Enfin, une piste de maîtrise de la prolifération fongique a été initiée à travers le développement de méthodes de lutte biologique en utilisant des flores bactériennes antifongiques, initialement présentes dans la terre crue.

Suite au premier chapitre que constitue cette introduction, un second chapitre fait la présentation des informations issues de la littérature. Les méthodes de fabrication à base de terre crue sont présentées, de même que les techniques existantes de prélèvement et d'évaluation des flores microbiennes intérieures. Les différentes communautés bactériennes et fongiques issues du sol et de l'habitat sont décrites, ainsi que les conditions de prolifération de certains microorganismes et les risques sanitaires associés. Enfin, le concept de biocontrôle est présenté, en vue d'un transfert à l'échelle du matériau de construction.

Le troisième chapitre présente l'optimisation des méthodes de prélèvements pour les matériaux en terre crue, ainsi que la caractérisation par culture des flores présentes dans les matières premières et sur les matériaux *in situ*. L'isolement de bactéries par culture a permis l'initiation des méthodes de biocontrôle appliquées aux matériaux en terre crue. L'activité antifongique des isolats bactériens obtenus *in situ* a ainsi été évaluée afin de sélectionner ceux présentant le plus d'intérêt pour une future application sur matériau.

Le quatrième chapitre concerne l'analyse par biologie moléculaire (séquençage haut-débit) de la diversité et de la composition des communautés microbiennes, assurant une représentativité plus exhaustive des microorganismes prélevés qu'avec les approches culturales.

Enfin, le cinquième chapitre conclut sur l'ensemble des données obtenues lors de ces travaux et sur les perspectives ouvertes suite à ces nouvelles données.

Chapitre 2 - Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

Pour de nombreuses raisons, les matériaux en terre crue, contenant dans certains cas des fibres végétales, connaissent un essor important. Cependant, ces matériaux peuvent présenter sous certaines conditions environnementales des développements fongiques à leur surface. La qualité de l'air intérieur et la santé des occupants peuvent être impactés par la prolifération de microorganismes au sein du bâtiment. Il est donc important de comprendre quels sont les microorganismes susceptibles d'être présents sur ces matériaux et dans quelles conditions ils risquent de se développer.

Dans un premier temps, cette revue de la littérature présente le matériau principal de cette étude, à savoir la terre crue. Son histoire à travers le monde et plus particulièrement en France, la typologie des sols utilisés, les différents types de constructions ainsi que ses avantages au sein du bâtiment sont abordés. Afin d'appréhender les éventuels risques pour les occupants, il est nécessaire de comprendre quelles flores microbiennes sont naturellement présentes sur ces matériaux. Pour cela, différentes méthodes d'évaluation des communautés microbiennes, en particulier sur les matériaux de construction, sont détaillées, depuis l'étape de prélèvement jusqu'à l'identification par culture ou par biologie moléculaire. A partir de ces techniques, les microorganismes présents dans différents environnements comme le sol (c.-à-d. la matière première principale de la terre crue) et l'intérieur des bâtiments ont été caractérisés dans de nombreuses études et sont présentés. Un focus est notamment porté sur les évolutions de ces flores dans des conditions favorables au développement microbien et sur les impacts sur la santé des occupants que peuvent causer ces proliférations. Afin de limiter celles-ci, la piste du biocontrôle d'organismes néfastes par d'autres microorganismes est également développée. Enfin, une présentation des différents objectifs de ces travaux conclut cette étude bibliographique.

2.1. La terre crue : diversité des constructions et origine du regain d'intérêt

2.1.1. L'Histoire de la terre crue en France

Depuis des millénaires, la terre a été utilisée par l'homme pour construire des habitations et des bâtiments. Selon les travaux archéologiques, le mode de construction en terre crue aurait fait son apparition il y a plus de 9000 ans. Des briques en terre crue, nommées adobes, ont été retrouvées dans le Turkménistan, et seraient datées entre 8000 et 6000 av. J.C. (Minke, 2006). D'autres travaux ont révélé des blocs d'adobes dans le bassin du Tigre qui auraient été façonnés autour de 7500 ans av. J.C. (Berge, 2009). Des traces de constructions en terre crue datant de la période d'Obeïd (environ 5000 à 4000 ans av J.C.) ont également été découvertes

en Mésopotamie (Pollock, 1999). La construction en terre crue a donc connu un développement indépendant au sein des premières civilisations émergentes, en Mésopotamie, en Egypte, mais également en Inde et en Chine.

Par la suite, ces techniques de construction ont été diffusées dans le reste du monde. Durant l'antiquité, de nombreuses constructions et édifices en terre crue ont vu le jour. La Grande Muraille de Chine, dont la construction débuta au III^{ème} siècle av. J.C., fut construite en partie avec de la terre crue damée. Dans le bassin Méditerranéen, de nombreuses villes antiques étaient composées de bâtiments en terre crue. Les phéniciens inventèrent notamment un procédé de construction en terre massive, le pisé, qui fut utilisé pour la construction de la ville de Carthage en 814 av J.C. (Jaquin, 2008; Mileto et al., 2012). Les civilisations gréco-romaines pratiquaient la construction à base de briques de terre crue, tandis que les populations celto-gauloises bâtissaient des habitations en bauge ou en torchis (Houben and Guillaud, 2006).

Au cours du Moyen-Âge en Europe, le torchis fut largement utilisé, et de nombreux bâtiments du patrimoine témoignent encore de ces habitudes de construction. En France, les usages de la terre crue évoluèrent au cours du temps, et durant les XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles, la construction en terre prit la forme d'habitats massifs. Les habitations avec des structures en bois à remplir par de la terre furent substituées à des murs composés essentiellement de terre crue, comme la bauge ou le pisé. Ce matériau fut donc très utilisé dans certaines régions françaises, et ce jusqu'à la fin de la Seconde Guerre Mondiale. Suite à ce conflit, la nécessité de reconstruire rapidement les habitats et infrastructures ont rendu la terre inadéquate au vue de ses contraintes et de ses délais de mise en place. D'autres facteurs, comme la désertification des campagnes et le développement important de la production industrielle à faible coût de matériaux de constructions standardisés, ont conduit à l'abandon de ce matériau dans les constructions (Pignal, 2005). La terre crue fut rapidement associée à un symbole de pauvreté, et tomba en désuétude durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle.

Pourtant, à l'heure actuelle, la terre crue est encore un matériau très répandu à travers le monde (Figure 2.1). Il est estimé que plus d'un tiers de la population mondiale habite dans une habitation en terre crue (Minke, 2000), cette proportion pouvant atteindre 50 % selon les estimations (Guillaud, 2008). Les principaux pays concernés sont les pays en voie de développement ou émergents, notamment en Afrique, les pays du Moyen Orient, en Chine ou encore en Mongolie. La terre crue représente un mode de construction efficace et

économique, qui répond aux attentes de ces pays. En Europe, il existe également un fort patrimoine des constructions en terre crue. Dans les pays développés, comme en France, en Allemagne, en Suède ou encore au Royaume-Uni, ces habitations sont principalement retrouvées dans les zones rurales. Ainsi en France, la population habitant dans les maisons en terre crue construites en torchis, en pisé ou en adobe est principalement localisée à la campagne. Depuis quelques dizaines d'années, la terre crue connaît un regain d'intérêt parmi les méthodes de construction. La dynamique de restauration et réhabilitation, plutôt que la construction de bâtiments neufs, a permis de redécouvrir ce matériau du patrimoine. De plus, la prise en compte des problématiques environnementales, comme l'impact environnemental (coût en CO₂ de la production des matériaux de construction, de leur transport, etc.) ou l'utilisation de matériaux nocifs pour la santé (amiante, etc.) pèse en faveur d'une utilisation moderne de la terre.

ARCHITECTURE DE TERRE DANS LE MONDE

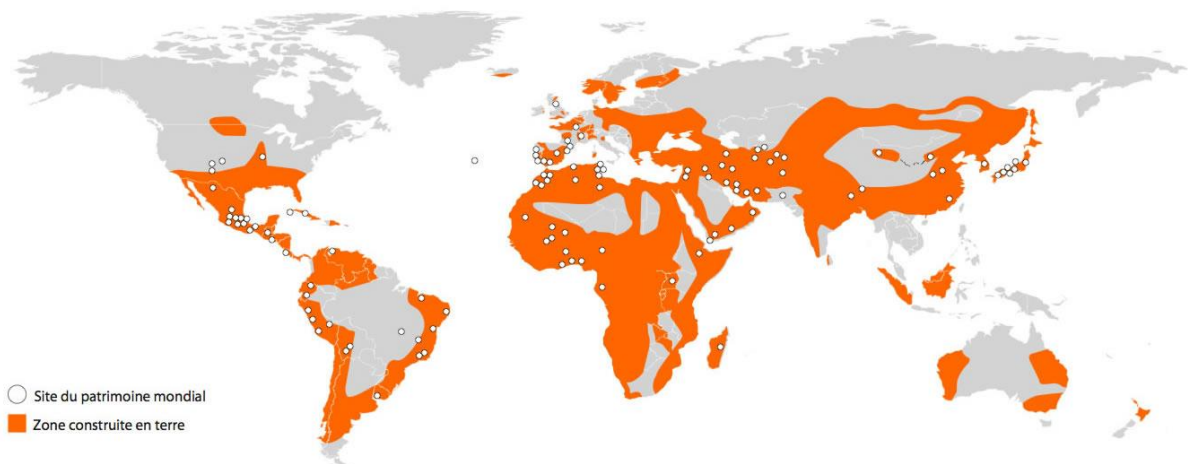


Figure 2.1 : Répartition des architectures en terre crue dans le monde (©CRAterre)

2.1.2. Quel type de terre est utilisé en construction ?

Pour bien comprendre quelles sont les propriétés de la terre utilisée dans les bâtiments et comment elle est utilisée, il faut dans un premier temps se pencher sur son origine et ses caractéristiques.

2.1.2.1. Formation du sol

Le sol constitue la fraction solide de la sphère terrestre. Il existe de nombreux types de terre, issus de différents processus physiques, chimiques et/ou biologiques. Il existe à la surface de la terre différents types de roches-mères, aux caractéristiques variées : les roches-

mères dures, comme le granit ou le schiste ; les roches-mères tendres ou meubles, comme la craie ou l'argile. Ces roches sont soumises à différents phénomènes de vieillissement, causés par les effets de la pluie, du froid ou du soleil, qui altèrent la roche dont la composition chimique et minéralogique est modifiée (Houben and Guillaud, 2006). Suite à cette première étape de désagrégation, un développement d'organismes (microorganismes, flore végétale, faune) à la surface des roches poursuit cette altération. Cette étape conduit à un enrichissement du sol en molécules organiques et modifie fortement sa composition. Le phénomène de migration des éléments solubles par lixiviation modifie également la composition du sol. Dans le cas d'un climat humide et pluvieux, les eaux de pluie tombant sur le sol migrent par gravité et les éléments solubles (particules argileuses, particules limoneuses, ions) sont alors emportés avec elles vers les nappes phréatiques (phénomène de lessivage). A l'inverse, si le climat est sec, les éléments solubles contenus dans le sol sont remontés par capillarité vers des couches plus élevées.

Ces différents phénomènes vont conduire à une stratification du sol, avec différentes compositions minérales et chimiques suivant la profondeur. Les différentes couches homogènes du sol sont nommées horizons, et possèdent des caractéristiques spécifiques (Figure 2.2) (Jahn et al., 2006). L'ensemble de ces horizons forme le profil du sol, dont les couches sont plus ou moins distinctes suivant son âge. Au total, 10 horizons principaux et 7 horizons de transition entre deux strates ont été définis. Les principales catégories sont les suivantes :

- Horizon O : couche de matières organiques (feuilles, aiguilles, mousses, lichens, etc.) composant une litière pas ou peu décomposée s'étant accumulée à la surface du sol minéral. Cet horizon est principalement formé d'humus, et la fraction minérale représente un faible pourcentage de son volume.
- Horizon A : couche mixte, mélangeant des matières organiques humifiées et des matières minérales. La partie minérale est issue de la dégradation de la roche mère. Cet horizon correspond à une terre arable, riche en humus.
- Horizon E : couche minérale avec de faibles concentrations en silicates d'argile, de fer ou d'aluminium, et principalement composée de sable et de limon. Cet horizon est le résultat du lessivage, et se situe souvent près de la surface, sous les horizons O ou A et au-dessus de l'horizon B.

- Horizon B : couche enrichie en divers composés tels que des argiles, des silicates d'aluminium, ou des oxydes de fer, notamment suite à la migration verticale des liquides. Cette couche est nommée horizon « illuvial », et se trouve sous les horizons O, A ou E.
- Horizon C : couche de roche mère peu altérée. Même si elle reste très proche de sa composition initiale, cette couche a subi des modifications. Elle peut contenir des roches sédimentaires et des sédiments.
- Horizon R : couche de roche mère non altérée (granit, basalte, quartz, etc.).

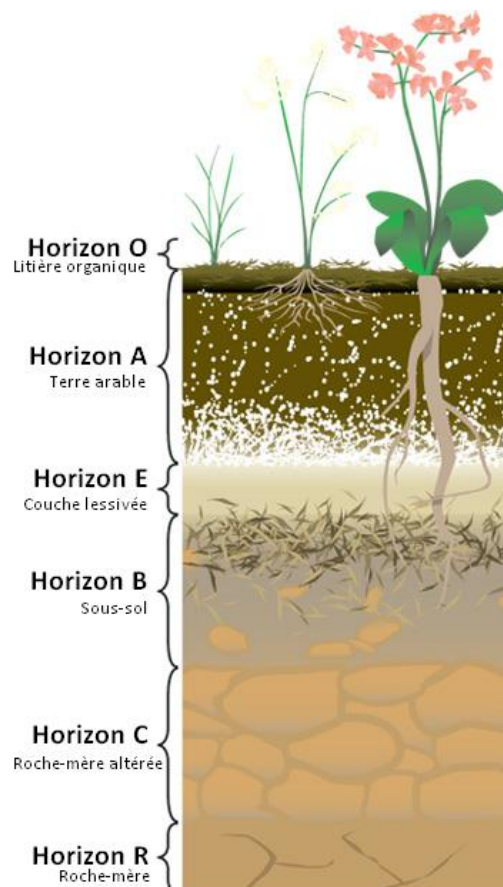


Figure 2.2 : Différents types d'horizons d'un profil de sol (adapté de <http://sparkcharts.sparknotes.com/gensci/envsci/section3.php>)

2.1.2.2. Composition du sol

La terre est composée de divers composés dont les proportions influencent ses caractéristiques physico-chimiques. Le sol contient des composés gazeux (N_2 , CO_2 , O_2). Ceux-ci sont apportés par le travail de la terre, comme le labourage, mais surtout par l'activité biologique de la faune du sol (arthropodes, annélides, etc.). La terre est également composée de liquides, qui peuvent être issus des précipitations, de la décomposition de matières

organiques ou encore des apports par les animaux ou l'homme. La terre contient des solides insolubles dans l'eau, pouvant être divisés en deux catégories: les constituants organiques et les constituants minéraux. Pour la matière organique, celle-ci correspond aux organismes vivants (végétaux, animaux, bactéries, champignons et protozoaires), aux déjections de la faune, aux animaux et végétaux morts en décomposition *via* les microorganismes, ainsi qu'à l'humus (Houben and Guillaud, 2006). La matière organique constitue une source d'azote, d'oxygène, d'hydrogène et d'hydrates de carbone. Elle est principalement concentrée dans des profondeurs de l'ordre de 5 à 35 cm. La partie minérale est, quant à elle, issue de la désagrégation de la roche mère, sous forme de sable, d'argile, de limon, de pierres ou encore de graviers.

D'un point de vue minéralogique, la terre est composée d'agrégats (pierre, gravier, sable) et d'une matrice liante (argile). La terre est caractérisée par sa composition (proportions en argile, limon, etc.) et par sa texture (ou granularité). Une terre avec une forte proportion en argile est appelée terre grasse, et est très cohésive. A l'inverse, une terre contenant de faibles quantités d'argile est peu cohésive, et est appelée terre maigre. La granularité correspond à la distribution dimensionnelle des particules qui composent la terre (caillou, graviers, sable grossier, sable fin, etc.). Il existe de nombreuses variations des différents types de terre. Dans le *Traité de construction en terre* est défini un ensemble de 12 états de la terre suivant sa composition, depuis le conglomérat compact (terre compacte et lourde) jusqu'à la barbotine (terre argileuse totalement dispersée dans l'eau) (Houben and Guillaud, 2006).

2.1.2.3. Sélection du type de terre pour utilisation en terre crue dans la construction

La terre crue utilisée pour les constructions est prélevée dans les couches de terre minérale (horizon B), sous la couche organique, à une profondeur variable suivant les sites (entre 40 et 100 cm de profondeur). Afin de déterminer si la terre est viable en tant que matériau de construction, sa sélection est effectuée à la suite de tests réalisés par un artisan (test de toucher, de lavage, d'adhérence, etc.) et/ou par un laboratoire (Pignal, 2005).

Différents critères sont à prendre en compte lors du choix du sol à utiliser, et ceux-ci varient suivant les techniques de construction (Jiménez Delgado and Guerrero, 2007). Dans un premier temps, l'analyse granulométrique donne les différents diamètres et la distribution des grains composant le sol. Si une terre contient trop d'argile, la phase liante du matériau risque d'être trop réactive à l'eau (i.e. de capter trop d'eau) et donc de faire gonfler le

matériau. La plasticité de la terre, déterminée par la teneur d'eau jusqu'à laquelle le matériau reste cohérent (limite de plasticité) et par la teneur d'eau à laquelle le matériau passe sous forme liquide (limite de liquidité), peut aussi être caractérisée. Une trop forte présence de sels dans la terre peut également être un problème, car leur cristallisation dans le matériau conduit à une fragilisation de celui-ci (Houben and Guillaud, 1994). La concentration en matières organiques ne doit également pas être trop élevée. Ces composants peuvent en effet gêner la cohésion physico-chimique du matériau en étant décomposés au cours du temps, ce qui fragiliserait la structure. Lors du séchage, la perte d'humidité conduit à une diminution du volume du matériau. Ce phénomène de retrait peut conduire à l'apparition de fissures et donc à une diminution des caractéristiques mécaniques. Il est donc important d'évaluer l'ampleur de ce retrait en amont de l'utilisation de la terre. Enfin, l'essai Proctor évalue de son côté la compressibilité du sol en déterminant la teneur en eau optimale par compactage de l'échantillon.

Si la terre crue extraite du sol est de bonne qualité et répond aux critères attendus pour un type de construction donné, il est possible de l'utiliser directement. Cependant, quand les caractéristiques du sol ne sont pas optimales, il est alors nécessaire d'ajouter différents composés à la terre afin d'en modifier les propriétés.

2.1.2.4. Ajouts à la terre crue

Différents types de composés peuvent être additionnés à la terre crue pour corriger certaines caractéristiques. Un ajout de granulats à la terre permet une modification des propriétés mécaniques et physiques de ce matériau (Pignal, 2005). Les granulats agissent en se fixant à l'argile, la phase liante de la terre. Ils peuvent être d'origine minérale ou végétale:

- Granulats minéraux : roche concassée, graviers, gravillons, sable, etc. L'utilisation de granulats minéraux dans le matériau terre crue permet de diminuer la proportion de la phase liante cohésive. Une diminution de la proportion d'argile permet une diminution de la quantité d'eau nécessaire pour plastifier le mélange ainsi qu'une diminution du retrait lors du séchage. Cette technique est appelée dégraissage. De plus, l'ajout de grains supplémentaires dans les fractions de taille trop peu présentes peut conduire à une amélioration de la résistance mécanique du matériau, par augmentation de la compacité granulaire. Il est cependant important de ne pas diminuer la quantité de liant de manière trop importante, car cela conduirait à une baisse de la cohésion du matériau.

- Granulats végétaux (Laborel-Préneron et al., 2016): paille, fibres de lin, chanvre, bois etc. Tout comme les granulats minéraux, les granulats végétaux peuvent être utilisés comme dégraissants (diminution du retrait durant le séchage). Les fibres permettent une répartition des tensions lorsque le matériau perd en volume d'eau, diminuant ainsi les risques de fissures. Leur ajout peut permettre d'améliorer la cohésion du matériau. En effet, la liaison entre les fibres végétales et les particules minérales stabilise la structure de l'ensemble du matériau. L'ajout de fibres végétales est donc associé à une meilleure résistance aux efforts de traction et à une plus grande stabilité mécanique. Cela permet notamment d'améliorer la mise en place de la terre crue, par exemple lors du remplissage de structures en bois dans le cas du torchis, ou de servir d'armature au matériau, dans le cas de la bauge. Enfin, l'ajout de fibres permet également d'alléger le matériau de construction.

Il est également possible d'ajouter des liants ou stabilisateurs à la terre afin de modifier ses caractéristiques de durcissement. La stabilisation de la terre peut se faire par l'ajout de liants minéraux ou organiques. L'ajout de liants minéraux correspond au mélange de faibles quantités de chaux ou de ciment avec la terre. De nombreux composés organiques comme le fumier, les colles de cellulose ou l'amidon sont également utilisés en tant que liants. L'emploi de liants améliore la mise en œuvre du matériau, en diminuant les délais de prise et en réduisant les éventuels gonflements de l'argile. De plus, ils permettent une résistance mécanique du matériau plus importante en renforçant la cohésion de l'argile de la terre. Pour finir, l'amélioration de la résistance à l'humidité, et donc aux intempéries, rend ces liants très intéressants comme additifs aux enduits extérieurs. Cependant, lors de l'addition de liants, il est important de prendre en compte les propriétés physiques de la terre afin qu'elle soit compatible avec le type de stabilisateur et la technique de construction utilisés (Burroughs, 2008). La production de liants minéraux représente tout de même un coût carbone non négligeable qu'il faut donc prendre en considération lorsque ce critère intervient dans le choix du matériau terre crue.

2.1.3. Différentes techniques de construction en terre crue

Il existe de nombreux modes d'utilisation de la terre crue. Celle-ci peut être coulée, comprimée, façonnée ou encore extrudée, avec à chaque fois des intérêts différents en termes de principes de construction (Houben and Guillaud, 2006). Très souvent, la terre utilisée pour la construction d'un bâtiment est extraite des sols près du site de construction. Ainsi, c'est le

type de terre disponible localement qui va déterminer quelles méthodes de constructions sont les plus adaptées. C'est par ailleurs cette utilisation d'un matériau local qui explique la plupart du temps les techniques de construction patrimoniales mises en œuvre dans les différentes régions. Les modes de construction principaux en France sont décrits ci-après (Pignal, 2005).

2.1.3.1. Le pisé

Cette technique de construction consiste en l'édification de murs en terre crue monolithiques, montés dans des coffrages en bois et constitués de plusieurs couches superposées de terre compactée (voir Figure 2.3). L'épaisseur moyenne des murs est de 50 cm, et la masse volumique du matériau est de 1,7 à 1,9 t/m³. Les bâtiments construits en pisé peuvent s'élever sur 2 ou 3 niveaux, voir jusqu'à 4 niveaux en milieu urbain. La terre utilisée pour le pisé nécessite une granulométrie sablo-granuleuse ou argilo-graveleuse.



Figure 2.3 : Mur en pisé (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Pisé>)

Le pisé est une technique qui a largement été popularisée comme mode de construction d'habitations à bas coût et incombustibles au cours du siècle des Lumières par les travaux de François Cointeraux (1740-1830). Cet architecte étant originaire de Lyon, le pisé a été fortement populaire dans la région lyonnaise. Des constructions en pisé peuvent également être retrouvées dans le patrimoine d'autres régions françaises, comme en Bretagne, en Bourgogne, en Auvergne, dans le Pays aquitain ou en Midi-Pyrénées.

2.1.3.2. La bauge

La bauge est une des techniques utilisant la terre crue qui nécessite le moins d'outillage spécifique. Elle correspond à la construction de murs en terre crue monolithiques, composés de terre structurée par des fibres végétales et empilée (Figure 2.4). Les murs obtenus avec cette technique peuvent être porteurs pour des maisons plain-pied (50-60 cm d'épaisseur), voire pour des constructions sur deux niveaux (70-80 cm d'épaisseur). La masse volumique du matériau est de l'ordre de $1,7 \text{ t/m}^3$. Les délais de mise en œuvre sont relativement longs avec cette technique. Elle nécessite des sols argileux à argilo-sableux. Pour les fibres végétales servant à structurer le matériau, la paille est principalement utilisée, mais, dans certains cas, du roseau ou de la bruyère ont pu être employés.



Figure 2.4 : Mur en bauge (<http://www.totem-terre-couleurs.fr>)

L'utilisation de la bauge se retrouve essentiellement en Grande-Bretagne. En France, le patrimoine en bauge se situe dans les régions où la pierre était rare et/ou chère, comme le bassin de Rennes. Ainsi, les principales régions présentant des bâtiments en bauge sont la Bretagne, la Normandie, l'Île-de-France et l'Orléanais. Cette méthode est souvent utilisée en complément de torchis.

2.1.3.3. L'adobe

L'adobe correspond à un bloc de terre crue moulée et séchée, sous forme de brique (Figure 2.5). Les murs maçonnés en adobe sont souvent porteurs, et l'épaisseur du mur varie entre 30 et 50 cm. La masse volumique du matériau est de $1,4$ à $1,8 \text{ t/m}^3$. Le sol utilisé doit être plutôt argilo-sableux. Il est possible d'ajouter des fibres lors de la fabrication des briques

crues. Ces fibres peuvent être végétales (paille, brindilles, etc.) ou animales (soie de porc), leur taille dépendant de la taille de l'adobe et leur proportion du type de construction recherché. Par ailleurs, l'adobe est une technique ayant été modernisée avec l'utilisation de presses à blocs de terre comprimée (BTC).



Figure 2.5 : Mur porteur en adobe (<http://www.lesguepesmaconnes.fr>)

Le mode de construction par blocs d'adobe est très ancien. De nombreuses constructions antiques ont été érigées avec cette méthode (Quagliarini et al., 2010). En France, l'adobe représente une particularité architecturale dans plusieurs régions (Gascogne, Auvergne et Champagne). Elle est souvent associée à l'utilisation de terre cuite, chacune ayant un intérêt et une fonction propre. La brique cuite est utilisée (i) pour les murs qui sont exposés aux intempéries et aux vents dominants, (ii) pour les structures architecturales nécessitant une forte résistance mécanique et (iii) à la base des murs pour éviter les remontées capillaires. L'adobe est, de son côté, utilisée pour les murs de refend et les murs non exposés aux vents dominants.

2.1.3.4. Le torchis

Le mode de construction en torchis consiste en une technique de hourdage. L'habitation repose sur une structure porteuse en bois, et celle-ci est remplie par un mélange de terre, d'eau et de paille (Figure 2.6). Le torchis n'est donc pas un matériau porteur, et sert d'isolation et de protection contre les précipitations. L'épaisseur des murs réalisés en torchis est de 8 à 15 cm en moyenne. La terre utilisée pour ce type de construction est issue d'un sol argilo-limoneux, avec une teneur en eau entre 20 à 30 %. L'ajout de fibres permet une structuration du matériau, ainsi qu'un retrait moins important lors du séchage. Les délais de mise en place de

cette technique sont très importants, aussi elle n'est actuellement utilisée que lors de la restauration de bâtiments anciens.



Figure 2.6 : Mur en torchis (<http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1104936>)

La construction en torchis est une technique très ancienne, utilisée depuis près de 6000 ans (Graham, 2004). En France, elle est assez répandue, notamment en Lorraine, en Alsace, en Franche-Comté et dans le Pays aquitain. On la retrouve régulièrement associée à d'autres méthodes de constructions en terre crue : avec de la bauge en Picardie et en Normandie ; avec de la bauge et du pisé en Bretagne ; avec du pisé dans le Bourbonnais, la Bourgogne et l'Auvergne ; avec de l'adobe en Champagne et en Midi-Pyrénées.

2.1.3.5. Les enduits de protection

Les enduits de protection sont des couches de terre crue déposées à la surface d'un mur (voir Figure 2.7). Ils sont composés de terre crue argileuse mélangée à de l'eau pour la mise en place. Il est possible d'y ajouter des fibres végétales qui permettent une diminution des retraits lors du séchage (Delinière et al., 2014). Ils sont principalement utilisés pour leur aspect esthétique et pour leurs apports dans la qualité de vie à l'intérieur des habitations (Röhlen and Ziegert, 2013). En effet, de par sa composition en argile, l'enduit est une surface ayant une forte capacité d'absorption et de désorption de l'humidité ambiante, permettant de ce fait une meilleure régulation du climat intérieur et une amélioration du confort dans l'habitat. L'enduit en terre crue peut être utilisé dans des pièces à forte humidité ponctuelle, comme une cuisine ou une salle de bains, car le surplus d'humidité est absorbé par l'enduit puis relargué une fois que l'humidité ambiante sera redescendue, évitant ainsi une condensation à la surface d'un mur ou d'une fenêtre. Il est couramment utilisé en extérieur,

afin de protéger un mur des précipitations ; auquel cas des stabilisateurs comme de la chaux sont ajoutés à sa composition. Les enduits sont utilisés à la fois dans la conception de bâtiments neufs, mais également lors de la rénovation d'anciennes bâtisses.



Figure 2.7 : Murs recouvert d'un enduit en terre crue (<http://www.asterre.org>)

2.1.4. Intérêts de la terre crue dans le bâtiment

Bien que la terre crue soit en grande partie abandonnée depuis la moitié du XX^{ème} siècle, ces dernières décennies ont vu naître un fort regain d'intérêt pour ce matériau. En effet, l'utilisation de la terre crue en tant que matériau de construction présente de multiples avantages. Tout d'abord, comme cela a été montré précédemment, la terre est la base d'une multitude de techniques de construction, témoignant de sa souplesse d'utilisation et de la versatilité du matériau. Du point de vue performance thermique, la terre possède une inertie particulièrement élevée. Il lui est possible de stocker la chaleur lorsque celle-ci est élevée dans l'habitat, en journée par exemple. La chaleur accumulée peut donc ensuite être restituée lorsque la température diminue, améliorant ainsi le confort intérieur (Minke, 2006). La quantité de chaleur que peuvent emmagasiner les murs est notamment dépendante de leur épaisseur. En ce qui concerne l'isolation thermique, l'utilisation de matériaux avec inclusion biosourcée, tels que le terre-paille, présente d'excellentes performances (Binici et al., 2007; Laborel-Préneron et al., 2016). L'ajout de fibres permet d'alléger le matériau, notamment en emprisonnant de l'air lorsque la paille est recouverte d'argile. Le matériau voit sa masse volumique diminuer, et l'air étant un très bon isolant, sa conductivité thermique diminue également, permettant ainsi d'obtenir un matériau aux performances d'isolation élevées. En plus d'isoler le bâtiment et de réguler la chaleur intérieure, la terre permet une excellente régulation de l'humidité de l'air intérieur (Pacheco-Torgal and Jalali, 2012). Lorsque

l'humidité intérieure devient très importante, l'eau présente dans l'air est en partie absorbée par les particules d'argile contenues dans la terre. Lorsque l'humidité de l'air décroît, les murs désorbent l'eau stockée, ce qui contribue au maintien de l'humidité intérieure. Ainsi, des blocs d'adobe peuvent absorber près de 10 fois plus d'humidité que des briques céramiques (Minke, 2000). Dans certains cas, les matériaux à base de terre crue peuvent même se révéler plus efficaces que la ventilation pour réguler l'humidité intérieure (Morton, 2010). Cette capacité de sorption, supérieure à celle des autres matériaux de construction, permet à la terre d'assurer un confort à travers la régulation de l'humidité de l'air intérieur. La terre présente également, de par sa forte composition minérale, une bonne résistance au feu (Pignal, 2005). De plus, l'ajout de fibres végétales au sein d'un matériau terre n'augmente l'inflammabilité de celui-ci que si les fibres ajoutées sont de grande taille.

Les matériaux à base de terre crue présentent également des intérêts écologiques et économiques. Les matériaux de construction conventionnels comme le béton nécessitent une extraction des matériaux, une transformation très énergivore et polluante, puis un transport qui, une fois cumulés, associent à ces matériaux un impact carbone et une consommation d'énergie importants, à travers les émissions de gaz à effet de serre et un gaspillage des ressources naturelles (González and García Navarro, 2006). Lorsque la terre crue est utilisée dans le bâtiment, elle est très souvent extraite à proximité du site de construction, diminuant fortement l'impact environnemental du transport. De plus, la terre, la paille ou encore la pierre peuvent être utilisées sans processus de transformation physique (cuisson) ou chimique. Tous ces aspects permettent d'obtenir un matériau ayant un coût carbone très faible. Enfin, le recyclage de ces matériaux est beaucoup plus facile à mettre en place que pour d'autres matériaux de construction comme l'acier ou le béton. La terre crue représente donc un matériau durable à l'impact environnemental très faible. Du fait de leur forte disponibilité locale et de la faible part des processus de transformation, les matériaux à base de terre sont très peu onéreux, et présentent donc un intérêt économique (Williams et al., 2010).

Malgré ces différents intérêts, la terre crue possède certaines limites et désavantages à prendre en compte lors de la construction (Zami and Lee, 2010). Le travail et la mise en place de bâtiments en terre nécessitent une main d'œuvre, un savoir-faire et des efforts importants. De plus, la terre crue a besoin d'être humidifiée pour être utilisée, et les délais de séchage peuvent s'avérer relativement longs. Il n'est donc pas possible de travailler ce matériau sous tous les climats et à toutes les saisons. Cet aspect de la saisonnalité du travail de la terre la

rend moins flexible à utiliser que d'autres types de matériaux. Par ailleurs, les résistances mécaniques et les charges supportées par la terre crue sont moins élevées que celles supportées par des matériaux plus conventionnels comme le béton. Il est alors nécessaire de mettre en œuvre des épaisseurs plus importantes, ce qui peut éventuellement diminuer les espaces de l'habitat. Les structures en terre sont également plus sensibles aux catastrophes naturelles comme les séismes. Un autre défaut majeur de la terre est sa sensibilité à l'eau, celle-ci pouvant dégrader le matériau et altérer ses performances (Pignal, 2005). La terre peut être le siège de remontées capillaires du sol, le mur pouvant rapidement être saturé en eau, ou à des intempéries et ruissellement sur la face extérieure du bâtiment. Des stabilisateurs comme la chaux ou une cuisson des adobes peuvent être utilisés, mais ils impactent alors le bilan carbone du matériau. Pour lutter contre les remontées capillaires, des soubassements constitués de pierre ou de brique peuvent être érigés, bloquant ainsi les éventuelles remontées d'humidité du sol. Une autre possibilité consiste à drainer le sol à proximité du mur. Concernant la face extérieure, il est important de prendre en compte lors de la conception de l'habitation les vents et pluies dominants de la région, pour anticiper quels murs seront à renforcer pour résister aux intempéries. De plus, les murs en terre nécessitent des débords de toiture suffisamment grands pour éviter le ruissellement de l'eau sur les murs. Un autre risque potentiel est la contamination et le développement de microorganismes à la surface des matériaux en terre crue. Par exemple, l'ajout de fibres peut avoir un impact sur la sensibilité du matériau aux microorganismes (Röhlen and Ziegert, 2013), les fibres apportant à la fois une source de carbone disponible pour la croissance des microorganismes mais également leurs propres flores bactériennes et fongiques. Dans certains cas, les matériaux en terre sont séchés à des températures supérieures à la température ambiante afin de réduire le temps de séchage. Röhlen et Ziegert (2013) suggèrent que des températures supérieures à 80°C seraient normalement suffisantes pour éliminer les microorganismes contenus dans les matériaux avec inclusion biosourcée, les rendant moins susceptibles au développement fongique. En cas de forte humidité, que cela soit lors de la mise en œuvre, suite à une mauvaise gestion de l'humidité intérieure ou suite à un dégât des eaux, des moisissures risquent de se développer dans le bâtiment. Il a été observé que ce développement est plus important sur les matériaux biosourcés que sur les matériaux sans ajout végétal (Hoang et al., 2010).

La prolifération des microorganismes à la surface des matériaux de construction en terre crue, biosourcés ou non, reste un risque assez mal caractérisé. L'apparition et le développement de moisissures sur des matériaux en terre crue contenant des fibres végétales

ont déjà pu être observés (Gomes et al., 2012), par exemple sur des panneaux de terre-chênevotte (Flament, 2013) ou sur des murs de terre-paille après retrait du coffrage, en particulier à l'intérieur des bâtiments peu ventilés (Marcom, 2011). Le développement de microorganismes comme des moisissures à l'intérieur des bâtiments est un problème important à prendre en compte, car il implique une dégradation de la qualité de l'air intérieur et des risques sanitaires pour les habitants (Verdier et al., 2014).

2.2. Méthodes d'évaluation et de caractérisation des flores environnementales

2.2.1. Généralités sur les microorganismes

Les microorganismes sont des organismes invisibles à l'œil nu présents de manière ubiquitaire y compris dans des environnements aux conditions physico-chimiques extrêmes. Ils représentent probablement les organismes les plus diversifiés (Torsvik et al., 2002; Venter et al., 2004) et abondants (Whitman et al., 1998) sur Terre. La biomasse que représentent les microorganismes est considérable, et serait estimée à 10^{30} cellules procaryotes dans le monde (Whitman et al., 1998). Par exemple, 1 gramme de sol ou 1 millilitre d'eau douce ou salée contiendrait respectivement entre 10^9 et 10^6 cellules procaryotes (Sogin et al., 2006; Whitman et al., 1998), et cette même masse de sol contiendrait entre 6000 et 50 000 espèces bactériennes différentes (Curtis et al., 2002), et jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques (Leake et al., 2004).

Les microorganismes sont impliqués dans de nombreux processus écologiques de leur habitat, qu'il s'agisse de processus physiques, chimiques ou encore biologiques. Ils jouent par exemple un rôle fondamental dans le recyclage des nutriments, la décomposition des matières organiques et la production de composés primaires dans le sol (Paul, 2014). Les vastes interactions entre les microorganismes et leur environnement rendent nécessaire de bien comprendre comment ces communautés se structurent, notamment lorsqu'elles sont en lien avec l'homme (santé, protection des champs agricoles, etc.).

2.2.1.1. Les champignons

Les champignons, aussi appelés *Fungi* ou Eumycètes, sont des organismes microscopiques eucaryotes, pouvant être unicellulaires ou pluricellulaires. Ils possèdent une paroi cellulaire composée notamment de chitine, de polysaccharides (comme le β -glucane), de protéines et de glycoprotéines. Leur appareil végétatif prend la forme d'une succession de cellules cloisonnées ou non appelée hyphe, et la ramification de ces hyphes est nommée thalle

ou mycélium. Certains champignons sont unicellulaires et sont alors appelés levures. Les organismes fongiques ne possèdent pas de plastides ou de chlorophylle, et n'effectuent donc pas de photosynthèse. Leur nutrition passe par l'absorption de composés à l'aide de transporteurs membranaires, et ils sont donc osmo-hétérotrophes. Pour récupérer les molécules carbonées nécessaires à leur croissance dans leur environnement, différents mécanismes peuvent être distingués. Certains *Fungi* puisent leurs nutriments chez d'autres organismes (plantes, champignons, animaux, etc.) sans impact identifié sur l'hôte (commensales). D'autres en revanche causent des maladies lors de ce processus, voire provoquent la mort de l'organisme (parasites/pathogènes). D'autres espèces dégradent les matières organiques mortes (bois, feuilles, organismes morts, etc.) pour se développer, et sont dites saprophytes. Enfin, certains champignons du sol, appelés champignons mycorhiziens, effectuent une symbiose mutualiste avec le système racinaire des plantes. Concernant le cycle de vie des *Fungi*, il peut être constitué d'une phase sexuée (ascospores et basidiospores) et/ou asexuée (spores végétatives aussi appelées conidies). Les spores produites par différents organes suivants le type de phase (asques et basides / conidiophores) vont être dispersées et coloniser de nouveaux environnements.

Le règne des champignons est une catégorie de microorganismes très riche, l'un des groupes les plus divers parmi les eucaryotes (Mueller et al., 2007). Le nombre d'espèces décrites est de l'ordre de 100 000, mais le nombre total d'espèces dans le monde serait estimé entre 1,5 millions et 5,1 millions (Blackwell, 2011; Hawksworth, 2001; Schmit and Mueller, 2006). Ces organismes sont présents de manière ubiquitaire dans des environnements à la fois intérieurs et extérieurs (Amend et al., 2010a; An and Yamamoto, 2016; Fröhlich-Nowoisky et al., 2009; Tedersoo et al., 2014). Parmi l'ensemble des *Fungi* présents, certains champignons sont filamenteux et appelés moisissures ou micromycètes. Ils appartiennent essentiellement au taxon des *Ascomycota*, mais certains champignons filamenteux existent également parmi les *Basidiomycota* et les *Mucoromycotina*. Ce sont ces moisissures qui composent principalement la flore fongique associée à l'habitat humain et la compréhension de sa structure revêt un intérêt majeur au vu des enjeux sanitaires que représente l'environnement intérieur.

2.2.1.2. Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes, la plupart du temps unicellulaires, disposant d'une paroi rigide. Leur taille peut être variable, en général de l'ordre de 1 à 5 μm , mais pouvant atteindre des valeurs plus extrêmes, de 0,1 à 500 μm . Les cellules bactériennes

peuvent prendre différentes formes suivant les genres/espèces : i) formes en bâtonnets (bacilles), ii) formes sphériques (coques), et iii) formes spiralées (spirilles). D'autres formes intermédiaires peuvent être identifiées comme les coccobacilles. Il existe deux grandes catégories de parois cellulaires chez les bactéries, pouvant être discriminées par la coloration de Gram. Les bactéries à Gram positif disposent d'une couche épaisse de peptidoglycane de 20 à 80 nm d'épaisseur à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Les bactéries à Gram négatif présentent une couche plus fine de peptidoglycane (2 à 7 nm) complétée par une seconde membrane lipidique. Celle-ci est notamment composée de phospholipides et de lipopolysaccharides, et contient de nombreux types de protéines (transport, enzyme, etc.). Certains groupes bactériens présentent des structures pariétales différentes, comme les mycobactéries par exemple.

Ces organismes sont ubiquitaires et sont extrêmement abondants dans de nombreux environnements, comme le sol, l'eau, l'air, mais aussi à la surface et à l'intérieur d'autres organismes vivants. Les bactéries peuvent développer des relations mutualistes avec ces organismes, comme les bactéries de la rhizosphère associées aux racines de plantes fixant l'azote et utilisé par ces dernières en échange de sources carbonées. A l'inverse, certaines bactéries peuvent présenter des comportements pathogènes, que ce soit vis-à-vis d'animaux ou de végétaux. Les bactéries présentent deux caractéristiques importantes : elles adhèrent souvent aux surfaces et se développent alors sous forme d'agrégats denses nommés biofilms (les *Fungi* peuvent également être présents au sein de ces structures) ; par ailleurs, certains genres de bactéries à Gram positif (*Bacillus*, *Clostridium*, *Sporohalobacter*, etc.) peuvent produire des structures dormantes et très résistantes nommées endospores (Nicholson et al., 2000). Ces formes permettent une survie du microorganisme à des conditions environnementales extrêmes (température, dessiccation, etc.) ou à un stress nutritif.

2.2.2. Méthodes de prélèvements

Pour l'étude des flores de l'habitat, différents environnements peuvent être étudiés comme l'air, les matériaux de construction (sol, murs, etc.) ou d'autres types de surface intérieures (table, rebords de fenêtres, etc.), mais avoir une observation exhaustive de la flore intérieure peut être complexe. Par exemple, les spores fongiques sont relargués dans l'air intérieur de manière irrégulière, dépendant de nombreux facteurs (type de matériau sur lequel les microorganismes prolifèrent, vitesse de l'air, etc.) (Kildesø et al., 2003; Sivasubramani et al., 2004). De plus, certains champignons pathogènes se développant sur des surfaces humides

ne relarguent que peu de spores dans l'air, ou celles-ci perdent leur cultivabilité peu après leur aérosolisation, ce qui augmente le risque de non détection. La détection de spores de certaines espèces n'est pas toujours associée à des pathologies, et inversement, la non-détection d'espèces pathogènes ne signifie pas leur absence. Les méthodes de prélèvements des microorganismes à l'intérieur des habitats sont donc cruciales afin d'accéder à la diversité des genres et espèces présents. Il existe une multitude de méthodes de prélèvement, chacune ayant ses conditions et supports privilégiés (Verdier et al., 2014). Néanmoins, chaque méthode de prélèvement possède ses propres biais, qui influencent notamment les types de microorganismes isolés. Dans le cas des matériaux de construction *in situ*, il n'existe actuellement pas de protocole de prélèvement standardisé. Le choix des méthodes repose surtout sur la notion de surface poreuse ou non poreuse, mais pas forcément sur le type de matériau de construction, qui peut cependant présenter des propriétés physico-chimiques, incluant des propriétés de surface, très variées (plâtre, béton, etc.). Afin de diminuer l'influence de la méthode de prélèvement sur les résultats, il est donc conseillé d'utiliser si possible au moins deux méthodes de prélèvement de surface différentes (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006).

2.2.2.1. Prélèvements de surface

Les prélèvements de surface peuvent se révéler pertinents afin de connaître les sources potentielles de relargage de contaminants dans l'air intérieur (Madsen et al., 2006). Différentes techniques sont utilisées pour le prélèvement de matériau de construction :

Prélèvement de fragments

Cette méthode est un moyen destructif de récupérer un échantillon du matériau, directement extrait de la surface par grattage ou carottage. La quantité prélevée est variable et dépendante du type de matériau, mais se trouve dans un ordre de grandeur de 0,3 à 5g. Cette technique est la plus utilisée pour les prélèvements de surface sur matériaux de construction (Verdier et al., 2014).

Une fois les échantillons prélevés, il existe différents moyens d'isoler les microorganismes contenus dans le prélèvement. Les fragments peuvent être soit directement déposés sur des milieux de culture, soit dispersés dans une solution de récupération qui est ensuite diluée et déposée sur des milieux de culture (Miller, 2001). Les suspensions obtenues peuvent également être traitées pour d'autres types d'analyses. Les microorganismes adhérents

à la surface des fragments peuvent également être observés directement par microscopie (Andersson et al., 1997).

Ecouvillonnage

L'écouvillon est constitué de cellulose/fibre artificielle ou d'alginate stérile, généralement imbibé d'une solution physiologique. Lors du prélèvement, il est frotté sur l'aire d'intérêt (de l'ordre de quelques cm²) et permet de récupérer les microorganismes présents. Cette méthode est souvent utilisée lorsque d'autres méthodes de contact, comme la gélose contact ou l'adhésif, ne peuvent pas être utilisées car la surface d'intérêt est difficilement accessible (Bellanger et al., 2009; Buttner et al., 2007; Ellringer et al., 2000; Reboux et al., 2009; Santucci et al., 2007). Les écouvillons peuvent également être utilisés pour le prélèvement de poussières intérieures (Adams et al., 2013a; Barberán et al., 2015).

Divers paramètres peuvent influencer les résultats du prélèvement: la manipulation de l'outil par l'opérateur (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006), le type d'écouvillon et sa matière (coton, nylon, polyester, etc.) ou si l'écouvillon est humidifié ou non (Edmonds, 2009; Edmonds et al., 2009; Rose et al., 2004). De plus, les propriétés de surface du matériau influent également sur l'efficacité de prélèvement, avec une meilleure performance sur les surfaces non poreuses et lisses (Buttner et al., 2007). L'étape ultérieure d'isolement des microorganismes est similaire à celle décrite précédemment.

Gélose contact

Le principe de la gélose contact consiste à presser directement un milieu de culture contre la surface d'intérêt. Le temps de contact et la pression exercée doivent être suffisants pour permettre le transfert des microorganismes sur la gélose. Celle-ci est ensuite incubée à des températures variables, en fonction des types de microorganismes recherchés (Andersen et al., 2011; Beguin and Nolard, 1994; Bouillard et al., 2005; Gravesen et al., 1999; Nielsen et al., 1998a; Santucci et al., 2007).

Parmi les différents paramètres impliqués dans l'efficacité de prélèvement, les principaux facteurs concernent le temps de contact et la pression appliquée sur la gélose (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006; Santucci et al., 2007). Afin de contrôler et de standardiser ces paramètres, l'utilisation d'applicateurs commerciaux est fortement recommandée. Le choix du type de gélose et ses conditions d'incubation sont essentiels pour

sélectionner les microorganismes étudiés, permettant la croissance soit uniquement des bactéries, soit uniquement des champignons, soit des deux en même temps.

Prélèvement par adhésif

Un film adhésif peut être appliqué sur la surface à prélever afin de récupérer les microorganismes présents. Il est ensuite déposé sur un milieu nutritif (Wiktor et al., 2009) ou observé sous microscope pour identification, ce qui permet éventuellement une semi-quantification des organismes non cultivables (Andersson et al., 1997; Boutin-Forzano et al., 2004; Doll, 2002; Gravesen et al., 1999; Nielsen et al., 1998a; Reenen-Hoekstra et al., 1991; Samson et al., 2010; Santucci et al., 2007). Simple, rapide à mettre en place et peu coûteuse, cette méthode permet un prélèvement non destructif, et est particulièrement utilisée dans le cas des monuments historiques, en pierre par exemple (Urzi and De Leo, 2001). Afin d'optimiser l'adhésion du film à la surface, il est préférable que celle-ci soit plate et sèche.

Méthode de la moquette

Cette technique de prélèvement des microorganismes est principalement utilisée en mycologie et notamment dans le cas des mycoses superficielles (Sierra et al., 2000). Un carré de moquette stérilisée est frotté contre la surface d'intérêt afin d'emprisonner les spores et filaments fongiques dans les fibres de la moquette. Il est ensuite déposé pendant plusieurs minutes sur un milieu nutritif pour transférer les microorganismes prélevés sur la gélose. Les microorganismes prélevés peuvent être ainsi isolés et identifiés.

Les prélèvements de surface permettent donc d'accéder aux flores microbiennes présentes à la surface du matériau. Cependant, ces flores ne sont pas toujours corrélées avec les problèmes de santé des occupants. En effet, certaines espèces pourront très bien être détectées à la surface, sans pour autant être en condition de développement et de sporulation, ne représentant alors pas ou peu de risque pour la santé des habitants. Il est donc conseillé d'effectuer à la fois un prélèvement de surface et d'air lorsqu'on cherche à évaluer les risques sanitaires liés à la prolifération microbienne dans un bâtiment (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006).

2.2.2.2. Prélèvement de l'air

Le principe du prélèvement d'air est de capturer un certain volume d'air qui est soit mis en contact avec un milieu de culture soit filtré sur une membrane avant mise en culture (dépôt direct de la membrane sur milieu de culture). Plusieurs méthodes sont utilisées pour prélever l'air d'un environnement :

- Prélèvement par impaction : cette méthode est actuellement la plus répandue et consiste en la captation d'un volume d'air (en général 100 à 1000 litres selon les locaux, le traitement d'air et l'appareil de prélèvement) au sein duquel les particules présentes, dont les microorganismes, viendront impacter sur un milieu de culture en boîte de Petri. Cette technique est notamment spécifiée dans la norme ISO 14698-1 (Afnor, 2003), et permet une détection et quantification directe des germes après incubation du milieu de culture. La durée et la qualité de collecte sont toutefois limitées avec cette technique, du fait du risque de dessiccation du milieu. De même, un débit d'air trop important peut causer des stress importants pour les microorganismes (non détection de certaines espèces).
- Prélèvement par cyclone : cet appareil permet de capturer les microorganismes présents dans l'air (maximum 3m³) dans un liquide de collecte, contenu dans un récipient, par force centrifuge. Le liquide contenant les microorganismes peut ensuite être analysé par méthodes culturales (directement ou après concentration/dilution), mais surtout servir à l'identification par biologie moléculaire ou immuno-analyses. Cela permet théoriquement d'obtenir des résultats plus rapidement qu'avec la méthode par impaction.
- Prélèvement par filtration : une quantité d'air déterminée est aspirée à travers un filtre d'un diamètre et porosité définis à une vitesse continue et fixe (Norme ISO 14698 ou Norme ISO 16000-16) (Afnor, 2003, 2008). La durée de prélèvement peut être étendue par rapport aux méthodes par impaction ou cyclone. Le filtre est ensuite soit déposé sur un milieu nutritif, soit déposé dans un milieu de récupération, soit utilisé pour des extractions d'ADN. Cette méthode est particulièrement utilisée pour des techniques de biologie moléculaire après prélèvement. Des méthodes d'aspiration de particules sur filtre similaires sont également utilisées dans le cas des prélèvements de poussières (Amend et al., 2010a; Bouillard et al., 2005; Dannemiller et al., 2014a; Hospodsky et al., 2012; Santucci et al., 2007).

- Prélèvement par sédimentation : cette technique est la plus simple, car elle consiste juste à laisser un milieu de culture ouvert pendant un certain temps, et de laisser les éventuels microorganismes de l'air déposer par simple sédimentation. La sédimentation est également utilisée dans certains cas pour l'étude des poussières intérieures (Adams et al., 2013b, 2013c; Emerson et al., 2015). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'évaluer les microorganismes viables / cultivables qui se déposent réellement sur des surfaces, comme par exemple dans le cas des industries agroalimentaire. Cependant, elle est fonction de la densité des microorganismes ou des particules auxquelles elles sont associées. Ainsi les *Fungi* sédimenteront plus rapidement que les bactéries. Des temps de sédimentation compris entre 1h et 4h sont classiquement utilisés afin également de limiter le dessèchement de la gélose.

Les prélèvements d'air sont particulièrement utilisés pour l'estimation des risques sanitaires pour les habitants, et de nombreuses études ont utilisé ces techniques pour caractériser la flore intérieure (Górny, 2004; Gutarowska and Żakowska, 2002; Hospodsky et al., 2012; Pasanen, 2001; Pastuszka et al., 2000; Portnoy et al., 2004; Reboux et al., 2009). Toutefois, ces prélèvements ne sont pas toujours représentatifs de la flore fongique et bactérienne se développant dans un bâtiment. Les prélèvements d'air favorisent les espèces produisant beaucoup de petites spores (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, etc.) au détriment de celles produisant peu de spores, mais avec un diamètre plus important (*Acremonium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Ulocladium*) (Samson et al., 2010). Le potentiel de dispersion des spores et des bactéries dans l'air ainsi que la survie de celles-ci varient d'une espèce à l'autre, et compliquent alors la détection de certains microorganismes pourtant bien présents.

Malgré l'efficacité reconnue de chaque méthode de prélèvement, elles ne permettent pas de détecter la totalité des microorganismes présents dans l'environnement étudié. Les biais inhérents à chaque méthode limitent toujours d'une manière ou d'une autre l'accès à certaines espèces (Andersen et al., 2011). De nombreuses études ont fait état du manque de standardisation pour les méthodes de prélèvements sur matériaux de construction, ce qui rend parfois difficile la comparaison des résultats (Bellanger et al., 2009; Brown et al., 2007; Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006; Hyvärinen et al., 2002; Santucci et al., 2007). Au final, de nombreux paramètres influencent la caractérisation et la quantification

des communautés microbiennes, que ce soit par le choix de la méthode de prélèvement, mais également par la sélection de la méthode d'analyse.

2.2.3. Méthodes d'analyses des communautés microbiennes

Plusieurs types de méthodes peuvent être utilisés pour étudier les flores environnementales microbiennes (Figure 2.8). Une fois le prélèvement effectué, les échantillons récupérés peuvent permettre un isolement par méthodes culturales et les microorganismes ainsi obtenus sont identifiés selon leurs caractéristiques (phénotypes, composés biochimiques, génotypes, etc.). Le métabarcoding est une autre approche consistant en l'extraction de l'ADN de l'ensemble des microorganismes contenus dans les échantillons, et l'amplification d'un marqueur génétique pour caractériser et identifier les communautés microbiennes présentes.

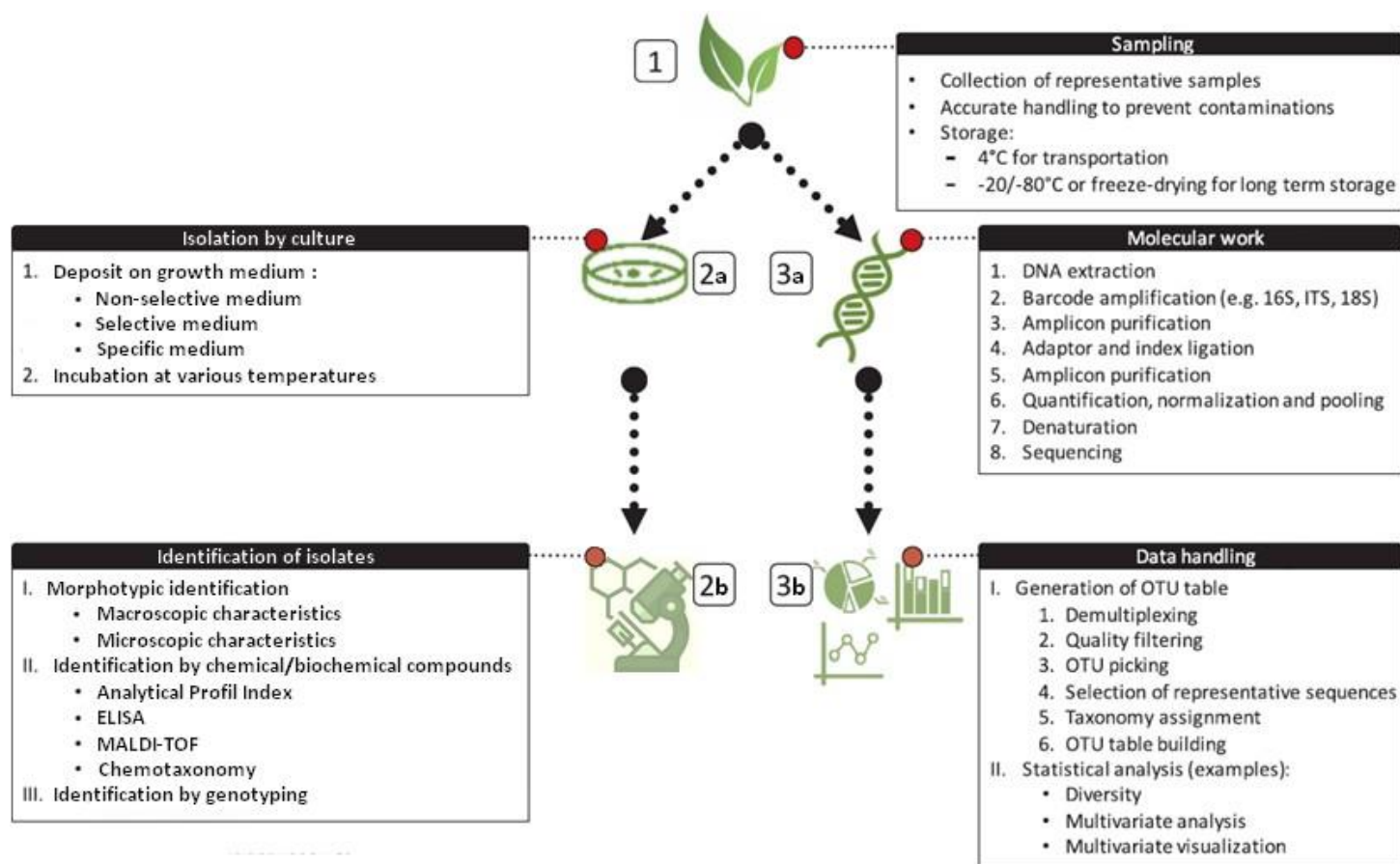


Figure 2.8 : Schéma des approches culturales et moléculaires pour l'identification des microorganismes environnementaux.

Les différentes étapes présentées sont regroupées en 3 catégories : (1) le prélèvement, (2) les approches culturales (2a : isolement par culture ; 2b : identification des isolats), (3) les approches de métabarcoding (3a : séquençage haut-débit ; 3b : bio-informatique et bio-statistiques). Adapté de (Abdelfattah et al., 2017).

2.2.3.1. Méthodes phénotypiques

Depuis le début des observations des microorganismes par microscopie au XVII^{ème} siècle, les approches d'identification des microorganismes par leurs morphotypes macroscopique et microscopique ont largement été utilisées. La principale méthode a consisté en l'isolement des microorganismes sur milieux nutritifs. L'identification morphologique des isolats est particulièrement importante dans le cas des champignons. Les caractéristiques phénotypiques des bactéries ne sont pas toujours suffisantes pour une identification précise, mais l'isolement reste nécessaire pour effectuer d'autres analyses. Le milieu de culture doit donc contenir les nutriments nécessaires pour le développement des microorganismes à isoler. Suivant les espèces de microorganismes, les nutriments essentiels à leur croissance peuvent être différents, permettant d'isoler spécifiquement certains microorganismes en ajustant la composition des milieux.

- Il existe des milieux non sélectifs, ne contenant pas de molécule inhibitrice. Ces milieux de culture peuvent être dits riches lorsqu'ils contiennent de nombreux nutriments, convenant à l'isolement des microorganismes à croissance rapide. D'autres milieux sont pauvres en nutriments, ralentissant alors la vitesse de croissance des microorganismes isolés, et permettant à ceux à faible vitesse de croissance de ne pas être occultés par ceux qui se développent rapidement.
- A l'inverse, les milieux dits sélectifs contiennent des substances chimiques capables d'inhiber le développement de certains microorganismes.
- Enfin, certains genres bactériens et fongiques possèdent des conditions de croissance très particulières (besoin de certains nutriments précis, pH du milieu, etc.) et sont donc cultivés sur des milieux dits spécifiques.

Une fois les isolats obtenus, d'autres milieux peuvent être utilisés pour permettre une meilleure identification en permettant une différenciation de certains genres voir espèces. Ainsi, il est alors possible de les trier selon différents critères, comme leurs caractéristiques morphologiques (couleur, forme de cellules, etc.), nutritives (croissance sur milieux sélectifs/spécifiques) ou métaboliques (détection d'activités enzymatiques spécifiques, dégradation de sucres, etc.). Dans le cas des bactéries, la coloration de Gram permet d'identifier le type de paroi des cellules présentes ainsi que de bien définir la forme des cellules. Chez les champignons, l'identification des conidiophores après coloration au bleu coton est principalement utilisée pour discriminer les différents genres et espèces. Grâce à

l'isolement de cellules sur milieu de culture, cette approche peut donc être à la fois quantitative et/ou qualitative.

Dans le cas des études de la flore microbienne sur les matériaux de construction et au sein des bâtiments, différents milieux de culture peuvent être utilisés (voir Tableau 2.1). L'un des principaux milieux utilisés pour l'isolement de champignons est le milieu MEA. Il permet le développement de la plupart des champignons mésophiles, et plus particulièrement des levures et moisissures. Cependant, certains champignons potentiellement toxiques comme *Chaetomium*, *Stachybotrys* ou *Trichoderma* ne sont que peu/pas isolés sur ce milieu (Andersen et al., 2011). Dans le milieu DG18, l'ajout de glycérol permet de diminuer l'activité de l'eau (a_w) du milieu c'est-à-dire l'eau disponible pour les réactions biochimiques, rendant ainsi le milieu de culture plus favorable à la croissance de champignons xérophiles comme *Wallemia* ou *Eurotium*. D'autres milieux non sélectifs (de Sabouraud, V8, PDA) permettent la croissance de nombreuses espèces de champignons, sans pour autant être toujours adaptés pour l'identification des isolats. Pour ce qui est des bactéries, le milieu de culture essentiellement utilisé est le milieu TSA, qui permet la croissance d'un large spectre de bactéries aérobies. Il existe également d'autres milieux non sélectifs pour l'isolement des bactéries de certains environnements, comme les milieux R2A (eau potable) ou PCA (produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques).

Tableau 2.1 : Liste des milieux de culture couramment utilisés pour l'isolement de microorganismes dans les intérieurs de bâtiments.

Champignons		
Type de milieu	Utilisation	Références
MEA	Milieu pour l'isolement des champignons mésophiles	(Andersson et al., 1997; Beguin and Noland, 1994; Chao et al., 2002; Gutarowska, 2010; Hyvärinen et al., 2001; Pastuszka et al., 2000; Pitkäranta et al., 2008; Reboux et al., 2009; Reenen-Hoekstra et al., 1991; Samson et al., 2010; Shelton et al., 2002; Toivola et al., 2002)
DG18	Milieu pour l'isolement des champignons xérophiles	(Andersson et al., 1997; Chao et al., 2002; Hyvärinen et al., 2001; Pitkäranta et al., 2008; Reboux et al., 2009; Reenen-Hoekstra et al., 1991; Takahashi, 1997; Toivola et al., 2002)
de Sabouraud	Milieu d'isolement non sélectif	(Cooley et al., 1998; Santucci et al., 2007)
V8	Milieu favorisant la sporulation. Ne permet pas la croissance de champignons xérophiles	(Andersen et al., 2011; Gravesen et al., 1999; Samson et al., 2010)
PDA	Milieu pour l'isolement de levures et moisissures. Favorise les champignons phytopathogènes et la sporulation	(Takahashi, 1997)
Bactéries		
TSA	Milieu non sélectif	(Andersson et al., 1997; Bouillard et al., 2005; Pastuszka et al., 2000)

Bien qu'ils soient largement utilisés pour l'isolement de microorganismes, les milieux de culture présentent toutefois de nombreuses limites. Tout d'abord, les résultats par culture ne sont qu'une indication de la flore à un instant précis. Il est donc nécessaire de faire plusieurs prélèvements à différents temps et d'enregistrer les différents paramètres pouvant impacter les communautés microbiennes (température, humidité, présence humaine, etc.). La qualité du prélèvement d'air ou de surface influence également de manière importante la représentativité des isolats obtenus (Reboux et al., 2009). De plus, les milieux de culture ne permettent pas la croissance de la totalité des germes viables présents et la flore observée sur un type de milieu de culture donné sera forcément biaisée par la composition de celui-ci (Takahashi, 1997). L'identification après culture ne permet d'obtenir en réalité qu'une faible fraction des espèces présentes dans l'environnement. Certains microorganismes possèdent des cycles de croissance lents, et nécessiteraient également une importante quantité de milieu (Pasanen, 2001; Wu et al., 2000). De plus, une partie des champignons isolés peut se développer sous forme de mycélium stérile sans production de spores, compliquant grandement leur identification. La

contrainte la plus importante de l'approche par culture est qu'elle ne permet de visualiser que les flores viables et cultivables, et ne détecte pas les microorganismes non cultivables ou partiellement altérés. Pourtant, la majorité des microorganismes sont viables / non cultivables (Amann et al., 1995; Fabian et al., 2005). Par exemple, la part de champignons cultivables dans l'air est estimée entre 1 à 40 % suivant les types d'organismes présents et les environnements étudiés (Niemeier et al., 2006; Peccia and Hernandez, 2006). Dans le cas des bactéries, la proportion de cellules viables/cultivables est encore plus faible. Par exemple, seulement 1 % des bactéries observables du sol sont ensuite isolées par culture (Amann et al., 1995; Skinner et al., 1952) et, malgré l'amélioration des milieux de culture spécifiques à certains environnements comme la terre, cette optimisation reste très fastidieuse et n'est pas suffisante pour atteindre la diversité microbienne réelle (Davis et al., 2005). En comparant les microorganismes présents dans l'air et observés par microscopie avec ceux retrouvés par culture, Radosevich *et al.* (2002) estiment que seulement 0,08 % des microorganismes observés sont ensuite isolés. L'étude par culture est de plus limitée pour certaines catégories taxonomiques, comme par exemple pour les Basidiomycètes (Bridge and Spooner, 2001). De la même manière, les bactéries à Gram négatif sont moins fréquemment viables / cultivables que les bactéries à Gram positif (sensibilité à la dessiccation, etc.), ce qui conduit à une surreprésentation de ces dernières, en particulier celles appartenant aux *Firmicutes* (Rintala et al., 2012). Enfin, bien que mortes, certaines cellules et spores d'espèces comme *Stachybotrys* contiennent toujours des molécules actives (allergènes, mycotoxines) et peuvent toujours être présentes dans l'air, sans pour autant être détectées (Jarvis and Miller, 2005).

Les approches culturelles permettent l'isolement d'une partie des microorganismes présents dans l'environnement étudié, et ainsi de les caractériser et les identifier en interrogeant des banques de données. Par exemple, il est possible de surveiller les flores de locaux, notamment en comparant différents temps de prélèvements (T0 et T1) avec une même méthode. De plus, l'isolement permet de pouvoir réutiliser les microorganismes obtenus pour des analyses autres qu'une identification (suivi épidémiologique). Cependant, l'utilisation de milieux de culture n'est pas suffisante pour des approches quantitatives et qualitatives précises, car elle conduit à une sous-estimation de la densité et de la diversité microbiennes (Hawksworth, 2001). L'étude de la flore intérieure de bâtiments par culture peut parfois être complétée par microscopie (Chew et al., 2006; Fabian et al., 2005), ce qui permet une meilleure estimation de la concentration microbienne dans l'air. Toutefois, la microscopie ne permet pas pour autant une identification complète des communautés, à cause de morphotypes

fortement similaires entre certaines espèces. D'autres méthodes ont donc été mises en place pour palier à certaines limites des méthodes par culture.

2.2.3.2. Méthodes d'identification par détection des composés chimiques/biochimiques

Un autre moyen d'évaluer la flore microbienne est la mesure de composés chimiques issus de la composition de la cellule (Baxi et al., 2016). Il est possible de mesurer des composés de la membrane fongique ((1→3)- β -D-glucane, ergostérol, polysaccharides extracellulaires lipopolysaccharides, phospholipides, etc.) (Andersson et al., 1997; Gutarowska, 2010; Pasanen et al., 1999; Szponar and Larsson, 2000), ou des composés cellulaires, comme l'adénosine triphosphate (ATP), issus du métabolisme (Haverinen-Shaughnessy et al., 2015). Par exemple, les différences entre les types de lipides composant la membrane des bactéries et cellules eucaryotes (acides gras phospholipidiques) et celle des archées (lipides-éthers phospholipidiques) permettent une discrimination de ces organismes (Gattinger et al., 2002). De même, l'ergostérol, qui est un composé de la membrane cellulaire des champignons, permet une estimation de la biomasse fongique dans des poussières intérieures, sans pour autant permettre des identifications plus fines sur les espèces ou genres présents (Zelles and Alef, 1995). Il est également possible d'utiliser les composés chimiques produits par les microorganismes pour évaluer leur présence, et notamment les métabolites secondaires (mycotoxines) (Andersen et al., 2002; Andersson et al., 1997; Tuomi et al., 2000), allergènes, COV, etc. Cette mesure permet donc une quantification indirecte *via* l'activité métabolique des microorganismes, et par extension une estimation de leur présence dans l'environnement étudié. Toutefois, les microorganismes ne produisent ces métabolites que lors des stades tardifs de leur développement, après la phase de croissance exponentielle. La détection de ces molécules permet ainsi d'avantage d'accéder à l'état métabolique des germes présents et donc à leur stade de développement, plutôt qu'à leur concentration. Enfin, l'étude des métabolites secondaires permet l'identification par profil chémotaxonomique pour certaines catégories de champignons (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ou encore *Stachybotrys*) (Frisvad et al., 2008).

D'autres méthodes se basant sur l'identification de microorganismes par les composés chimiques sont appliquées sur les isolats obtenus par culture. Ce type de méthode a été miniaturisé pour une utilisation plus aisée, comme par exemple les galeries API (Analytical Profil Index) (Bouillard et al., 2005; Gutarowska, 2010). En testant une série de réactions

biochimiques avec agent colorimétrique, il est ainsi possible de déterminer le genre voir l'espèce du germe selon son profil métabolique, bien que certaines espèces aux profils très proches ne puissent pas être discriminées. Des essais immunologiques peuvent également être menés pour la détection de microorganismes spécifiques ou de composés chimiques dangereux. Le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permet, par réaction antigène / anticorps puis mesure de la formation de ce complexe, de déterminer la présence d'un antigène spécifique, qu'il soit associé à une espèce particulière ou à une catégorie de molécules comme des mycotoxines (Murtoniemi et al., 2003). D'une manière similaire, le test LAL (Lysat d'Améboocytes de Limules) permet la détection d'endotoxines bactériennes (LPS) dans l'échantillon étudié, et peut être notamment utilisé sur les matériaux de construction ayant subi des dégâts des eaux (Andersson et al., 1997; Jacobs et al., 2014).

Néanmoins, il n'existe pas de corrélation absolue entre le type et la concentration de métabolites mesurés et des espèces fongiques (Tuomi et al., 2000). Plusieurs métabolites peuvent être produits par une même espèce (Andersen et al., 2002), ou plusieurs espèces différentes peuvent produire le même métabolite, compliquant alors l'identification par cette approche. Ce manque de sensibilité et de spécificité ne rend pas les méthodes chimiques et immunologiques toujours adaptées à l'identification de la flore microbienne au sein des bâtiments (Pasanen, 2001).

Une autre méthode d'identification des microorganismes consiste en l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight). La spectrométrie de masse est une technique permettant de détecter les molécules composant une matrice suivant leur ratio masse/charge (m/z). La matrice d'intérêt solide est bombardée par laser et les molécules ainsi ionisées passent en phase gazeuse. Celles-ci sont séparées par migration dans un champ électrique suivant leur masse moléculaire (m) et leur charge (z) et l'intensité relative du signal pour chaque molécule est mesurée, permettant de générer un spectre du ratio masse/charge des molécules. Cette technique permet l'analyse de molécules à haut poids moléculaire, pouvant excéder les 10.000 Da (Karas and Hillenkamp, 1988), et est particulièrement rapide, avec un résultat sous quelques minutes. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est utilisée dans de nombreux domaines, et notamment pour l'identification des microorganismes (Du et al., 2002; Lay, 2001; Mellmann et al., 2008, 2009). Chaque genre, espèce voir sous-espèce possède des compositions en protéines

suffisamment différentes pour être discriminées par cette méthode. Par exemple, le groupe *Bacillus cereus* contient notamment les espèces *B. anthracis*, *B. cereus*, et *Bacillus thuringiensis* qui sont extrêmement proches phylogénétiquement et donc difficilement discriminables par biologie moléculaire. Cependant, elles possèdent différents niveaux de pathogénicité (Rasko et al., 2005). L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet alors l'identification des différentes espèces de *Bacillus* (Hotta et al., 2011; Starostin et al., 2015). Il est donc possible de générer des profils protéiques spécifiques sous forme de spectre pour chaque taxon, et des banques de données de spectres ont été construites pour de nombreux microorganismes, principalement des bactéries mais également des levures et champignons. Actuellement cette méthode de détection est particulièrement utilisée dans l'identification des isolats cliniques au sein des milieux hospitaliers en raison de sa précision et de sa rapidité (Carbonnelle et al., 2011; Seng et al., 2013). Les banques de données concernant les flores environnementales sont en cours d'implémentation.

2.2.3.3. Méthodes de biologie moléculaire

Afin d'étudier la diversité des communautés environnementales microbiennes, l'utilisation de l'ADN et des méthodes de biologie moléculaire s'est imposée comme une approche extrêmement intéressante. L'un des avantages de la biologie moléculaire en comparaison des autres techniques présentées précédemment est sa capacité à accéder à une diversité microbienne environnementale et humaine/animale plus exhaustive et plus représentative (Buttner et al., 2007; Gurtner et al., 2000; Yamamoto et al., 2011). En effet, en se basant sur l'ADN présent dans l'échantillon, il est possible d'identifier et d'étudier la vaste portion de microorganismes non cultivables, qui n'auraient pas pu être isolés par culture (Amann et al., 1995; Rinke et al., 2013). Les profils environnementaux ainsi obtenus par les méthodes de culture et par les méthodes génétiques sont significativement différents en termes de groupes, genres et espèces détectés, que cela soit d'un point de vue qualitatif ou quantitatif, comme par exemple dans le cas des flores associées à l'asthme (Dannemiller et al., 2014a, 2016a; Reponen et al., 2012). De plus, bien qu'étant relativement plus onéreuses que les approches par culture, les méthodes moléculaires sont moins chronophages. Cependant, différentes limites sont inhérentes à l'utilisation des méthodes basées sur l'ADN. Les extractions d'ADN ne sont pas homogènes pour tous les types de microorganismes, et cette variabilité d'efficacité peut conduire à des biais importants dans la détection et l'évaluation des proportions des microorganismes présents dans un échantillon. De même, cette méthode conduit également à la détection de tous les ADN, y compris ceux des microorganismes non-

viables, et prend donc en compte les microorganismes morts (avec ADN non dégradé) dans les analyses de présence/abondance. Pour ce qui est de l'étude des flores intérieures des habitats, cela peut présenter un intérêt car la dangerosité potentielle des flores microbiennes n'est pas forcément dépendante de la cultivabilité et viabilité des organismes (Brasel et al., 2005).

De nombreuses techniques se basant sur l'ADN ont été mises au point afin de définir la diversité des communautés microbiennes. La première étape commune à toutes ces méthodes est l'extraction de l'ADN des microorganismes présents dans la matrice étudiée. Ensuite, à partir des brins d'ADN obtenus depuis la matrice d'intérêt, différentes techniques peuvent être utilisées pour caractériser les communautés environnementales. Les méthodes d'analyse par empreinte génétique ont particulièrement été utilisées pour les études environnementales. Le polymorphisme de certaines régions génomiques permet de générer des séquences de taille ou de compositions différentes suivant les organismes, et des profils reflétant ces variations peuvent être ainsi obtenus, témoignant de la diversité des individus présents dans l'échantillon. Toutefois, ces techniques ne permettent pas d'avoir une identification taxonomique des organismes prélevés, et le nombre d'individus identifiables sur un seul profil reste restreint. Des techniques d'identification par hybridation génétique comme les puces à ADN peuvent être mises en place, permettant de cibler un plus grand nombre de séquences. Cependant, elles rencontrent certaines limites car elles ne peuvent détecter que les organismes référencés dans les bases de données. Enfin, les méthodes de séquençage haut-débit de l'ADN ont beaucoup évolué ces dernières décennies, permettant une profondeur de séquençage, c'est-à-dire un nombre de séquences lues par séquençage, bien plus importante que les méthodes précédentes. En ciblant une région conservée au sein d'une catégorie d'êtres vivants (bactéries, champignons, animaux, etc.), il est possible d'obtenir la composition taxonomique de la flore présente dans la matrice d'intérêt. Bien que présentant toujours certains biais, ces méthodes sont actuellement les principales techniques utilisées pour l'analyse des communautés microbiennes. Dans le cadre de l'étude des flores microbiennes associées aux matériaux en terre crue, ce sont donc ces techniques de séquençage haut-débit qui ont été utilisées, associées aux méthodes culturelles classiques.

2.2.3.3.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une étape essentielle pour toute technique de biologie moléculaire. Il est possible de distinguer deux types d'extraction : i) la méthode directe,

consistant à effectuer l'extraction directement sur l'échantillon prélevé, et qui est la plus utilisée ; ii) la méthode indirecte, consistant à séparer les cellules de la matrice puis à effectuer l'extraction, mais impliquant des quantités de matrices plus importantes, des appareils plus spécifiques et une durée d'expérience plus grande (Delmont et al., 2011a). Une fois la matrice d'intérêt prélevée, comme un échantillon de poussières ou de sol, les microorganismes présents sont lysés, relarguant alors dans le milieu extérieur les brins d'ADN contenus dans les cellules, mais également toute sorte de composés cellulaires (protéines, lipides, sucres, etc.). Des étapes de purification sont mises en place pour éliminer les contaminants non-ADN et ne récupérer que les acides nucléiques. La non-dégradation de l'ADN au cours des différentes étapes est également un élément clé. L'optimisation de chaque étape du protocole d'extraction d'ADN est importante pour obtenir une description des communautés les plus exhaustives et représentatives possibles.

Lyse cellulaire

L'étape de lyse des cellules dépend de nombreux paramètres comme le type de microorganisme recherché (champignons, bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, etc.), de l'état cellulaire attendu (spores, cellules végétatives, biofilms) ou des propriétés de la matrice elle-même. La lyse des cellules peut se faire par voie chimique (détergents, enzymes) et/ou physique (température, billes). Par exemple la lyse physique par billes, bien que diminuant la taille des fragments d'ADN extraits, permet une meilleure lyse des cellules, et se révèle nécessaire dans le cas de matrices de sols avec présence d'acides humiques et argileux (Cullen and Hirsch, 1998; Saleh-Lakha et al., 2005). D'autres méthodes de lyses physiques comme la sonication ou les chocs thermiques alternant congélation puis décongélation sont utilisés pour les échantillons de sols (Robe et al., 2003). Certains champignons possédant des parois cellulaires plus complexes à lyser que celles des bactéries, cette étape est cruciale pour pouvoir observer l'ensemble de la diversité fongique (Delmont et al., 2011a; Feinstein et al., 2009; Fredricks et al., 2005). En comparant différentes méthodes d'extraction d'ADN à partir du sol, Terrat *et al.* (2015a) et Plassart *et al.* (2012a) ont mis en avant l'importance de l'utilisation de billes et broyeur pour les cellules fongiques. Pour ce qui est des bactéries, certains genres/espèces (*Lactobacillus* sp., *Cutibacterium acnes*) ou formes cellulaires (spores) peuvent également se révéler très résistants à la lyse.

Purification de l'ADN

Dans le cas de l'étude des matériaux de construction, et plus particulièrement de ceux à base de terre crue, les matrices récupérées sont généralement soumises aux mêmes contraintes d'extraction d'ADN que le sol, car de nombreux inhibiteurs et molécules indésirables sont présents dans les deux cas (métaux lourds, acides humiques, etc.) (Ettenauer et al., 2012). Des acides humiques, des substances organiques ou encore des particules d'argiles présentes dans la terre peuvent se lier à l'ADN et l'ARN et risquent d'être co-extraits avec les acides nucléiques, conduisant alors à limiter sa purification (Moran et al., 1993). Post-extraction, les acides humiques sont capables d'inhiber les réactions enzymatiques et compliquent donc fortement l'utilisation de l'ADN (Tebbe and Vahjen, 1993). Les terres avec de fortes concentrations en acides humiques et/ou en argile présentent donc de plus grandes difficultés pour l'extraction des acides nucléiques que les sols sableux par exemple (Hirsch et al., 2010). L'étape de purification des contaminants organiques co-extraits avec les acides nucléiques est cruciale pour ce type de matrice afin d'obtenir un ADN de qualité (Cullen and Hirsch, 1998; Robe et al., 2003; Thakuria et al., 2008). De nombreuses méthodes d'extraction et de purification ont été mises en place pour répondre à ces contraintes, en particulier en fonction du type de sol ou de sédiments (Ogram et al., 1987; Picard et al., 1992; Zhou et al., 1996).

Une fois l'ADN génomique extrait, il peut être utilisé pour différentes techniques, en particulier la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) qui permet de dupliquer en un grand nombre de copies (amplicons) une région ciblée de l'ADN. Les variations d'efficacité de lyse des cellules, de la quantité d'ADN obtenu ou encore de la pureté de celui-ci affectent toutefois de manière importante les techniques post-extraction (Bertrand et al., 2005; Ettenauer et al., 2012; Picard et al., 1992; Young et al., 1993). Aucune méthode d'extraction n'est exempte de biais, et chacune présente des avantages pour certains organismes et des limites pour d'autres (Kang and Mills, 2006; Martin-Laurent et al., 2001; Ranjard et al., 2003; Terrat et al., 2012; Zhou et al., 1996). Cette étape essentielle à l'analyse par biologie moléculaire influence donc l'observation de la diversité, de l'abondance et de la composition des communautés microbiennes présentes dans la matrice étudiée. Sachant qu'il n'existe pas de consensus sur la meilleure méthode pour extraire l'ADN de sol et de terre, celle-ci doit être adaptée en fonction du type de flore recherchée et des caractéristiques de la matrice étudiée, voir combiner plusieurs techniques pour accéder à une proportion plus exhaustive du génome

microbien et obtenir une représentativité en termes de populations (Delmont et al., 2011b). A l'inverse, la comparaison entre échantillons nécessite de conserver la même technique d'extraction pour tous les échantillons traités dans une étude (Kuczynski et al., 2012).

2.2.3.3.2. Méthodes d'analyse par empreinte génétique

Il est possible de caractériser une communauté microbienne en se basant sur une empreinte génétique. Ce type de méthode permet l'observation de la structure, la diversité ainsi que la dynamique de population au sein d'un écosystème microbien. Le principe consiste à suivre des variations génétiques d'un gène témoin dans une communauté, en observant l'ensemble des variants présents (séquences d'ADN provenant d'une même région mais ayant subi des mutations différentes selon les organismes au cours de l'évolution). Pour cela, le gène d'intérêt est amplifié par PCR, puis les différents amplicons sont discriminés suivant différentes techniques. Les marqueurs phylogénétiques peuvent être soit des gènes universels comme les gènes ribosomiques (16S pour les bactéries et 18S pour les eucaryotes), soit des gènes plus spécifiques, impliqués par exemple dans certains processus métaboliques. Les résultats des méthodes d'analyse par empreinte génétique se présentent généralement sous la forme de profils de bandes sur un gel de migration. La variabilité des séquences permet une séparation des amplicons lors de la migration, et ensuite une comparaison sur l'absence / présence de bandes entre les différents échantillons, chaque bande correspondant à une séquence particulière. Le développement de ces méthodes, rapides et peu coûteuses, a ainsi permis d'avoir des informations sur la diversité, la richesse et la composition des communautés microbiennes. Différentes méthodes d'empreinte génétique peuvent être distinguées (Nocker et al., 2007) :

Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

La DGGE est une technique de caractérisation moléculaire des communautés utilisée depuis les années 90. Cette méthode permet de faire migrer les amplicons PCR par électrophorèse en présence d'un agent chimique dénaturant plus facilement les liaisons AT que CG, discriminant ainsi les séquences sur le critère de leur composition (Muyzer and Smalla, 1998; Muyzer et al., 1993). Dans le cas de la TGGE (Electrophorèse sur gel à gradient de température), l'agent dénaturant chimique est remplacé par un gradient de température.

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

La RFLP permet une identification des individus d'une population en se basant sur le polymorphisme des différentes séquences d'ADN étudiées au niveau de leurs sites de restriction. Après l'amplification PCR d'un marqueur génétique, les amplicons sont digérés par une enzyme de restriction et migrent sur un gel par électrophorèse. Les séquences d'une région donnée pouvant avoir des sites de restriction ou des tailles de séquence entre chaque site de restriction différents d'un genre ou d'une espèce à l'autre ; ces variations observées sur le profil seront un indicateur de la diversité microbienne.

Une amélioration de cette technique, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP), consiste à ajouter un fluorochrome fixé sur une ou deux amorces lors de la PCR, permettant alors une révélation par fluorescence des parties terminales des fragments (Liu et al., 1997). Il est ainsi possible de dépasser certaines limites de la RFLP, comme la faible sensibilité et résolution génotypique, tout en étant moins fastidieuse à mettre en place. En comparant une communauté microbienne du sol par DGGE et par T-RFLP, Tiedje *et al.* (1999) ont montré une sensibilité 5 fois supérieure pour cette dernière.

Polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP)

Cette méthode est principalement utilisée pour la recherche et la détection de mutations et d'allèles dans des séquences d'ADN, mais a également été adaptée pour l'étude des communautés microbiennes (Lee et al., 1996; Schwieger and Tebbe, 1998). Les amplicons sont dénaturés en simples brins et déposés sur gel non-dénaturant. Les simples brins d'ADN adoptent une structure 3D particulière (structure secondaire), dépendante de la séquence, et celle-ci influence leur mobilité lors de la migration dans le gel. Il est alors possible de différencier des fragments de même poids moléculaire sur la base de ces différences de structures secondaires et donc de séquence. La différenciation des fragments peut également être réalisée par électrophorèse capillaire.

Analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (ARISA)

La méthode de génotypage ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) se base sur l'analyse des régions intergéniques ribosomales pour évaluer les communautés bactériennes et fongiques. Ces régions sont généralement plus variables que les régions

ribosomales codantes, et permettent ainsi une meilleure identification des sous-types de certaines souches bactériennes ou la différenciation d'espèces très proches phylogénétiquement. Ces régions sont amplifiées par PCR et les amplicons sont séparés selon leur taille. L'utilisation d'amorces fluorescentes permet de mesurer une intensité relative à la quantité de séquences pour chaque groupe de taille de séquences proches et par extension chaque ensemble taxonomique proche (espèce, genre) (Danovaro et al., 2006; Fisher and Triplett, 1999). Cet outil s'est révélé performant pour l'analyse de communautés nécessitant une résolution fine et précise (Jensen et al., 1993).

L'ensemble de ces approches présente plusieurs limitations. Tout d'abord, puisque ce sont des profils de bandes et non des régions d'ADN séquencées, elles ne permettent pas une réelle identification taxonomique des individus présents dans la communauté. Il faut nécessairement effectuer dans un second temps le séquençage de chaque bande si l'identification des genres et espèces est recherchée. Ces méthodes ne permettent d'observer que les taxons les plus abondants dans la communauté, les plus rares n'étant pas suffisamment amplifiés pour être détectés, et cela conduit donc à une faible résolution phylogénétique (Dunbar et al., 2001; Muyzer and Smalla, 1998). De plus, certaines espèces peuvent être difficiles à discriminer suivant les méthodes, comme le genre *Staphylococcus* dans le cas du SSCP, et la présence de plusieurs copies différentes d'une région cible au sein d'un même génome peut biaiser la représentativité quantitative du profil obtenu. Comme toutes les méthodes basées sur l'amplification PCR, des erreurs dans les séquences et donc dans les profils peuvent apparaître. Enfin, il est assez compliqué en utilisant des profils de bandes sur gels de comparer les résultats de différentes études. Ces méthodes ne permettent donc pas d'obtenir des informations précises sur les échantillons environnementaux étudiés, mais un profil général des principaux organismes présents et de leur diversité.

2.2.3.3.3. Méthodes d'analyse par hybridation génétique

Puce à ADN

La principale technique utilisant l'hybridation génétique pour la caractérisation de flore microbienne est la puce à ADN. Celle-ci consiste en une puce avec fixée, au fond de chaque puits, une séquence nucléique déterminée. L'extrait d'ADN d'intérêt est ensuite déposé dans chaque puits de la puce et, s'il contient la même séquence que celle fixée dans le puits, les

deux séquences peuvent s'hybrider et alors être amplifiées par PCR. Des puces à ADN ont notamment été utilisées pour caractériser les microflore présentes dans le sol, en utilisant les bases de données des séquences de la région ribosomale 16S (Sessitsch et al., 2006) ou une région ITS (Mitchell and Zuccaro, 2006). De plus, l'utilisation de puces à ADN permet d'accéder à une diversité plus importante que les méthodes conventionnelles de clonage et de séquençage (DeSantis et al., 2007). Il est également possible de comparer les résultats obtenus entre différentes études si un même design de plaque a été utilisé.

Néanmoins, les puces à ADN ne permettent pas l'identification de nouveaux taxons, car le système de détection est entièrement basé sur l'utilisation de séquences déjà identifiées dans les bases de données (DeSantis et al., 2007; Ehrenreich, 2006). De même, l'analyse est dépendante du choix des taxons ciblés, présents sur la puce. Cette limite est particulièrement gênante lors de l'étude d'environnement comportant des flores peu référencées.

Amplification PCR quantitative (qPCR)

En utilisant des amorces ciblant spécifiquement certaines espèces, genres ou taxons plus larges, la qPCR permet d'obtenir des données quantitatives sur les cellules présentes dans l'échantillon en termes d'unités génome (UG). Elle peut donc être utilisée pour cibler certaines espèces précises, pour détecter par exemple la présence dans l'air de certaines espèces potentiellement pathogènes (Cruz-Perez et al., 2001; Jacobs et al., 2014; Simoni et al., 2011; Vesper, 2011; Vesper et al., 2004). Ainsi, dans l'étude de Bellanger *et al.* (2009), les auteurs identifient la présence du champignon *Stachybotrys chartarum* sur 21 échantillons en utilisant la qPCR, au lieu d'un seul échantillon en utilisant des milieux de culture. De manière similaire, Vesper *et al.* (2007) ont ainsi évalué par qPCR la quantité d'UG de 36 espèces fongiques au sein de 1096 habitations aux Etats-Unis. En plus de pouvoir cibler des espèces précises, il est également possible d'utiliser les approches de qPCR en ciblant des taxons plus larges (Phylum, Classe) pour suivre des profils microbiens (Fierer et al., 2005).

L'utilisation de qPCR ne permet cependant pas d'identifier toutes les espèces présentes dans les communautés étudiées. L'utilisation de marqueurs phylogénétiques pour des grands groupes taxonomiques ne rend pas possible une identification plus précise des espèces présentes. Les approches de séquençage génétique permettent d'accéder à ces informations.

2.2.3.3.4. Méthodes d'analyse par séquençage génétique

Avec le développement de la PCR (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) et d'amorces universelles, l'identification taxonomique des microorganismes est passée de profils morphologiques à des profils génétiques. Les différentes techniques de séquençage permettent d'obtenir la séquence nucléotidique du ou des brins d'ADN contenus dans un échantillon. En obtenant ainsi la composition en acides nucléiques de séquences d'ADN, il est devenu alors possible d'établir une taxonomie plus représentative de la diversité du vivant. A partir des isolats obtenus en culture, le séquençage de certains gènes et régions du génome a également permis une identification bien plus précise que les précédentes méthodes utilisées (Reller et al., 2007) et secondairement d'affiner la différenciation des genres, espèces, voire sous-espèces par design d'amorces plus spécifiques.

Dans le cadre de la caractérisation de communautés environnementales, sans passer par une pré-étape d'isolement sur milieu nutritif, deux approches du séquençage peuvent être distinguées :

- Le métabarcoding : correspond au séquençage d'un marqueur phylogénétique. Cette méthode permet de connaître les taxons (genres et espèces) présents dans la matrice à partir de l'identification taxonomique des différents variants obtenus (Cristescu, 2014; Hebert et al., 2003a; Hugerth and Andersson, 2017; Taberlet et al., 2012).
- La métagénomique : correspond au séquençage en shotgun (amplification de petits fragments) de l'ensemble de l'ADN génomique extrait de l'échantillon. Les séquences ainsi obtenues peuvent être réassemblées en comparant leurs régions chevauchantes, puis alignées sur les bases de données afin de connaître les gènes présents dans la communauté, et ainsi déterminer les fonctions métaboliques de celle-ci (Gill et al., 2006; Moran et al., 2009; Riesenfeld et al., 2004).

Dans le cas des études des communautés microbiennes, le métabarcoding est préféré à la métagénomique, qui nécessite le séquençage préalable de nombreux gènes pour l'ensemble des espèces étudiées. Les techniques de métabarcoding ont pu être utilisées pour étudier des environnements microbiens jusqu'alors inexplorés, et révéler ainsi leur très grande diversité (Moreira and López-García, 2002; Pace, 1997). L'utilisation de marqueurs génétiques est actuellement largement répandue pour l'identification d'organismes, et ce dans de nombreux champs disciplinaires comme la gestion de l'environnement, la conservation de la biodiversité ou encore la sécurité alimentaire (Taylor and Harris, 2012; Valentini et al., 2009). Une fois le

prélèvement de la matrice d'intérêt et l'extraction d'ADN effectués, la technique de barcoding regroupe une succession d'opérations, et peut être caractérisée par 3 étapes principales : i) l'amplification du marqueur génétique, ii) le séquençage, et iii) l'analyse des données.

Comme développé précédemment, le prélèvement des échantillons représente une étape capitale afin de récupérer une communauté représentative de l'environnement écologique étudié. L'extraction d'ADN et l'amplification PCR des séquences nucléiques extraites sont également des étapes sensibles dans le processus de metabarcoding, car elles peuvent influencer de manière significative la diversité et la qualité des séquences récupérées (Thomas et al., 2012). Il est important d'essayer d'éviter les contaminations par de l'ADN externe, ce qui peut arriver lors de la manipulation, dans les tampons d'extraction de l'ADN ou encore dans les constituants utilisés lors de l'amplification PCR. La technologie de séquençage utilisée pour l'étude a également un impact sur les résultats obtenus, tout comme les outils bio-informatiques mis en place pour le traitement de l'ensemble des données.

2.2.3.3.4.1. Techniques de séquençage

Depuis plusieurs dizaines d'années, différentes techniques de séquençage de l'ADN ont été développées afin de permettre la lecture d'un plus grand nombre de séquences nucléotidiques. Le séquençage Sanger fut la première technologie de séquençage utilisée, permettant la lecture de séquences amplifiées, mais uniquement pour des échantillons ne contenant qu'une seule séquence. Par la suite, les séquençages de nouvelle génération (NGS) apparus à la moitié des années 2000 ont permis d'améliorer la profondeur de séquençage et d'utiliser des échantillons contenant plusieurs séquences différentes. De plus, la possibilité de multiplexer plusieurs échantillons au cours d'un seul séquençage est également un point intéressant de ces techniques, permettant de traiter en simultané plusieurs échantillons environnementaux. Enfin, le développement des méthodes de séquençage se poursuit à l'heure actuelle, avec des séquenceurs de troisième génération, permettant une lecture des brins d'ADN directe et sans étape préalable (PCR, etc.).

Séquençage Sanger

Le développement du séquençage Sanger a permis de caractériser et d'identifier d'une nouvelle manière les organismes (Sanger et al., 1977). Afin d'identifier des espèces ou des genres microbiens, les amplicons obtenus directement par PCR à partir d'isolats ou

d'échantillons environnementaux doivent être clonés afin d'isoler les séquences et de les purifier. Les bibliothèques de clones peuvent ensuite être séquencées par Sanger en effectuant une PCR avec des désoxyribonucléotides (dNTP) et une faible quantité de didésoxyribonucléotides marqués par un fluorochrome différent pour chaque base (ddNTP). Lorsqu'ils sont ajoutés par la polymérase, les ddNTP stoppent la synthèse du brin d'ADN, permettant d'avoir un ensemble de séquences marquées par un fluorochrome spécifique de la base terminant la séquence. En faisant migrer les amplicons par électrophorèse et en observant l'ordre des fluorochromes suivant les tailles des différents fragments, il est possible de déduire la séquence d'ADN initiale. L'automatisation du séquençage en 96 capillaires permet de séquencer plus de 1000 séquences de 1000pb par jour, permettant de traiter d'importantes bibliothèques de clones. Le séquençage Sanger automatisé est considéré comme la technique de séquençage de « première génération ».

En alignant la séquence d'intérêt obtenue sur celles disponibles dans les bases de données, il est alors possible de déterminer l'assignation taxonomique de cette séquence. Le séquençage pour l'identification phylogénétique des petites sous-unités ribosomiques (ARNr) 16S pour les bactéries et 18S pour les eucaryotes a permis d'obtenir un nouveau regard sur les communautés environnementales, et a alors révélé une très grande diversité de microorganismes non cultivables (Eckburg et al., 2005; Giovannoni et al., 1990). Ces méthodes ont permis la détection et la caractérisation de nouveaux taxons et phylotypes microbiens (O'Brien et al., 2005; Schadt et al., 2003; Vandenkoornhuyse et al., 2002).

Le séquençage d'amplicons par Sanger a largement été utilisé pour la caractérisation de la flore intérieure (Pashley *et al.*, 2012; Pitkäranta *et al.*, 2008, 2011) ou la diversité fongique du sol (O'Brien et al., 2005). Par exemple, en comparant les résultats obtenus par culture et par bibliothèques de clones de l'ITS, Pitkäranta *et al.* (2011) observent que la diversité de la flore intérieure mesurée dans leur étude était 5 à 10 fois plus importante par méthode moléculaire que par culture. Lors du séquençage des clones dans les études environnementales, seuls les amplicons les plus abondants et représentatifs sont toutefois séquencés. Pour observer toute la complexité d'un écosystème, il serait nécessaire de séquencer plusieurs centaines ou milliers de clones. Cette technique reste coûteuse et assez chronophage, limitant la profondeur d'analyse.

Séquençages nouvelle génération (NGS)

Chacune des méthodes présentées précédemment reste limitée pour avoir un aperçu global de la diversité bactérienne et fongique, ne permettant souvent pas d'accéder à l'ensemble de l'écosystème étudié. Apparues vers la fin des années 2000, les technologies de séquençages nouvelle génération (NGS) ont révolutionné les approches d'étude des séquences d'ADN, que cela soit pour le séquençage de nouveaux génomes ou l'étude de communautés environnementales (Glenn, 2011; Shendure and Ji, 2008). Avec les méthodes de métabarcoding et les NGS haut-débit, il est possible de multiplexer de nombreux échantillons simultanément et d'avoir une profondeur de séquençage très importante, de l'ordre de plusieurs millions de séquences par séquençage, dépassant d'au minimum 5 fois la profondeur du Sanger automatisé par électrophorèse capillaire (Metzker, 2010). Alors que l'identification d'espèces était auparavant réalisée sur des organismes isolés, l'utilisation de méthodes de séquençage haut-débit permet désormais l'identification d'une plus grande proportion des individus appartenant à un écosystème spécifique directement depuis l'amplification PCR de l'ADN environnemental (ADNe), sans passer par des étapes de clonage (Bohmann et al., 2014). L'ajout des NGS aux méthodes de métabarcoding a donc permis une augmentation de la rapidité, de la précision ainsi que de la résolution dans l'identification des genres/espèces (Gibson et al., 2014; Ji et al., 2013; Taylor and Harris, 2012). De plus, avec la forte diminution du coût du séquençage, l'utilisation de réplicats est devenu possible, augmentant ainsi la robustesse des analyses (Thomas et al., 2012).

Depuis le développement des méthodes de séquençage haut débit, le nombre d'études faisant appel au métabarcoding et aux techniques qui lui sont associées est en augmentation. Les plateformes NGS ont pu être utilisées pour mieux caractériser les communautés environnementales complexes et observer les éventuels changements et dynamiques au sein des structures de ces communautés, et ce dans une grande variété d'environnements (Fierer et al., 2007; Ji et al., 2013; Taberlet et al., 2012; Valentini et al., 2016). Ces modifications, pouvant être considérées mineures mais très informatives sur l'état d'un écosystème, ne sont pas discernables avec des méthodes traditionnelles moins sensibles, comme le séquençage Sanger, d'où le fort impact que les séquenceurs NGS ont eu sur les études écologiques (Huse et al., 2010; Roesch et al., 2007; Sogin et al., 2006). Le métabarcoding ne permet pas une quantification absolue du nombre de cellules présentes dans l'échantillon, mais permet d'obtenir des résultats semi-quantitatifs, avec une bonne représentativité des proportions

relatives des différents taxons détectés au sein d'un même échantillon (Amend et al., 2010b). Les cellules majoritaires vont toutefois conduire à une forte représentation sur l'ensemble des séquences obtenues, ce qui occulter les microorganismes plus rares en fonction de la profondeur de séquençage. En complément, si la quantité d'un taxon est recherchée, le séquençage haut-débit peut alors être couplé avec des qPCR pour une quantification précise de ce taxon (Dannemiller et al., 2014b; Yamamoto et al., 2014).

Différentes études ont décrit les paramètres spécifiques associés à divers protocoles de métabarcoding utilisant les NGS (Abdelfattah et al., 2017; Bálint et al., 2014; Cristescu, 2014; D'Amore et al., 2016; Ficetola et al., 2016). Le choix de la technologie de séquençage haut-débit pour les études écologiques et environnementales reste largement discuté et étudié, et la sélection d'une plateforme de séquençage s'effectue sur plusieurs critères. La qualité des séquences générées est le critère primordial à prendre en considération, car influant très fortement les analyses (Schloss et al., 2011). Un autre facteur essentiel dans les études de métabarcoding est la taille des séquences générées, afin que celle-ci soit adaptée à l'assignation taxonomique à l'aide de marqueurs génétiques (Wang et al., 2007). Enfin, un autre aspect à prendre en compte est le ratio nombre de séquences/coût financier : plus une méthode pourra proposer un séquençage à faible coût, plus il sera possible de multiplexer plusieurs échantillons au sein d'un seul séquençage. En ce qui concerne les études environnementales, trois principales techniques ont été/sont utilisées (Metzker, 2010; Shokralla et al., 2012) :

- **Pyroséquençage 454**

Cette technologie de séquençage a été lancée en 2005 par Roche, et s'est placée comme la première technique de séquençage nouvelle génération. Elle a été utilisée durant près d'une décennie et a permis une avancée considérable dans la biologie moléculaire, et notamment dans les analyses de populations, en permettant le séquençage à faible coût d'un nombre beaucoup plus important de séquences que ne le permettait le séquençage Sanger.

Le fonctionnement de cette méthode de séquençage est le suivant. Les banques de brins d'ADNe sont préparées avec l'ajout d'adaptateurs aux extrémités des brins d'ADN. Les fragments sont ensuite fixés par leur adaptateur sur des billes, avec un fragment par bille, puis une PCR en émulsion est réalisée. Ce type de PCR consiste en la formation d'une bulle de nature lipidique qui devient un mini-réacteur à PCR, et chaque bille se recouvre de millions de copies de la séquence qui y était fixée (voir Figure 2.9.a). Une fois l'amplification

effectuée, les billes sont déposées dans une plaque PTP (PicoTiter Plate) comportant des millions de puits permettant le dépôt d'une seule bille par puits (voir Figure 2.9.b). Le pyroséquençage a alors lieu dans chaque puits, permettant ainsi de distinguer les différentes séquences de la banque. Durant le séquençage, lorsqu'un nucléotide est ajouté par la polymérase, un pyrophosphate lié au nucléotide est libéré. Une série de réactions enzymatiques permet de transformer la libération de ce pyrophosphate en lumière, et il est ainsi possible de détecter l'ajout de nucléotide à la séquence. La quantité de lumière est directement proportionnelle au nombre de nucléotides additionnés. Les nucléotides sont ajoutés successivement, permettant de déterminer le signal lumineux dans chaque puits pour chacune des bases ajoutées. Les profils lumineux mesurés, les pyrogrammes, sont ensuite transformés en séquence d'ADN (voir Figure 2.9.c).

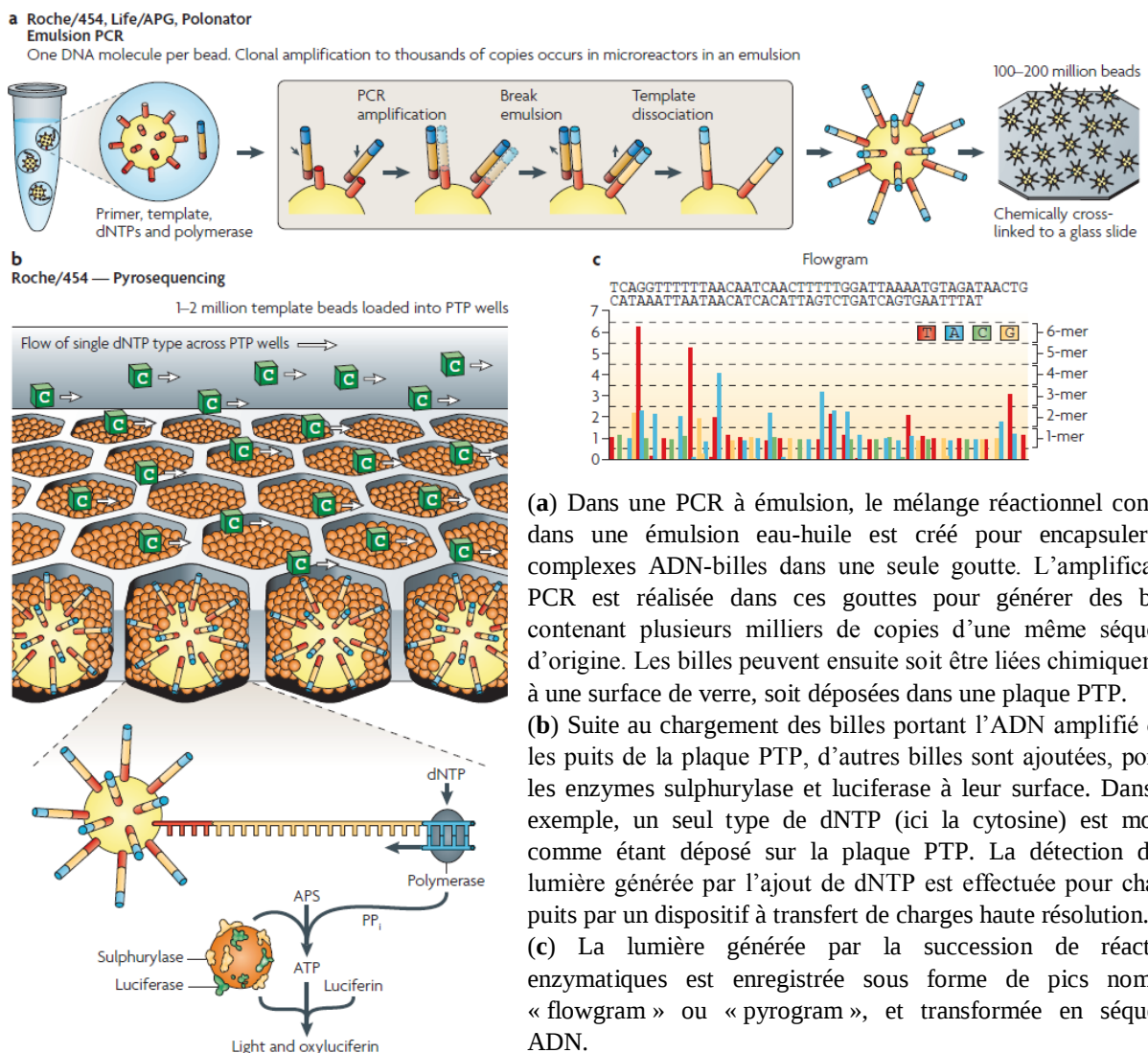


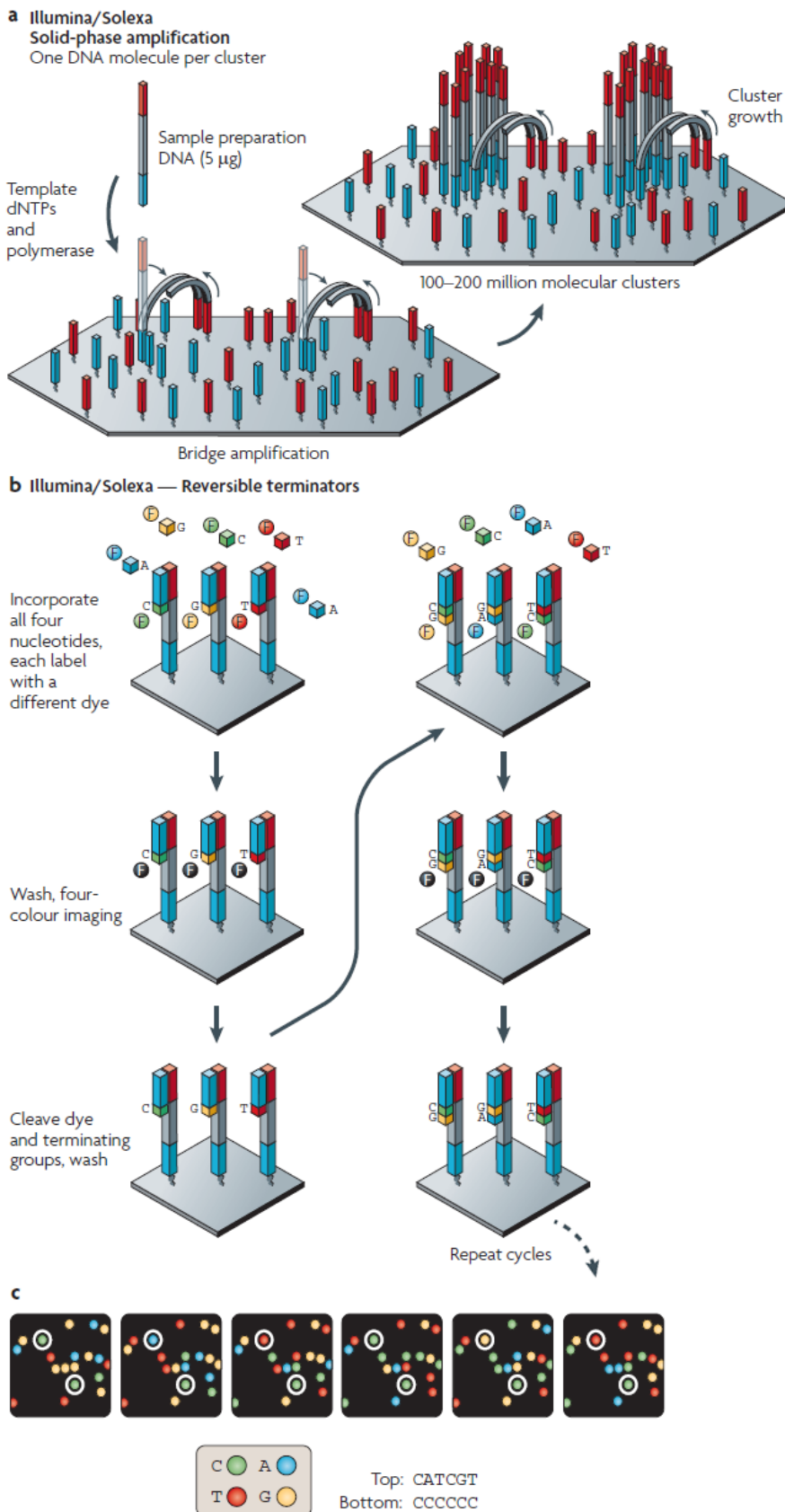
Figure 2.9 : Pyroséquençage utilisant une plateforme Titanium 454 (Roche) (Metzker, 2010).

De par sa méthode, le pyroséquençage 454 permet l'analyse de séquences d'ADN relativement longues, ce qui est particulièrement intéressant pour la précision de l'annotation taxonomique dans les études écologiques. Le fait qu'aucun agent chimique de déblocage d'extension ne soit utilisé permet de limiter les risques d'extension incomplète ou différée (Metzker, 2010), mais cela implique également une difficulté à séquencer les régions homopolymériques. Le pyroséquençage 454 reste également une technologie relativement onéreuse. Le nombre de lectures obtenues lors d'un séquençage n'est parfois pas suffisamment profond pour étudier la totalité de certains échantillons complexes et atteindre toutes les espèces présentes (Claesson et al., 2010). L'arrivée de nouvelles technologies, plus performantes et/ou à moindre coût, a rendu l'utilisation du pyroséquençage 454 moins adaptée pour l'étude des communautés microbiennes, et les plateformes de séquençage 454 ont été arrêtées par Roche en 2016 (D'Amore et al., 2016).

- Séquençage Illumina

La chimie Illumina utilisée pour le séquençage a été commercialisée en 2007 par Solexa, et s'est rapidement imposée dans le domaine du séquençage de génomes entiers grâce à son importante production de séquences.

La méthode de séquençage fonctionne de manière différente du pyroséquençage 454. La plateforme Illumina utilise une méthode de séquençage par synthèse couplée à une amplification par pont (« bridge ») à la surface de la « flowcell » (cellule dans laquelle se déroule le séquençage) (voir Figure 2.10.a). La banque des fragments d'ADN est préparée en ajoutant des adaptateurs aux deux extrémités des séquences. Grâce à ses adaptateurs, les simples brins d'ADN se fixent aléatoirement à la surface de la « flowcell ». Ensuite, des cycles de PCR « bridge » sont réalisés, c'est-à-dire que les adaptateurs proches du brin fixé servent d'amorces, permettant l'amplification localement d'un même brin et ainsi la génération de millions de groupes denses (« clusters »). Durant le séquençage, des nucléotides marqués avec un fluorochrome, spécifiques à chaque base, sont ajoutés et une modification chimique empêche l'addition de nucléotide après eux (Figure 2.10.b). La « flowcell » est excitée pour mesurer au niveau de chaque cluster les fluorochromes présents et donc les nucléotides ajoutés. Un traitement chimique vient ensuite libérer le fluorochrome fixé sur les nucléotides et permet l'ajout à nouveau de nucléotides marqués durant le cycle suivant de séquençage. En répétant ces étapes, et grâce à la correspondance fluorochrome – nucléotide, il est possible de séquencer chaque cluster (voir Figure 2.10.c).



(a) L'amplification sur phase solide se décompose en de deux étapes : fixation du simple brin de référence sur les adaptateurs du support, puis amplification en pont du brin de référence avec les amorces (adaptateurs) les plus proches afin de former un cluster.

(b) Les quatre types de nucléotides marqués chacun par un fluorochrome spécifique sont utilisés pour l'extension du brin de référence. L'ajout d'un nucléotide marqué bloque l'extension du brin. Une fois les nucléotides non fixés éliminés par lavage, la fluorescence est mesurée pour chaque cluster. L'étape de clivage permet de retirer le fluorochrome et de rendre l'ajout de nouveaux nucléotides possible.

(c) Le signal du fluorochrome associé au nucléotide ajouté dans chaque cluster est détecté. Ici le séquençage de deux clusters est montré pour 6 lectures (Metzker, 2010).

Figure 2.10 : Séquençage utilisant la chimie Illumina (Solexa).

En comparaison de la précédente technique de séquençage haut débit, le séquençage Illumina présente plusieurs avantages. Dans leur étude, Luo *et al.* (2012) ont comparé les communautés microbiennes obtenues par les méthodes de séquençage 454 et Illumina. Les profils de communautés obtenus sont similaires, et la principale différence se trouve alors dans le nombre de séquences produites et le coût de séquençage. Les séquences générées sont à minima d'aussi bonne qualité qu'avec le 454, mais la chimie Illumina présente l'avantage d'avoir une profondeur de séquençage bien meilleure, et ce pour un coût moins important (Caporaso et al., 2012; Claesson et al., 2010; Kozich et al., 2013; Smith and Peay, 2014). La détection des nucléotides un par un permet également une meilleure détection des régions homopolymorphiques par rapport au séquençage 454. Ces différents avantages de la chimie Illumina par rapport au pyroséquençage 454 en font donc la technologie de metabarcoding actuellement privilégiée pour les études de diversité microbienne. Toutefois, une des limites de cette technique est la taille des séquences amplifiables. Celles-ci doivent être de l'ordre de 500pb maximum (séquençage de 2x250pb), ce qui est inférieur aux tailles envisageables en pyroséquençage 454 ou en séquençage Sanger. Cette contrainte peut s'avérer problématique pour l'assignation taxonomique de certaines séquences, pour discriminer des genres ou espèces très proches phylogénétiquement. De plus, le risque de déphasage, c'est-à-dire d'une extension incomplète, est plus important du fait de l'utilisation d'agents chimiques pour débloquent l'extension une fois les nucléotides ajoutés.

- Séquençage IonTorrent

La technologie d'IonTorrent est développée par Thermo Fisher Scientific depuis 2010. La préparation des banques est basée sur un principe similaire à celui du pyroséquençage 454, à savoir l'amplification PCR à émulsion à la surface de billes (Shendure and Ji, 2008). Les millions de billes portant chacune des millions de copies d'une seule séquence par bille sont déposées dans des puits individuels sur une puce de séquençage semi-conductrice (Rothberg et al., 2011). Chaque type de nucléotide est introduit de manière cyclique en présence de polymérase. L'ajout d'un nucléotide particulier est détectée par la libération d'ions hydrogène, et permet ainsi de générer la séquence amplifiée dans chaque puits.

L'Ion Torrent présente l'avantage d'être une plateforme plus petite et moins chère que les autres. Le temps de séquençage est également fortement réduit, passant de plusieurs dizaines d'heures pour les autres technologies à quelques heures pour l'Ion Torrent. Néanmoins, dans une comparaison entre un séquençage par Illumina et par Ion Torrent, Salipante *et al.* (2014)

ont montré que le séquençage Ion Torrent était caractérisé par une profondeur de séquençage et une qualité des séquences inférieures à celles obtenues par chimie Illumina (Tableau 2.2). Enfin aucun système de blocage d'extension n'est utilisé, et plusieurs nucléotides peuvent être ajoutés à la suite durant un seul cycle de séquençage, ce qui peut provoquer des erreurs pour les régions homopolymériques.

Tableau 2.2 : Systèmes de séquençage nouvelle génération et leurs caractéristiques.
Les plateformes présentées concernent celles utilisées en métabarcoding pour les communautés
environnementales. Adapté de (Staats et al., 2016).

Appareil	Société	Temps de séquençage (h)	Séquences / séquençage	Taille des séquences (base)	Données de sortie
454 GS Junior Plus	Roche	18	70×10^3	700	70 Mb
MiniSeq	Illumina®	24	$44-55 \times 10^6$	2x 150	6,6-7,5 Gb
MiSeq	Illumina®	56	$44-55 \times 10^6$	2x 300	13,2-15 Gb
NextSeq 500	Illumina®	29	Jusqu'à 800×10^6	2x 150	100-120 Gb
Ion PGM™ System	Ion Torrent™	7,3	$4-5,5 \times 10^6$	400	1,2-2,0 Gb
Ion Proton™ System	Ion Torrent™	4	$60-80 \times 10^6$	200	Jusqu'à 10 Gb

Bien que les NGS soient un outil extrêmement utile pour mesurer l'abondance des différents taxons dans un environnement, cette mesure n'est toutefois pas absolue, notamment du fait de biais pouvant intervenir à la fois lors de l'amplification PCR et/ou du séquençage (Fierer et al., 2009). L'ADNe peut être trop dégradé et empêche alors une amplification ou un séquençage correct du marqueur génétique. L'obligation de passer par une étape de PCR depuis l'ADNe induit des biais potentiels qui risquent d'influencer l'estimation de la biodiversité (Bik et al., 2012). Ces biais peuvent être causés par des erreurs à deux niveaux : i) durant la préparation de la banque d'amplicons, ii) durant l'amplification des banques avant le séquençage (PCR en émulsion, PCR en pont, etc.). Ces erreurs lors de la synthèse de nouveaux brins d'ADN peuvent être des substitutions ou des insertions/délétions de régions, et sont dépendantes du type de polymérase utilisée et du nombre de cycles d'amplification (Cline et al., 1996). Le choix des amorces lors de la PCR est également une source de biais dans l'analyse des communautés (Lindahl et al., 2013). Pour limiter ces biais, il est donc recommandé d'utiliser une polymérase Hot-start, de limiter le nombre de cycles

d'amplification, de diminuer la température d'hybridation ainsi que de regrouper plusieurs réplicats PCR par échantillon (Lindahl et al., 2013). Concernant ce dernier point, Smith et Peay (2014) se sont intéressés à l'effet de différents nombres de réplicats de PCR regroupés, puis séquencés ensemble sur des échantillons de sols pour rechercher les ectomycorhizes. Les auteurs n'ont pas observé de différences significatives entre réplicats pour la diversité ou la structure des communautés étudiées, les effets de la localisation du prélèvement ou de la méthode de séquençage étant bien plus prédominants. Le regroupement des réplicats ne permettait pas d'améliorer l'abondance relative car la proportion des taxons était relativement identique entre eux. Enfin, des erreurs peuvent également apparaître lors du séquençage, par exemple avec la désynchronisation ou l'arrêt prématuré du séquençage pour certains clusters lors de la chimie Illumina.

Le développement des méthodes de séquençage haut-débit est en constante évolution, et de nouvelles techniques ont été régulièrement mises au point au cours de ces dernières années. La troisième génération de séquenceur, c'est-à-dire les méthodes permettant de séquencer directement des molécules d'ADN sans passer par des étapes préliminaires, peut être intéressante pour obtenir une représentativité plus juste de la biodiversité de l'écosystème étudié. La technologie de PacBio, apparue en 2011, permet le séquençage de longs fragments d'ADN, d'en moyenne 5kb mais pouvant monter jusqu'à 30kb. Cette technique fonctionne avec l'amplification de molécules d'ADN uniques par des polymérases fixées à l'intérieur de structures nanophotoniques, et l'incorporation de nucléotides est alors détectée par fluorescence. Actuellement, le faible débit de séquençage (50 000 lectures / séquençage) et l'important taux d'erreurs rendent cependant cette technique inadaptée pour le métabarcoding. Le MinION, commercialisé par Oxford Nanopore depuis 2015, est une autre plateforme de séquençage de troisième génération, avec la particularité d'avoir la taille d'une clé USB. Le principe de cette méthode est de faire passer les fragments d'ADN de la banque dans un nanopore. Le passage d'un brin d'ADN modifie alors le courant électrique au niveau du nanopore, et cette variation peut être mesurée. Chaque base modifiant le courant électrique de manière différente, il est possible en traitant le profil électrique mesuré de le transformer en séquence d'ADN. La portabilité de cet appareil ainsi que ses performances de séquençage lui ont permis d'être déjà utilisé dans de nombreux cas, comme lors de l'épidémie d'Ebola au Libéria en 2015 (Hoenen et al., 2016) ou dans la station spatiale internationale (Rainey, 2016). Mais bien qu'il ne soit pas nécessaire de passer par des étapes d'amplification en amont, ces techniques demandent l'utilisation d'ADN de très bonne qualité, ce qui est

rarement le cas dans les études environnementales. De plus, puisque l'ensemble des génomes environnementaux est séquencé, le pourcentage de pb correspondant aux régions d'un marqueur génétique sélectionné est très faible, même si la plateforme présente une bonne profondeur de séquençage. Il faudrait donc passer par un enrichissement des régions ciblées afin de régler en partie ces problèmes de profondeur de séquençage trop faible (Logares et al., 2014; Zhou et al., 2013).

Suivant la technique de séquençage sélectionnée, un marqueur génétique doit être choisi en fonction des contraintes de cette technique.

2.2.3.3.4.2. Sélection du marqueur génétique

Les acides nucléiques représentent actuellement le marqueur le plus efficace pour l'assignation taxonomique des microorganismes. Lors de l'utilisation des techniques de métabarcoding, l'un des paramètres les plus importants est le choix de la région qui sera amplifiée et utilisée comme marqueur génétique (« barcode »). La région sélectionnée se doit de répondre à plusieurs critères essentiels (Valentini et al., 2009) :

- i) Elle doit être universelle, c'est-à-dire présente chez tous les organismes du taxon étudié.
- ii) Elle doit être robuste, avec des régions fortement conservées au niveau de ses extrémités 5' et 3', afin que des amorces universelles puissent s'hybrider sur les régions bordantes.
- iii) Elle doit présenter une variabilité suffisamment importante pour permettre une discrimination des différents genres/espèces, mais doit être identique entre individu d'une même espèce.
- iv) Si la séquence n'est pas encore identifiée pour certaines espèces, elle doit contenir suffisamment d'informations phylogénétiques pour permettre une assignation à des niveaux taxonomiques plus hauts.
- v) Elle doit être standardisée, c'est-à-dire que la même région doit être utilisée pour l'ensemble des groupes taxonomiques étudiés, afin de pouvoir réaliser des comparaisons.

Avec l'importance capitale de la standardisation des différents marqueurs génétiques, l'évaluation de l'efficacité des régions candidates fut le principal objectif au début des techniques de métabarcoding. Le « Consortium for the Barcode of Life » (CBOL) a ainsi

standardisé l'identification des espèces par marqueurs génétiques, notamment en spécifiant quels marqueurs devaient être utilisés pour chaque groupe taxonomique. Par exemple, en ce qui concerne les animaux, le gène mitochondrial codant pour la cytochrome c oxydase I a été défini comme la région à utiliser pour le metabarcoding (Hebert et al., 2003b). Toutefois, cette région n'est pas adaptée pour les autres groupes taxonomiques, comme les plantes ou les champignons (Hollingsworth et al., 2009). Pour les microorganismes, les gènes ribosomiques sont de très bons candidats. De par leur fonction vitale chez les organismes, ils sont présents dans l'ensemble des individus. Ils ne sont que très rarement transférés horizontalement, ce qui assure la spécificité d'une séquence attribuée à un taxon. Ces gènes possèdent à la fois des domaines très conservés, portant des fonctions essentielles à la viabilité de l'organisme, et des régions hypervariables, permettant leur utilisation pour la comparaison phylogénétique des séquences. Chez les bactéries, le gène codant pour l'ARNr 16S est la région la plus couramment utilisée dans toutes les méthodes moléculaires pour l'identification taxonomique (Andersson et al., 1997; Rintala et al., 2002). Dans le cas des champignons, les régions ITS1 et ITS2 ont été proposées comme marqueurs génétiques universels à utiliser (Schoch et al., 2012).

Bactéries – ARNr 16S

La région la plus couramment utilisée pour identifier les communautés bactériennes se situe au niveau du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (Tringe and Hugenholtz, 2008). Sur la totalité de la séquence codante pour l'ARNr 16S, neuf sous-régions variables ont pu être distinguées, chacune séparée par une région très conservée (voir Figure 2.11) (Baker et al., 2003; Wang and Qian, 2009).

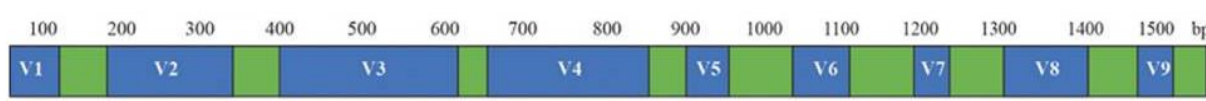


Figure 2.11 : Représentation schématique de la séquence codant pour l'ARNr 16S avec les régions conservées (vert) et hypervariables (bleu). Adaptée de (Singer *et al.*, 2016).

Actuellement, les limites des techniques de séquençage haut débit ne permettent pas de séquencer la totalité de la région codant pour l'ARNr 16S, d'où la nécessité de sélectionner une sous-région comme marqueur génétique. Ayant un rôle très important sur le profil microbien observé (Kumar et al., 2011), le choix de cette région ainsi que le design des amorces ont fait l'objet de nombreuses études, afin de déterminer quels sont la région et/ou le couple d'amorces optimaux pour l'étude des flores bactériennes (Kim et al., 2011; Klindworth

et al., 2013; Yu et al., 2012). L'utilisation de communautés artificielles (« mock ») permet de tester l'efficacité de marqueurs génétiques de manière contrôlée (Kozich et al., 2013). Dans une étude *in silico*, Yang et al (2016) ont aligné les différentes régions hypervariables présentes dans les bases de données afin de générer des arbres phylogénétiques et ainsi évaluer la variabilité de chacune de ces régions. La région V4 serait la région la plus variable, et donc la plus efficace pour l'étude taxonomique, suivie par les régions V5 et V6 (voir Figure 2.12). Actuellement, les études utilisent essentiellement les régions V3-V4 ou V4-V5 pour l'identification des communautés bactériennes (Barberán et al., 2015; Caporaso et al., 2011, 2012; Emerson et al., 2015; Fierer et al., 2012a; Parada et al., 2016; Takahashi et al., 2014).

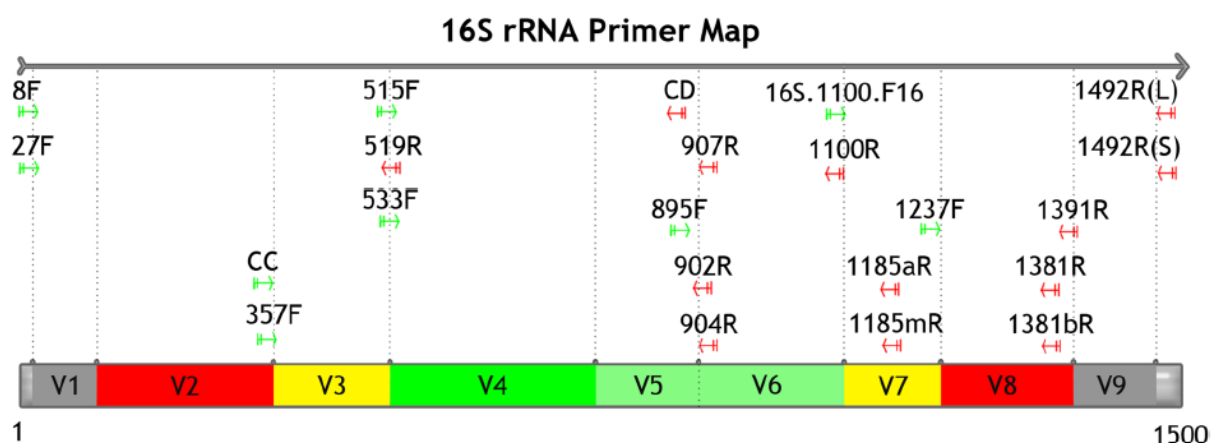


Figure 2.12 : Représentation schématique des différentes régions variables du gène codant pour l'ARNr 16S.

Les régions rouges (V2, V8) ont une faible résolution phylogénétique. Les régions vertes (V4, V5, V6) sont potentiellement les meilleurs choix pour les analyses phylogénétiques. La carte d'amorces provient de Lutzonilab (<http://lutzonilab.org/16s-ribosomal-dna/>) (Yang et al., 2016).

Champignons - ITS

L'étude des flores fongiques par les méthodes de barcoding reste plus complexe que dans le cas des flores bactériennes. La résolution taxonomique de l'analyse des champignons par métabarcoding est fortement dépendante de la sélection du marqueur génétique utilisé (Arfi et al., 2012; Schoch et al., 2012), et les résultats sont difficilement comparables si le marqueur choisi est différent. La séquence ciblée ne doit pas être trop longue ou contenir des introns, cela pouvant gêner l'amplification et le séquençage de nouveaux groupes taxonomiques (Lindahl et al., 2013). En effet, dans l'étude d'Ihrmark et al. (2012) réalisée sur une communauté artificielle en utilisant le séquençage 454, la taille du marqueur génétique serait inversement corrélée avec l'abondance détectée. La variabilité des régions ITS rend ces

séquences particulièrement intéressantes comme marqueur génétique (Nilsson et al., 2008, 2009, 2012; Schoch et al., 2012). D'autres marqueurs alternatifs à l'ITS ont parfois été utilisés, comme les régions codant pour la grande sous-unité de l'ARNr (LSU/28S) ou la petite sous-unité ribosomale (SSU/18S), en particulier pour certains groupes taxonomiques comme les Zygomycètes ou les Gloméromycètes. Ces régions restent toutefois insuffisantes pour permettre l'étude des flores fongiques totales par les techniques NGS (Tedersoo et al., 2015).

Alors que le séquençage Sanger permet le séquençage de la totalité des deux régions ITS, les techniques de séquençage haut-débit ne permettent pas la production de séquences aussi grandes, et il est donc nécessaire de sélectionner une des deux régions comme marqueur génétique (voir Figure 2.13). Le choix entre l'ITS1 et l'ITS2 est une source potentielle de biais dans l'analyse des communautés fongiques. L'ITS1 a largement été utilisé dans de nombreux travaux (Adams et al., 2013c, 2013a; Amend et al., 2010a; Barberán et al., 2015; Buée et al., 2009; Danielsen et al., 2012; Emerson et al., 2015; Gardes and Bruns, 1993; Schmidt et al., 2013; White et al., 1990) tandis que d'autres études préfèrent utiliser l'ITS2 comme marqueur (Korpelainen et al., 2016; Rocchi et al., 2017). Dans leur étude comparative entre ITS1 et ITS2, Blaali et al. (2013) concluent que ces deux régions conduisent dans la majorité des cas à des résultats similaires lorsqu'elles sont utilisées pour du métabarcoding chez les champignons, avec cependant certaines variations pour certains taxons (*Lecanorales* plus abondants dans les librairies d'ITS2 et *Agaricales* présentant plus de genres différents dans les librairies d'ITS1). A l'inverse, les travaux de Tedersoo et al. (2015) et de Bazzicalupo et al. (2013) suggèrent que la région ITS2 serait plus variable, et couvrirait une diversité fongique plus grande que l'ITS1. Au final, il serait intéressant lorsque cela est possible d'utiliser les deux régions ITS afin d'obtenir des informations sur les communautés fongiques certes différentes mais complémentaires (Buée et al., 2016).

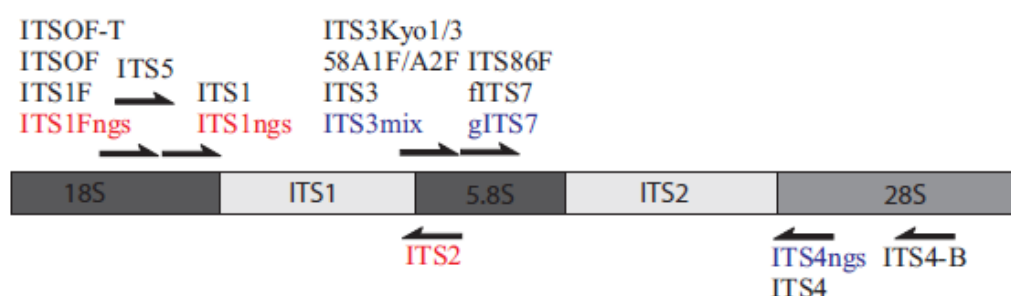


Figure 2.13 : Carte de la région ribosomale comportant les ITS 1 et 2 ainsi que les amorces utilisées par Tedersoo et al. (2015). Adaptée de (Tedersoo et al., 2015).

Le choix des couples d'amorces est également un critère important dans les études de métabarcoding, car l'universalité des amorces pour les ITS est en partie limitée. Différents couples d'amorces ciblant le même marqueur génétique peuvent conduire à la détection de taxons différents, ce qui a pu être observé *in silico* (Bellemain et al., 2010) ou sur des échantillons environnementaux (Op De Beeck et al., 2014; Tedersoo et al., 2010). Les amorces apporteraient un biais significatif, avec des effets importants sur la composition de la communauté fongique observée (Arfi et al., 2012; Blaaid et al., 2013). Selon le choix du couple d'amorces utilisé pour l'ITS1, 2% de la composition de la communauté au niveau des OTUs seraient par exemple impactés (Tedersoo et al., 2015).

2.2.3.3.4.3. Analyses des données de séquençage

Une fois les séquences obtenues à la suite des séquençages haut-débit, leur nombre important rend ces données difficiles à traiter sans l'utilisation d'outils bio-informatiques spécifiques. Plusieurs pipelines bio-informatiques peuvent être utilisés pour traiter ces séquences, comme les outils QIIME, MOTHUR ou encore OBITOOLS (Boyer et al., 2016; Caporaso et al., 2010; Schloss et al., 2009). Différentes étapes sont nécessaires afin d'obtenir la table taxonomique globale de la communauté étudiée :

- i) **Démultiplexage des séquences** : lors du séquençage, des index sont ajoutés en amont des séquences afin de pouvoir conserver la correspondance séquence – échantillon. Lors du traitement des données de séquençage, les index sont retirés et les séquences réassignées aux échantillons correspondants.
- ii) **Assemblage des séquences** : le séquençage Illumina est réalisé en pair-end, ce qui signifie que l'amplification a lieu depuis les extrémités 5' et 3' de la séquence. Il est donc nécessaire de fusionner des séquences chevauchantes afin de reconstruire complètement les séquences initiales. Les séquences ainsi obtenues sont filtrées selon leur qualité afin d'éliminer tout artefact (séquence trop courte, chimère, etc.) issu du séquençage.
- iii) **Clustering des séquences** : avec une très grande quantité de séquences, il est nécessaire de rassembler les séquences les plus proches en clusters à l'aide de différents algorithmes, afin de faciliter par la suite l'analyse des données (Chen et al., 2013). Cette étape permet notamment de diminuer l'impact des erreurs lors du séquençage ou de l'amplification PCR. En effet, même avec des erreurs sur quelques bases, les séquences seront suffisamment similaires pour être associées à

la séquence initiale dans le cluster. Chaque cluster forme alors une Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU), correspondant à un groupe d'individus avec une taxonomie plus ou moins précise. Le clustering s'effectue à un seuil de similarité fixé, dans la majorité des cas à 97%, ce qui est proche des similarités intra-espèces chez les procaryotes (Kim et al., 2014). Dans le cas de taxons très proches, le seuil de similarité de 97% ne sera parfois pas suffisant pour les discriminer (Nilsson et al., 2008). Certaines études utilisent parfois un pourcentage de similarité plus stringent à 99% (Rocchi et al., 2017), ce qui permet d'améliorer l'identification de certains taxons spécifiques, mais peut d'un autre côté conduire à une surestimation de la diversité totale, par exemple à cause des variations intra-génomiques des multi-copies des marqueurs génétiques. Cela rend également la banque générée plus sensible aux erreurs de séquençage. Dans certains cas, une fois le clustering effectué, les OTUs singletons (1 seule séquence) ou avec trop peu de séquences sont retirées des jeux de données, car pouvant être associés à des erreurs de séquençage ou des groupes taxonomiques trop minoritaires (Auer et al., 2017; Brown et al., 2015). Dans le cas de l'étude des ITS, un retrait des régions bordantes 5,8S et 28S est également possible grâce au Hidden Markov Model (HMM) et permet ainsi d'extraire uniquement l'ITS pour faciliter l'assignation taxonomique des séquences par la suite (Bengtsson-Palme et al., 2013). L'étape de clustering peut toutefois conduire à une perte d'information, notamment lorsque les rôles et fonctions métaboliques sont pris en compte. Deux espèces proches phylogénétiquement mais ayant des fonctions métaboliques différentes peuvent être assemblées dans le même cluster, ce qui empêchera leur discrimination (Eren et al., 2014; McElroy et al., 2013).

- iv) **Assignation taxonomique :** une fois les clusters d'OTUs effectués, les séquences représentatives de ces OTUs sont alignées sur des bases de données pour permettre une assignation taxonomique par similarité des séquences. Différents outils d'alignement de séquences sont utilisés, les plus communs étant BLAST (Altschul et al., 1990), BLAT (Kent, 2002) ou encore USEARCH (Edgar, 2010). Les principales bases de données utilisées pour l'assignation des séquences 16S des bactéries sont SILVA (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013) et Greengenes (DeSantis et al., 2006). Pour les champignons, la base de données UNITE sert souvent de référence pour l'assignation taxonomique (Kõljalg et al., 2005, 2013).

Que cela soit pour les bactéries ou les champignons, GenBank peut également être utilisée pour la vérification de séquences non assignées ou à un niveau phylogénétique trop imprécis.

- v) **Construction de la table d'OTUs** : Une fois chaque OTU assignée à une taxonomie, une table d'OTUs est réalisée afin d'avoir une correspondance entre cette taxonomie et le nombre de séquences détectées dans chaque échantillon. Afin de pouvoir comparer plus facilement les échantillons entre eux et malgré une diminution de la profondeur de séquençage, Weiss *et al.* (2017) recommandent la normalisation des tailles des banques en amont des analyses.

Une fois la table d'OTUs générée, des analyses statistiques sont effectuées afin d'obtenir des données descriptives des communautés étudiées (Bálint *et al.*, 2016), les deux principales caractéristiques étant la diversité alpha et beta. La diversité alpha correspond à la diversité au sein d'un seul échantillon. A l'inverse, la diversité beta correspond à la diversité entre les différents échantillons, en les comparant à l'aide d'analyses multivariées (ANOSIM, PERMANOVA) et d'outils de visualisation comme les Analyses en Composante Principale (PCA), les Analyses en Coordonnées Principales (PCoA) ou le Positionnement Multidimensionnel Non-Métrique (NMDS) (Buttigieg and Ramette, 2014; Thomas *et al.*, 2012). D'autres données comme les abondances relatives des individus de la communauté, à différents niveaux taxonomiques, peuvent être obtenues afin d'observer les profils taxonomiques des échantillons séquencés.

Comme pour toute technique, l'estimation de la diversité par métabarcoding est cependant soumise à de nombreuses limites et biais (Taberlet *et al.*, 2012). Tout d'abord, l'extraction d'ADN n'est pas homogène entre les différents groupes de microorganismes, et impacte donc directement les résultats des analyses. De même, le choix et la résolution taxonomique du marqueur génétique sélectionné, ainsi que les amorces utilisées pour l'amplifier, influencent fortement le profil de la communauté étudiée. Cette approche est semi-quantitative, et se base donc sur la proportion de séquences d'une population au sein d'un échantillon. Le nombre de copies des régions choisies (région ribosomale 16S bactérien, régions ITS fongiques) peut varier d'une espèce à l'autre (Herrera *et al.*, 2009), et il est difficile d'évaluer quel sera l'impact de cette variation sur leur abondance relative finale. De plus, certaines espèces peuvent porter dans leur génome plusieurs variants du marqueur

génétique sélectionné, ce qui peut par la suite conduire à des biais dans l'analyse des données (Reeder and Knight, 2009).

D'autres biais techniques sont également à prendre en compte. Bien qu'étant de haute fidélité, les polymérases peuvent effectuer des erreurs lors de la PCR ou le séquençage, et ainsi conduire à des séquences mal assignées (Carlsen et al., 2012; Degnan and Ochman, 2012). La profondeur de séquençage peut aussi représenter une limite, surtout dans le cas de multiplexage. Il faut que la quantité de séquences générées soit suffisante pour couvrir la totalité des amplicons de chaque banque, sinon les organismes rares risquent alors d'être non détectés. Lorsque l'abondance des organismes est irrégulière dans un environnement, il est également possible que les taxons rares soient occultés par ceux les plus communs, et il est donc important de bien répartir les prélèvements et d'avoir une profondeur de séquençage suffisante (Adams et al., 2013b). La profondeur de séquençage étant corrélée à la richesse observée (Haegeman et al., 2013), l'étape de normalisation des banques est nécessaire pour limiter les éventuels biais liés à des quantités de séquences différentes. Toutefois, cela peut conduire à une perte d'information concernant les taxons les plus rares. Une autre limite avec les séquençages haut-débit est le séquençage préférentiel des petites séquences. Ce problème est relativement peu impactant dans le cas du 16S, car les tailles des régions codant pour les ARNr sont très proches au sein des bactéries. En revanche, dans le cas des champignons, les régions ITS peuvent être fortement variables, pouvant aller de 200 à 600pb, pouvant causer un biais dans la représentativité de la communauté.

Ainsi, une étude récente a montré que dans le cas du 16S, le nombre de séquences par OTUs, et donc l'abondance relative, ne serait pas forcément corrélée à l'abondance réelle des individus dans l'échantillon étudié (Edgar, 2017a). En étudiant *in silico* l'abondance d'espèces bactériennes présentes dans des communautés artificielles par l'amplification de la région V4 du gène ribosomal 16S, l'auteur a pu observer que les différences du nombre de copies de ce gène dans les génomes ainsi que les mésappariements des amorces conduisaient à des biais dans les résultats d'abondance obtenus. De plus, la variabilité dans le nombre de copies du gène codant pour le 16S ainsi que la possibilité de mésappariement des amorces peuvent conduire à des variations d'abondance observée non corrélées à des différences d'abondance réelle.

Le choix des pipelines bio-informatiques pour traiter les données influe également sur le résultat final (Cristescu, 2014). L'utilisation d'étape de clustering pour les séquences très proches peut aussi être une source de réduction de la diversité taxonomique réelle (Kõljalg et al., 2013; Yamamoto and Bibby, 2014). Des séquences qui peuvent être issues d'espèces très proches phylogénétiquement mais différentes pourraient être assemblées dans un même OTU, diminuant alors la diversité. A l'inverse, un clustering trop stringant peut conduire à la séparation de taxons pourtant issus de la même espèce et une surestimation de la diversité (Kunin et al., 2010). Suivant le pourcentage de similarité choisi, l'étape de clustering des différentes séquences donc est une étape pouvant réduire la diversité réelle au niveau des espèces. En comparant de larges données de séquences d'ARNr 16S, Robert C. Edgar suggère que le clustering à 97 % ne serait pas assez précis pour permettre l'identification correcte jusqu'au niveau de l'espèce, et préconise alors un clustering plus stringant, de l'ordre de 99 % ou 100 % pour y parvenir (Edgar, 2017b). Il n'existe pas encore de protocole standardisé et rigoureux pour l'ensemble des analyses de données et l'interprétation des résultats. Les données de sorties, comme le nombre d'OTUs ou leur assignation taxonomique, sont relatives aux différents pipelines utilisés (algorithmes différents pour le filtre qualité, le clustering, l'alignement, etc.), ce qui limite les possibilités de comparaisons de la diversité entre études.

Enfin, il est nécessaire que l'espèce ou le genre ait été identifié en amont et que sa séquence soit référencée dans des bases de données fiables et robustes, corrélées à des isolats morphologiquement identifiés, pour permettre une assignation taxonomique précise (Taberlet et al., 2012). Bien que ce problème d'exhaustivité des bases de données s'améliore au fur et à mesure des années, la proportion de non-assignés reste importante, en particulier chez les champignons. La présence de séquences non assignées, notamment jusqu'au niveau de la famille, suggère la présence d'espèces encore non décrites car trop éloignées des espèces actuellement connues (Langarica-Fuentes et al., 2015). Les différences de qualité et d'abondance des séquences des différentes espèces dans les bases de données influencent la probabilité d'identification d'un taxon particulier (Kõljalg et al., 2013). Par ailleurs, dans le cas des champignons, les régions ciblées par les amorces sont souvent partagées par d'autres organismes eucaryotes (plantes, oomycètes, etc.), ce qui conduit parfois à de fortes proportions de séquences non fongiques et diminue alors la profondeur de séquençage (Schmidt et al., 2013). Dans ces situations, il est nécessaire de trouver un compromis entre la spécificité des amorces et le recouvrement de l'ensemble des taxons fongiques (Toju et al.,

2012), conduisant à l'utilisation d'amorces relativement « non spécifiques » pour étendre la diversité fongique observable.

Malgré ces limites, les méthodes de métabarcoding par séquençage haut-débit représentent une révolution du paradigme des études environnementales. La profondeur de détection des organismes est bien plus importante qu'avec les méthodes précédentes, et cela a permis de caractériser de manière plus précise de nombreuses flores microbiennes et de compléter les banques de données avec les séquences correspondant à des espèces non cultivables, que ce soit pour la flore associée à l'habitat humain, ou la flore du sol servant de matière première dans le cas des habitations en terre crue.

2.3. Etude des flores environnementales

L'étude des communautés microbiennes de l'habitat et des matériaux de construction est une étape importante pour appréhender et comprendre l'influence de ces organismes sur la santé des occupants.

Les matériaux de constructions conventionnels subissent un grand nombre de traitements qui altèrent fortement les microorganismes présents dans les matières premières. Dans le cas des matériaux en terre crue, celle-ci est généralement séchée à température ambiante, et ne subit pas de modification physico-chimique aussi importante que dans le cas d'autres matériaux comme le béton ou le plâtre. Ainsi, il est possible que les flores microbiennes initialement présentes dans le sol utilisé pour la construction soient conservées à la surface et dans le matériau final, et doivent donc être prises en considération lors des travaux sur la caractérisation microbienne proliférant dans et sur les matériaux en terre crue.

De nombreuses études ont également été menées sur les communautés microbiennes à l'échelle de l'habitat. Les bactéries et champignons présents dans l'air et les poussières intérieures ainsi que sur les surfaces des bâtiments ont été caractérisés par différentes méthodes, culturelles ou moléculaires. Différentes origines de ces microorganismes ont ainsi été distinguées. Les facteurs pouvant influencer ces flores doivent être pris en compte car ils pourraient affecter de la même manière les microorganismes présents sur les matériaux en terre crue lorsque ceux-ci sont présents dans les habitats. Parmi ces facteurs, une forte humidité, due par exemple à des accidents hydriques (dégâts des eaux, remontées capillaires,

etc.), peut avoir un impact fort sur les communautés microbiennes et leur prolifération. Ce phénomène est particulièrement important dans les problématiques sanitaires.

En effet, le développement de microorganismes dans l'habitat peut, sous certaines conditions environnementales, conduire à des risques pour la santé des occupants du bâtiment. La qualité de l'air intérieur peut être altérée par de nombreux polluants dont ceux produits lors de la prolifération de microorganismes, en particulier de moisissures, au sein du bâtiment. Ces problématiques de développement microbien dans l'habitat et sur les matériaux de constructions sont reliées à différentes conditions, et peuvent conduire à l'apparition de certaines pathologies respiratoires chez les occupants. C'est pourquoi il est important de caractériser les flores des matériaux de construction et leurs conditions de développement afin de pouvoir mieux contrôler ces risques.

2.3.1. Flore microbienne du sol

Le sol est composé d'une grande diversité taxonomique au sein de ses écosystèmes (Torsvik et al., 2002; Tringe et al., 2005). Un gramme de sol contiendrait environ 10^9 cellules et 10^6 taxons différents, ce qui témoigne de leur forte diversité (Curtis et al., 2002; Gans et al., 2005). Cet environnement complexe constitue un des plus grands réservoirs biologiques, et notamment en ce qui concerne les microorganismes (Roesch et al., 2007; Whitman et al., 1998).

Les microorganismes sont un composant essentiel des écosystèmes terrestres (Maron et al., 2011; Torsvik and Øvreås, 2002; Van Der Heijden et al., 2008). Un vaste panel de modes de vie peut être retrouvé, comme des organismes décomposeurs (saprophytes) (Berg and McLaugherty, 2013), mutualistes des plantes (endophytes, mycorhiziens) (Allen, 1991; Courty et al., 2010; Smith and Read, 2010) ou encore opportunistes/pathogènes. Les microorganismes du sol jouent ainsi un rôle dans de très nombreux processus écologiques comme l'acquisition de nutriments (Smith and Read, 2010), le recyclage de l'azote (Tiedje, 1988) et du carbone (Högberg et al., 2001) ou encore la structure du sol (Rillig and Mummey, 2006). Ces effets sont notamment étudiés pour leur impact essentiel sur la productivité des plantes. Par exemple, les bactéries fixatrices d'azote présentes dans le sol permettent un enrichissement de la terre en azote et en phosphore et subviennent ainsi à des besoins capitaux pour les plantes. Le processus de minéralisation, c'est-à-dire la décomposition des matières organiques solubles et insolubles ainsi que la conversion en matières inorganiques assimilables par d'autres organismes, est réalisé par les microorganismes du sol et permet de

renouveler l'accessibilité en nutriments (Schimel and Bennett, 2004). Environ 80% des espèces de plantes à travers le monde sont en symbiose au niveau des racines avec des champignons mycorhiziens qui permettent un apport en de nombreux composants (Azote, Phosphore, Cuivre, Zinc, Fer, etc.) en échange de carbone. Certaines bactéries produisent également des métabolites antifongiques permettant de protéger les plantes contre les champignons néfastes (Weller et al., 2002). Certains microorganismes peuvent être délétères pour les plantes (*Phytophthora*, *Fusarium*, *Pythium*, etc.), s'attaquant directement à elles ou en leur faisant concurrence dans l'accessibilité aux nutriments. Les microorganismes peuvent également être responsables de la nitrification du sol, rendant alors le milieu moins favorable au développement de certains organismes.

L'utilisation de méthodes de biologie moléculaire basées sur la PCR et le séquençage de régions ribosomiques a permis de décrire avec une plus grande précision les flores microbiennes du sol. Ces techniques ont permis d'étudier, par profilage génétique et séquençage Sanger, des processus écologiques affectant la diversité des communautés fongiques (Artz et al., 2007; Fierer et al., 2007; Gomes et al., 2003; O'Brien et al., 2005; Schadt et al., 2003; Tedersoo et al., 2003). L'identification des flores microbiennes a pu être largement améliorée avec l'utilisation de séquençages haut-débit comme le pyroséquençage 454 (Buée et al., 2009; Danielsen et al., 2012; Gottel et al., 2011; Jumpponen et al., 2010; Nacke et al., 2011; Rousk et al., 2010; Thomson et al., 2015; Will et al., 2010; Xu et al., 2012) ou le séquençage Illumina (Schmidt et al., 2013).

De nombreux types de sols ont ainsi été caractérisés pour mieux appréhender la diversité microbienne qui les compose (voir Tableau 2.3). A travers les différentes études de métabarcoding sur des extraits de sols, les taxons bactériens majoritairement détectés appartiennent aux phylums *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *α -proteobacteria*, *β -proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *γ -proteobacteria* (Fierer et al., 2012b; Gottel et al., 2011; Nacke et al., 2011; Roesch et al., 2007; Thomson et al., 2015; Will et al., 2010). Dans le cas des études sur les champignons, ce sont les phylums *Ascomycota* et *Basidiomycota* qui ont été principalement identifiés, avec dans une moindre mesure le phylum *Zygomycota* (Buée et al., 2009; Danielsen et al., 2012; Gottel et al., 2011; Jumpponen et al., 2010; Schmidt et al., 2013; Tedersoo et al., 2014; Thomson et al., 2015; Xu et al., 2012). Le type de terre (sol sableux, sol de forêt, etc.) joue toutefois un rôle important dans la composition des communautés microbiennes présentes. Par exemple, Fierer *et al.* (2005) ont évalué la présence de différents

grands groupes taxonomiques au sein de trois types de sols (sols désertiques, forestiers ou de prairie), et leur étude a révélé un ratio *Fungi/Bacteria* extrêmement élevé dans le cas du sol forestier. Dans le cas de l'horizon organique d'un sol forestier, prélevé entre 0 et 5 cm, de fortes abondances en Basidiomycètes sont détectées, et secondairement Ascomycètes et *Mortierella* (Buée et al., 2009). Différentes catégories de champignons ont pu être identifiées : des champignons saprophytes (*Cryptococcus*, *Mortierella*), parasites (*Ceratobasidium*), mutualistes (*Lactarius*) ou ectomycorhiziens (*Boletales*, *Agaricales*, *Thelephorales*, *Russulales*, *Cantharellales*, *Sebacinales*). Dans d'autres types de sol, les proportions des abondances relatives entre les phylums *Ascomycota* et *Basidiomycota* sont à peu près équivalentes (Jumpponen et al., 2010). A l'inverse, en prélevant entre 0 et 10 cm de profondeur dans des sols de prairies, composés d'alluviaux argileux, Schmidt *et al.* (2013) ont établi une communauté fongique très différente, avec une abondance relative au niveau des principaux phylums de 78,14% pour les *Ascomycota*, 10,24% pour les *Basidiomycota*, 3,61% pour les *Glomeromycota*. L'étude de Xu *et al.* (2012) sur des sols agricoles démontre également une prévalence des *Ascomycota* sur les *Basidiomycota*, et en particulier des genres *Phoma* et *Verticillium*. Dans une vaste étude sur 365 sites de prélèvements à travers le monde, Tedersoo *et al.* (2014) ont caractérisé la flore fongique de très nombreux types de terre (sol de prairie, de toundra arctique, de forêt tropicale, etc.) et ont ainsi mis en évidence des variations significatives en fonction du type de sol ou encore de la position géographique, notamment avec l'impact du climat. Les principaux groupes fongiques sont présents dans tous les écosystèmes, mais en proportion variable. Ainsi, le ratio *Ascomycota* sur *Basidiomycota* est plus élevé dans les prairies et les forêts tropicales humides, mais plus faible dans les forêts de feuillus. D'autres taxons peuvent varier d'un type de sol à l'autre, comme *Chytridiomycota*, *Cryptomycota* et *Glomeromycota* qui sont plus divers dans les prairies que dans les autres sols. La profondeur de prélèvement intervient également dans la structure des communautés microbiennes observée. En étudiant différentes strates du sol, Will *et al.* (2010) ont mis en évidence la différence de diversité bactérienne suivant l'horizon observé, avec une association des phylums *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria*, et γ -*proteobacteria* plutôt avec l'horizon A tandis que *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira* seraient retrouvés de manière plus abondante dans l'horizon B.

Chapitre 2 – Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

Tableau 2.3 : Principaux taxons microbiens détectés dans différents types de sols.

Type de sol	Profondeur de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectées	Références
Champignons				
Sols forestiers	5 cm	Pyroséquençage 454	<i>Basidiomycota</i> (<i>Ceratobasidium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Russula</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Inocybe</i>), <i>Ascomycota</i> (<i>Neofabraea</i> , <i>Cenococcum</i>), <i>Mortierella</i>	(Buée et al., 2009)
Sols urbains / ruraux de chênes	15 cm	Pyroséquençage 454	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i>	(Jumpponen et al., 2010)
Sols de peupliers	-	Pyroséquençage 454	<i>Ascomycota</i> (<i>Pezizomycotina</i>), <i>Basidiomycota</i> (<i>Agaricomycotina</i>)	(Gottel et al., 2011)
Champs agricoles	20 cm	Pyroséquençage 454	<i>Ascomycota</i> (<i>Phoma</i> , <i>Verticillium</i>), <i>Basidiomycota</i> (<i>Guehomyces</i> , <i>Cryptococcus</i>), <i>Zygomycota</i>	(Xu et al., 2012)
Champs agricoles	20 cm	Pyroséquençage 454	<i>Filobasidiaceae</i> , <i>Mortierellaceae</i>	(Danielsen et al., 2012)
Sols alluviaux	10 cm	Séquençage Illumina	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i>	(Schmidt et al., 2013)
Sols variés	5 cm	Pyroséquençage 454	<i>Basidiomycota</i> (<i>Agaricomycetes</i>), <i>Ascomycota</i> (<i>Sordariomycetes</i> , <i>Leotiomycetes</i> , <i>Eurotiomycetes</i> , <i>Dothideomycetes</i>), <i>Mortierellomycotina</i> , <i>Mucoromycotina</i>	(Tederloo et al., 2014)
Sols variés	20 cm	Pyroséquençage 454	<i>Basidiomycota</i> (<i>Agaricomycetes</i> , <i>Tremellomycetes</i>), <i>Ascomycota</i> (<i>Eurotiomycetes</i> , <i>Sordariomycetes</i>)	(Thomson et al., 2015)
Bactéries				
Champs agricoles / Sol forestier	10 cm	Pyroséquençage 454	<i>Proteobacteria</i> (β - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i>), <i>Bacteroidetes</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i>	(Roesch et al., 2007)
Sols de prairie	Horizon A & B	Pyroséquençage 454	<i>Acidobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , δ - <i>proteobacteria</i>	(Will et al., 2010)
Sols de peupliers	-	Pyroséquençage 454	<i>Proteobacteria</i> (α - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i>), <i>Acidobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	(Gottel et al., 2011)
Sols forestiers / Sols de prairie	Horizon A	Pyroséquençage 454	<i>Acidobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i>	(Nacke et al., 2011)
Sols de prairie	0-5 cm	Pyroséquençage 454	<i>Acidobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i>	(Fierer et al., 2012b)
Sols variés	20 cm	Pyroséquençage 454	<i>Actinobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i>	(Thomson et al., 2015)

De nombreux facteurs biotiques et abiotiques sont responsables de variations spatiales et temporelles au sein des communautés microbiennes présentes dans le sol, et en particulier la composition du sol. Le pH est un facteur très important dans la variabilité de la diversité et de la richesse microbienne du sol (Fierer and Jackson, 2006; Griffiths et al., 2011; Rousk et al., 2010; Tederloo et al., 2014; Thomson et al., 2015). Par exemple, les clusters des taxons bactériens présents dans des sols à un pH donné sont similaires pour d'autres sols de pH similaire. La concentration en azote a également un impact significatif sur la composition des communautés bactériennes (Campbell et al., 2010; Fierer et al., 2012a) et fongiques du sol (Egerton-Warburton et al., 2007; Frey et al., 2004). Plus particulièrement, le ratio C : N a un effet très significatif sur le profil des flores fongiques (Thomson et al., 2015). La saison aurait également un effet significatif sur l'abondance de certains taxons fongiques du sol (Jumpponen et al., 2010), mais ce facteur aurait un rôle bien inférieur à celui de la composition du sol (Thomson et al., 2015). La localisation géographique, et par extension

le climat ambiant, influence également fortement les communautés fongiques et bactériennes du sol (Cho and Tiedje, 2000; Fierer and Jackson, 2006; Green et al., 2004; Tedersoo et al., 2014). Celui-ci contient donc une très grande diversité de microorganismes, avec une forte hétérogénéité suivant le type de sol, la zone ou la profondeur de prélèvement. Les interprétations sont donc souvent prudentes car, en plus de l'ensemble de ces facteurs de variations, chaque méthode employée possède ses propres biais (Hirsch et al., 2010).

2.3.2. Flore microbienne associée à l'habitat

La flore microbienne présente au sein des habitats possède un fort impact sur la santé des occupants. Le lien entre l'être humain et l'environnement intérieur n'a fait qu'augmenter au cours de ces dernières décennies, avec actuellement un temps passé à l'intérieur de plus de 80 % (Brasche and Bischof, 2005; Höppe and Martinac, 1998). Une faible diversité microbienne dans l'habitat aurait notamment une influence positive sur le développement de certaines pathologies comme l'asthme (Dannemiller et al., 2014a) et la présence de microorganismes particuliers sur des surfaces du bâtiment peut avoir un impact sur la transmission de certaines maladies (Boone and Gerba, 2007). C'est pourquoi il est parfois indispensable d'obtenir des mesures précises de l'exposition aux microorganismes, et plus particulièrement lors d'études sanitaires (Karvonen et al., 2014).

2.3.2.1. Origines des microorganismes à l'intérieur des habitats

Les bâtiments sont des écosystèmes variés et complexes, composés de milliards de microorganismes interagissant entre eux et avec leur environnement (Frankel et al., 2012; Kembel et al., 2012). Au sein des habitats, les microorganismes présents dans l'air, sur le sol et sur les surfaces à l'intérieurs des bâtiments peuvent provenir de sources très diverses (Adams et al., 2013c; Dunn et al., 2013; Hospodsky et al., 2012; Squinazi, 2002; Täubel et al., 2009). Pour ce qui est de la flore de l'air intérieur, deux types peuvent être distingués : i) la flore naturelle de l'air, aussi appelée flore de base, comportant des spores fongiques et quelques espèces bactériennes (p. ex. *Bacillus*), et la ii) la flore accidentelle, reliée essentiellement à la présence et aux activités humaines créant des bioaérosols.

L'une des principales origines des microorganismes de l'habitat est l'environnement extérieur. Les microorganismes présents dans l'air hors des constructions pénètrent par les ouvertures (portes et fenêtres) lors de l'aération du bâtiment. Parallèlement, les

microorganismes transportés par l'homme, par l'intermédiaire des vêtements ou des chaussures, se déposent par la suite sur les surfaces intérieures. Cet impact de l'extérieur sur la flore intérieure est particulièrement marqué pour les communautés fongiques (voir Figure 2.14) (Adams et al., 2013c; Shin et al., 2015). Ces dernières, en suspension dans l'air extérieur, sont très nombreuses et variées (Shelton et al., 2002), parfois plus que les flores bactériennes (Fierer et al., 2008). L'abondance des différents champignons composant les communautés fongiques de l'air extérieur est dépendante de la saison (Fröhlich-Nowoisky et al., 2009), de la géographie (Barberán et al., 2015), des conditions météorologiques, de l'activité humaine (zone rurale/urbaine) et est plus généralement soumise à une importante variation temporelle, avec des changements significatifs selon les jours (Pashley et al., 2012). Dans leurs travaux, Adams *et al.* (2013c) ont étudié par séquençage haut-débit les structures des communautés fongiques à l'intérieur et à l'extérieur de différentes résidences durant 1 mois à deux saisons différentes. La majorité des champignons et des levures détectés provenaient de l'air extérieur, et la communauté fongique de cet air était effectivement variable selon à la fois la géographie et la saisonnalité. Puisque la flore intérieure serait en grande partie issue de l'air extérieur, cette dispersion au sein des flores extérieures impacterait alors de la même manière la flore intérieure observée.

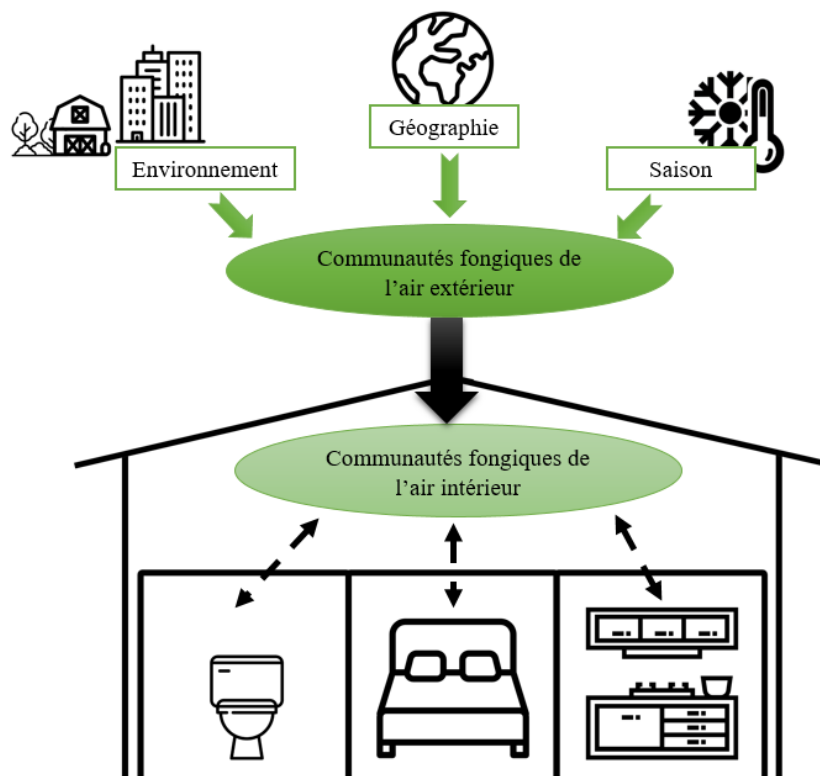


Figure 2.14 : Schéma de la structure des communautés fongiques de l'air.

Les communautés fongiques de l'air intérieur seraient dépendantes de la dispersion de celles de l'air extérieur (flèche noire), et de la croissance et resuspension depuis différents environnements intérieurs (flèches discontinues). Les résultats d'Adams *et al.* indiquent que la dispersion des espèces extérieures, changeant selon la géographie et les variations de saisons (flèches vertes), serait un déterminant de la diversité fongique intérieure plus important que la croissance et la resuspension associées à la fonction des pièces. Adapté d'Adams *et al.* (2013c). (Icônes réalisées par Freepik).

Pour ce qui est des bactéries, la flore de base de l'air ne représente qu'une faible fraction dès lors qu'il y a présence et activité humaines, car, dans ce cas, la source des bactéries majoritairement présentes dans l'air est le microbiote humain (ensemble des microorganismes présents chez l'homme) (Adams *et al.*, 2015; Dunn *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2013; Lax *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2012; Ruiz-Calderon *et al.*, 2016; Wilkins *et al.*, 2017). Chaque humain possède à la surface de sa peau une flore bactérienne de composition et de structure particulières, qui peut même se révéler être une empreinte spécifique d'un individu (Dekio *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007; Grice and Segre, 2011; Grice *et al.*, 2008). La flore associée au revêtement cutané humain est en partie déposée à chaque contact avec une surface, comme les claviers d'ordinateurs (Fierer *et al.*, 2010), les téléphones mobiles (Meadow *et al.*, 2014a) ou encore les surfaces de l'habitat (Lax *et al.*, 2014; Wilkins *et al.*, 2016). L'homme perd près d'un milliard de cellules mortes cutanées par jour par desquamation (Milstone, 2004), et le décrochage de ces cellules dissémine par la même occasion des microorganismes dans

l'habitat (Tringe et al., 2008). Ainsi, la flore bactérienne détectée sur des surfaces intérieures est fortement corrélée à celle des occupants des bâtiments (Dunn et al., 2013; Flores et al., 2011, 2013; Hewitt et al., 2012; Hospodsky et al., 2012; Lax et al., 2014; Rintala et al., 2008; Shin et al., 2015). Par exemple, parmi les bactéries détectées à la surface des cuisines, près de 20% sont spécifiquement associés à la flore bactérienne des mains (Flores et al., 2013). En effectuant des prélèvements dans 40 résidences, Dunn *et al.* (2013) ont estimé qu'environ 80% des bactéries sur les surfaces de l'habitation seraient associés à la flore humaine. Ce microbiote pouvant évoluer au cours du temps et des activités, ce changement peut conduire à une modification de la flore présente sur les surfaces dans les habitats (Wilkins et al., 2017). Les flores ORL, à travers la respiration, la toux ou les reniflements, viennent apporter des microorganismes supplémentaires dans l'air. La flore bactérienne associée à l'homme représenterait alors au moins 20 % de la flore de l'air dans les classes d'écoles (Hospodsky et al., 2012; Meadow et al., 2014b). En plus des surfaces et de l'air, les bactéries commensales de l'homme sont également retrouvées dans les poussières intérieures (Rintala et al., 2008; Täubel et al., 2009). L'occupation et l'activité humaine conduisent également à une mise en suspension dans l'air des microorganismes présents en surface ou dans les poussières, et donc à une augmentation des concentrations en bactéries et en champignons en suspension (Hospodsky et al., 2012, 2015; Meadow et al., 2014b; Qian et al., 2014). A l'inverse, lors de l'absence d'une personne de son habitat, l'empreinte de son microbiote sur les surfaces intérieures diminue sous quelques jours (Lax et al., 2014). La très faible quantité de champignons chez l'homme par rapport à la flore bactérienne explique le faible impact voire l'absence d'impact de la présence de l'homme sur la flore fongique (Huffnagle and Noverr, 2013).

Enfin d'autres macroorganismes, comme des animaux, des plantes ou des insectes, peuvent être une autre voie d'apport supplémentaire de microorganismes spécifiques de ces organismes dans les locaux (Fujimura et al., 2010; Hospodsky et al., 2012).

Chaque environnement possède ses propres contraintes (sources de nutriments, humidité, température, etc.), et est plus propice au développement de certains microorganismes. La structure et la diversité des communautés bactériennes et fongiques sont donc différentes entre l'air extérieur (Fröhlich-Nowoisky et al., 2009), l'air intérieur (Adams et al., 2013c; Fierer et al., 2008), les poussières des bâtiments (Amend et al., 2010a; Rintala et al., 2008) et

à la surface des matériaux de construction humides (Andersen et al., 2011; Gravesen et al., 1999). Grâce à de nombreux travaux, depuis les études par culture jusqu'au métabarcoding actuel, certains microorganismes majoritaires ont pu être identifiés.

2.3.2.2. Flores microbiennes dans les habitats sains

Champignons

De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des communautés fongiques à l'intérieur des habitats, que ce soit dans l'air, dans les poussières ou sur les surfaces de la construction (voir Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Principaux taxons fongiques détectés dans différents environnements de l'habitat intérieur (air, poussières, surfaces).

Environnement	Méthode de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectés	Références
Air intérieur				
Habitations	Aerocollecteur centrifugeur	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Leotiomycetes</i> (<i>Botrytis</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Scopulariopsis</i> , <i>Acremonium</i>)	(Beguin and Noland, 1994)
Habitations	Aerocollecteur centrifugeur	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>)	(Takahashi, 1997)
Habitations	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Saccharomycetes</i> (<i>Candida</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium herbarum</i> & <i>sphaerospermum</i> & <i>cladosporoides</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Myrothecium</i>), <i>Microbotryomycetes</i> (<i>Rhodotorula</i>), <i>Penicillium</i>	(Pastuszka et al., 2000)
Habitations	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>)	(Hyvärinen et al., 2001)
Bâtiments	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), champignons non-sporulants	(Shelton et al., 2002)
Habitations	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>)	(Dassonville et al., 2008)
Classe d'université	Aerocollecteur cyclonique	Séquençage Sanger	<i>Sordariomycetes</i> (<i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i>)	(Fierer et al., 2008)
Hôpital	Aerocollecteur	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>)	(Sautour et al., 2009)
Habitations	Sédimentation	Pyroséquençage 454	<i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Phoma</i> , <i>Stemphylium</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>)	(Adams et al., 2013c)
Ecoles, garderies	Aerocollecteur	Pyroséquençage 454	<i>Agaricomycetes</i> , <i>Dothideomycetes</i> , <i>Eurotiomycetes</i>	(Shin et al., 2015)
Poussières				
Bureaux	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Culture	Levures, <i>Dothideomycetes</i> (<i>Aureobasidium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>)	(Chao et al., 2002)
Habitations	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Trichoderma</i>), <i>Mucor</i>	(Santucci et al., 2007)
Garderie	Aspirateur	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Aureobasidium</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>) <i>Sordariomycetes</i> (<i>Acremonium</i>)	(Pitkäranta et al., 2008)
Garderie	Aspirateur	Séquençage Sanger	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Leptosphaerulina</i> , <i>Macrospora</i>), <i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>), <i>Malasseziomycetes</i> (<i>Malassezia</i>), <i>Saccharomycetes</i> (<i>Candida</i>), <i>Microbotryomycetes</i> (<i>Rhodotorula</i>)	
Bâtiments	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Pyroséquençage 454	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Epicoccum</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Fusarium</i> , <i>Stachybotrys</i>)	(Amend et al., 2010a)

Chapitre 2 – Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

Environnement	Méthode de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectés	Références
Poussières				
Bureaux	Aspirateur	Séquençage Sanger	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Hormonema</i>), <i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>), <i>Malasseziomycetes</i> (<i>Malassezia</i>), <i>Saccharomycetes</i> (<i>Saccharomyces</i>)	(Pitkäranta et al., 2011)
Université	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Séquençage Illumina	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Aureobasidium</i> , <i>Preussia</i>), <i>Saccharomycetes</i> (<i>Saccharomyces</i> , <i>Cyberlindnera</i>), <i>Microbotryomycetes</i> (<i>Rhodotorula</i>), <i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>)	(Korpelainen and Pietiläinen, 2016)
Habitations	Collecteur électrostatique de poussière	Séquençage Illumina	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Wallemiomycetes</i> (<i>Wallemia</i>)	(Rocchi et al., 2017)
Surfaces dans le bâtiment				
Habitations	Géloses de contact, écouvillons	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus fumigatus et versicolor</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>)	(Beguin and Noland, 1994)
Habitations	Ecouvillons, Géloses contact, Adhésifs	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Ulocladium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i>)	(Santucci et al., 2007)
Habitations	Ecouvillons	Pyroséquençage 454	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Phoma</i>), <i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Exophiala</i>), <i>Saccharomycetes</i> (<i>Candida</i>), <i>Malasseziomycetes</i> (<i>Malassezia</i>), <i>Microbotryomycetes</i> (<i>Rhodotorula</i>), <i>Wallemiomycetes</i> (<i>Wallemia</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Fusarium</i>)	(Adams et al., 2013a)

Du fait de son impact sanitaire important, l'identification des champignons présents dans l'air de l'habitat a rapidement été un enjeu majeur. En utilisant des approches par culture, les principaux taxons isolés appartiennent aux Ascomycètes, et en particulier aux genres *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria*. Par exemple, une étude sur les flores microbiennes présentes à l'intérieur d'habitations à Paris a conduit à la détection de *Cladosporium*, *Aspergillus*, et *Penicillium* dans environ 60% des logements, ainsi que d'*Alternaria* dans un peu moins de 20% des logements (Dassonville et al., 2008). Ces flores sont également détectées par culture dans les poussières et les surfaces des bâtiments.

L'utilisation des méthodes de biologie moléculaire, et notamment de séquençage haut-débit, a permis d'observer une diversité fongique plus importante, en particulier pour les Basidiomycètes qui étaient difficilement isolables. Ainsi, dans leur étude, Korpelainen et Pietiläinen (2016) ont détecté dans l'air intérieur de nombreux genres habituellement peu isolés comme *Aureobasidium*, *Preussia* ou encore des levures comme *Cryptococcus* ou *Saccharomyces*. Il existe toutefois certaines différences significatives entre les études de la flore de l'habitat recensées dans la littérature. Dans une étude sur la composition fongique intérieure globale, Amend *et al.* (2010a) ont montré une dominance du phylum *Ascomycota*. En effectuant des prélèvements de poussières à l'intérieur des constructions, Rocchi *et al.* (2017) ont également révélé une prévalence des Ascomycètes (79%) et une faible détection des Basidiomycètes (20%). A l'inverse, les résultats d'Adam *et al.* (2013b, 2013c, 2013a)

révélaient une composition fongique diverse, avec une abondance importante des Agaricomycètes (Basidiomycètes) et des Dothideomycètes (Ascomycètes) dans les environnements intérieurs (Adams et al., 2013b, 2013c, 2013a). Enfin, les prélèvements de Shin *et al.* (2015) semblaient être composés majoritairement de Basidiomycètes, et plus particulièrement d'environ 60 % à 70 % d'Agaricomycètes. Ces différences peuvent toutefois être expliquées par plusieurs facteurs, variant suivant les études : méthodes de prélèvements (sédimentation, aspiration sur filtre, écouvillons, etc.), technologies de séquençage (pyroséquençage 454, séquençage Illumina), fonction du bâtiment (habitations, bureaux, université, garderies, etc.), ou encore localisation géographique (USA, France, Corée du Sud, etc.). Il est donc complexe de comparer ces résultats entre eux dans la mesure où de nombreux paramètres sont impliqués.

Malgré ces variabilités entre études, certains genres fongiques ont toutefois été caractérisés comme étant associés à l'environnement intérieur. Les champignons présents à l'intérieur du bâtiment étant un sous-ensemble des champignons initialement présents à l'extérieur, la plupart des genres et espèces identifiés sont donc communs à ces deux environnements (Adams et al., 2013c; Amend et al., 2010a; Pitkäranta et al., 2008). Par exemple, le genre *Cladosporium* est un champignon xérotolérant, se retrouvant de manière très abondante à la fois dans l'air intérieur et extérieur (Amend et al., 2010a; An and Yamamoto, 2016; Yamamoto et al., 2012). Les principaux genres fongiques détectés dans l'air intérieur appartiennent aux Ascomycètes, comme *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Stachybotrys*, et aux Basidiomycètes, avec essentiellement des levures (*Candida*, *Cryptococcus*, *Cyberlindnera*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*) et *Wallemia*. Au niveau des espèces, certaines sont plus fréquemment détectées, comme *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* et *niger* ainsi que *Stachybotrys chartarum*. Cette relation entre flore intérieure et extérieure rend importante l'évaluation de ces deux flores pour comprendre les modifications des profils fongiques et pour détecter une prolifération spécifique à l'habitat de certaines espèces.

Bactéries

Des analyses sur les aérosols bactériens et des prélèvements de surface ont permis de dégager de la même manière une composition générale de la flore bactérienne intérieure, avec certains taxons majoritaires (voir Tableau 2.5).

Chapitre 2 – Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

Tableau 2.5 : Principaux taxons bactériens détectés dans différents environnements de l’habitat intérieur (air, poussières, surfaces).

Environnement	Méthode de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectés	Références
Air intérieur				
Habitations	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Actinobacteria</i> (<i>Micrococcus</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i>)	(Pastuszka et al., 2000)
Chambres, bureaux, classes	Aerocollecteur	Culture	<i>Actinobacteria</i> (<i>Micrococcus</i> , <i>Kocuria</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Enterobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i>)	(Bouillard et al., 2005)
Classe d'université	Aerocollecteur cyclonique	Séquençage Sanger	<i>Flavobacteriia</i> (<i>Flavobacterium</i> / <i>Chryseobacterium</i>), <i>Cytophagia</i> (<i>Flexibacter</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i>), α - <i>proteobacteria</i> (<i>Rhizobium</i> , <i>Sphingomonas</i>), <i>Actinobacteria</i> (<i>Arthrobacter</i> , <i>Cytophagia</i> (<i>Hymenobacter</i>))	(Fierer et al., 2008)
Hôpital	Aerocollecteur	Pyroséquençage 454	β - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i>	(Kembel et al., 2012)
Classe d'université	Aerocollecteur	Pyroséquençage 454	<i>Actinobacteria</i> (<i>Propionibacteriaceae</i> , <i>Micrococccineae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacteriaceae</i>)	(Hospodsky et al., 2012)
Habitations	Sédimentation	Pyroséquençage 454	<i>Actinobacteria</i> , <i>Bacilli</i> , α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i>	(Adams et al., 2014)
Ecoles, garderies	Aerocollecteur	Pyroséquençage 454	α - <i>proteobacteria</i> (<i>Parracoccus</i> , <i>Methylobacterium</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Acinetobacter</i>), <i>Firmicutes</i> (<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i>), <i>Actinobacteria</i> (<i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i>)	(Shin et al., 2015)
Habitations	Aerocollecteur	Séquençage Illumina	<i>Actinobacteria</i> (<i>Acinetomycetales</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Bacillales</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Pseudomonadales</i>)	(Emerson et al., 2017)
Poussières				
Chambres, bureaux, classes	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Culture	<i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcaceae</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Enterococcaceae</i>)	(Bouillard et al., 2005)
Maisons de retraite	Aspirateur	Séquençage Sanger	<i>Actinobacteria</i> (<i>Corynebacterium</i> , <i>Propionibacterium</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>)	(Rintala et al., 2008)
Habitations	Aspirateur	Séquençage Sanger	<i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>) <i>Actinobacteria</i> (<i>Corynebacterium</i> , <i>Propionibacterium</i>), <i>Proteobacteria</i>	(Täubel et al., 2009)
Classe d'université	Echantillonneur par aspiration sur filtre	Pyroséquençage 454	<i>Actinobacteria</i> (<i>Propionibacteriaceae</i> , <i>Micrococccineae</i>), γ - <i>proteobacteria</i> (<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Chryseomonas</i>), α - <i>proteobacteria</i> (<i>Sphingomonas</i> , <i>Acinetobacter</i>)	(Hospodsky et al., 2012)
Surfaces du bâtiment				
Tables, photocopieurs, etc.	Gélose contact	Culture	<i>Actinobacteria</i> (<i>Micrococcus</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Staphylococcus</i>), α - <i>proteobacteria</i> (<i>Agrobacterium</i> , <i>Methylobacterium</i>)	(Bouillard et al., 2005)
Habitations	Ecouvillons	Séquençage Illumina	<i>Actinobacteria</i> , <i>Bacilli</i> , <i>Clostridia</i> , α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i>	(Dunn et al., 2013)

Lors des différentes études portant sur la flore microbienne intérieure, les bactéries détectées appartiennent essentiellement aux phylums suivants (Adams et al., 2014; Bouillard et al., 2005; Dunn et al., 2013; Emerson et al., 2017; Fierer et al., 2008; Hospodsky et al., 2012; Kembel et al., 2012; Rintala et al., 2008; Shin et al., 2015; Täubel et al., 2009) :

- i) *β -proteobacteria*
- ii) *γ -proteobacteria* : *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*)

- iii) *α-proteobacteria* : *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*), *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*)
- iv) *Actinobacteria* : *Propionibacterineae* (*Propionibacterium*), *Micrococcineae* (*Micrococcus*, *Kocuria*, *Arthrobacter*), *Corynebacterineae* (*Corynebacterium*)
- v) *Firmicutes* : *Bacillaceae* (*Bacillus*), *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus*), *Streptococcaceae* (*Streptococcus*)

Suivant les études, différents taxons sont détectés majoritairement dans les prélèvements d'air et de surface. Par exemple, les classes *Actinomycetales*, *Bacillales* et *Pseudomonadales* seraient majoritaires dans les habitats (Emerson et al., 2017). Dans l'étude de Shin *et al.* (2015), les espèces relatives à la flore humaine comme *Micrococcus* sp. et *Staphylococcus* sp. sont principalement détectées, mais avec certaines espèces environnementales comme *Paracoccus* sp. et *Methylobacterium* sp.. En observant différentes pièces de résidences, Adams *et al.* (2014) ont pu montrer une corrélation entre la flore humaine (*γ-proteobacteria*, *Corynebacterineae*, *Propionibacterineae*, *Streptomycetaceae*, *Bacilli*, etc.) et les pièces intérieures, et un lien entre les flores issues de sources extérieures (*α-proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Deinococci*, etc.) comme le sol ou des feuilles, et les zones externes de l'habitation (balcon). Dans l'ensemble, les bactéries présentes dans l'environnement intérieur seraient donc issues d'une combinaison de flores commensales de l'homme et de flores de l'environnement extérieur. Les proportions des différents taxons varient en fonction de nombreux facteurs comme l'aération, le traitement de l'air ou l'occupation des locaux.

Facteurs de variation des communautés microbiennes intérieures

La composition et la diversité des communautés microbiennes sont influencées par un large panel de facteurs biotiques et abiotiques.

L'ensemble de ces facteurs rend la flore de chaque site souvent spécifique à un bâtiment voire un point du bâtiment, à un instant donné. Dans leur étude sur les communautés bactériennes chez 7 familles américaines durant 6 semaines (prélèvements de peau et de surface de l'habitation), Lax *et al.* (2014) ont mis en évidence que les prélèvements de différents sites (cuisine, salle de bains, etc.) au sein d'une même maison étaient moins différents que les prélèvements d'un même site dans plusieurs maisons différentes. Cette variabilité inter-bâtiment a été confirmée dans d'autres études, avec des flores microbiennes dans les habitats très variables d'une habitation à l'autre (Emerson et al., 2017; Tringe et al., 2005). Dans le cas des flores bactériennes, cette spécificité de site peut être en partie

expliquée par le fait que la majorité des bactéries provient des individus présents dans la construction, chacun ayant une flore commensale et des modes de dissémination/maîtrise des flores spécifiques. De plus, des différences significatives ont été observées entre les flores des environnements extérieurs urbains et ruraux (Bowers et al., 2013). Pour ce qui est des flores fongiques, la localisation géographique semble avoir un impact très important sur la composition des communautés de l'air extérieur (Barberán et al., 2015). Dans la mesure où les champignons de l'intérieur proviennent en grande partie de l'extérieur, cette variabilité géographique peut se retrouver dans les flores de l'habitat (Adams et al., 2013c; Amend et al., 2010a).

L'architecture du bâtiment, comme la présence de ventilation, joue un rôle significatif dans la structure des communautés microbiennes intérieures (Kembel et al., 2012, 2014; Lax et al., 2014). Egalement, le type de surface dans le bâtiment a une influence sur la flore bactérienne qui s'y développera (Flores et al., 2011). Celles-ci peuvent être différentes au sein d'une même construction, suivant la fonction de la pièce (Kembel et al., 2014). Par exemple, les bactéries associées à la flore de l'homme sont plus fortement corrélées aux pièces avec une forte activité humaine, tandis que les bactéries d'origine environnementale sont plus présentes dans les lieux ouverts vers l'extérieur ou avec peu de présence humaine. L'occupation humaine augmente la présence des taxons spécifiques à son microbiote, mais la flore de l'air intérieur tend vers le profil de l'air extérieur lorsque l'environnement est bien ventilé, qu'il y ait une occupation humaine ou non (Meadow et al., 2014b). Le taux de renouvellement de l'air influence donc de manière significative la composition microbienne de l'habitat (Kembel et al., 2012). Le lieu de prélèvement (pièce, surface, etc.), l'aération et la présence humaine ont donc un rôle important dans le profil microbien qui est observé (Dunn et al., 2013; Flores et al., 2013; Hewitt et al., 2012). Dans d'autres cas, aucune variation significative n'est observée entre les différentes pièces, et ce malgré des différences d'usage et d'humidité (Adams et al., 2013c).

En plus d'une variabilité importante entre les différents sites géographiques et au sein des habitations, les communautés microbiennes présentes dans les habitats ne sont pas équivalentes au cours du temps. Par exemple, les flores bactériennes de l'air intérieur peuvent connaître de fortes variabilités au sein d'une habitation sur de courtes durées, de l'ordre de quelques semaines, ainsi que sur des périodes plus longues (1 an), notamment à travers les saisons (Emerson et al., 2017; Fierer et al., 2008; Meadow et al., 2014b; Rintala et al., 2008).

De la même manière, la diversité des spores fongiques à l'intérieur des bâtiments varie en fonction des saisons, que cela soit sur un plan quantitatif ou qualitatif (Adams et al., 2013c; Fierer et al., 2008; Shelton et al., 2002). Pitkäranta *et al.* (2008) notent par exemple une plus forte abondance des taxons de levures dans les poussières intérieures en hiver, et des champignons filamenteux en été. A l'extérieur, les communautés microbiennes ont été observées comme étant plus différentes entre les saisons qu'au sein d'une même saison (Bowers et al., 2011, 2013). Les changements d'humidité relative et de température au sein de l'habitat sont souvent corrélés à des modifications de la flore microbienne intérieure (Dannemiller et al., 2014a; Frankel et al., 2012; Hyvärinen et al., 2002; Kembel et al., 2012; Pitkäranta et al., 2011; Sordillo et al., 2011). L'occupation de l'habitat influence également les dynamiques de flores en surface et dans l'air. L'activité humaine conduit à une remise en suspension des particules fongiques et des microorganismes dans l'air (Ferro et al., 2004; Qian et al., 2014), et à une diminution des flores commensales de l'homme lorsqu'un lieu devient inoccupé (Lax et al., 2014). A l'inverse, une plus forte concentration microbienne est donc détectée dans l'air lorsque les locaux sont occupés (Hospodsky et al., 2012, 2015; Qian et al., 2008). Le rôle des animaux dans la structure des communautés microbiennes de l'habitat a notamment été rapporté dans d'autres études (Dunn et al., 2013; Fujimura et al., 2010).

L'ensemble de ces facteurs témoigne des interactions complexes entre les caractéristiques physiques, environnementales et écologiques de ces écosystèmes. Le prélèvement sur une seule période de temps n'est pas toujours suffisant pour être informatif sur les microorganismes auxquels les habitants sont exposés tout au long de l'année, voire tout au long de leur vie.

Parmi les genres bactériens et fongiques détectés dans des habitats à priori sans problèmes sanitaires, certains font tout de même partie de la liste des microorganismes potentiellement nocifs, du fait de leur production de toxines et d'allergènes (ASEF, 2012; Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006; Reboux et al., 2010). Toutefois, c'est lorsque le bâtiment présente des conditions d'humidité excessives que le risque sanitaire est le plus élevé.

2.3.2.3. Flore microbienne dans les habitats humides

Sous certaines circonstances, il est possible que les bâtiments subissent des dégâts des eaux, causés par une fuite d'eau par le toit, une plomberie défectueuse, ou une forte condensation, entraînant alors une humidité intérieure très élevée et incontrôlée (Gravesen et al., 1999). Les phénomènes de moisissures dans les locaux apparaissent très souvent suite à ces accidents, avec des symptômes reconnaissables (odeurs de moisi, moisissures apparentes) présentant des risques sanitaires pour les occupants (Mendell et al., 2011). C'est pourquoi de nombreuses études ont cherché à caractériser les flores bactériennes et surtout fongiques se développant en conditions de forte humidité dans le bâtiment.

L'humidité est un facteur primordial induisant le passage des microorganismes en phase active de multiplication. Une humidité croissante conduit à une augmentation de leur concentration et de leur richesse à la surface des matériaux de construction (Andersson et al., 1997; Boutin-Forzano et al., 2004; Santucci et al., 2007) et dans les poussières du sol des habitations (Dannemiller et al., 2014a, 2016b; Kettleson et al., 2015; Pitkäranta et al., 2011). Dans le cas des bactéries, Kettleson *et al.* (2015) n'ont pas observé de modification de la richesse ou de la diversité de ces communautés dans les bâtiments ayant subi des dégâts des eaux. L'absence de corrélation entre l'augmentation de l'abondance de la flore fongique et la flore bactérienne peut être expliquée par le fait que le développement des champignons nécessite une activité de l'eau a_w moins haute que pour les bactéries (Pastuszka et al., 2000). A l'inverse, d'autres études ont montré que certains taxons bactériens étaient détectés de manière plus importante dans les maisons fortement humides que dans les maisons saines (Kettleson et al., 2013; Rintala et al., 2004). D'autres paramètres, comme les conditions d'humidité et le type de matériau, peuvent rendre certains champignons plus invasifs que d'autres (Nielsen et al., 2004; Pasanen et al., 1992a). Cette modification de la flore intérieure perdure dans le temps, les communautés bactériennes et fongiques restant toujours altérées suite aux dégâts des eaux même après une réhabilitation du bâtiment (élimination des traces visibles du dégât des eaux, retour à une humidité relative intérieure intermédiaire) (Emerson et al., 2015). Cette subsistance des microorganismes associés aux dégâts des eaux présente alors un risque de re-prolifération si des conditions favorables sont de nouveau rencontrées.

Différents taxons bactériens et fongiques ont été détectés dans les bâtiments ayant subi des dégâts des eaux (Tableau 2.6). En utilisant des approches par culture, il a été montré que les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont les plus associés à un excès d'humidité dans le

Chapitre 2 – Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

bâtiment, et en particulier les espèces *Penicillium chrysogenum* et *Aspergillus versicolor* (Andersen et al., 2011; Andersson et al., 1997; Gravesen et al., 1999; Niemeier et al., 2006; Reboux et al., 2009). En plus de ces deux genres, d'autres champignons filamenteux comme *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium* et *Stachybotrys* sont également régulièrement détectés dans ces environnements. Les approches de biologie moléculaire ont confirmé l'abondance majoritaire des genres *Penicillium* et *Aspergillus* dans les bâtiments ayant subi des dégâts des eaux (An and Yamamoto, 2016; Dannemiller et al., 2017; Emerson et al., 2015).

Tableau 2.6 : Principaux taxons microbiens détectés dans différents environnements de l'habitat intérieur humide (air, poussières, surfaces) définis selon la littérature.

Environnement	Méthode de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectés	Références
Champignons				
Air intérieur				
Classes d'écoles	Aerobiocollecteur 2 étages	Culture	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>)	(Cooley et al., 1998)
Habitations	Aerocollecteur par impaction	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Dothideomycetes</i> (<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium cladosporoides</i>), <i>Mucoromycotina</i> (<i>Absidia</i>))	(Pastuszka et al., 2000)
Habitations	Aerocollecteur	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>)	(Niemeier et al., 2006)
Habitations	Collecteur impacteur	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>), Levures	(Reboux et al., 2009)
Poussières				
Bureaux	Aspirateur	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Chaetomium</i> , <i>Stachybotrys</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Ulocladium</i> , <i>Cladosporium</i>)	(Chao et al., 2002)
Habitations	Aspirateur	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Fusarium</i>), <i>Mucoromycotina</i> (<i>Mucor</i>)	(Niemeier et al., 2006)
Bureaux	Aspirateur	Séquençage Sanger	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>)	(Pitkäranta et al., 2011)
Habitations	Sédimentation dans une boîte de Petri	Séquençage Illumina	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>)	(Emerson et al., 2015)
Habitations	Fragments de tapis + Aspirateur	Séquençage Illumina	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Wallemiomycetes</i> (<i>Wallemia</i>)	(Dannemiller et al., 2017)
Surfaces du bâtiment				
Garderie	Echantillonnage par fragments	Culture	<i>Sordariomycetes</i> (<i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Chaetomium globosum</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium herbarum</i> et <i>sphaerospermum</i>), <i>Mucoromycotina</i> (<i>Mucor</i>)	(Andersson et al., 1997)
Bâtiments publics (écoles, garderies, etc.)	Géloses contact, Adhésif	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Chaetomium</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Ulocladium</i>)	(Gravesen et al., 1999)
Habitations	Ecouvillons	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>)	(Niemeier et al., 2006)
Habitations	Ecouvillons	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i>), Levures,	(Reboux et al., 2009)
Habitations, bâtiments publics	Géloses contact	Culture	<i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>), <i>Sordariomycetes</i> (<i>Chaetomium</i> , <i>Acremonium</i>), <i>Dothideomycetes</i> (<i>Ulocladium</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>)	(Andersen et al., 2011)
Habitations	Ecouvillons	Séquençage Illumina	<i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Crivellia</i>), <i>Microbotryomycetes</i> (<i>Rhodotorula</i>), <i>Tremellomycetes</i> (<i>Cryptococcus</i>), <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus</i>)	(An and Yamamoto, 2016)

Chapitre 2 – Etude bibliographique : la flore microbienne associée aux constructions en terre crue

Environnement	Méthode de prélèvement	Méthode d'identification	Principaux taxons détectés	Références
Bactéries				
Poussières				
Habitations	Sédimentation dans une boîte de Petri	Séquençage Illumina	<i>γ-proteobacteria</i> (<i>Moraxellaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>)	(Emerson et al., 2015)
Surfaces du bâtiment				
Garderie	Echantillonnage par fragments	Culture	<i>α-proteobacteria</i> (<i>Agrobacterium</i> , <i>Caulobacter</i>), <i>Actinobacteria</i> (<i>Mycobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Micrococcus</i>), <i>Bacilli</i> (<i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> et <i>amyloliquefaciens</i>)	(Andersson et al., 1997)

Tout comme dans le cas le cas des environnements intérieurs sains, certaines études ont établi des corrélations entre la localisation du prélèvement (sol, murs, type de pièce, etc.) et la flore microbienne présente dans les bâtiments fortement humides (Bellanger et al., 2009; Reboux et al., 2009; Santucci et al., 2007). En plus de cette variabilité locale, le type de matériau étudié joue également un rôle important dans la composition de la flore fongique qui s'y développe en condition humide (An and Yamamoto, 2016; Andersen et al., 2011; Andersson et al., 1997; Doll, 2002; Hyvärinen et al., 2002; Pasanen et al., 1992a). Dans leur étude, Andersen *et al.* (2011) ont montré que des matériaux comme le plâtre ou le papier peint sont favorables au développement d'*Acremonium*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys*, *Ulocladium*, et pas d'*Aspergillus niger*. Dans le cas du bois ou du contreplaqué, la prolifération d'*Arthrini* *phaeospermum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma* et de levures a pu être observée. Ces résultats ont été confirmés dans d'autres études (Paic Lacaze, 2016). Enfin, les flores se développant sur les bétons humides appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Mucor* et *Penicillium*, qui sont des flores souvent détectées dans les poussières et le sol. Cela suggère que ces champignons seraient apportés par la saleté et, en étant capables de supporter les conditions modérément alcalines du béton carbonaté, seraient capables de se développer à la surface de celui-ci quand les conditions d'humidité le permettent. D'une manière générale *Penicillium* est le genre le plus retrouvé, quel que soit le matériau, tandis que le genre *Aspergillus* est souvent détecté sur des matériaux céramiques (béton, plâtre, etc.), sur les peintures et sur les colles. Le genre *Stachybotrys* est fortement présent sur les plâtres humides, en particulier les espèces *S. chartarum* et *S. chlorohalonata* (Andersen et al., 2003). D'autres genres fongiques, comme *Acremonium* (*A. strictum*), *Chaetomium* (*C. globosum*) et *Trichoderma* (*T. harzianum*), peuvent, dans une moindre mesure, proliférer en condition de forte humidité. Enfin, les zones du matériau de construction où le mycélium fongique est visible présentent très souvent une diversité fongique plus faible (An and Yamamoto, 2016). Le développement important d'un

champignon conduirait en partie à la monopolisation des ressources de l'écosystème par ce champignon, diminuant de fait la présence ou la détection d'une partie des flores minoritaires. Toutefois, il n'existe pas de profil type de flore issue d'une condition de forte humidité. Dans ses travaux, Paic Lacaze (2016) a mis en évidence la succession des microorganismes se développant sur des matériaux de construction dans ce type de condition. Par exemple, la production de composés azotés par des bactéries initialement présentes permettrait le développement par la suite de certains champignons. De nombreux facteurs seraient impliqués dans la dynamique de colonisation d'un support, comme la nature du matériau, ses propriétés physico-chimiques, les conditions environnementales ambiantes ou encore les communautés microbiennes présentes, notamment à travers les interactions néfastes entre microorganismes (champignons – champignons ou bactéries – champignons) avec la production de molécules antagonistes.

Pour les bactéries, les organismes majoritairement identifiés sur des zones humides dans les bâtiments sont des bactéries à Gram positif (Rintala et al., 2008) et en particulier des *Actinobacteria*, comme *Streptomyces* (Rintala et al., 2002, 2004), et des mycobactéries (Andersson et al., 1997; Torvinen et al., 2006). De plus, le type de communauté bactérienne sur les surfaces humides intérieures est très souvent relié à la contamination fongique (Hyvärinen et al., 2002; Pitkäranta et al., 2008; Torvinen et al., 2006).

Dans certaines conditions environnementales, les microorganismes présents dans l'habitat peuvent se développer de manière importante. Cela peut par la suite conduire à une dégradation de la qualité de l'air, et impliquer alors des risques pour la santé des habitants.

2.3.3. Qualité de l'air et impacts sanitaires

2.3.3.1. Enjeux de la qualité de l'air

Actuellement, les humains passent plus de 80 % de leur temps à l'intérieur des bâtiments (Brasche and Bischof, 2005; Höppe and Martinac, 1998). Dans leur étude, Kirchner *et al.* (2011) ont suivi le temps de présence des individus au sein de leur logement. Bien que ces données varient suivant l'âge, le sexe ou l'activité des personnes, les habitants passeraient en moyenne 16 h par jour dans leur maison, dont 39 % du temps dans la pièce à coucher, 12 % dans le séjour et 11 % dans la cuisine. Si le temps de travail ou d'école est additionné, c'est au total entre 20 à 22 heures sur 24 qui sont passées dans des lieux intérieurs. Au sein d'un environnement clos, les occupants peuvent être exposés à une grande variété d'agents physiques et de contaminants chimiques ou microbiologiques, parfois sur de très longues

durées. Les effets de ces composants sur la santé dépendent de nombreux facteurs comme le temps d'exposition, les prédispositions génétiques, les facteurs socio-économiques ou encore les paramètres environnementaux. Bien qu'il existe une forte médiatisation de la pollution de l'air extérieur et de son impact sur la santé, cette sensibilisation est moins importante pour l'enjeu sanitaire que représente la pollution de l'air intérieur alors que le temps passé à son contact est bien plus important.

L'impact de l'air intérieur sur la santé des occupants est une problématique qui s'est développée depuis une quarantaine d'années dans les pays industrialisés. L'expression « Air intérieur » a fait son apparition dans les années 70 et témoigne d'une prise de conscience du danger que peut représenter une mauvaise gestion de l'environnement à l'intérieur de l'habitat. Différents cas cliniques ont appuyé l'enjeu de l'air intérieur, comme l'utilisation de mousse urée-formol aux Etats-Unis qui a conduit à une contamination par du formaldéhyde des habitants de ces bâtiments (Marbury and Krieger, 1991). Ainsi, une revue scientifique spécialisée sur cette thématique, *Indoor Air*, fut fondée en 1991, démontrant l'intérêt grandissant pour ces problématiques. La qualité de l'air intérieur est donc devenue depuis ces dernières décennies une problématique de santé publique majeure (Krieger and Higgins, 2002). De nombreuses études ont tenté d'évaluer l'importance et les risques sanitaires que représente la pollution intérieure, ainsi que de l'impact économique de ce danger. Dans une étude exploratoire menée par l'ANSES, l'OQAI et le CSTB, les auteurs se sont intéressés aux coûts socio-économiques que représente la pollution intérieure par différents polluants (benzène, radon, trichloréthylène, monoxyde de carbone, particules et fumée de tabac) ; ceux-ci représenteraient une somme de 19,6 milliards d'euros par an, évaluée en se basant sur les coûts de mortalité (8,9 milliards), de qualité de vie (8,9 milliards), de perte de production (1,6 milliard), de soins (360 millions), de recherche (11 million) ou encore sur le gain des retraites non versées (209 millions) (ANSES et al., 2014). Les problématiques de qualité de l'air intérieur ont un impact sanitaire et économique très important, il est donc essentiel de bien définir les sources de pollution induisant des risques pour la santé des habitants.

2.3.3.2. Typologie de la pollution intérieure

Un polluant de l'air correspond à toute matière, quel que soit son état (solide/liquide/gaz, poussière/gouttelettes, etc.), en suspension dans l'air et pouvant donc être inhalée par les individus. Bien que les principaux contaminants de l'air extérieur soient souvent identifiés et étudiés, les contaminants relatifs à l'air intérieur ne sont pas toujours bien définis, malgré le

fait qu'ils soient en contact avec l'homme sur des durées plus importantes (Kirchner et al., 2011).

De nombreux paramètres sont à prendre en compte lors de l'étude des contaminants aériens. Il est possible de distinguer deux principaux modes d'actions : i) les polluants dont les effets apparaissent suite à de courtes expositions et à de fortes concentrations, provoquant des irritations de la peau et des muqueuses respiratoires ou encore des nausées ; ii) les polluants dont les effets ne se manifestent qu'à la suite d'une exposition longue et généralement à une faible concentration, étant à l'origine par exemple de pathologies respiratoires, neurologiques, cardiovasculaires, voire cancéreuses. La diffusion des polluants au sein de l'air intérieur varie suivant l'hygrométrie ambiante, induisant ainsi une modification de leur présence dans l'air suivant les saisons. Un autre facteur essentiel dans la qualité de l'air est l'aération de l'environnement. En effet, une aération régulière permet un renouvellement de l'air intérieur par de l'air extérieur et ainsi une probable diminution des polluants dans l'habitat ou du moins une limitation de leurs concentrations dans les locaux. Elle permet également de réguler plus efficacement l'humidité au sein de l'habitat, et donc d'éviter la condensation de vapeurs d'eau sur une surface, pouvant conduire au développement de moisissures.

Parmi l'ensemble des matières présentes en suspension dans l'air, il est possible de distinguer les catégories de polluants suivantes (Kirchner et al., 2011) :

- Les polluants chimiques : monoxyde de carbone, composés organiques volatils (COV), aldéhydes ou encore plomb. Ces composés sont reliés à des pathologies dont les effets sont bien identifiés, comme l'irritation des yeux ou des voies respiratoires en présence de COV ou d'aldéhydes, le développement de pathologies respiratoires suite à l'exposition aux particules et oxydes d'azote ou encore le développement de cancers suite à l'inhalation de benzène ou de formaldéhyde (Viegi et al., 2004).
- Les polluants physiques : radon, amiante, etc. L'inhalation de particules de radon ou d'amiante peut conduire à des développements de cancer du poumon (Bourdès et al., 2000).
- Les polluants biologiques : allergènes domestiques (acariens, chat, chien, etc.) et plus particulièrement les polluants microbiologiques, correspondant aux champignons et bactéries et à leurs métabolites. Les impacts de ces derniers sur la santé sont nombreux, allant de développements d'allergies et d'asthmes suite à l'inhalation de

COV d'origine microbienne à des toxi-infections ou des irritations respiratoires causées par des mycotoxines (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006). Les polluants biologiques incluent également les virus présents dans l'air, essentiellement d'origine humaine et pouvant causer des pathologies infectieuses (grippe, rhume, rougeole, etc.). Les réservoirs biologiques de la microflore intérieure sont principalement les moquettes, revêtements muraux, matériaux d'isolation, installations sanitaires, circuits de distribution de l'eau et systèmes de climatisation et de ventilation. Dans l'air, les microorganismes sont souvent adhérents aux particules de poussières et de saletés ou présents dans les gouttelettes émises par les éternuements et la toux (gouttes de Pflügge), et ils parviennent à se stabiliser notamment grâce à l'humidité contenue dans les gouttes d'aérosols.

L'air intérieur est donc susceptible de contenir une diversité de particules polluantes, avec des impacts plus ou moins importants sur la santé des habitants. Les sources de ces contaminants peuvent être nombreuses : une partie des contaminants est apportée par l'air extérieur comme les gaz d'échappement (Chikara et al., 2009) ; la composition des matériaux de construction conventionnels peut également être liée à la présence de produits chimiques et de métaux lourds, pouvant impliquer par la suite des problèmes de santé chez les habitants ; enfin, la présence et le développement de microorganismes à l'intérieur de l'habitat peut conduire à une pollution biologique.

Dans certaines conditions, les occupants peuvent présenter des symptômes médicaux (irritations des yeux, de la peau ou des voies respiratoires, troubles de la concentration, maux de tête, etc.) reliés à l'ensemble de leur environnement intérieur. Ce phénomène complexe est nommé Syndrome du Bâtiment Malsain (SBM) (Norbäck, 2009), et provient d'une combinaison de facteurs environnementaux (COV, biocontaminants, bruits, lumière trop faible, etc.), socio-professionnels (organisation du travail, etc.) et psychologiques. Bien que les polluants de l'air intérieur ne soient pas la seule cause de SBM, ils y contribuent fortement. L'humidité et le développement de moisissures sont très souvent impliqués dans l'augmentation du SBM (Crook and Burton, 2010) et la contamination microbienne est un facteur majeur de la pollution de l'air intérieur.

2.3.3.3. Développement microbien et pollution de l'air intérieur

Le développement de microorganismes au sein du bâtiment est une problématique répandue à travers le monde. Différents travaux ont tenté d'évaluer l'étendue des habitats

touchés par les moisissures. En France, près de 37% des logements présenteraient une contamination fongique, avec 15% des habitations ayant des moisissures visibles (Kirchner et al., 2011). Si on étend l'observation à l'ensemble de l'Europe du Nord et de l'Amérique du Nord, le taux de bâtiments contaminés par des moisissures serait compris entre 20 et 40 % (Brunekreef et al., 1989; Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2006; Spengler et al., 1994). Lors d'une grande étude publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (2009), il est estimé que le problème d'humidité, conduisant à l'apparition de champignons, toucherait entre 10 à 50 % des bâtiments en Australie, en Europe, en Inde, au Japon et en Amérique du Nord, avec des variations suivant le climat des pays.

2.3.3.3.1. Conditions environnementales de prolifération des microorganismes au sein du bâtiment

Les microorganismes impliqués dans les problèmes d'air intérieur peuvent être soit d'origine humaine ou extérieure, soit présents dans l'air suite à une prolifération sur les surfaces intérieures de l'habitat. Dans ce dernier cas, ils se développent sur des surfaces et, lors des stades avancés de leur croissance, relarguent des cellules/spores ou/et des composés pouvant affecter la santé des occupants. Si les colonisations microbiennes sont visibles à l'œil nu, il y a alors d'importants risques de relargage de spores dans l'air, et il est donc important de connaître les facteurs ayant conduit à cette prolifération. La principale catégorie de microorganismes impliqués dans les problèmes d'air intérieur suite à des proliférations correspond aux moisissures. Ces champignons microscopiques nécessitent la présence d'eau, de substrats carbonés et de minéraux pour se développer (Botton et al., 1990). Dans l'environnement intérieur d'une habitation, ils peuvent croître directement sur la nourriture, sur le bois ou encore le papier peint. En plus d'une source de nutriments, ces microorganismes ont besoin de conditions environnementales particulières pour assurer leur croissance. De nombreuses études se sont intéressées au développement fongique à la surface des matériaux de construction et ont tenté de modéliser les conditions environnementales optimales de croissance sur ces supports (Hoang et al., 2010; Isaksson et al., 2010; Johansson et al., 2012, 2013; Latif et al., 2015; Nielsen et al., 2004; Pasanen et al., 2000; Ryu et al., 2015).

Humidité

L'activité de l'eau (a_w) est un élément clef dans le développement des moisissures, notamment dans l'habitat (Ayerst, 1969; Grant et al., 1989; Nielsen et al., 2004; Pasanen et al., 1992b). Elle correspond à la pression de vapeur d'eau d'un produit humide divisée par la

pression de vapeur saturante à la même température. Cette quantité correspond à l'eau disponible pour les réactions biochimiques, et par la même occasion utilisable par les microorganismes pour leur croissance.

De nombreuses études se sont intéressées à la relation entre l'activité de l'eau et la croissance des microorganismes (Corry, 1987; Gibson et al., 1994; Leong et al., 2006; Parra and Magan, 2004; Sautour et al., 2002). La croissance fongique peut être observée à partir d'une a_w de 0.7 (Brown, 1976; Pitt and Christian, 1968), mais le seuil minimum d'activité de l'eau varie en fonction des espèces de champignons (Grant et al., 1989). Pour la majorité des moisissures, le développement est possible à partir d'une a_w de 0.78 (Ayerst, 1969; Nielsen, 2002). Chez certaines espèces (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium* ou encore *Epicoccum*), une survie à des humidités faibles (a_w autour de 0.5) peut toutefois être observée sur 3 semaines (Park, 1982). Les moisissures possèdent donc des capacités de croissance différentes suivant les espèces. Certaines sont capables de se développer dans des environnements secs, et sont nommés xérophiles, tandis que d'autres nécessitent des milieux fortement humides, et sont appelées hydrophiles.

Dans la majorité des habitats, aucun problème d'HR n'est observé, limitant ainsi la croissance des microorganismes. Par exemple, si le taux d'humidité dans l'air reste en dessous de 70%, il n'y a pas de risque de développement de moisissures dans l'habitat (Hacker et al., 2005). Cependant, l'apparition de microorganismes et la colonisation des surfaces du bâtiment ont été reportées occasionnellement lorsque certains seuils d'humidité ont été atteints à l'intérieur du bâtiment (Andersen et al., 2011; Cooley et al., 1998; Johanning et al., 1996; Straus, 2011; Straus et al., 2003). Si l'activité de l'eau est supérieure à 0.75, cela implique des risques importants de développement fongique au sein de l'habitat (Viitanen et al., 2010). L'humidité relative minimum pour la croissance de moisissures est toutefois fortement dépendante du type de matériau de construction et de sa propre capacité de rétention d'eau (Johansson et al., 2005; Nielsen et al., 2004) : i) 70 % pour des matériaux à base de bois, ii) 85 % pour du plâtre et iii) 90 % à 95 % pour des matériaux cimentaires et des bétons. Lorsque le matériau n'est pas en condition humide (non imbibé), l'humidité relative nécessaire au développement de champignons est très élevée, de l'ordre de 85 à 95 %. A l'inverse, la présence d'eau liquide dans le matériau favorise fortement la croissance et la sporulation des microorganismes (Black and Straube, 2007; Doll, 2002; Pasanen et al., 1991, 1992b, 1992a). D'une manière plus générale, une humidité élevée et incontrôlée (HR entre 60 % et 90 %)

conduit au développement de moisissures à l'intérieur de la construction (Nielsen et al., 2004).

Les dégâts des eaux sont donc l'un des facteurs principaux du développement microbien à l'intérieur du bâtiment et peuvent avoir des origines variées (Andersen et al., 2011). L'humidité contenue dans l'air peut se condenser sur des surfaces plus froides que l'air ambiant, et alors former des zones avec de l'eau liquide, favorable à la croissance microbienne. Cette vapeur d'eau peut être produite par l'activité humaine (cuisine, lessive, douche, etc.) ou par le métabolisme du corps humain (respiration, transpiration). L'eau peut également provenir du sol (nappe phréatique, eaux d'infiltration, fuite de canalisations enterrées) et, par remontée capillaire par les fondations ou dans des murs poreux, humidifier la structure du bâtiment, et par la même occasion, l'air intérieur. Elle peut également être apportée lors d'intempéries comme des inondations, des fortes pluies ou des fontes de neiges. Des défauts dans la toiture ou dans les murs de l'habitation peuvent aussi conduire à une humidification importante et incontrôlée. Enfin, elle peut survenir lors de rupture de canalisation sous pression à l'intérieur du bâtiment. Les mesures d'humidité relative sont donc de bons indicateurs de la probable contamination microbienne, notamment pour les matériaux de construction dans les bâtiments ayant subi des dégâts des eaux (Boutin-Forzano et al., 2004; Pasanen et al., 2000).

Les bactéries sont également impliquées dans la pollution de l'air intérieur, et en particulier les bactéries à Gram négatif avec la production d'endotoxines. L'humidité est l'un des facteurs favorisant la présence d'importantes teneurs en endotoxines bactériennes dans l'air. A l'inverse, l'usage de déshumidificateur est associé à de faibles concentrations en endotoxines dans l'habitat (Rylander, 2002). L' a_w nécessaire à la croissance des bactéries est plus élevée que pour les champignons, de l'ordre de 0,91 (Rockland et al., 1987). L'impact des endotoxines sur la qualité de l'air intérieur reste toutefois moins étudié que celui des moisissures, car moins fréquemment évalué.

Température

Le second paramètre prépondérant dans le développement des microorganismes est la température. En fonction des espèces, les températures de croissance s'étendent globalement de 0 à 50°C (Ayerst, 1969; Sedlbauer, 2001). Dans la mesure où la majorité des bactéries et moisissures d'importance pour l'homme correspond à des espèces mésophiles, les températures optimales de croissance les plus répandues sont comprises entre 20°C et 30°C

(Adan and Samson, 2011; Grant et al., 1989; Magan and Lacey, 1984). Les températures optimales de croissance étant différentes suivant les espèces, la croissance microbienne peut être observée entre 10°C et 35°C au sein des bâtiments (Nielsen et al., 2004).

Oxygène

L'oxygène est un autre facteur influant sur le développement microbien. Il existe deux types de respiration, avec différents types de comportement par rapport à l'oxygène chez les microorganismes :

- Aérobie : les organismes dits aérobies présentent des chaînes d'oxydo-réduction utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Les moisissures se développent en condition aérobie.
- Anaérobie : le mécanisme respiratoire n'utilise pas le dioxygène comme accepteur final d'électrons, mais une substance minérale oxydée.
 - Les bactéries dites anaérobies-stricts sont détruites en présence d'oxygène du fait de la production d'H₂O₂ létal, en absence de capacité à dégrader ce composé.
 - Les microorganismes anaérobies facultatifs sont capables de fonctionner en aérobie ou anaérobie suivant la disponibilité du dioxygène dans l'environnement.

Dans la mesure où les supports au sein de la maison sur lesquels les moisissures et bactéries risquent de se développer (murs, sols, meubles, ...) sont toujours au contact de l'air ambiant, les microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs sont essentiellement retrouvés lorsqu'il y a un développement microbien dans le bâtiment. L'oxygène n'est donc pas un critère pris en compte lors des études de flore intérieure.

Au vu des comportements variés des microorganismes en fonction des différents paramètres environnementaux, les espèces se développant dans un environnement ou sur un support seront fortement dépendants de ces conditions. Dans le cas des contaminations de l'air dues à la prolifération de microorganismes sur des surfaces, différents modèles de développement des espèces fongiques sur des matériaux de construction en fonction de l'humidité relative et de la température ont donc été proposés (Clarke et al., 1999; Viitanen

and Ojanen, 2007). Néanmoins, d'autres caractéristiques sont également à prendre en compte pour ce type de contamination, et notamment les propriétés du support colonisé.

2.3.3.3.2. Impact des matériaux de construction sur la prolifération des microorganismes

En plus de paramètres environnementaux, les caractéristiques physico-chimiques du support sur lequel les moisissures sont susceptibles de se développer vont influencer leur croissance.

Composition du matériau

Dans le cas de la croissance des microorganismes, la composition chimique du substrat a une influence primordiale (Ayerst, 1969; Gutarowska, 2010; Hoang et al., 2010; Spengler and Chen, 2000). Selon sa composition, le matériau de construction peut être directement utilisé comme source de nutriments par les microorganismes (Lugauskas et al., 2003; Santucci et al., 2007; Vacher et al., 2010). Si le matériau contient de la cellulose, comme dans le cas des matériaux biosourcés avec des fibres végétales ou les matériaux à base de bois, cet effet sera encore plus prononcé. En effet, la cellulose représente une source carbonée facilement assimilable par certains microorganismes, et en particulier les champignons. Dans son étude, Gutarowska (2010) a mesuré le développement d'*Aspergillus niger*, de *Penicillium expansum* et *Penicillium chrysogenum* sur différents matériaux de construction associés à un milieu de culture. Les matériaux contenant de la cellulose (papier peint, plâtre en carton) étaient plus favorables au développement fongique que les autres (plâtres, ciments), notamment grâce aux cellulases produites par les champignons. A l'inverse, le fort pH du ciment ainsi que les composés inorganiques le composant ont limité la prolifération fongique. De même, Hoang et al (2010) ont étudié le développement de champignons sur des matériaux de construction verts et leur équivalents non verts, avec, dans ces deux catégories, certains matériaux contenant des matières organiques (planche en fibres de tournesol, parquet en bambou, planche en pin recyclé, parquet en bois). Les matériaux ont été inoculés soit artificiellement avec une suspension d'*Aspergillus niger* à la surface, soit naturellement en les exposant à l'environnement intérieur, puis ont été placés sous forte humidité (89 %). Dans les deux cas, les matériaux riches en cellulose ont présenté un développement fongique plus important par rapport aux matériaux inorganiques, qu'ils soient verts ou non. L'utilisation de ces matériaux organiques comme source de nutriments par les champignons les rendraient plus sensibles à la prolifération fongique. Les matériaux sans matière organique, comme les plâtres ou les

bétons, seront moins susceptibles d'être utilisés comme substrat (Grant et al., 1989; Gutarowska, 2010; Hoang et al., 2010). Cependant, des saletés et des poussières peuvent se trouver sur les surfaces intérieures des bâtiments et être alors utilisées comme une source de nutriments par les microorganismes. Des matériaux n'étant alors théoriquement pas sensibles à la prolifération microbienne peuvent ainsi présenter des mycéliums visibles (Hoang et al., 2010).

pH

Le pH du milieu est un autre facteur influant sur le développement des microorganismes, avec différents pH optimaux suivant les espèces (Garraway and Evans, 1991). La majorité des germes se développent à des pH relativement peu acides / neutres, entre 4 et 7, ce qui rend les matériaux ayant un pH dans cette gamme plus sensibles aux microorganismes. A l'inverse, les matériaux au pH alcalin entre 12 et 13, comme les matériaux cimentaires au jeune âge, sont bien moins susceptibles de présenter des développements microbiens (Verdier et al., 2014). Cependant avec le temps, le processus de carbonatation à la surface des matériaux (formation de calcite par réaction du CO₂ de l'air avec le calcium contenu dans la matrice cimentaire, en présence d'eau) conduit à une diminution du pH jusqu'à 9, rendant la surface du matériau de construction plus favorable au développement microbien (Shirakawa et al., 2002; Wiktor et al., 2009; Wilimzig and Bock, 1994). Certaines espèces bactériennes et fongiques ont toutefois une tolérance ou affinité pour les milieux à forts pH, et peuvent se développer malgré des conditions très stringentes (Sedlbauer, 2001). Par exemple, certaines bactéries alcalophiles peuvent être incorporées dans le béton afin d'en réparer les micro-fissures (Jonkers et al., 2010).

Rugosité / Porosité

Enfin, l'état de surface des matériaux a également un fort impact sur la capacité des microorganismes à coloniser un environnement et à s'y développer. Sur les matériaux de construction, deux paramètres sont principalement pris en compte : la porosité et la rugosité. Ces caractéristiques vont intervenir à la fois sur l'absorption de l'eau et sur l'accumulation de nutriments à la surface (D'Orazio et al., 2014; Gutarowska, 2010; Hoang et al., 2010) mais également sur l'adhésion des microorganismes dans les aspérités du matériau (Deruelle, 1991; D'Orazio et al., 2014; Tran et al., 2012). Dans le cas des matériaux de construction, les surfaces ont très souvent une forte porosité et rugosité. Dans un environnement avec une importante humidité ambiante, les matériaux à forte porosité captent l'eau de l'air (Hoang et

al., 2010). La poussière et les nutriments se déposent et adhèrent plus facilement sur des surfaces à forte porosité et rugosité (Lugauskas et al., 2003; Van den Bulcke et al., 2007). Ces deux facteurs favorisent alors le développement microbien en surface.

De nombreux facteurs sont impliqués dans le développement microbien au sein d'un bâtiment. Les conditions environnementales et les caractéristiques du matériau colonisé (composition, propriété de surface, etc.) sont des critères essentiels pour la croissance des bactéries et champignons. Lorsque des conditions favorables sont rencontrées dans une construction, les microorganismes peuvent proliférer et relarguer dans l'air de multiples composés ou éléments cellulaires nocifs pour les habitants.

2.3.3.4. Impacts de la détérioration de la qualité de l'air intérieur par les microorganismes sur la santé des occupants

Les problématiques liées à la croissance de moisissures et de bactéries à l'intérieur des bâtiments sont actuellement un enjeu sanitaire majeur. En 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé a émis un rapport établissant que les preuves épidémiologiques étaient suffisantes pour établir une corrélation entre l'occupation d'un bâtiment humide et/ou avec présence de moisissures et le développement de problèmes respiratoires, d'asthme, d'allergies ou d'infections (World Health Organization, 2009). Plusieurs études soutiennent ce lien positif entre les expositions aux champignons et l'apparition de pathologies respiratoires chez les occupants (Brunekreef et al., 1989; Clark et al., 2004; Garrett et al., 1998; Mendell et al., 2011). Comme présenté précédemment, l'humidité a une influence capitale sur la croissance, ce qui conduit à une forte corrélation entre l'humidité présente dans le bâtiment et les risques pour la santé des habitants (Fisk et al., 2007; Jacobs et al., 2014; Mendell et al., 2011). Par exemple, dans leur étude sur les logements en milieu rural en France, Hulin *et al.* (2013) mettent en avant une association entre l'indice de contamination fongique, déterminé par la présence visuelle de mycélium ou la détection de COV dans l'air, et le développement de maladies respiratoires. Dans leur méta-analyse, Mendell *et al.* ont comparé 17 travaux sur l'exposition fongique et l'asthme (2011). Les auteurs ont finalement établi une corrélation entre développement de l'asthme et forte humidité intérieure / présence de moisissures. Il est donc établi qu'une forte humidité, conduisant au développement de moisissures dans le bâtiment et au relargage de composés fongiques nocifs, provoque des maladies respiratoires (Baxi et al., 2016).

Plusieurs types de composés sont relargués lors de la croissance des moisissures. Les fragments de mycélium ou les spores comportent des composés pariétaux, comme les bêta (1-3)-glucanes. Certaines espèces fongiques produisent lors de leur développement des métabolites spécifiques pouvant avoir des effets cytotoxiques et immunotoxiques, nommés mycotoxines (Robbins et al., 2000). Celles-ci sont détectées dans les spores fongiques, le mycélium, le support de prolifération du champignon ou dans les poussières environnantes. Enfin, des composés organiques volatils d'origine microbienne (mCOV) sont spécifiquement émis au cours de la prolifération fongique.

Si les occupants sont soumis à une inhalation de ces particules et molécules, plusieurs pathologies respiratoires peuvent alors être induites. Trois principaux types de réactions peuvent être distingués : i) les réactions allergiques, ii) les effets irritatifs et toxiques et iii) les effets infectieux (ASEF, 2012).

Le développement d'allergies est un phénomène largement répandu. Les allergies causées par les plantes, les animaux et les champignons touchent plus de 30% de la population dans les pays industrialisés (Cramer et al., 2014). Dans le cas uniquement des allergies aux champignons, on estime qu'entre 3 et 10 % de la population globale seraient sensibles aux espèces fongiques (Horner et al., 1995). L'exposition aux allergènes relargués lors de la prolifération des moisissures (spores, composés pariétaux, COV, mycotoxines, etc.) peut provoquer l'apparition d'allergies, pouvant aller jusqu'à des réponses inflammatoires (asthme), voire des pathologies plus graves (par ex. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique) (Douwes et al., 2003; Ege et al., 2011; Fisk et al., 2007; Verhoeff and Burge, 1997; Verhoeff et al., 1995). Les phénomènes allergiques et asthmatiques liés aux moisissures peuvent apparaître aussi bien chez l'enfant (Jaakkola et al., 2010) que chez l'adulte (Karvala et al., 2010).

L'inhalation de certains composés fongiques produits dans l'habitat peut également conduire à des irritations et des toxi-infections (Bornehag et al., 2004; Dales et al., 1991; Husman, 1996; Peat et al., 1998; Peltola et al., 2001; Samson et al., 1994; Verhoeff and Burge, 1997). Les effets irritatifs peuvent concerner la muqueuse oculaire, nasale, bronchique et également la peau. Les symptômes cliniques les plus fréquents sont donc les rhino-conjonctivites, les irritations de l'oropharynx, les congestions nasales et les démangeaisons. Les bêta (1-3)-glucanes possèdent des propriétés pro-inflammatoires et sont impliqués dans des problèmes respiratoires chez les occupants. Les mycotoxines sont également responsables

d'inflammations des muqueuses nasales et oculaires et d'effets cytotoxiques (Miller et al., 2010; Rand et al., 2005, 2010; Robbins et al., 2000; Tuomi et al., 2000).

Enfin, dans certains cas, la prolifération des moisissures à l'intérieur de l'habitat peut conduire à des infections chez les occupants (Baxi et al., 2016). Par exemple, les sujets immunodéprimés peuvent développer des aspergilloses pulmonaires invasives. De plus, les mycotoxines peuvent altérer l'intégrité de la structure de l'épithélium pulmonaire, pouvant conduire à une colonisation par les moisissures des cavités alvéolaires. Elles peuvent alors faciliter les infections fongiques sur les personnes immunodéprimées ou faciliter des infections secondaires par leurs effets immunosuppresseurs.

Certains genres et espèces fongiques ont des impacts plus importants que d'autres dans les risques sur la santé des occupants. Les genres majoritairement impliqués dans les problèmes sanitaires sont *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* et *Trichoderma* (Andersen et al., 2011; Andersson et al., 1997; Jarvis, 2003; Mitchell et al., 2007; Nielsen et al., 1998b; Reboux et al., 2009; Tuomi et al., 2000). Dans leurs travaux, Simon-Nobbe *et al.* (2008) ont reporté près de 150 espèces fongiques allergisantes (Simon-Nobbe et al., 2008) (Simon-Nobbe et al., 2008) (Simon-Nobbe et al., 2008, p.) (Simon-Nobbe et al., 2008) [479, p.]. Certaines espèces d'*Alternaria*, d'*Aspergillus*, de *Candida*, de *Cladosporium*, d'*Epicoccum*, de *Penicillium* et de *Phoma* sont majoritairement associées à des productions d'allergènes (Simon-Nobbe et al., 2008; Vijay et al., 2005). Par exemple, *Aspergillus fumigatus* provoque chez l'adulte des réponses de type asthme avec des formes sévères et persistantes (Knutsen et al., 2012). *Alternaria* a été aussi décrit comme responsable d'asthmes sévères (O'Hollaren et al., 1991). Les spores de *Trichoderma* contiennent de grandes quantités de glucanes fongiques et de molécules actives (McMullin et al., 2017). De même, il a été démontré que *Chaetomium* sp. produisait de nombreux métabolites secondaires dans les environnements intérieurs, avec un risque pour les habitants (Došen et al., 2017). *Stachybotrys* produit plusieurs mycotoxines, et notamment des hémolysines, ce qui en fait un genre important à surveiller pour des raisons sanitaires (Hossain et al., 2004). Les pathologies développées suite à une exposition à la prolifération fongique peuvent donc varier (Jarvis and Morey, 2001; Lee, 2003), car causées par des flores fongiques diverses (Gravesen et al., 1999; Hyvärinen et al., 2002).

En ce qui concerne les bactéries, les effets néfastes sur la santé sont similaires à ceux évoqués pour les champignons. Le relargage de composés pariétaux de certaines bactéries dans l'air, ou la production de toxines, sont des causes potentielles de maladies respiratoires, d'intoxications voir d'infections (Douwes et al., 2003; Falkinham, 2009; Fields et al., 2002; Huttunen et al., 2003; Jussila et al., 2002). Les bactéries à Gram négatif sont les plus impliquées dans les problèmes d'air intérieur, principalement à travers le relargage dans l'air des endotoxines (Rylander, 1995, 2002). Les endotoxines correspondent aux lipopolysaccharides associés à la membrane externe, et ces composants sont donc spécifiques aux bactéries à Gram négatif. L'exposition à de fortes concentrations d'endotoxines peut alors provoquer une inflammation des muqueuses respiratoires et faire développer un syndrome de type grippal (« pneumonie toxique ») (Liebers et al., 2008). D'autres types de bactéries peuvent également intervenir dans la dégradation de la qualité de l'air, comme les mycobactéries (Torvinen et al., 2006) et les *Streptomyces* (Rintala et al., 2002, 2004).

La biodiversité microbienne semble également être un facteur impliqué dans les maladies allergiques. En comparant le développement de pathologies respiratoires entre des enfants habitant dans des régions ayant une forte diversité bactérienne (principalement environnement rural) à d'autres habitants dans des régions à faible biodiversité (principalement environnement urbain), ceux exposés à une grande diversité présentaient moins de problèmes de santé par la suite (Hanski et al., 2012; Ruokolainen et al., 2015). En effectuant des prélèvements sur 198 maisons d'enfants asthmatiques dans le sud de la Nouvelle-Angleterre, Dannemiller *et al.* (2016b) ont pu relier la richesse et la composition des communautés microbiennes à de nombreux facteurs comme la présence de fuites d'eau, le niveau d'urbanisation, la présence d'air conditionné ou encore la présence d'animaux. D'une manière générale, plus que la détection de certaines espèces, c'est la mesure d'une faible diversité fongique et/ou dominance d'une espèce dans l'air et les poussières qui favoriserait le développement d'asthme, notamment chez l'enfant (Dannemiller et al., 2014a; Ege et al., 2011).

Ces problèmes de santé représentent un impact sanitaire et économique élevé à travers le monde (Gutarowska and Piotrowska, 2007; Mudarri and Fisk, 2007). Le coût annuel des pathologies causées par une mauvaise qualité de l'air intérieur est estimée à 3,5 millions de

dollars (ASEF, 2012). Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer la présence des microorganismes potentiellement pathogènes au sein des habitats, et de développer des solutions pour prévenir ou lutter contre le développement de ces organismes.

2.4. Biocontrôle de la prolifération fongique

Comme présenté précédemment, lorsqu'elle survient à l'intérieur des habitats, la prolifération fongique peut conduire à des risques importants pour la santé des occupants, à travers diverses pathologies respiratoires (World Health Organization, 2009). Mais elle affecte également d'autres domaines. Elle est à l'origine d'importants gaspillages alimentaires dus à la détérioration des denrées, de l'ordre de 5 à 10% de la production mondiale de certains aliments (produits laitiers, pain, etc.) (Pitt and Hocking, 2009). La production de toxines sur les aliments ou dans les stocks de céréales par ces champignons peut avoir des impacts sanitaires. Ces dégâts peuvent aussi intervenir directement au niveau des champs agricoles avec la prolifération des moisissures phytopathogènes sur les cultures. Différents moyens de lutte sont utilisés contre ce problème, avec principalement l'utilisation de fongicides chimiques. Par exemple, dans le domaine de l'agroalimentaire, différents additifs chimiques sont utilisés comme conservateurs contre les champignons, comme par exemple l'acide benzoïque, le benzoate de sodium ou certains antifongiques (Davidson et al., 2013). Cependant, ces méthodes conduisent à des phénomènes de résistance et, dans le cas des fongicides utilisés sur les sols, comportent parfois des risques environnementaux et sanitaires multiples (toxicité résiduelle, etc.). D'autres techniques sont donc étudiées pour trouver des alternatives. Parmi elles, le développement des approches de biopréservation ou de biocontrôle est une piste intéressante. Le principe de cette technique est de limiter la prolifération des champignons à l'aide de microorganismes non-nocifs et aux propriétés antifongiques (Leyva Salas et al., 2017; Oliveira et al., 2014).

Différents microorganismes d'intérêt et mécanismes de lutte ont ainsi été mis en évidence. Les principales espèces impliquées dans les développements fongiques sur une grande variété d'aliments sont *Penicillium* et *Aspergillus*, tandis que *Fusarium* concerne les stocks de grains de céréales (Filtenborg et al., 1996). Afin de lutter contre ces moisissures, des bactéries lactiques peuvent être utilisées (Schnürer and Magnusson, 2005; Stiles, 1996). En effet, ce type de bactéries produit de nombreux composés antimicrobiens, comme le peroxyde d'hydrogène ou des acides organiques (lactique, acétique, formique, propionique) qui conduisent à une diminution du pH du milieu, le rendant ainsi moins favorables à d'autres

microorganismes (Lindgren and Dobrogosz, 1990). Au niveau des cultures, il est possible d'utiliser des bactéries naturellement présentes dans le sol comme antagonistes aux organismes nocifs. Ces bactéries peuvent affecter négativement la croissance des phytopathogènes, et jouent ainsi un rôle essentiel dans l'élimination des maladies des plantes (Weller et al., 2002; Whipps, 2001). Plusieurs mécanismes d'actions sont mis en place (Haas and Défago, 2005; Handelsman and Stabb, 1996; Walker et al., 2003) : i) inhibition de la croissance du pathogène, ii) compétition dans la colonisation du site et des sources nutritives, iii) parasitisme et iv) mycophagie.

Concernant les aspects d'inhibition de croissance, certaines bactéries du sol produisent de nombreux métabolites antifongiques, comme des toxines, des bio-surfactants et des COV (Raaijmakers et al., 2002). Ceux-ci sont particulièrement étudiés en biocontrôle. Ils regroupent des molécules pouvant avoir un effet négatif, mais parfois positif, sur la croissance d'autres organismes, champignons ou plantes (Wheatley, 2002). Ainsi, les COV émis par des bactéries du sol peuvent avoir un impact sur certaines moisissures phytopathogènes (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Trichoderma*, *Verticillium*, etc.) (Chaurasia et al., 2005; Kai et al., 2007; Zheng et al., 2013). La production de métabolites bactériens volatils à potentiel antifongique a été déterminée chez de nombreuses espèces bactériennes. Celles-ci appartiennent principalement aux genres *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ensifer*, *Lysobacter*, *Pectobacterium*, *Planomicrobium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sporosarcina*, *Stenotrophomonas* et *Xanthomonas* (Kai et al., 2009). Par exemple, un effet antifongique par production de COV a été mis en évidence pour des souches de *Stenotrophomonas* (*maltophilia*, *rizophila*), *Serratia odorifera*, de *Pseudomonas* (*fluorescens* et *trivialis*), et de *Bacillus subtilis* sur le champignon pathogène *Rhizoctonia solani* (Kai et al., 2007). Dans leur étude, Senol et al (2014) ont recherché un effet antifongique de 158 isolats bactériens contre *Fusarium culmorum*, un pathogène des légumes. Certains isolats de *Bacillus megaterium* (10/46), *subtilis* (8/21), *pumilus* (6/19), de *Pseudomonas fluorescens* (2/15), *putida* (3/15), de *Paenibacillus macerans* (1/11) et *Pantoea agglomerans* (1/10) ont limité la croissance du champignon *in vitro*. Tous les isolats d'une même espèce ne semblent donc pas avoir les mêmes propriétés en terme de biocontrôle, d'où la nécessité de tester chaque isolat indépendamment.

La recherche d'activités antifongiques chez les bactéries peut être effectuée suivant différentes méthodes. La méthode en double-couche permet d'évaluer une activité antifongique de contact. Une première gélose est ensemencée en spot ou en strie avec la bactérie d'intérêt, puis après le développement de cette souche, la gélose est recouverte par un second milieu semi-gélosé contenant des spores fongiques. Des halos d'inhibition de la croissance du champignon sont alors observés autour des colonies bactériennes si celles-ci présentent une activité antagoniste (Magnusson et al., 2003; Prema et al., 2010). Il est également possible d'évaluer l'effet antifongique en milieu liquide. Le surnageant de la culture bactérienne d'intérêt est mélangé à un milieu de culture et à des spores fongiques. Après incubation, la DO est mesurée pour évaluer la croissance des champignons et donc l'impact des composés produits par les bactéries. Dans le cas de l'étude des inhibitions de croissance par production de COV, la bactérie d'intérêt et le champignon sont mis en culture dans une même boîte mais dans deux compartiments séparés. Les molécules volatiles éventuellement produites par la bactérie lors de sa croissance peuvent donc entrer en contact avec le mycélium fongique et ainsi altérer son développement. Des techniques de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse peuvent être utilisées pour mettre en évidence ces productions de COV (Kai et al., 2007; Wilkins, 1996; Zheng et al., 2013).

Le biocontrôle / biopréservation est donc une approche qui revêt de nombreux intérêts pour limiter la prolifération fongique. L'utilisation de souches non pathogènes pour l'homme afin de lutter contre les organismes nocifs offre une solution avec un faible impact environnemental et sanitaire. Dans la mesure où les matériaux en terre crue sont des matériaux de construction issus du sol et donc plus riches en minéraux et en nutriments que ceux utilisés conventionnellement, il est envisageable de transférer ce concept à ces supports.

2.5. Objectifs de la thèse

Actuellement, l'utilisation de matériaux de construction à base de terre crue connaît un fort regain d'intérêt. Ces matériaux largement utilisés par le passé possèdent de nombreuses caractéristiques intéressantes. Le confort apporté par une régulation naturelle de l'air intérieur dont une bonne isolation thermique est un apport avantageux pour l'habitat, que ce soit dans le cas de restauration de bâtiments du patrimoine ou pour une construction neuve. De plus, son impact carbone quasi-nul en fait un matériau de premier choix dans une optique de construction à développement durable.

Néanmoins, la terre crue reste un matériau potentiellement sensible à l'eau. Ses caractéristiques physiques (porosité, rugosité) et chimiques (matériau organique) et l'ajout de fibres végétales pourrait constituer autant de risques en termes de prolifération microbienne, et en particulier fongique. Ces développements impliqueraient alors une dégradation de la qualité de l'air intérieur, avec des risques sanitaires variés pour les occupants comme le développement d'allergies, d'asthme voire de toxi-infections. La compréhension des risques que présente le matériau terre crue, biosourcé ou non, reste nécessaire pour pouvoir l'utiliser sans danger.

L'objectif de ces travaux a donc été de caractériser les flores microbiennes, qu'elles soient bactériennes ou fongiques, dans les matières premières et à la surface des matériaux de construction en terre crue, avec inclusion biosourcée ou non, ainsi que les conditions de prolifération. L'origine des microorganismes a également été évaluée, afin de savoir si la contamination pouvait provenir uniquement de l'environnement extérieur ou bien du matériau lui-même.

La première partie de ces travaux s'est intéressée à la caractérisation des flores bactériennes et fongiques liées à ces matériaux par les approches culturales. La première étape a consisté en l'optimisation en laboratoire des méthodes de prélèvements des microorganismes depuis les matières premières jusqu'aux matériaux de construction. A partir des matières premières ou de prélèvement sur éprouvette, différentes conditions ont été testées pour assurer une récupération maximale des microorganismes présents. En plus de cette optimisation, le placement des éprouvettes en terre crue en conditions de forte humidité a permis une première analyse de la prolifération microbienne sur ce matériau. En utilisant les éprouvettes directement après leur fabrication, les capacités de développement des

microorganismes initialement présents dans les matières premières ont également pu être évaluées. En plus des études sur des éprouvettes en laboratoire, des prélèvements *in situ* à l'intérieur d'habitations en terre crue ont été menées. Une partie de ces prélèvements a été utilisée pour des isolements des bactéries et champignons viables / cultivables à l'aide de différents milieux de culture. Les isolats ainsi obtenus ont pu être identifiés soit par leur morphotype, soit par analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A partir des isolats obtenus depuis les prélèvements *in situ*, l'application du concept de biocontrôle aux produits de construction biosourcés en terre crue a été étudié. Bien que ces travaux restent à des étapes préliminaires, une sélection selon l'activité antifongique a été initiée pour ces isolats. Les souches bactériennes d'intérêt pourraient être utilisées comme flore « positive » afin d'effectuer un contrôle négatif sur la croissance des moisissures pouvant se développer sur les matériaux à base de terre crue.

La seconde partie s'est focalisée sur l'étude des flores microbiennes issues des prélèvements *in situ* par métabarcoding. En effet, les approches par culture ne couvrent qu'entre 1 et 10 % de la flore microbienne totale. C'est pourquoi, en parallèle des approches par culture conventionnelle, des méthodes d'identification par biologie moléculaire ont été menées. Les approches de métabarcoding par séquençage haut-débit ont permis de définir la diversité biologique présente sur ces matériaux *in situ* et d'identifier les taxons bactériens et fongiques majoritaires. De plus, l'effet de certains facteurs sur la flore microbienne, comme la composition du matériau, son utilisation dans une construction habitée ou non ou encore l'historique du bâtiment, ont été évalués dans cette étude.

Chapitre 3 - Etude par culture de la flore microbienne des matériaux biosourcés

Les matériaux de construction en terre crue, incorporant, dans certains cas, des fibres végétales (pour l'amélioration de l'isolation thermique, l'augmentation des caractéristiques mécanique et/ou l'allègement du matériau (Laborel-Préneron et al., 2016)) connaissent actuellement un essor important. Cependant, l'addition de matières végétales apporte une source potentielle de nutriments pour les microorganismes, et pourrait conduire à une plus grande sensibilité de ces matériaux à la prolifération fongique. Il est donc nécessaire d'identifier les communautés microbiennes naturellement présentes sur ces matériaux, afin de connaître les genres susceptibles de proliférer lorsque les conditions environnementales favorables sont atteintes, et de déterminer si l'ajout de fibres végétales impacte de manière significative ces flores et leur potentiel développement. Des essais ont ainsi été mis en place afin de déterminer la composition des communautés fongiques et bactériennes présentes sur les matériaux de construction en terre crue, sur des matières premières et éprouvettes fabriqués en laboratoire, d'une part, et sur des prélèvements réalisés sur des matériaux *in situ*, d'autre part. L'impact des fibres sur le développement microbien lorsque les matériaux sont soumis à des conditions environnementales favorables a également été évalué.

Les méthodes de prélèvements des microorganismes, par grattage et par film adhésif, ainsi que les conditions de récupération ont été optimisées. Les microorganismes ainsi prélevés ont été quantifiés et isolés par culture à partir de supports *in situ* ainsi qu'au sein de matières premières et à différentes étapes du processus de fabrication d'éprouvettes en terre crue. Celles-ci ont été placées en condition de forte humidité afin d'évaluer la prolifération fongique sur ces matériaux. Enfin, l'évaluation des propriétés antifongiques des bactéries isolées *in situ* a été effectuée en vue d'appliquer le concept de biocontrôle à l'échelle des matériaux de construction en terre crue.

3.1. Matériaux et sites de prélèvement étudiés

Afin de caractériser la flore microbienne présente sur les supports en terre crue, deux catégories de matériaux ont été utilisés. Une partie des travaux a été axée sur l'étude des matières premières utilisées dans la fabrication de produits de construction en terre crue, avec ou sans ajout de fibres végétales. Ces matériaux ont été testés directement sous leur forme initiale (p. ex : fibres végétales seules) ou sous forme d'éprouvettes fabriquées en laboratoire, et leurs caractéristiques sont été présentées ci-dessous.

La seconde partie des essais s'est intéressée aux flores environnementales présentes sur les matériaux en terre crue utilisés dans des bâtiments. Les campagnes de prélèvements *in situ*

se sont étalées sur deux ans et ont permis d'étudier 16 murs différents. L'ensemble des informations concernant les matériaux prélevés ainsi que le déroulement des différentes campagnes sont reportés dans la section 3.1.2.

3.1.1. Matériaux étudiés

Terre crue

La terre utilisée lors de cette étude correspond à des fines argilo-calcaires, désignées FAC dans ce manuscrit. Ces FAC sont des déchets du processus d'exploitation de carrières de calcaire. Lors de leur extraction, les granulats calcaires sont séparés de la terre par des traitements à l'eau. Les boues de lavage ainsi obtenues sont déposées dans des bassins de sédimentation jusqu'à être sèches. Elles sont alors transformées en poudre pour obtenir le produit final.

Les FAC ont été caractérisées par le Laboratoire de Matériaux et Durabilité des Constructions (LMDC) (Laborel-Préneron, 2017). Ces fines sont composées à 60 % de calcite, à 11 % de kaolinite, à 11 % d'illite, à 10 % de quartz, à 6 % de dolomie et à 3 % de goethite. Ce matériau possède un pH de 7,8, ce qui en fait un matériau neutre. Les FAC sont des poudres très fines : plus de 99 % en masse des particules ont une taille inférieure à 80 µm. La taille moyenne, déterminée par analyse par pipette, est de l'ordre de 6,5 µm.

Fibres végétales

De la paille d'orge a été utilisée pour un ajout de fibres végétales dans le matériau terre crue. La paille d'orge correspond à la partie de la tige de l'orge rejetée lors de la récolte. La longueur des brins de paille d'orge est comprise entre 10 et 30mm. Sa caractérisation physique a été réalisée par le LMDC (Laborel-Préneron, 2017). La paille utilisée est issue de déchets agricoles mais aucune information concernant d'éventuels traitements chimiques appliqués n'est disponible pour ce matériau. La paille est stockée à température et luminosité ambiantes dans le laboratoire dans des sacs en plastique.

Matériaux manufacturés

Deux mélanges différents ont été fabriqués par le LMDC : i) éprouvettes composées uniquement de FAC, notées FAC-S0 %, et ii) éprouvettes composées de FAC et de 3 % de paille (teneur en poids), notées FAC-S3 %. La teneur en eau des mélanges, déterminée par l'essai Proctor, est d'environ 14 % pour les FAC-S0 % et 19 % pour les FAC-S3 %. Pour fabriquer ces échantillons, les fractions de terre et de paille sont versées dans un mélangeur et mélangées à la main. Ensuite, l'eau est ajoutée et les matériaux sont malaxés mécaniquement

dans le mélangeur jusqu'à obtenir un mélange homogène. Les matières premières sont mélangées la veille du coulage.

Des éprouvettes cylindriques de 5 cm de diamètre et de 5 cm de haut ($\Phi 5H5$) (Figure 3.1) ont été fabriquées par double compression statique à la densité Proctor. Les éprouvettes sont d'abord séchées à 40°C pendant 24 heures, puis la température est augmentée de 0,1°C/min jusqu'à atteindre 100°C. La température est maintenue à 100°C jusqu'à masse constante (variation de masse inférieure à 0,1%). Les éprouvettes sont ensuite transférées et stockées en conditions stériles à température ambiante depuis la salle de fabrication au laboratoire de microbiologie. La densité des éprouvettes sèches est de 1,99 g.cm⁻³ pour la composition FAC-S0 % et de 1,52 g.cm⁻³ pour la composition FAC-S3 %.

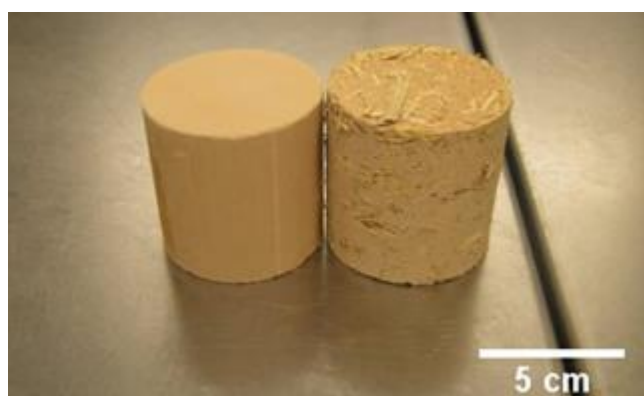


Figure 3.1 : Epreuves cylindriques FAC-S0 % (gauche) et FAC-S3 % (droite)

3.1.2. Sites de prélèvements

Localisation des sites

Trois campagnes d'échantillonnage *in situ*, sur des bâtiments en terre crue, ont été effectuées au cours de cette étude (Tableau 3.1). Ces campagnes se sont étendues sur la région toulousaine, lyonnaise et dans le Tarn-et-Garonne et se sont déroulées au cours de l'automne 2015, de l'été 2016 et de l'automne 2016 (Figure 3.2). Les sites ont majoritairement été prélevés sur une même saison (automne) afin de diminuer la variation des flores microbiennes extérieures due à la saisonnalité. Certains sites ont été prélevés en été à cause de contrainte organisationnelle. Le prélèvement de deux sites à un an d'intervalle a permis de visualiser la variation annuelle de leurs flores microbiennes. Le nombre moyen de prélèvements par site est de 4, mais dans certains cas, le nombre de prélèvements a été limité à 1 ou 2, en particulier pour les échantillons correspondant à des contrôles externes pour un lieu déjà prélevé (EG, Hext).

Tableau 3.1 : Liste des sites de prélèvements *in situ* et caractéristiques.

Code du Site	Code de prélèvement	Fonction	Type de matériau	Date de la construction	Historique	Commune	Environnement	Mois de prélèvement	T°C / HR lors du prélèvement	Nombre de prélèvements
A	AM	Entrée	Adobe terre seule	Avant 1800	Ancienne étable ayant connu la présence d'animaux	Maureville	Rural	Septembre 2015	-	6
	AJ		Joint terre chaux						-	6
B	Ba1	Entrée	Adobes terre seule	Août 1995	Ancien développement fongique (drain bouché) Stockage régulier de fruits / légumes	Castanet-Tolosan	Rural	Octobre 2015	-	4
	Ba2							Novembre 2015	18,6% / 63%	4
	Bb	Cellier	Torchis terre paille					Octobre 2015	-	5
C	C1	Bureau	Enduit terre chanvre	Printemps 2009	Local d'habitation	Lanta	Rural	Novembre 2015	-	4
	C2							Novembre 2016	18,5% / 62,4%	4
D	DM	Cuisine	Adobe terre seule	Non connu	Probablement présence d'un ancien enduit à la surface du mur	Maureville	Rural	Novembre 2015	-	3
	DJ		Joint terre seule						-	3
E	E	Chambre	Pisé terre seule	Environ 1800	Local d'habitation	Tignieu-Jameyzieu	Rural	Juillet 2016	22,6°C / 52%	4
	EG	Grange			Stockage d'outils / débarras				-	1
F	F	Grange	Pisé terre seule	Environ 1850	Pas de porte / fenêtre fermées	Tignieu-Jameyzieu	Rural	Juillet 2016	18,9°C / 60%	4
G	G	Cellier	Pisé terre seule	Environ 1850	Stockage d'outils / débarras	Tignieu-Jameyzieu	Rural	Juillet 2016	18,6°C / 60%	4
H	H	Bureau / Salon	Enduit terre paille	2013	Local d'habitation	L'Union	Urbain	Octobre 2016	21,6°C / 58,2%	4
	Hext	Extérieur	Adobe terre paille		Brique dehors depuis la construction				-	1
I	I	Salon	Enduit terre seule	Juillet 2008	Local d'habitation	Mirabel	Rural	Novembre 2016	19,2°C / 61,2%	4
J	J	Site non habité	Enduit terre fibres végétales	Avant 1900	Pas d'occupant et faible isolation	Monteils	Rural	Novembre 2016	11,9°C / 70,7%	4
L	L	Salle à manger / Cuisine	Enduit terre paille	2006	Local d'habitation	Cazals	Rural	Novembre 2016	17,9°C / 66%	4
M	Ma	Entrée	Adobe terre seule / Adobe paille	Été 2016	Local d'habitation	Caussade	Urbain	Janvier 2017	-	5
	Mb	Chambre	Adobe paille	2012	Local d'habitation				-	4

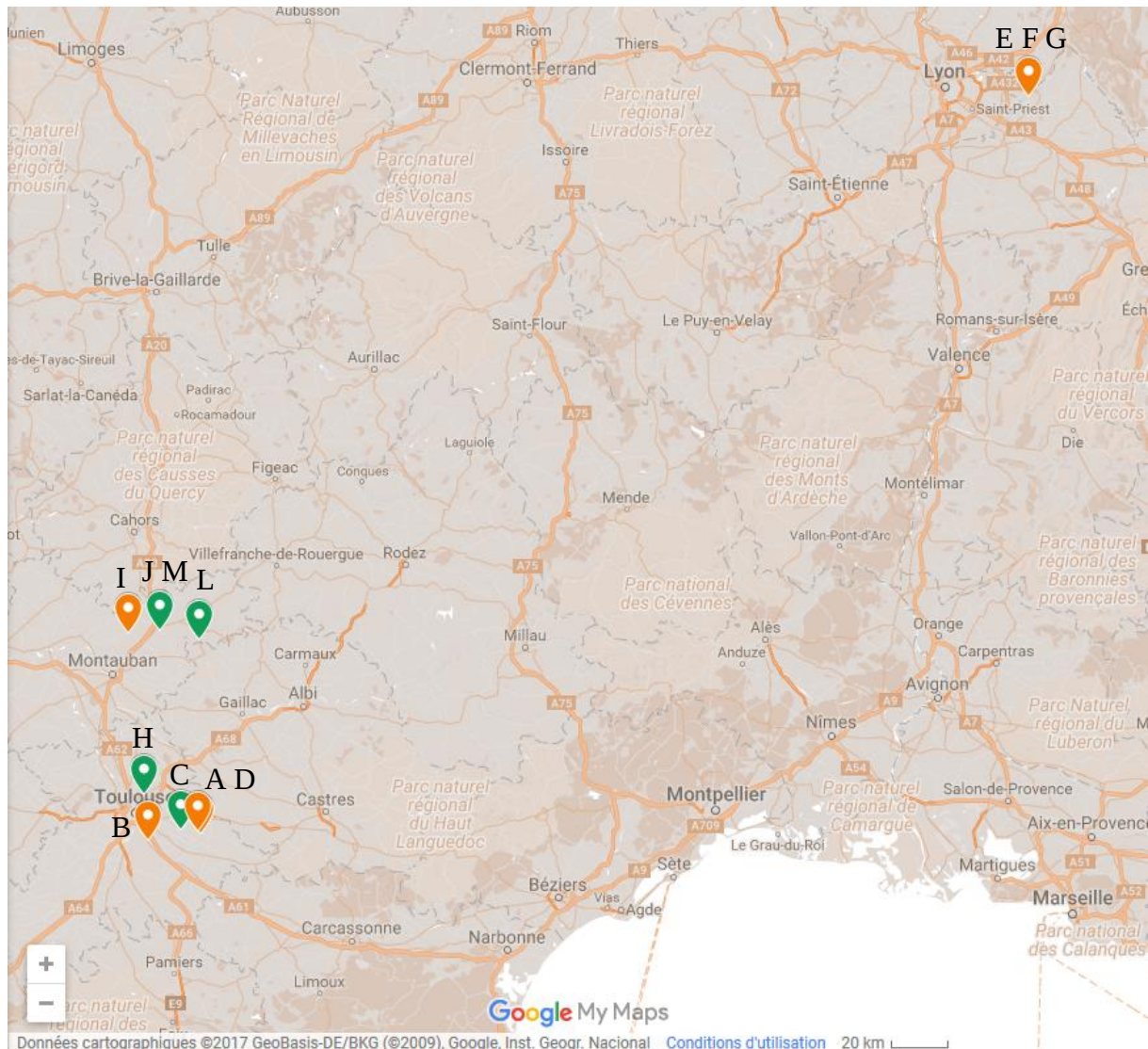


Figure 3.2 : Localisation des sites de prélèvement *in situ*, avec prélèvements sur matériaux composés de terre seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert).

Méthode de prélèvement

La méthode de prélèvement consiste au grattage du mur à l'aide d'un scalpel stérile sur une superficie d'environ 35 cm² par prélèvement, sans nettoyage préalable (Figure 3.3). La terre et les fibres ainsi décrochées ont été récupérées dans des tubes à usage unique stériles. La profondeur de prélèvement était comprise entre 2 et 5mm suivant la dureté du matériau. Entre 1 et 2g de matériaux ont été stockés sous 48h maximum à -80°C pour les analyses par biologie moléculaire, tandis que le reste du prélèvement a été directement utilisé pour l'étude des flores microbiennes par culture (dans le cas des sites A, B, C et D). Lors du prélèvement, un masque à poussière et des gants stériles étaient portés afin d'éviter une contamination de l'échantillon par le manipulateur. Lorsque cela était possible, les températures et humidités

des lieux ont été mesurées lors du prélèvement à l'aide d'un enregistreur autonome de température et d'humidité (KISTOCK KH 200 - KIMO®).



Figure 3.3 : Méthode de prélèvement des sites Bb (gauche) et D (droite) par grattage au scalpel.

Déroulement des campagnes de prélèvements

Un ensemble de 15 supports a été prélevé (Figure 3.4). La première campagne s'est déroulée durant l'automne 2015, et a concerné 4 habitations :

- Sur deux des sites (A et D), les prélèvements ont porté sur des adobes composés uniquement de terre crue (notés AM et DM), ainsi que sur les joints de ces murs (notés AJ et DJ). Des échantillons à différentes hauteurs ont été récupérés.
- Les prélèvements sur le site B ont été effectués sur deux murs différents : i) un mur en adobe, qui avait déjà connu un événement de développement fongique à sa surface suite à l'obstruction du drain de la maison (noté Ba1) ; ii) un mur en torchis dans un cellier servant à stocker notamment des fruits et légumes (noté Bb).
- Le site C est une salle faisant office de bureau et de chambre d'amis, dont les murs sont composés d'un mélange terre-paille revêtu d'un enduit terre chanvre. L'enduit situé au pied du mur (moins de 20 cm de hauteur) a été prélevé.

La seconde campagne de prélèvements a été effectuée durant l'été 2016, en ciblant trois habitations de la région lyonnaise, situées dans un même village. La méthode de construction utilisée sur ces trois sites (E, F et G) était celle du pisé, avec une terre crue locale. Les trois habitations étaient d'anciens bâtiments, déjà présents sur les cadastres il y a plus de 100 ans.

- Le mur échantillonné sur le site E est au niveau d'un escalier permettant de monter dans une chambre d'amis. Un mur de grange faisant partie de la même bâtisse a été prélevé (noté EG).

- Dans le cas du site F, un mur de pisé, situé dans une grange, a été échantillonné. Ce mur est soumis aux températures et humidités extérieures car les ouvertures de la pièce ne possèdent pas de vitre ou de porte solide.
- Enfin, des échantillons ont été récupérés dans une autre habitation, au niveau d'un cellier en pisé (G).

L'ajout de murs de grange ou de cellier dans notre étude permet d'avoir des témoins externes sur la composition de la flore ayant les capacités de se développer ou de se maintenir sur ce type de support.

La troisième campagne de prélèvements s'est étendue d'octobre 2016 à janvier 2017.

- Deux sites qui avaient déjà été échantillonnés lors de la première campagne ont été une nouvelle fois prélevés (notés Ba2 et C2), permettant d'avoir un premier aperçu des éventuelles dynamiques de communautés microbiennes 1 an après.
- Une habitation de la région toulousaine, composée d'adobe de terre-paille recouvert par un enduit terre paille, a également été échantillonnée (H). Les prélèvements se sont portés sur plusieurs pièces, en ciblant des zones proches du sol dans les angles, afin de ne laisser que des traces discrètes. Une brique d'adobe terre-paille restée à l'extérieur depuis la construction a également été prélevée (noté Hext).

Enfin, une série de bâtiments situés dans le Tarn-et-Garonne a été ajoutée à notre étude au cours de cette troisième campagne :

- Un enduit en terre crue présent dans une salle de vie a été prélevé à différentes hauteurs (I).
- Une ancienne habitation du patrimoine non habitée depuis plusieurs dizaines d'années présentant un mur en terre avec des fibres végétales incorporées, a été prélevée (J). La température et l'humidité à l'intérieur de ce bâtiment étaient proches des conditions extérieures.
- Deux zones ont été prélevées dans une habitation avec des enduits terre paille dans la salle à manger / cuisine (L) : à différentes hauteurs d'un des murs et au pied d'un autre mur, à 20 cm du sol.
- Pour finir, le site M correspondait à une habitation construite en adobe de terre crue, avec deux murs différents qui ont été prélevés sur toute leur hauteur : i) un mur composé à la fois d'adobe de terre seule (noté MaT) ou de terre avec paille (MaB), situé au rez-de-chaussée de l'habitation et réalisé durant l'été 2016 ; ii) un mur composé d'adobe terre-paille, situé dans une chambre et réalisé autour de l'année 2012.



Figure 3.4 : Sites d'échantillonnage de bâtiments en terre crue seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert).

3.2. Mise au point du protocole d'isolement des microorganismes

La première étape des analyses par culture est l'optimisation des méthodes de récupération des microorganismes à partir des matières premières ou des échantillons prélevés *in situ*, afin de maximiser le nombre de microorganismes cultivables isolés. La principale technique consiste à disperser les microorganismes présents dans le prélèvement à l'aide d'un milieu de récupération, puis à mettre en culture les cellules ainsi récupérées. Plusieurs paramètres doivent être évalués, comme la concentration en dispersant (tensioactif), l'agitation (temps et méthode d'agitation), le ratio prélèvement / milieu de récupération ou encore le milieu de culture utilisé.

3.2.1. Matériels et méthodes

3.2.1.1. Méthode de récupération des microorganismes à partir des prélèvements

Les matières premières ont été suspendues dans un milieu de récupération suivi d'un dépôt de la suspension sur milieu nutritif. Plusieurs paramètres ont été testés dans le but d'optimiser la méthode. Chaque matériau (FAC : 1g ; paille : 0,25g) a été mélangé à température ambiante dans un tube avec 10 mL de milieu de récupération. Celui-ci était composé de tampon phosphate salin stérile (PBS) et d'un tensioactif stérile (Tween 80), ajouté pour disperser plus facilement les cellules bactériennes et fongiques. Différentes concentrations finales de détergent (1%, 5% et 10%) ont été testées. Les suspensions ont été agitées à 300 rpm pendant 10 minutes (Agitateur MaxQ 4000 – Thermo Scientific). Le temps d'agitation testé a également été allongé à 30 minutes pour la concentration finale en détergent de 5%. Les tubes ont été placés à l'horizontale lors de l'agitation afin de limiter la sédimentation des matériaux. Trois ratios 'masse du matériau/volume du milieu de récupération' ont été testés pour les FAC (1/10, 5/20 et 25/100 g/mL), avec une agitation de 30 minutes et une concentration finale en détergent de 5 %.

Une fois l'étape d'agitation terminée, les suspensions ont été homogénéisées au vortex extemporanément, puis une gamme de dilutions (raison 10) a été préparée dans de l'eau distillée stérile. Un volume de 100 µL de suspension initiale ou de chaque dilution a été déposé sur des milieux nutritifs en condition aérobie, qui ont été incubés à différentes températures (Tableau 3.2). Après incubation, les colonies formées ont été dénombrées afin de déterminer le nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) par gramme de matériau.

Tableau 3.2 : Liste des milieux de cultures utilisés lors de l’optimisation des méthodes de prélèvements.

Milieu de culture	Microorganismes recherchées	Température d’incubation	Durée d’incubation
Tryptone Soy Agar (TSA)	Bactéries aérobies et aéro-anaérobies	32,5°C	48h (2 jours)
Potato Dextrose Agar (PDA) + 0,05g de chloramphénicol (Cm)	Champignons	22,5°C	120h (5 jours)

Dans le cas de la paille, une méthode d’agitation alternative a été testée. A la place d’un agitateur classique, un broyeur homogénéiseur Smasher™ (AES Laboratories) a été utilisé. La paille (2,5 g) a été placée dans un sac plastique stérile contenant une membrane interne (Gosselin™) pour séparer les particules solides du liquide après broyage. Ensuite, 100 mL de milieu de récupération ont été ajoutés dans le sac à température ambiante. Deux concentrations finales en détergent (1% et 5%) ont été testées. Les sacs ont été broyés pendant 2 minutes. Le temps de broyage a été allongé à 5 minutes pour la concentration finale en détergent de 5 %. Une gamme de dilutions a été effectuée et les UFC ont été dénombrées comme décrit précédemment.

3.2.1.2. Méthode de prélèvement par adhésif

Pour les prélèvements sur les matériaux manufacturés, l’efficacité d’une méthode de prélèvement par adhésif a été évaluée. Des pansements adhésifs stériles (Hydrofilm® - Hartmann) ont été découpés en carrés de 4 cm². Un volume de 1mL d’une suspension de conidies d’*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404 / CBS 733.88) à la concentration de 10⁷ UFC/mL a été déposé sur chaque adhésif. Les adhésifs ont été laissés sous PSM avec la face contaminée vers le haut, afin d’évaporer l’eau contenant les spores fongiques. Une fois tout le liquide évaporé, chaque adhésif a été transféré dans un tube et 10mL de milieu de récupération (PBS + Tween80 à une concentration finale de 5 %) ont été ajoutés dans le tube. Les tubes ont été agités par vortex durant différentes durées : 5 secondes, 5 minutes ou 10 minutes. Une gamme de dilutions (raison 10) a été préparée dans de l’eau distillée stérile. La suspension initiale et les dilutions ont été déposées sur milieu PDA contenant 0,05 mg/mL de Cm, puis les milieux ont été incubés à 22,5°C durant 5 jours. Après incubation, les UFC ont été dénombrées. L’évaluation a été réalisée en triplicat.

3.2.1.3. Outils statistiques

Les moyennes et écarts-types ont été calculés dans chaque condition sur les valeurs en $\log_{10}$. Un test de Student a été réalisé pour comparer les moyennes entre elles. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel R. Une valeur de p-value inférieure au seuil de signification statistique (0,05) est indiquée par un astérisque au-dessus des moyennes concernées.

3.2.2. Résultats

Afin d'étudier les flores microbiennes par culture, celles-ci doivent tout d'abord être récupérées depuis une matrice pour être ensuite déposées sur des milieux nutritifs. Une fois que les microorganismes se sont développés sur ces milieux et ont été isolés, il est alors possible de les caractériser et de les identifier. La phase de prélèvement et de préparation de l'échantillon pour mise en culture est une étape très importante dans l'étude des communautés microbiennes. Dans cette étude, deux méthodes de prélèvements ont été testées :

- La première consiste en une mise en suspension des matériaux directement dans une solution de récupération. Cette méthode est notamment utilisée lorsque les échantillons sont récupérés sous forme particulaire. Cette technique destructive est particulièrement utilisée dans le cas des matériaux de construction, et permet d'avoir directement un extrait de la matrice d'intérêt. L'influence de différents paramètres a été évaluée, comme le temps d'agitation ou la concentration en détergent dans le milieu de récupération, afin d'optimiser la dispersion à partir des particules. L'efficacité de prélèvement/dispersion a été associée à la quantité d'UFC obtenus sur milieu de culture suivant ces différents facteurs.
- La seconde méthode était celle du prélèvement des microorganismes à la surface de matériaux fabriqués par film adhésif. Cette technique est une alternative non-destructive au prélèvement par grattage, permettant de récupérer les flores fongiques présentes à la surface du matériau sans abîmer visuellement ce dernier. Dans ce cas, le relargage des conidies fongiques adhérentes sur le film en fonction du temps d'agitation a été étudié. Cela a ainsi permis d'évaluer si cette étape ne limite pas la récupération des microorganismes prélevés par le film.

D'autres techniques de prélèvement de surface peuvent être utilisées sur les matériaux et les surfaces, mais n'ont pas été appliquées dans cette étude. Les prélèvements par gélose contact ou écouvillonnage sont des options habituellement non destructives, mais l'humidification du matériau en terre crue lors du prélèvement pourrait conduire à une

dégradation de celui-ci. La méthode de prélèvement par adhésif a été préférée à celle par moquette car cette dernière est peu adaptée au prélèvement de bactéries.

3.2.2.1. Optimisation de la méthode de récupération des microorganismes pour une mise en culture

A partir des matières premières, différents paramètres ont été analysés en vue d'améliorer le prélèvement des microorganismes contenus dans les FAC (Figure 3.5) ou dans la paille d'orge (Figure 3.6).

Pour les FAC, on peut observer que :

- Pour les différents temps d'agitations testés (5, 10 et 15 min), la concentration moyenne en bactéries est supérieure à celle des moisissures ($2,5 \pm 0,4 \times 10^4$ UFC/g contre de $2,5 \pm 0,2 \times 10^2$ UFC/g, respectivement) (Figure 3.5.A).
- Une augmentation de la durée d'agitation n'a pas amélioré la récupération des cellules bactériennes et fongiques.
- La concentration moyenne en bactérie est de $2,5 \pm 0,2 \times 10^4$ UFC/g lorsque la concentration de détergent varie (Figure 3.5.B), indiquant que l'ajout de détergent n'a pas d'effet significatif sur la récupération des cellules et spores bactériennes.
- Cependant, l'utilisation d'un détergent à une concentration finale de 5% a permis d'améliorer légèrement la récupération de conidies fongiques, passant d'une concentration de $1,1 \pm 0,2 \times 10^2$ UFC/g à $2,6 \pm 0,3 \log_{10}(\text{UFC/g})$.
- Enfin, lors des essais avec différents ratios de quantités de FAC / milieu de récupération, les concentrations moyennes de bactéries et de moisissures sur l'ensemble des ratios sont respectivement de $2,1 \pm 0,2 \times 10^4$ UFC/g et de $1,9 \pm 0,3 \times 10^2$ UFC/g, aucun effet significatif n'ayant été observé dans les deux cas (Figure 3.5.C).

En ce qui concerne la paille, on note que :

- Le temps d'agitation influence, sur l'intervalle testé, la concentration en microorganismes. Pour les bactéries la concentration est comprise entre $3,7 \pm 0,3 \times 10^4$ UFC/g (à 0') et $5,6 \pm 1,1 \times 10^5$ UFC/g (à 30'), et pour les moisissures elle est comprise entre $9 \pm 0,1 \times 10^2$ UFC/g (0') et $6,73 \pm 1,2 \times 10^3$ UFC/g (30') (Figure 3.6.A). Une durée d'agitation de 30 minutes améliore significativement (d'environ 1 log₁₀) la récupération des spores bactériennes et des conidies fongiques.

- La concentration en détergent n'a pas d'effet significatif sur la récupération des bactéries : $1,9 \pm 0,1 \times 10^5$ UFC/g de bactéries sont récupérées en moyenne sur l'ensemble des concentrations (Figure 3.6.B). Toutefois, dans le cas des champignons, l'addition de détergent améliore significativement la récupération des conidies, dont le nombre passe de $7,3 \pm 0,9 \times 10^2$ UFC/g (0%) à $5,4 \pm 0,3 \times 10^3$ UFC/g (1%), soit une augmentation de près de 1 log₁₀.
- La figure 3.6.C présente les résultats issus des prélèvements à partir de paille en utilisant le Smasher™ comme outil d'agitation pour la dispersion. Cette technique d'agitation n'a pas eu d'impact significatif sur la récupération des bactéries dont la concentration moyenne sur l'ensemble des essais de $1,5 \pm 0,3 \times 10^6$ UFC/g.
- Cependant, la concentration en champignons a significativement augmenté entre 0% et 1% de détergent, passant de $1,3 \pm 0,7 \times 10^3$ UFC/g (à 2' - 0%) à $6,3 \pm 1 \times 10^3$ UFC/g (à 2' - 1%).
- Un allongement du temps de mélange à 5 minutes (au lieu de 2 minutes) ne présente pas d'effet sur la récupération des microorganismes.
- Finalement, le procédé de broyage à une concentration en détergent de 5% a permis de récupérer $1,3 \pm 0,1 \times 10^6$ UFC/g bactéries contre $2,1 \pm 0,4 \times 10^5$ UFC/g par la méthode de prélèvement par simple agitation. Il a donc amélioré la récupération des cellules et spores bactériennes d'environ un log₁₀. Aucune différence significative n'a pu être observée pour les moisissures, avec $6,3 \pm 1 \times 10^3$ UFC/g par broyage et $5,1 \pm 1,3 \times 10^3$ UFC/g par agitation.

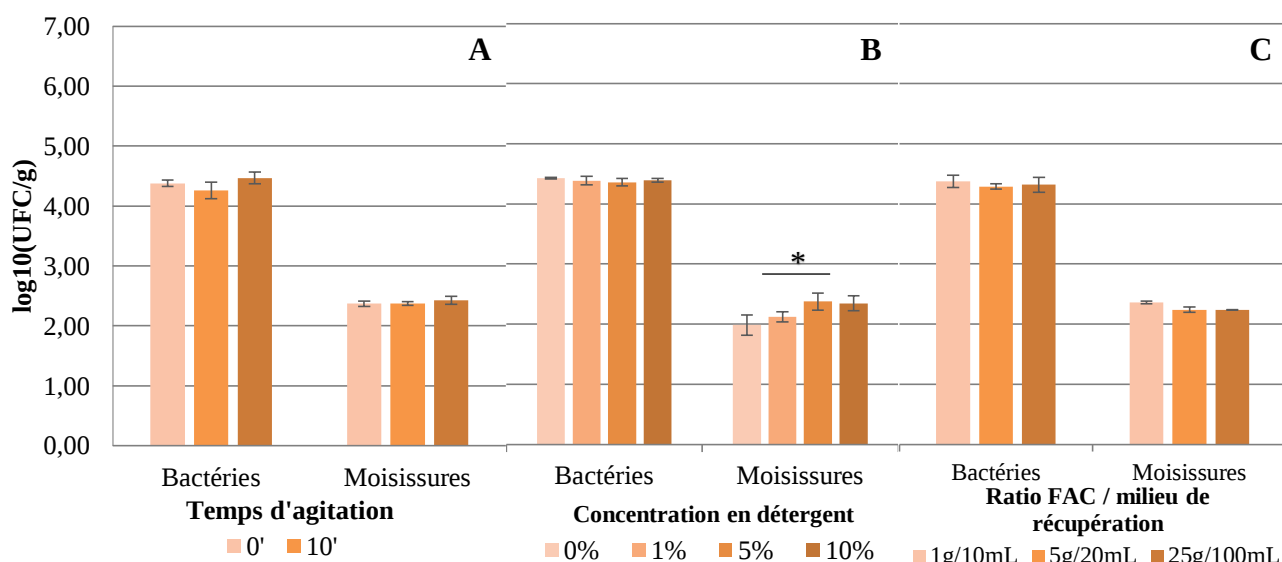


Figure 3.5 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de FAC en fonction du temps d'agitation (A) (concentration en détergent finale 5 % ; ratio 1g/10mL), de la concentration en détergent (B) (temps d'agitation de 10 minutes ; ratio 1g/10mL) ou du ratio masse de matériau / volume de milieu de récupération (C) (temps d'agitation de 10 minutes ; concentration en détergent finale 5 %).

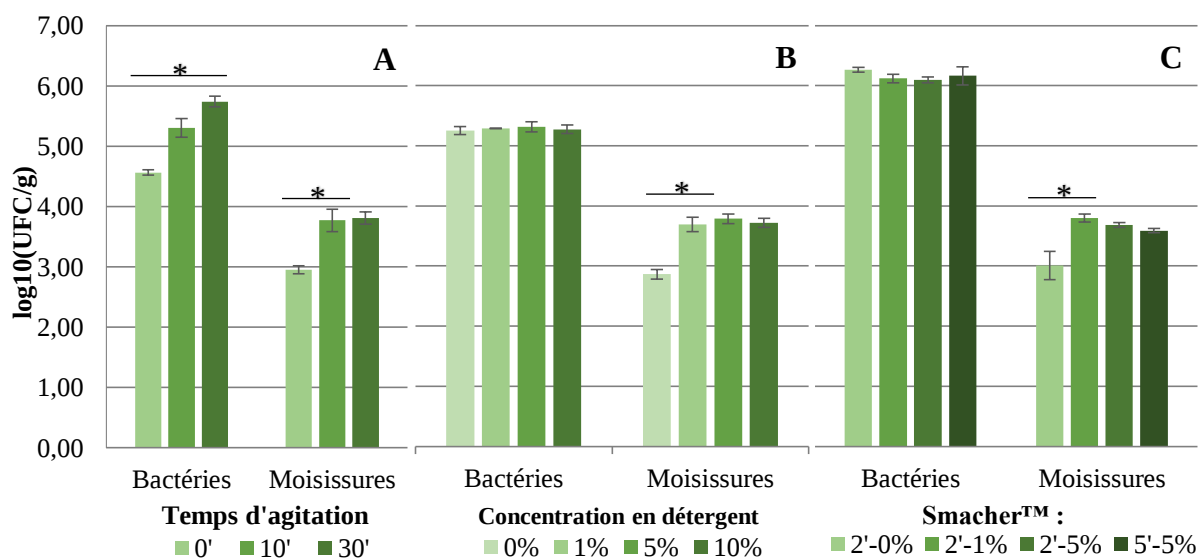


Figure 3.6 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de paille en fonction du temps d'agitation (A) (concentration en détergent finale 5 %), de la concentration en détergent (B) (temps d'agitation de 10 minutes) ou de la concentration en détergent et du temps d'agitation lors de l'utilisation du broyeur Smasher™ (C).

Ces premiers éléments nous ont permis de sélectionner des conditions optimales de traitement des échantillons : rapport masse/volume, concentration en détergent, technique (vortex ou Smasher™) et temps d'agitation (Tableau 3.3) :

- Pour les FAC, une meilleure récupération des bactéries et des moisissures est obtenue lorsque le milieu de récupération contient une concentration finale en détergent de 5 %, et que les FAC sont agitées par agitateur durant 30 minutes. Les ratios masse/volume n'ont pas d'impact sur la récupération, et le choix s'est alors porté sur celui nécessitant le moins de matière, à savoir 1g/10mL.
- Les conditions optimales pour la paille consistent en un broyage de 2,5 g de paille par Smasher™ durant 2 minutes dans 100 mL de milieu de récupération à une concentration en détergent de 1 %.
- Au final, les mêmes conditions que pour les FAC ont été appliquées pour les échantillons *in situ* à cause de leur similarité en termes de composition.

Tableau 3.3 : Conditions optimales de traitement pour la récupération des microorganismes en fonction des matières premières.

Matières	Ratio masse / volume	Concentration en détergent	Temps d'agitation	Type d'agitation
FAC	1g / 10mL	5 %	30 minutes	Agitateur 300rpm
Paille	2,5g / 100mL	1 %	2 minutes	Smasher™
Echantillons <i>in situ</i>	1g / 10mL	5 %	30 minutes	Agitateur 300rpm

3.2.2.2. Optimisation de la récupération des spores fongiques à partir du film adhésif

L'influence du temps de vortex sur le relargage des microorganismes adhérents dans la solution de récupération (concentration finale en détergent de 5 %) a été évaluée en agitant par vortex durant 5 secondes ou 5 à 10 minutes un adhésif avec une quantité connue de conidies déposées à sa surface (Figure 3.7). Quand l'adhésif n'est agité par vortex que quelques secondes, la quantité de spores récupérées est de $3,6 \pm 0,5 \times 10^5$ UFC, alors que $8,7 \pm 2,8 \times 10^6$ UFC avaient été déposées sur l'adhésif. Avec un temps d'agitation plus long (5 ou 10 minutes), le recouvrement des conidies augmente significativement, i.e. d'environ 1 log10, et $2,8 \pm 0,5 \times 10^6$ UFC sont récupérées. Aucune différence significative n'est observée entre les temps d'agitation 5 et 10 minutes, ce qui suggère que le temps d'agitation n'a plus d'impact sur la récupération des conidies adhérentes. Un temps de 5 minutes de vortex semble suffisant

pour décrocher les conidies adhérentes, bien que le taux de recouvrement final ne soit que d'environ 30 %.

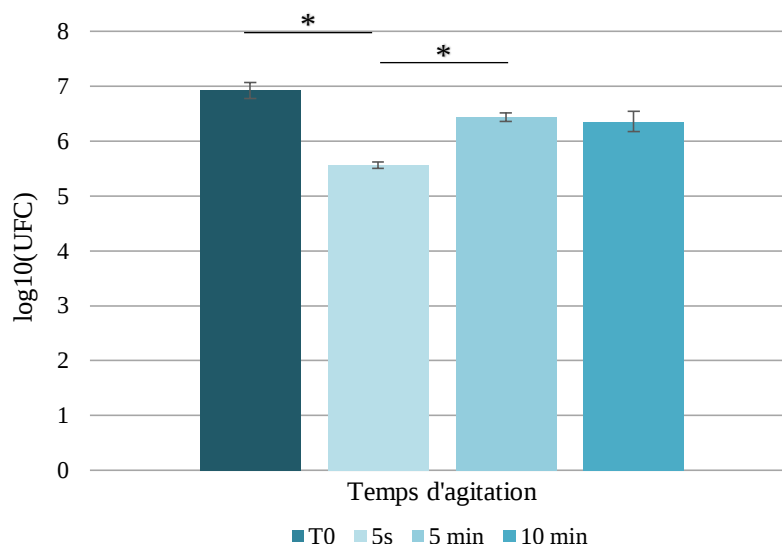


Figure 3.7 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) d'*A.brasiliensis* recouvrées depuis le film adhésif en fonction de la durée d'agitation.

3.2.3. Discussion

L'optimisation des méthodes de prélèvements et de récupération des microorganismes à partir de ces prélèvements est une étape indispensable pour assurer un recouvrement maximal des microorganismes cultivables. En effet, la méthode de prélèvement/dispersion choisie peut avoir un impact sur le type et la quantité de microorganismes isolés, et ainsi conduire à certains biais comme l'isolement de certains genres particuliers et une sous-représentation de certains organismes. Par exemple, les prélèvements d'air favorisent les champignons produisant un grand nombre de petites conidies au détriment de ceux qui en produisent moins.

Pour les FAC, l'augmentation de la durée d'agitation n'a pas amélioré la récupération des cellules bactériennes et fongiques. Les FAC peuvent être facilement mises en suspension dans le milieu de récupération par un simple passage au vortex, et les particules en suspension des FAC peuvent être ainsi diluées de manière homogène.

A l'inverse, la paille possède plus d'aspérités de surface que les FAC ; les microorganismes peuvent alors être adsorbés voire adhérents à sa surface, ce qui limiterait leur remise en suspension. Une extension de la durée d'agitation présente un impact significatif pour cette matière première. Pour améliorer le recouvrement des champignons, l'ajout de Tween80 s'est révélé nécessaire.

Un agent tensio-actif est régulièrement utilisé dans les milieux de récupération des microorganismes. Il permet par exemple de mieux disperser les spores en évitant qu'elles s'agrègent entre elles ou à la surface du tube (Silva et al., 2011). Il est donc possible que le détergent permette de détacher les conidies présentes sur les matières premières et de limiter leur aggrégation et que, suivant les différentes dispositions de ces agrégats en fonction du type de matière première (terre, paille), cela conduise à une augmentation plus ou moins importante du nombre d'UFC énumérées. Cet effet est beaucoup moins important dans le cas des bactéries.

Enfin, par rapport à la méthode de prélèvement par simple agitation, le procédé de broyage a amélioré la récupération de spores bactériennes d'un facteur 4 mais aucune différence significative n'a pu être observée pour les moisissures. L'utilisation du Smasher™ pour la paille reste cependant intéressante par rapport à l'étape d'agitation, car elle permet une meilleure récupération des bactéries et un temps de traitement plus court.

L'utilisation d'adhésif lors des prélèvements intérieurs est parfois mise en œuvre, en particulier pour prélever des zones de mycéliums visibles et coupler cette méthode de prélèvement avec des observations par microscopie (Andersson et al., 1997; Gravesen et al., 1999; Nielsen et al., 1998a). Néanmoins, les adhésifs peuvent également être envisagés dans le but d'effectuer des prélèvements non destructifs sur matériaux de construction (Urzi and De Leo, 2001), et il est important d'évaluer l'efficacité de relargage des conidies fongiques une fois adhérentes. Après dépôt d'une suspension de conidies titrée, l'efficacité de relargage dans le milieu de récupération a été évaluée à environ 30 %. L'utilisation de cette méthode ne semble donc pas être totalement adaptée pour la quantification précise des microorganismes présents sur les surfaces, car il n'est pas garanti que 100 % des cellules soient adhérentes lors du dépôt du film, et le relargage n'est pas représentatif de la totalité des bactéries et champignons prélevés. Cependant, la quantité de microorganismes non récupérés reste inférieure à 1 log₁₀, et le prélèvement par adhésif permet tout de même d'avoir un aperçu de la quantité globale ainsi que des flores majoritaires sur l'échantillon, notamment par dépôt direct sur milieu de culture (Urzi and Albertano, 2001). Une des limites potentielles des essais préliminaires réalisés est représentée par une évaluation uniquement basée sur des aspects quantitatifs (UFC/g) et non qualitatifs.

Une fois les paramètres des méthodes de traitements des prélèvements déterminés, celles-ci ont été mises en place pour étudier les flores microbiennes associées aux matériaux biosourcés à base de terre crue par les approches de culture.

3.3. Caractérisation par culture des flores microbiennes *in situ*

Les méthodes de prélèvement précédemment présentées ont été appliquées afin d'isoler les microorganismes présents dans les matrices étudiées. Les méthodes de caractérisation par culture permettent de visualiser une partie des flores cultivables pouvant se développer sur les milieux de culture test. Elles ne conduisent pas à l'isolement de la totalité des microorganismes présents, mais donnent de premières indications sur certains genres environnementaux. Ainsi, une caractérisation de la flore microbienne a été menée par culture sur différents étages de la construction en terre crue, depuis la matière première jusqu'à l'éprouvette séchée. Afin d'évaluer la prolifération des microorganismes subsistant dans le matériau final, des prélèvements ont également été menés sur des éprouvettes mises en condition de forte humidité. Enfin, il est important d'étudier ces types de matériau dans leurs conditions d'utilisation, c'est pourquoi les microorganismes présents *in situ* dans certains habitats en terre crue ont également été isolés. L'isolement de certaines bactéries peut notamment être intéressant pour être par la suite utilisées lors des essais de flore positive, antifongique.

3.3.1. Matériels et méthodes

Les microorganismes contenus dans les FAC et la paille ont été récupérés selon la méthode de prélèvement par agitation (voir section 3.2.1.1) avec les paramètres déterminés lors de l'optimisation de cette méthode (voir section 3.2.2.1).

3.3.1.1. Prélèvements à la surface et à l'intérieur des éprouvettes manufacturées

Afin de déterminer les flores initialement présentes sur les éprouvettes manufacturées, des prélèvements ont été effectués à la surface et à l'intérieur :

- Prélèvements de surface : ils sont réalisés avec des adhésifs stériles (Hydrofilm® - Hartmann) sur des éprouvettes Ø5H5 FAC-S0% et FAC-S3% à deux moments du processus de fabrication : avant l'étape de séchage, directement après l'étape de compression, et après l'étape de séchage, lorsque les éprouvettes ont été retirées de l'enceinte thermique. Les adhésifs de 4 cm² ont été pressés manuellement sur les éprouvettes pendant 5 minutes. Ils ont ensuite été transférés dans un tube et 10 mL de milieu de récupération (PBS + Tween80 à 5% en concentration finale) ont été ajoutés. Les suspensions ont été agitées par vortex durant 5 minutes pour décrocher les microorganismes adhérents. La gamme de dilution et la numération des UFC ont été réalisées comme décrit précédemment (voir section 3.2.1.1).

- Prélèvements en surface et à cœur : deux des éprouvettes cylindriques séchées de chaque composition ont été brisées horizontalement à l'aide d'une presse hydraulique de 100kN. Des prélèvements sont effectués à l'aide des adhésifs à la surface et à l'intérieur des éprouvettes brisées. Les adhésifs sont déposés sur des milieux PDA-Cm et incubés pendant 7 jours à 22,5°C pour observer le développement de champignons.

3.3.1.2. Evaluation de la cinétique développement de moisissures sur des éprouvettes manufacturées

Une méthode d'humidification par capillarité a été adaptée de précédents travaux d'absorption capillaire de matériaux de construction en terre crue, afin de permettre une humidification de l'éprouvette sans délitement (Kunwufine, 2011). Dans des conditions contrôlées (sous poste de sécurité microbiologique de type II ou PSM), une brique de terre cuite stérile est placée dans une bassine stérile. Un morceau d'éponge est placé pour recouvrir la brique de terre cuite. Trois éprouvettes $\Phi 5H5$ séchées de la même composition sont placées sur l'éponge. La bassine est alors remplie avec de l'eau stérile jusqu'à presque la hauteur de la brique en terre cuite, ce qui permet une humidification des éprouvettes par capillarité sans qu'elles ne se désagrègent (Figure 3.8). La bassine est maintenue dans des conditions contrôlées (sous PSM) à température ambiante pendant 3 mois. Le niveau d'eau est réajusté régulièrement afin qu'il reste stable. Une bassine est préparée comme décrit ci-dessus pour chacune des deux compositions d'éprouvettes, FAC-S0 % et FAC-S3 %. Deux éprouvettes témoins de chaque composition sont placées en conditions contrôlées sans être humidifiées. Les éprouvettes sont observées régulièrement durant les 3 mois.

Au terme des 3 mois, deux éprouvettes de chaque condition (composition / humidité) sont brisées horizontalement à l'aide d'une presse hydraulique de 100kN. Deux prélèvements sont réalisés à la surface à l'aide des adhésifs, ainsi que deux prélèvements à l'intérieur des éprouvettes brisées (voir section 3.3.1.1).

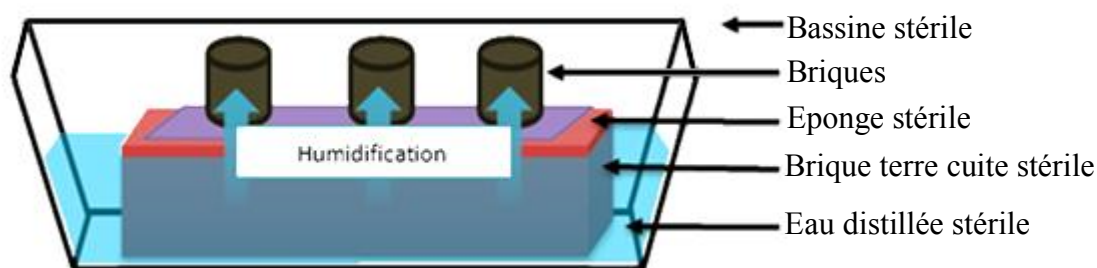


Figure 3.8 : Schéma du système d'humidification par capillarité.

3.3.1.3. Mise en culture des prélèvements sur matériaux *in situ*

Suite à la première campagne de prélèvement *in situ* (voir section 3.1.2), les microorganismes viables / cultivables contenus dans les échantillons des sites A, B, C et D ont été isolés par culture. La méthode de récupération des microorganismes par mise en suspension dans un milieu puis agitation (voir section 3.2.1.1) a été utilisée pour l'ensemble des échantillons *in situ* avec les paramètres déterminés dans la section 3.2.2.1 (Tableau 3.3). Des milieux de culture plus spécifiques à la flore fongique de l'intérieur ont été utilisés (Tableau 3.4). Une fois récupérées et déposées sur milieu de culture, les bactéries et les moisissures ont été dénombrées et le nombre d'UFC/g d'échantillon a été calculé.

Tableau 3.4 : Liste des milieux de cultures utilisés pour les prélèvements réalisés *in situ*.

Milieu de culture	Microorganismes recherchés	Température d'incubation	Durée d'incubation
Tryptone Soy Agar (TSA)	Bactéries aérobies et aéro-anaérobies	32,5°C	48h (2 jours)
Potato Dextrose Agar (PDA) + 0,05g/L de chloramphénicol (Cm)	Champignons	22,5°C	120h (5 jours)
MEA + 0,05g/L de chloramphénicol (Cm)	Champignons	22,5°C	120h (5 jours)
DG18 + 0,05g/L de chloramphénicol (Cm)	Champignons xérophiles	22,5°C	120h (5 jours)

3.3.1.4. Caractérisation des microorganismes isolés

En plus de l'aspect quantitatif, les colonies et mycéliums obtenus ont été caractérisés pour obtenir des données qualitatives. Les différentes colonies bactériennes isolées présentant des différences phénotypiques ont été étudiées, ainsi que la totalité des isolats fongiques. Les isolats microbiens ont été observés à différents niveaux :

- sur un plan macroscopique : aspect des colonies ou du mycélium, couleur, taille, relief, etc.
- sur un plan microscopique : une coloration de Gram a été effectuée sur les isolats bactériens (microscopie optique à immersion, X1000). Une distinction a été faite sur la forme des cellules (bacille / coque) ainsi que sur les caractéristiques de la paroi (Gram + / Gram -) et la présence de spores. Une coloration au bleu de coton a été effectuée pour les champignons (microscopie optique X400) afin d'observer la forme

des hyphes et des conidiophores. La majorité des isolats a pu être identifiés au niveau du genre.

Les isolats bactériens ont été caractérisés, dans un premier temps, par tests enzymatiques (Oxydase / Catalase). Une identification supplémentaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été effectuée. A partir d'une colonie bactérienne sur gélose, un échantillon de cette colonie a été déposé sous forme de dépôt homogène sur une position de la cible MALDI (MSP 96 polished steel BC target). Le dépôt est ensuite recouvert d'1µL d'acide formique à 70 %. Après séchage, 1µL de matrice IVD Matrix HCCA (Bruker), reconstituée au préalable avec 250µL de solution de solvant organique (acétonitrile 50 %, eau 47,5 %, TFA 2,5 %) (Sigma-Aldrich), a été déposé à sa surface et laissé sécher. Un contrôle interne, nommé BTS (Bacterial Test Standard) a été ajouté sur une position de la cible MALDI. Le profil protéique des spots a ensuite été analysé par MALDI-TOF BioTyper (Bruker). Le spectre acquis a été comparé avec les spectres de référence contenus dans la banque de données générale IVD MALDI BioTyper, version 4.0(5627). Le seuil de score de congruence des spectres est classiquement fixé à un résultat supérieur ou égal à 2 pour l'identification des isolats environnementaux. Des scores inférieurs ont été pris en compte pour certains isolats en considérant l'ensemble des identifications proposées (10 premières) et la concordance avec les observations macro et microscopiques, ainsi que les tests enzymatiques initiaux.

3.3.2. Résultats

L'étude des communautés microbiennes des matériaux en terre crue a été réalisée à plusieurs étapes de la fabrication du matériau. Les microorganismes contenus dans les différentes matières premières utilisées dans cette étude, à savoir les FAC et la paille, ont été quantifiés par culture puis identifiés par leur morphotype et par spectrométrie de masse MALDI-TOF, cette dernière technique permettant une identification rapide et précise des isolats bactériens. De la même manière, ceux présents à la surface et à l'intérieur d'éprouvettes fabriquées en laboratoire ont été évalués avant et après un séchage du matériau à 100°C. L'impact de cette étape sur les flores microbiennes et leur survie au sein du matériau a ainsi pu être observé. De plus, ces éprouvettes ont été placées en condition de forte humidité afin d'évaluer le développement des microorganismes persistants après le traitement thermique. Le rôle de l'ajout de fibres végétales sur les proliférations bactériennes et fongiques a également pu être déterminé. Enfin, une partie des prélèvements obtenus sur des supports *in situ* en terre crue a été étudiée. Différents milieux de culture ont été utilisés pour

isoler un large spectre de champignons, et les communautés microbiennes cultivables ont été identifiées et quantifiées.

3.3.2.1. Microorganismes issus des matières premières

Les matières premières ont été analysées dans un premier temps (Figure 3.9). Les quantités maximales de bactéries énumérées sont de l'ordre de $2,8 \pm 0,7 \times 10^4$ UFC/g pour les FAC et de $1,9 \pm 0,3 \times 10^6$ UFC/g pour la paille. Pour les moisissures, environ $2,6 \pm 0,3 \times 10^2$ UFC/g ont été détectées pour la FAC et $6,7 \pm 0,1 \times 10^3$ UFC/g pour la paille. La paille contiendrait donc significativement plus de microorganismes que la FAC, bactéries et champignons confondus.

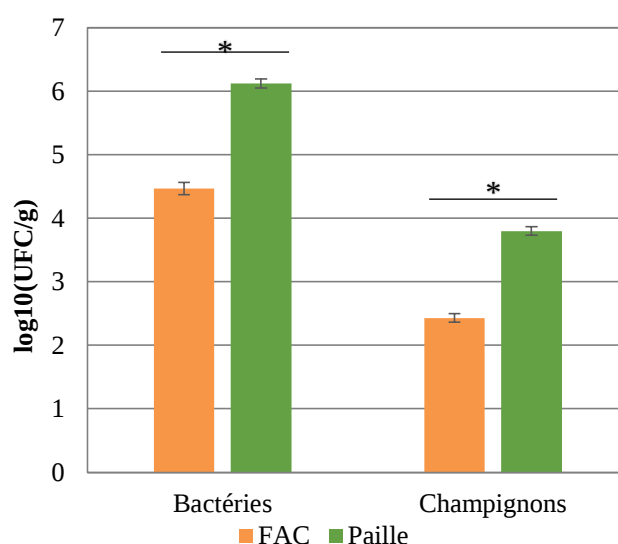


Figure 3.9 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de FAC (orange) et de paille (vert).

Les microorganismes isolés lors des essais ont été caractérisés sur la base de leurs phénotypes macroscopiques et microscopiques, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le cas des bactéries.

FAC

Pour la FAC, la majorité des isolats bactériens sont des bacilles à Gram + capables de croître dans des conditions aérobies (Tableau 3.5). Une identification plus poussée par spectrométrie de masse MALDI-TOF a révélé parmi ces bacilles une forte prédominance du genre *Bacillus*, avec différentes espèces, ainsi que d'autres genres proches (*Paenibacillus*, *Solibacillus*). Quelques coques à Gram + comme *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus pasteurii* ont également été identifiés. Dans le cas des champignons, il a été possible de quantifier le nombre d'UFC pour chaque isolat. Les genres fongiques isolés sont principalement *Penicillium* (environ 40 % des UFC ; 4 isolats), *Aspergillus* (35 % ; 3 isolats),

Cladosporium (10 % ; 2 isolats) et plus rarement, *Rhizopus* (2 % ; 1 isolat) et *Ulocladium* (2 % ; 1 isolat) (Figure 3.10).

Paille

Comme pour la FAC, les isolats bactériens provenant de paille sont principalement des bacilles à Gram +, avec *Bacillus megaterium*, *Curtobacterium flaccumfaciens* et *Paenibacillus amylolyticus*, ainsi que des coccobacilles ou coques à Gram + avec *Arthrobacter scleromae* et *Staphylococcus epidermidis* (Tableau 3.5). Contrairement aux FAC, des bacilles à Gram – ont été détectés au sein de la paille. Les isolats fongiques appartenait principalement aux genres *Aspergillus* (environ 95 % ; 4 isolats), avec quelques *Penicillium* (2 % ; 2 isolats) et *Rhizopus* (2 % ; 1 isolat). Les phénotypes bactériens et fongiques observés sur milieu de culture à partir des prélèvements de la paille ont montré une richesse deux fois moins importante que celle de la FAC.

Tableau 3.5 : Identification des isolats bactériens (morphologie et signature MALDI TOF) et fongiques (identification morphologique) obtenus après isolement respectivement sur milieu TSA et milieu PDA pour les matières premières.

Catégorie	FAC	Paille
Bactéries	Bacille à Gram + non identifié <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> <i>Solibacillus silvestris</i> <i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Arthrobacter scleromae</i> Bacille à Gram + non identifié Bacille à Gram - non identifié <i>Bacillus megaterium</i> <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Paenibacillus amylolyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Champignons	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Ulocladium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.

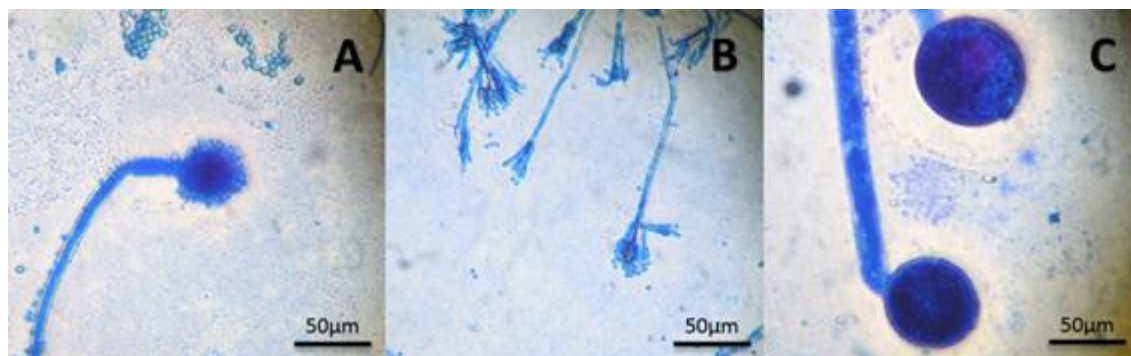


Figure 3.10 : Observations par microscopie optique d'isolats d'*Aspergillus* sp. (A), *Penicillium* sp. (B) et *Rhizopus* sp. (C) après coloration au bleu coton (G x400).

3.3.2.2. Prélèvements et quantification sur des éprouvettes manufacturées

La figure 3.11 présente les UFC énumérées par cm² d'adhésif après prélèvement de la surface des éprouvettes cylindriques FAC-S0 % et FAC-S3 %, avant l'étape de séchage (Figure 3.11.A) ou après (Figure 3.11.B). Les éprouvettes FAC-S3% non séchées contenaient en moyenne 1 log₁₀ de bactéries et de champignons par cm² d'adhésif de plus que les éprouvettes FAC-S0% non séchées. Bien que les éprouvettes FAC-S3% ne contiennent que 3 % de paille, l'addition de fibres végétales a conduit à la détection d'une quantité plus importante de microorganismes à la surface des éprouvettes qu'avec la terre seule. Les isolats obtenus sur les éprouvettes cylindriques étaient identiques à ceux retrouvés dans les deux types de matières premières.

Les prélèvements sur éprouvettes FAC-S0 % après séchage contenaient en moyenne 3 UFC d'isolats bactériens par cm² d'adhésif alors que, avant l'étape de séchage, la quantité de bactéries était de $2,6 \pm 2,3 \times 10^3$ UFC/cm². De même, les prélèvements des éprouvettes séchées FAC-S3 % contenaient en moyenne 10 UFC/cm² alors que les éprouvettes non séchées de même composition présentaient initialement $2,7 \pm 2,2 \times 10^4$ UFC/cm² à leur surface. Aucune valeur n'est indiquée pour les moisissures sur des éprouvettes après séchage car en moyenne moins d'1 UFC/cm² a été obtenue.

Afin de confirmer l'absence ou la présence de moisissures dans les éprouvettes séchées, un prélèvement a été effectué sur la surface et à l'intérieur des éprouvettes cylindriques puis le film adhésif a été directement déposé sur milieu de culture (Figure 3.12). Très peu de moisissures ont été isolées à partir de ces prélèvements de surface: moins d'un isolat par prélèvement, et seulement sur les éprouvettes FAC-S3 %. Mais dans le cas des prélèvements réalisés à l'intérieur des éprouvettes, diverses moisissures ont été observées. Ces résultats

suggèrent que certains microorganismes ont survécu à l'étape de séchage, et en particulier au cœur des produits manufacturés.

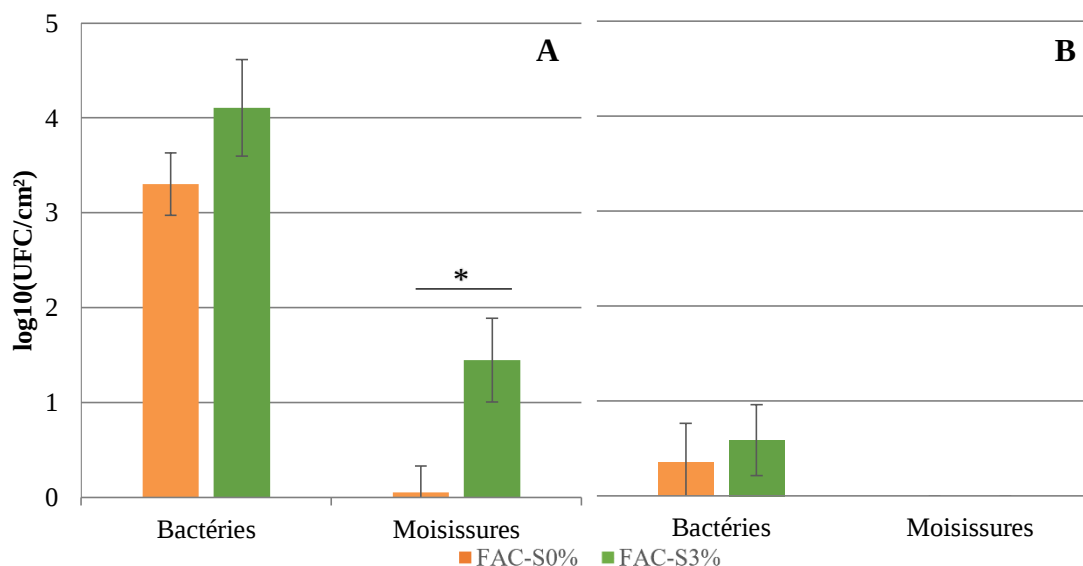


Figure 3.11 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types; trois essais indépendants en triplicats techniques) par cm^2 prélevé obtenues lors des prélèvements à la surface des éprouvettes non séchées (A) ou séchées (B).

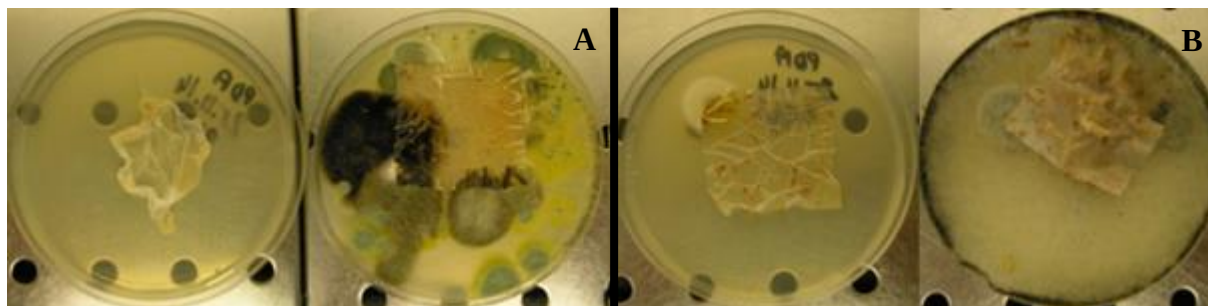


Figure 3.12 : Isolats obtenus après 7 jours d'incubation à 22,5°C à partir des prélèvements réalisés par adhésif à la surface (à gauche) et à l'intérieur (à droite) des éprouvettes FAC-S0 % (A) et FAC-S3 % (B) séchées.

3.3.2.3. Observation du développement microbien en condition de forte humidité en laboratoire sur éprouvettes manufacturées

Des éprouvettes cylindriques séchées ont été observées pendant trois mois en (i) condition sèche et (ii) condition humide. La condition humide correspond à une humidification totale du matériau avec de l'eau liquide. Elle a été mise en œuvre par remontée capillaire. Aucun développement visible à l'œil nu de moisissure n'a été observé sur les éprouvettes en condition sèche. Après un mois en condition d'humidité élevée, quelques mycéliums blancs sont apparus sur les éprouvettes de chaque composition et se sont lentement développés. À 6 semaines, des moisissures se sont fortement développées sur les éprouvettes

FAC-S0 % (Figure 3.13.A). Dans le même temps, pour les éprouvettes FAC-S3 % (Figure 3.13.B), deux d'entre elles ont présenté un important recouvrement par des moisissures noires. Le développement de moisissures dans les éprouvettes séchées mises en condition humide a confirmé les observations de la section 3.3.2.2, à savoir la persistance de moisissures dans l'éprouvette après séchage. Après 2 mois, le développement plus tardif de moisissures différentes a été observé à la surface des éprouvettes, avec une hétérogénéité quant à la localisation du développement. Ces résultats suggèrent que, même si certaines moisissures survivent au traitement thermique dans les échantillons, toutes n'ont pas la même cinétique de revivification et de croissance dans le matériau.

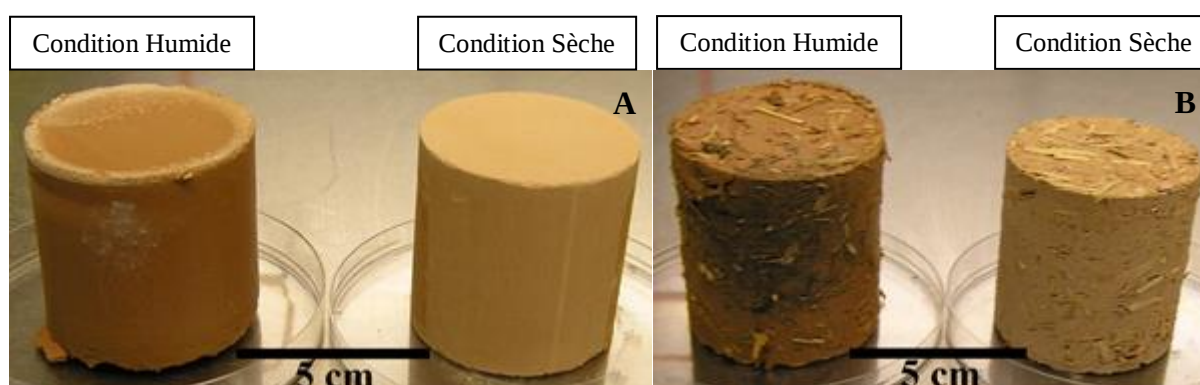


Figure 3.13 : Observations d'éprouvettes FAC-S0 % (A) et FAC-S3 % (B) après incubation à température ambiante pendant deux mois en condition humide (à gauche sur les photos) et en condition sèche (à droite sur les photos).

La figure 3.14 présente les résultats de numération des bactéries (Figure 3.14.A) et des champignons (Figure 3.14.B) des prélèvements réalisés à la surface et à l'intérieur des éprouvettes pour chaque condition d'humidité après 3 mois. Dans le cas des éprouvettes humides, un des prélèvements de surface a été effectué sur une zone, notée Surface-M, où un mycélium était visible. Pour ce qui est des éprouvettes restées en condition sèches, aucune différence significative n'a pu être observée entre la surface et l'intérieur de l'éprouvette, et ce quelle que soit leur composition. Cependant, la quantité de bactéries prélevées après 3 mois se situe entre $8,5 \times 10^1$ UFC/cm² et $4,1 \times 10^2$ UFC/cm² alors qu'elle était inférieure à 10^1 UFC/cm² à la sortie de l'enceinte thermique. De même, des moisissures ont pu être détectées après 3 mois, ce qui n'avait pas été le cas juste après séchage. Il y a donc eu développement des microorganismes dans le produit malgré la condition « sèche » (HR ambiante). Lorsque les éprouvettes ont été mises en condition humide, un développement bactérien très important a pu être observé pour les deux compositions, que ce soit en surface ou à l'intérieur. Les éprouvettes FAC-S0% humides n'ont pas présenté significativement plus de moisissures à

leur surface que celles en condition sèche, excepté dans la zone où le mycélium est visible, en accord avec un développement de moisissures très localisé ou une phase de latence très longue. Une augmentation significative de la quantité de champignons détectés à l'intérieur des éprouvettes humides peut toutefois être notée par rapport aux éprouvettes sèches, validant la deuxième hypothèse. Les prélèvements de l'éprouvette FAC-S3 % mise en condition humide ont révélé de leur côté une importante contamination fongique, y compris au niveau des surfaces ne présentant pas de mycélium visible et à l'intérieur. Enfin, les éprouvettes humides FAC-S3% présentent significativement plus de microorganismes que les éprouvettes humides FAC-S0%, hors zone de mycélium apparent. La paille pourrait donc avoir un rôle à la fois dans l'apport de contamination mais également en favorisant le maintien et le développement secondaire des microorganismes.

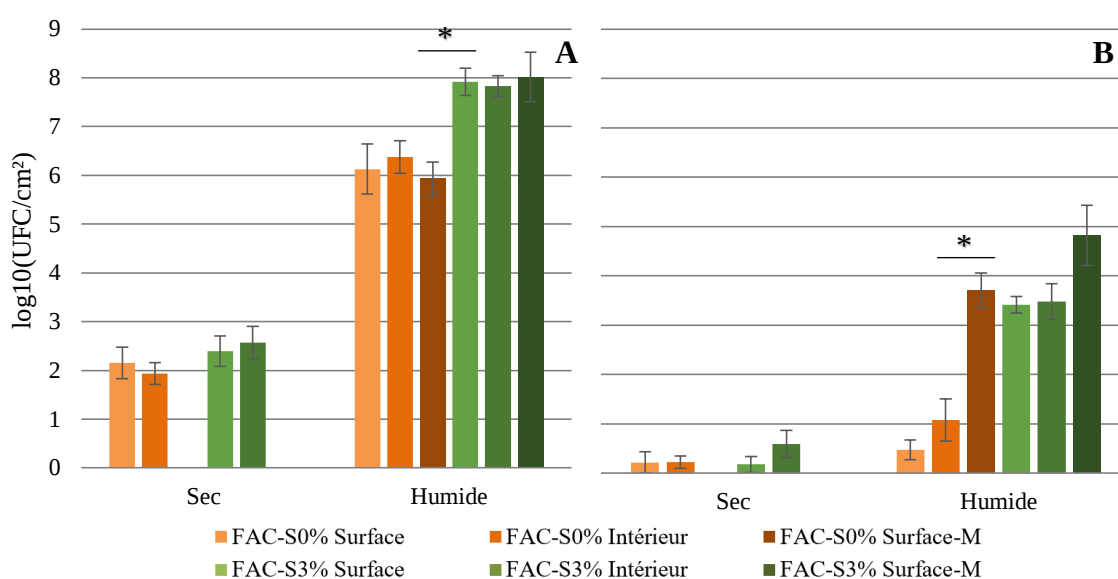


Figure 3.14 : Unités formant colonies (moyennes ± écarts-types; deux éprouvettes par condition) de bactéries (A) et de champignons (B) par cm² obtenues lors des prélèvements à la surface et à l'intérieur des éprouvettes en fonction de leur condition d'humidité.

3.3.2.4. Quantification et identification des microorganismes des prélèvements *in situ*

A partir des prélèvements *in situ* des sites A, B, C et D, l'isolement et la numération des microorganismes présents dans les échantillons ont été effectués (Figure 3.15). Les différents sites présentent des historiques variés :

- Le site A est une ancienne étable en adobe ayant connu la présence d'animaux et qui a été restaurée en habitation il y a une dizaine d'années.

- Le site D est une ancienne habitation de ferme dans la même commune que le site A, avec un mur en terre crue présentant des traces d'un ancien enduit, et qui est actuellement habitée.
- Le support Ba est un mur en adobe d'une maison construite en 1995 et qui a connu un évènement de forte humidité, et le support Bb est un mur en torchis du cellier de cette même maison servant à stocker des fruits et légumes.
- Le site C est une habitation qui n'a pas connu d'incident, et dont l'enduit terre-chanvre prélevé a été posé en 2009.

Les densités de bactéries sont variables suivant le site de prélèvement, avec une plus forte concentration pour les prélèvements du support Bb ($1,9 \times 10^6$ UFC/g), et plus faible dans le cas du site D ($2,7 \times 10^4$ UFC/g). Dans le cas du site A, la quantité de bactéries cultivables varie fortement suivant la hauteur de réalisation du prélèvement. Alors que les prélèvements réalisés à 120 cm et 100 cm présentent une colonisation élevée en bactéries (environ 10^7 UFC/g sur l'adobe), le reste du mur présente des quantités significativement inférieures, de l'ordre de 10^4 à 10^5 UFC/g sur l'adobe. Cette variation confirme la nécessité de prélever à différents emplacements du mur lorsque cela est possible afin d'avoir des échantillons représentatifs de la totalité du support. Aucune différence significative en termes d'identification des isolats obtenus par culture n'a toutefois été observée entre les différentes hauteurs de prélèvement sur ce site. Les résultats pour le site A montrent que le nombre d'UFC sur adobe (AM) est supérieur d'environ 1 log₁₀ au nombre recensé sur joint (AJ), pour des prélèvements réalisés à la même hauteur. A l'inverse, le site D, dont le joint possède une composition visuellement différente par rapport au site A, ne présente pas de différence entre les deux composants du mur, alors que joint et adobe ont une composition différente. La nature du joint du mur semble avoir un impact important sur la densité des bactéries présentes localement.

En ce qui concerne les champignons, les deux supports du site B sont les plus chargés en champignons (plus de 10^3 UFC/g) tandis que la quantité sur l'ensemble des autres sites est en dessous de 10^2 UFC/g. Les milieux PDA et MEA 2 % ont donné des résultats similaires, que cela soit en nombre d'isolats ou en genres isolés. En revanche, le milieu DG18 a permis l'isolement à partir du support Ba d'une forte concentration de *Wallemia* sp., ce qui n'était pas observé sur les autres milieux.

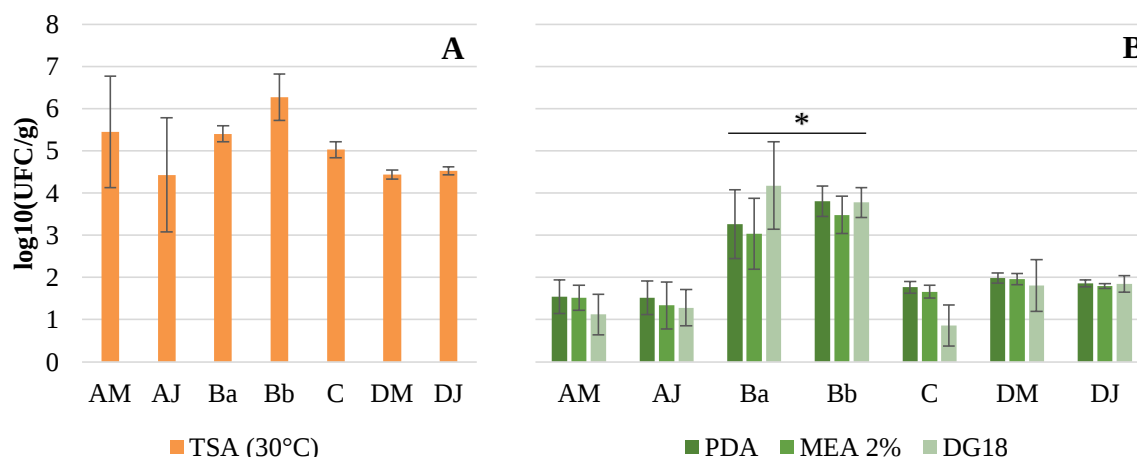


Figure 3.15 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types; n=6 pour AM et AJ, n=5 pour Bb, n=4 pour Ba et C, n=3 pour DM et DJ) de bactéries (A) et de champignons (B) par gramme de matériau prélevé en fonction du milieu de culture utilisé.

Suite à la numération des isolats obtenus à partir des prélèvements *in situ*, ces isolats ont été identifiés comme décrit précédemment. Pour les bactéries, le genre majoritairement retrouvé sur l'ensemble des supports prélevés est le genre *Bacillus* (Tableau 3.6). Différentes espèces ont été isolées selon les sites, avec, néanmoins, la présence de *Bacillus simplex* sur les 4 sites étudiés. Les autres genres détectés sur les matières premières, *Micrococcus*, *Solibacillus*, et *Staphylococcus* ne sont présents que sur 1 ou 2 supports. La présence de bacilles à Gram – a pu être observée sur différents sites, que ce soit des bactéries du genre *Pseudomonas* ou des isolats non identifiés. Le genre *Streptomyces* a également été mis en évidence. En ce qui concerne les champignons, les deux genres les plus communs sont *Penicillium* et *Aspergillus* (Tableau 3.7). *Cladosporium* est détecté sur les sites A et B, tandis que d'autres genres variés comme *Alternaria*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Ulocladium* ou encore *Wallemia* ne sont pas communs à plus d'un site.

Tableau 3.6 : Identification par MALDI-TOF des isolats bactériens après isolement sur milieu TSA à partir des les prélèvements *in situ*.

Site	AM	AJ	Ba	Bb	C	DM	DJ
Isolats							
<i>Bacillus atrophaeus</i>				•			
<i>Bacillus cereus</i>			•				
<i>Bacillus indicus</i>							•
<i>Bacillus licheniformis</i>	•	•					•
<i>Bacillus mojavensis</i>	•						
<i>Bacillus megaterium</i>				•			•
<i>Bacillus muralis</i>			•				•
<i>Bacillus mycoides</i>				•			
<i>Bacillus niacini</i>				•			
<i>Bacillus pseudomycoides</i>				•	•		
<i>Bacillus pumilus</i>			•		•		
<i>Bacillus simplex</i>	•	•	•	•	•	•	•
<i>Bacillus subtilis</i>		•					
Bacille à Gram + non identifié	•	•	•	•	•	•	•
Bacille à Gram - non identifié		•	•	•		•	•
Coque à Gram + non identifié	•	•	•	•	•	•	•
<i>Micrococcus luteus</i>					•		
<i>Pseudomonas luteola</i>		•					
<i>Pseudomonas stutzeri</i>			•				
<i>Solibacillus silvestris</i>				•			
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		•					
<i>Streptomyces griseus</i>					•		

Tableau 3.7 : Identification morphologique des isolats fongiques après isolement sur milieux PDA, MEA et DG18 à partir des prélèvements *in situ*.

Site	AM	AJ	Ba	Bb	C	DM	DJ
Isolats							
<i>Alternaria</i> sp.	•						
<i>Aspergillus</i> sp.	•		•	•	•	•	•
<i>Cladophialophora</i> sp.				•			
<i>Cladosporium</i> sp.	•	•	•	•			
<i>Exophiala</i> sp.			•				
<i>Mucor</i> sp.				•		•	
<i>Penicillium</i> sp.	•	•	•	•	•	•	•
<i>Rhizopus</i> sp.		•					
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					•		
<i>Ulocladium</i> sp.	•	•					
<i>Wallemia</i> sp.			•				

3.3.3. Discussion

Les méthodes de culture mises en place ont permis d'avoir un premier aperçu des flores présentes sur les matériaux de construction à base de terre crue. Concernant les matières premières, comme attendu, la plupart des isolats fongiques appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, des moisissures fréquemment détectées dans l'environnement extérieur, que cela soit dans l'air (Shelton et al., 2002) ou le sol (Vassilev et al., 2006). La plupart des isolats bactériens présents dans la FAC appartenaient au genre *Bacillus*, genre commun associé à de nombreux environnements, en particulier le sol (McSpadden Gardener, 2004). Pour la paille, les espèces identifiées sont également des bactéries environnementales classiques, avec *Bacillus* sp., mais également *Arthrobacter* sp. ou *Paenibacillus* sp. Après le processus de fabrication des éprouvettes et avant le séchage, ces genres restent associés aux flores présentes à la surface des éprouvettes. La flore initiale des matériaux de construction à base de terre crue correspondrait donc aux communautés environnementales contenues dans les matières premières qui les constituent.

Cependant, l'étape de séchage a un impact significatif sur les microorganismes présents sur et dans les éprouvettes. Le traitement thermique à 100°C élimine la quasi-totalité des bactéries en surface, et fait descendre la population de champignons en dessous de la limite de quantification du prélèvement par adhésif. Toutefois, ce traitement thermique n'est pas suffisant pour éliminer l'ensemble de la flore et n'affecte pas tous les microorganismes présents, en particulier au cœur de l'éprouvette. Certains auteurs suggèrent que les séchages à des températures supérieures à 80°C permettraient une stérilisation du matériau (Röhlen and Ziegert, 2013). Bien que la température soit montée à 100°C au cœur de l'éprouvette, certains microorganismes ont tout de même subsisté. Ceci est notamment cohérent avec la dominance d'espèces capables de sporuler (*Bacillus* sp.) et leur détection en nombre supérieur après trois mois en condition humide. De la même manière, lorsque ces éprouvettes sont mises en condition de très forte humidité, les moisissures ayant survécu peuvent à nouveau se développer et proliférer jusqu'à la surface du produit. Ces résultats indiquent qu'une des origines des microorganismes se développant sur ces supports peut correspondre aux communautés initialement présentes dans la terre et sur les fibres végétales utilisées.

L'ajout de matières végétales semble également avoir un impact sur le comportement des microorganismes dans le matériau. Tout d'abord, les approches par culture sur les matières premières ont révélé une densité bactérienne et fongique plus importante sur la paille que sur les FAC. Lors de l'incorporation de la paille dans le matériau de construction, ces fibres

végétales apporteraient donc une quantité de microorganismes significative. Cette observation est confirmée par les prélèvements de surface avant l'étape de séchage, en particulier pour la flore fongique.

Lorsque les éprouvettes FAC-S0 % et FAC-S3 % ont été mises en condition humide, la cinétique d'apparition des premiers mycéliums était équivalente entre les deux formulations. Les éprouvettes FAC-S3 % présentaient toutefois des zones de contamination rapidement plus étendues que dans le cas des FAC-S0 %. En effectuant des prélèvements après 3 mois en condition humide, la quantité de bactéries par cm² d'adhésif était d'environ 10⁸ UFC pour les FAC-S3 %, soit 2 log10 de plus que pour les FAC-S0 %. De même, la surface des FAC-S0 % ne présentait que des mycéliums ponctuels, le reste de l'éprouvette présentant des niveaux de contamination d'environ 10¹ UFC/cm² de champignons à la surface et à l'intérieur. A l'inverse, le développement fongique sur les éprouvettes FAC-S3 % était nettement plus important, avec plus de 10³ UFC/cm² sur l'ensemble du produit. Les fibres végétales pourraient influencer la croissance des microorganismes dans les briques selon deux processus :

- Tout d'abord, elles constituent une source de carbone utilisable par certains organismes, favorisant ainsi leur croissance. Le même phénomène a été observé dans le cas de matériaux contenant de la cellulose (Hoang et al., 2010; Huang et al., 2015; Mensah-Attipoe et al., 2015).
- Un autre facteur pouvant augmenter le développement des microorganismes est la porosité du matériau. En effet, dans le cas des éprouvettes FAC-S0%, la terre est fortement comprimée et donne un matériau avec très peu d'aspérités et de vides internes. L'ajout de fibres végétales a pour conséquence de piéger de l'air à l'intérieur de l'éprouvette, ce qui permet notamment d'alléger le matériau et d'augmenter ses performances d'isolation thermique (Laborel-Préneron et al., 2016). Toutefois, l'augmentation de la porosité du matériau favorise également l'absorption de l'eau (Hoang et al., 2010). Cette porosité induit également une augmentation de la surface disponible pour le développement microbien à l'intérieur et à la surface du matériau. L'ajout de fibres végétales induirait donc, selon différents mécanismes, une plus forte sensibilité au développement microbien.

Les prélèvements *in situ* constituent une première observation de la diversité de la densité microbienne présente en surface des murs à base de terre crue. D'une manière générale, la

densité bactérienne s'étendait de $1,1 \times 10^3$ UFC/g à $1,4 \times 10^7$ UFC/g, avec en moyenne $1,2 \times 10^5$ UFC/g sur l'ensemble des prélèvements. En comparaison, la concentration en bactéries est de l'ordre de $7,3 \times 10^5$ UFC/g pour des poussières dans des bureaux (Bouillard et al., 2005) et à $1,6 \times 10^6$ UFC/g pour des poussières sous des lits (Horak et al., 1996), ce qui est légèrement supérieur mais relativement proche des concentrations détectées à la surface des murs en terre crue prélevés. Les prélèvements sur le site A ont toutefois révélé une forte variabilité du nombre de bactéries présentes suivant la hauteur de prélèvement du mur, avec une concentration supérieure de 2 voire 3 log10 sur les hauteurs 100 cm et 120 cm par rapport au reste du mur. Ces variations pourraient être liées à la persistance de bactéries associées à la présence d'animaux dans le bâtiment avant sa rénovation. Dans le cas des autres supports où la hauteur variait (Ba, Bb, D), cet effet de hauteur n'a pas été observé, suggérant que cette variation soit en partie liée à l'historique du site. Toutefois, les approches par culture n'ont pas permis de déterminer des types d'isolats bactériens spécifiques suivant la hauteur de prélèvement. De plus, la nature du joint semble également influencer la quantité de bactéries prélevées, avec 1 log 10 d'UFC/g pour le prélèvement sur joint du site A par rapport à celui sur adobe pour toutes les hauteurs. La composition du matériau, comme par exemple l'éventuelle présence de chaux qui aurait basifié le mortier, peut expliquer cette différence de développement (Verdier et al., 2014). Sur le site D, avec une composition de joint visuellement différente du site A, cet effet n'est pas observé. Malheureusement, les prélèvements sur site ne permettent pas de récupérer suffisamment de matériel pour des analyses de pH et de composition minéralogique de ces matériaux, aussi est-il difficile de confirmer ces hypothèses. Pour la suite de cette étude, lorsque les murs présentaient des joints et mortiers, les prélèvements se sont concentrés sur les adobes, qui composent la partie majoritaire du mur.

En ce qui concerne la flore fongique, celle-ci ne présente pas les mêmes variations que la flore bactérienne, avec une absence de différence significative selon la hauteur ou la localisation (adobe, joint) des prélèvements sur le site A. En prenant en compte les numérations sur milieu PDA, la densité fongique sur les supports en terre crue prélevés est comprise entre 10^1 UFC/g à $6,9 \times 10^3$ UFC/g, avec une moyenne de $1,8 \times 10^2$ UFC/g. La quantité de champignons mesurée par exemple dans des poussières de bureaux varie de 8×10^3 à 4×10^5 UFC/g dans l'étude de Pitkäranta *et al.* (2008), soit quelques log10 de plus que celle détectée sur la terre crue. Au sein des différents sites prélevés, une différence significative ($p < 0,05$) peut toutefois être observée entre les surfaces Ba et Bb d'un côté (concentration

fongique supérieure à 10^3 UFC/g) et le reste des sites de l'autre (concentration fongique entre 10^1 et 10^2 UFC/g). Dans le cas du site Ba, il s'agit d'un mur en adobe ayant déjà subi un évènement de recouvrement et développement fongique apparent. Suite à un problème de drain, le mur s'est retrouvé humidifié par capillarité depuis le sol, et la présence de mycélium/spores visibles à l'œil nu avait pu être observée par les occupants sur une zone du mur derrière un meuble. Bien que le problème ait été réglé, que l'humidité du mur soit retournée à la normale et les *Fungi* aient été éliminés sur le plan visuel, une partie des champignons s'étant développée a certainement subsisté sur ou à l'intérieur du mur. Avec les identifications des isolats, la très forte abondance du genre *Wallemia* suggère que ce genre s'est majoritairement développé et/ou maintenu suite à l'évènement. Puisque le genre *Wallemia* est un champignon pouvant se développer à des humidités relativement faibles (Zalar et al., 2005), il est possible que ce champignon ait été l'un des premiers à croître lorsque le mur a commencé à s'humidifier. La persistance des flores associées à des dégâts des eaux sur les surfaces de bâtiments, et ce malgré une remédiation partielle ou totale du bâtiment, a été mise en avant dans plusieurs études (Emerson et al., 2015; Pitkäranta et al., 2011), et pourrait expliquer cette abondance fongique particulière. Pour ce qui est du mur en torchis Bb, la présence de fibres végétales dans le torchis peut expliquer cette concentration fongique supérieure aux autres murs. Toutefois, le site C est également un enduit biosourcé, et il ne présente pas de différence significative avec les autres sites. Dans la mesure où la majorité des champignons présents à l'intérieur des bâtiments provient de l'air extérieur (Adams et al., 2013c; Amend et al., 2010a), la fonction de la salle où le mur Bb a été prélevé, à savoir un cellier où étaient entreposés de nombreux fruits et légumes, pourrait contribuer à un enrichissement de cette surface en champignons, ce qui ramène au rôle de l'usage et de l'historique du mur.

En termes d'identification, les genres détectés sont similaires à ceux des matières premières utilisées pour les essais en laboratoire. Un large panel d'isolats de *Bacillus* a été isolé sur les différents sites, mais ces isolats restent difficilement discriminables. En effet, l'identification des espèces du genre *Bacillus* est complexe, et les méthodes biochimiques et moléculaires ne sont pas suffisantes pour séparer certains groupes d'espèces pourtant différentes. La spectrométrie de masse MALDI-TOF utilisée pour l'identification au rang d'espèce permet en partie cette discrimination (Hotta et al., 2011; Starostin et al., 2015). Cette méthode d'identification a permis d'observer une importante diversité dans les espèces de *Bacillus* isolées à partir de ces prélèvements, avec la présence de *B. simplex* sur l'ensemble

des sites. D'autres genres bactériens potentiellement issus du sol comme *Pseudomonas*, *Solibacillus* et *Streptomyces* sont également présents sur les matériaux en terre crue. Dans une moindre mesure, certains genres notamment associés à la flore commensale cutanée humaine (*Micrococcus*, *Staphylococcus*) sont détectés sur les sites A et C. Lors des études sur l'environnement intérieur des bâtiments par culture (air et surface), de nombreux isolats sont associés à la présence humaine (Bouillard et al., 2005; Pastuszka et al., 2000). Dans le cas des murs en terre crue prélevés, les flores issues du sol sont prédominantes par rapport aux flores commensales de l'homme. Les murs sont rarement prélevés dans les études des flores intérieurs, et il serait intéressant de pouvoir comparer ces matériaux à ceux usuellement utilisés dans les habitats intérieurs (plâtre, papier peint, etc.), afin de déterminer si l'absence ou non détection de flores humaines est une caractéristique commune aux murs ou spécifique aux matériaux en terre crue.

Pour ce qui est de la flore fongique, les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été retrouvés sur l'ensemble des différents sites de prélèvement. Ces deux genres ont largement été isolés lors d'études de l'environnement intérieur par culture, que cela soit dans l'air (Beguin and Nolard, 1994; Dassonville et al., 2008; Hyvärinen et al., 2001; Shelton et al., 2002; Takahashi, 1997), dans les poussières (Chao et al., 2002; Pitkäranta et al., 2008) ou sur les surfaces intérieures (papiers peints, plâtres, bureau, etc.) (Beguin and Nolard, 1994; Santucci et al., 2007). Le genre *Cladosporium*, largement répandu dans l'air extérieur (Barberán et al., 2015; Shelton et al., 2002; Takahashi, 1997), est présent dans 2 habitations sur les 4 prélevées. Enfin, les autres genres détectés sur un seul site (*Alternaria*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Ulocladium*, *Wallemia*) sont également des isolats communément détectés dans l'habitat. L'ensemble des genres isolés par culture ne semble donc pas différer du type de flore détecté dans les habitats conventionnels.

Principaux enseignements des analyses microbiennes par culture

Les principales conclusions qui peuvent être tirées des analyses microbiennes par culture sont :

- Les flores microbiennes présentes dans les matières premières (terre, fibres végétales) sont une des sources de contamination des matériaux de construction.
- L'ajout de fibres végétales augmente le niveau de colonisation ainsi que la sensibilité du matériau au développement microbien.
- Sur prélèvements réalisés *in situ*, la différence de densité microbienne entre l'adobe et le joint sur le site A a montré l'influence de la composition du support sur les communautés bactériennes.
- D'importantes variations de la densité bactérienne peuvent être observées suivant la hauteur de prélèvement du mur, ce qui implique des prélèvements *in situ* répartis sur toute la hauteur lorsque cela est possible.
- Les événements d'humidité qu'a rencontrés le support peuvent avoir une influence sur le type de flore présente, même une fois l'humidité redevenue normale.
- La fonction de la salle (lieu de vie / cellier) et son historique semblent avoir un impact sur les flores environnementales à la surface des murs en terre crue.
- Les flores bactériennes identifiées sur les supports en terre crue intérieurs seraient principalement composées de genres issus de l'environnement en général (sol, air extérieur, etc.), et non de genres issus de la flore commensale humaine. Il est possible que ces derniers aient plus de difficultés à se maintenir et à survivre à la surface du matériau dans les conditions rencontrées.
- Les flores fongiques identifiées sur les supports en terre crue intérieurs seraient principalement composées de genres environnementaux issus du sol ou de l'air extérieur, comme dans le cas des habitations conventionnelles.

3.4. Approche de biocontrôle de la flore fongique des matériaux biosourcés *via* une flore bactérienne antagoniste

Sous certaines conditions environnementales comme une forte humidité, le développement de moisissures peut être observé à la surface des matériaux en terre crue. Par la suite, la prolifération de ces champignons peut conduire à une pollution de l'air intérieur à travers la production de diverses molécules nocives pour les occupants (COV, mycotoxines, etc.) et il est donc important de prévenir et de limiter cette croissance. Une des approches possibles est de s'assurer que les conditions favorables aux champignons ne soient pas rencontrées dans l'habitat, mais certains phénomènes comme des dégâts des eaux peuvent difficilement être anticipés. D'autres méthodes peuvent être mises en place pour inhiber le développement fongique, et notamment l'application du concept de biocontrôle. En utilisant des flores bactériennes antifongiques, il est possible dans les domaines alimentaire et agricole de lutter contre des champignons néfastes. En effet, certaines bactéries, présentes par exemple dans le sol, produisent naturellement différents composés pouvant impacter négativement la croissance des champignons. Ces techniques pourraient être envisagées à l'échelle du matériau, avec un enrichissement du matériau terre crue avec des isolats antifongiques notamment issus de ce type de matériau.

La première étape consiste à identifier des isolats d'intérêt parmi l'ensemble des bactéries isolées par culture sur les matériaux en terre crue *in situ*. Dans le cadre de ces travaux, seule cette étape a pu être menée, mais l'utilisation des bactéries antifongiques sélectionnées pourra être développée par la suite afin de prévenir les problèmes de prolifération fongiques sur ces matériaux.

3.4.1. Matériels et méthodes

Différentes techniques sont utilisées pour la recherche d'activité antifongique par les bactéries. L'une des méthodes les plus rapides à mettre en place est l'utilisation de gélose en double couche. Il est ainsi possible de déterminer l'inhibition de croissance par contact des isolats bactériens testés. Toutefois, certaines bactéries peuvent se révéler extrêmement mobiles et se déplacer dans le milieu gélosé contenant initialement le champignon. Cela complique alors l'analyse de leur capacité d'inhibition. Plutôt que d'être déposés dans un milieu semi-gélosé, les champignons peuvent être filtrés sur une membrane et celle-ci est déposée sur un spot bactérien afin d'observer uniquement l'inhibition de contact, sans que la mobilité des bactéries impacte le résultat.

3.4.1.1. Souches fongiques et isolats *in situ* étudiés

L'effet antifongique de 69 isolats bactériens obtenus à partir des prélèvements *in situ* (Tableau 3.8) a été évalué par méthode double-couche contre les souches de référence d'*Aspergillus versicolor* (IP⁵ 1187-79) et de *Cladosporium cladosporioides* (IP⁵ 123280). L'ensemble des isolats sélectionnés est issu d'un seul prélèvement par site afin de limiter les risques de redondance. Une évaluation des isolats des autres prélèvements pourra être menée ultérieurement. Cet effet a également été évalué pour 9 isolats en utilisant une méthode adaptée permettant de définir la nécessité d'un contact direct ou si l'activité est liée à des molécules diffusibles extra cellulaires (inoculation sur membrane) (Tableau 3.9). Tous les isolats d'intérêt n'ont pas encore été testés par cette méthode.

Tableau 3.8 : Liste des isolats utilisés pour les essais de biocontrôle par double-couche.

Isolats	Site du prélèvement (nombre d'isolats)
Bactéries	
<i>Bacillus cereus</i>	Ba1 (1)
<i>Bacillus licheniformis</i>	AM (2), AJ (2)
<i>Bacillus mojavensis</i>	AM (1)
<i>Bacillus muralis</i>	Ba1 (1)
<i>Bacillus pseudomycolides</i>	C1 (1)
<i>Bacillus pumilus</i>	C1 (1)
<i>Bacillus simplex</i>	AM (2), AJ (4), Ba1 (5), C1 (2), DM (4)
<i>Bacillus subtilis</i>	AJ (1), DM (1)
Bacille à Gram +	AM (5), AJ (8), Ba1 (1), C1 (7), DM (2)
Bacillus à Gram -	AJ (1), Ba1 (2)
Coques à Gram +	AM (1), AJ (3), Ba1 (2), C1 (2)
<i>Micrococcus luteus</i>	C1 (1)
<i>Pseudomonas luteola</i>	AJ (1)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ba1 (3)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AJ (1)
<i>Streptomyces griseus</i>	C1 (1)

Tableau 3.9 : Liste des isolats utilisés pour les essais de biocontrôle sur membrane.

Isolats	Site du prélèvement (nombre d'isolats)
Bactéries	
<i>Bacillus cereus</i>	Ba1 (1)
<i>Bacillus licheniformis</i>	AM (1), AJ (1)
<i>Bacillus mojavensis</i>	AM (1)
<i>Bacillus muralis</i>	Ba1 (1)
<i>Bacillus simplex</i>	AM (1)
<i>Bacillus subtilis</i>	AJ (1)
<i>Pseudomonas luteola</i>	AJ (1)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ba1 (1)

⁵ Collection Institut Pasteur

3.4.1.2. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique par double-couche

L'inhibition de la croissance fongique par les isolats bactériens a été évaluée par méthode double-couche (Grimoud et al., 2010). Les isolats bactériens ont été cultivés sur milieu TSA et incubés à 32,5°C pendant 24 heures. Une suspension de chaque bactérie a été préparée extemporanément dans du tryptone sel (BioMérieux) et ajustée à 10^8 UFC/ml par lecture de DO (640 nm). 8 µl de suspension bactérienne ont été déposés à la surface d'une gélose TSA, sous forme d'un spot central. Après séchage sous hotte à flux laminaire, les boîtes ont été incubées 24 heures à 32,5°C. Six boîtes ont été préparées pour chaque isolat, trois pour chaque champignon testé.

Après incubation, une suspension de chaque souche de filamenteux titrant 10^7 UFC/ml a été préparée extemporanément et 100µl ont été ajoutés à 10ml de milieu semi-gélosé PDA. L'ensemble a été homogénéisé et déposé délicatement à la surface des boîtes de Petri avec spot. Après séchage sous hotte à flux laminaire, les géloses ainsi préparées ont été incubées à 22,5°C pendant 3 à 5 jours.

3.4.1.3. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique sur membrane

Afin de vérifier si l'inhibition des champignons par les isolats est due à un contact direct des bactéries avec la souche fongique testée *via* le milieu semi-gélosé, des essais d'activité antifongique mettant en jeu une membrane ont été réalisés. Les 9 isolats bactériens ont été déposés sous forme de spot central sur des géloses TSA et mis à incuber comme décrit dans la section 3.4.1.2.

Après incubation, une suspension de chaque souche de filamenteux titrant 10^7 UFC/ml a été préparée extemporanément et 100 µl ont été filtrés sur une membrane (Ø : 47mm ; porosité 0.45µm). La membrane a ensuite été déposée à la surface des boîtes de Petri au niveau du spot bactérien. Les géloses ainsi préparées ont été incubées à 22,5°C pendant 3 à 5 jours. L'inhibition de croissance de la souche fongique par l'isolat testé a été évaluée visuellement.

3.4.2. Résultats

Les isolats bactériens obtenus à partir des prélèvements *in situ* des sites A, Ba1, Bb, C et D ont été testés pour leur activité antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus versicolor* et *Cladosporium cladosporoides*. La méthode en double-couche a dans un premier temps été utilisée pour une évaluation rapide des propriétés d'inhibition du développement fongique de ces isolats. Ceux présentant une activité fongique intéressante ont été testés avec la méthode

par membrane pour limiter l'impact de la mobilité des bactéries sur l'observation et définir le rôle d'un contact direct ou de molécules diffusibles.

3.4.2.1. Méthode par double-couche

L'activité antifongique de différents isolats obtenus à partir des prélèvements *in situ* a été évaluée par observation suite à une co-incubation en double-couche avec des champignons (Figure 3.17), avec des effets variables suivant les isolats (Figure 3.16). L'ensemble des résultats d'inhibition est présenté dans le Tableau 3.10. Les résultats des différents isolats d'une même espèce ont présenté des effets similaires et sont donc affichés ensemble dans le tableau.

Lors des essais en double-couche, les champignons ont pu se développer sur la totalité de la boîte lorsqu'ils étaient en co-culture avec la quasi-totalité des coques isolés (Figure 3.16.A), à l'exception de *Staphylococcus haemolyticus*. De plus, la majorité des bacilles à Gram + non identifiés (20/23) et la totalité des bacilles à Gram – non identifiés n'ont pas affecté le développement d'*Aspergillus versicolor* ni de *Cladosporium cladosporioides*.

Les isolats du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont, en revanche, montré des effets significatifs sur la croissance des champignons co-inoculés. Les isolats de *Pseudomonas luteola* et *stutzeri* ainsi que ceux de *Bacillus muralis* et *simplex* ont pu se développer à travers le milieu semi-gélosé (Figure 3.16.B).

Dans le cas de *Bacillus cereus* et *mojavensis*, un faible halo d'inhibition est observé à l'interface entre le spot qui s'est développé et le tapis fongique (Figure 3.16.C). Ce halo témoigne d'une probable diffusion de molécules actives dans le milieu, impactant négativement la croissance des champignons.

Enfin, les isolats de *Bacillus licheniformis*, *pseudomycoïdes*, *pumilus* et *subtilis* ont largement diffusé dans le milieu semi-gélosé, colonisant la quasi-totalité de la boîte de Petri (Figure 3.16.D). Ces bactéries présentent probablement une plus forte mobilité et cela complique la conclusion sur un potentiel effet antifongique. Dans la mesure où les bactéries se sont rapidement déplacées dans le milieu semi-gélosé, leur développement plus rapide a pu limiter celui des champignons. Il était donc nécessaire d'effectuer des essais où le facteur mobilité était plus restreint et avec un contact direct entre bactérie et champignon.

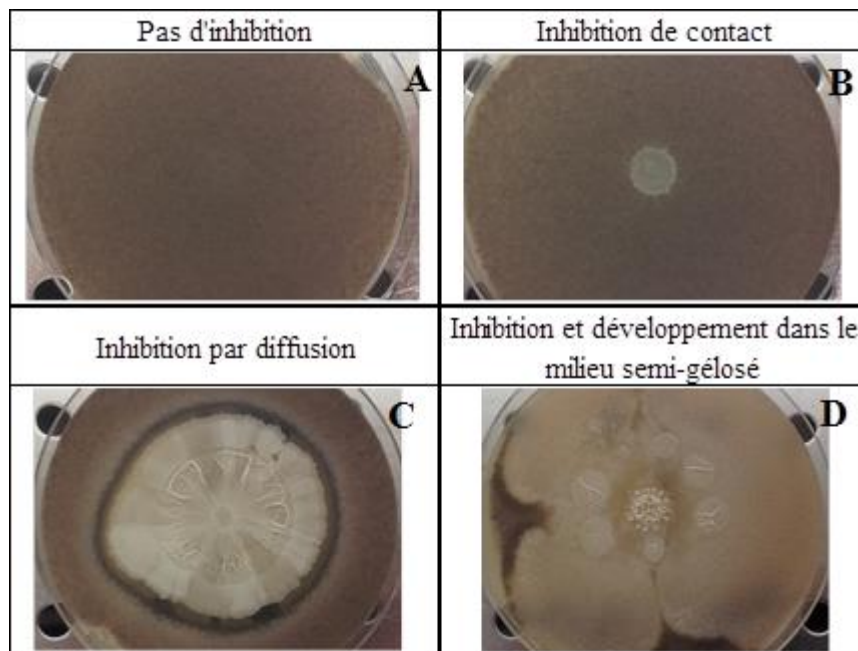


Figure 3.16: Types d'inhibition de la croissance fongique observés pour les différents isolats bactériens.

A : pas d'inhibition ; B : inhibition de contact ; C : inhibition de contact et halo d'inhibition ; D : inhibition et diffusion des bactéries importantes

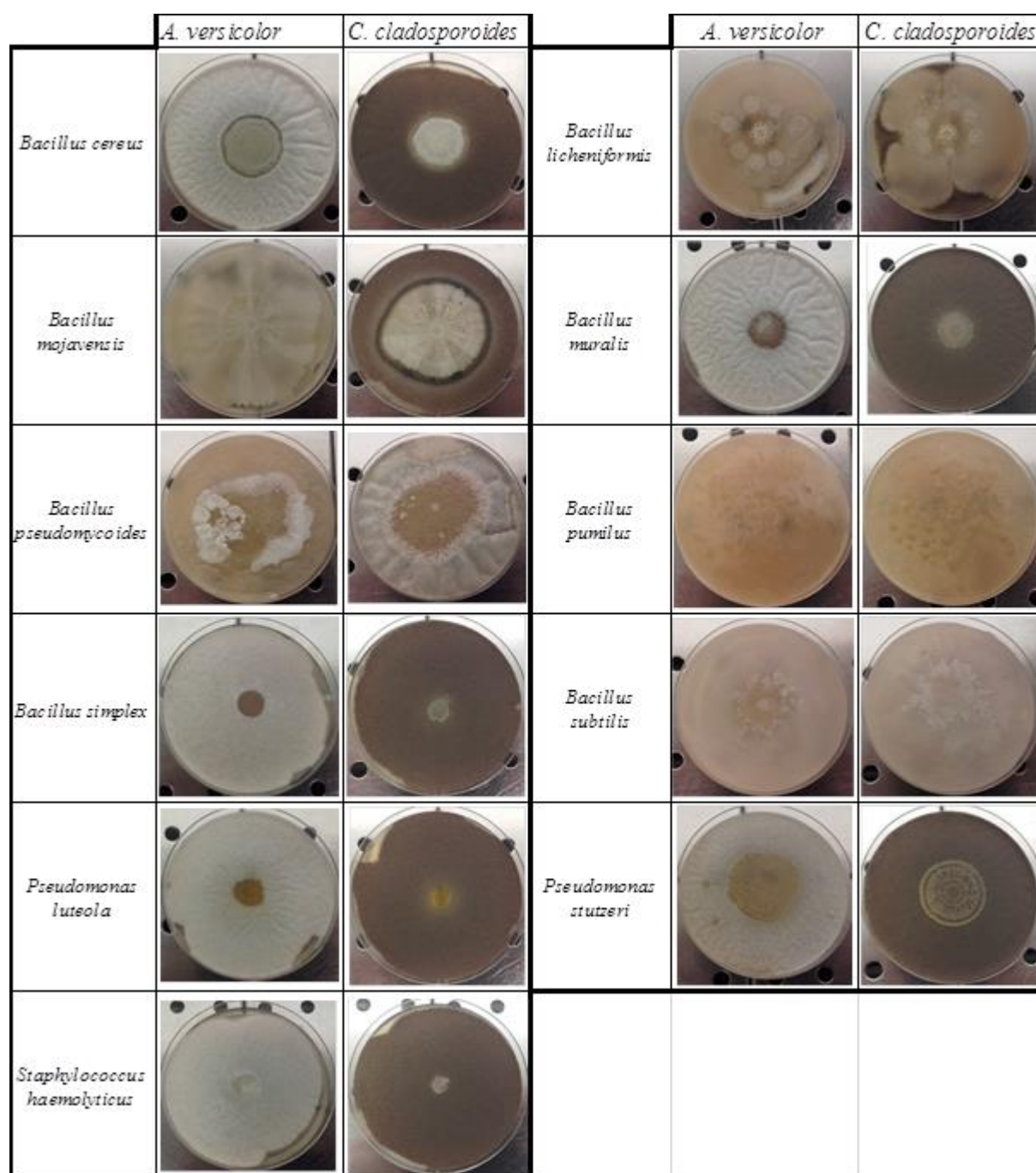


Figure 3.17 : Boîtes des milieux double-couche des isolats présentant une activité antifongique.

Tableau 3.10 : Inhibition par double-couche de la croissance des espèces fongiques en fonction de l'espèce d'appartenance des isolats testés.

- : pas d'inhibition ; + : inhibition de contact ; ++ : inhibition de contact et halo d'inhibition ; +++ : inhibition et diffusion des bactéries importantes.

Espèce bactérienne	Genre	<i>Bacillus</i>					
	Espèce (Nbr d'isolats)	<i>cereus</i> (1)	<i>licheniformis</i> (4)	<i>mojavensis</i> (1)	<i>muralis</i> (1)	<i>pseudomycoloides</i> (1)	<i>pumilus</i> (1)
Espèce fongique	<i>A. versicolor</i>	++	+++	+++	+	+++	+++
	<i>C. cladosporoides</i>	++	+++	+++	+	+++	+++
Espèce bactérienne	Genre	<i>Bacillus</i>		<i>Micrococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>		<i>Staphylococcus</i>
	Espèce (Nbr d'isolats)	<i>simplex</i> (17)	<i>subtilis</i> (2)	<i>luteus</i> (1)	<i>luteola</i> (1)	<i>stutzeri</i> (3)	<i>haemolyticus</i> (1)
Espèce fongique	<i>A. versicolor</i>	+	+++	-	+	+	+/-
	<i>C. cladosporoides</i>	+	+++	-	+	+	+/-
Espèce bactérienne	Genre	<i>Streptomyces</i>	Bacille Gram +		Bacille Gram -	Coques Gram +	
	Espèce (Nbr d'isolats)	<i>griseus</i> (1)	(20)	(3)	(3)	(8)	
Espèce fongique	<i>A. versicolor</i>	-	-	+	-	-	
	<i>C. cladosporoides</i>	-	-	+	-	-	

3.4.2.2. Méthode par inoculation sur membrane

Afin de mieux définir le type d'activité antifongique détecté et notamment limiter le facteur mobilité des bactéries, les spores fongiques ont été filtrées sur une membrane qui a été déposée sur le spot bactérien. L'activité antifongique a été évaluée par observation (Figure 3.18 & Tableau 3.11).

Tous les isolats testés par la méthode de co-culture avec membrane induisaient une inhibition de la croissance fongique en double-couche, soit uniquement par contact, soit avec un halo. Les isolats de *Bacillus muralis* et de *Pseudomonas luteola* n'ont présenté aucune efficacité à inhiber le développement des spores filtrées sur la membrane. Dans le cas de *Bacillus simplex* et *Bacillus licheniformis*, un halo d'inhibition est visible au niveau du spot bactérien, mais n'est pas nettement délimité, suggérant une faible activité antifongique ou une neutralisation rapide de celle-ci au sein de la gélose. Les isolats de *Bacillus cereus*, *mojavensis* et *subtilis*, ainsi que de *Pseudomonas stutzeri*, présentent un halo d'inhibition très net. Dans le cas de *Bacillus mojavensis*, la bactérie a réussi à s'étendre au-delà du diamètre du filtre, et inhibe alors la croissance d'*Aspergillus versicolor* au niveau des zones où elle est présente sous la membrane. Ces quatre isolats semblent être ceux qui possèdent la plus forte activité antifongique parmi l'ensemble des bactéries issues des prélèvements *in situ*. Ces résultats confirment la majorité des premières observations en double-couche, tout en éliminant les doutes concernant l'éventuel impact de la mobilité sur les effets observés.

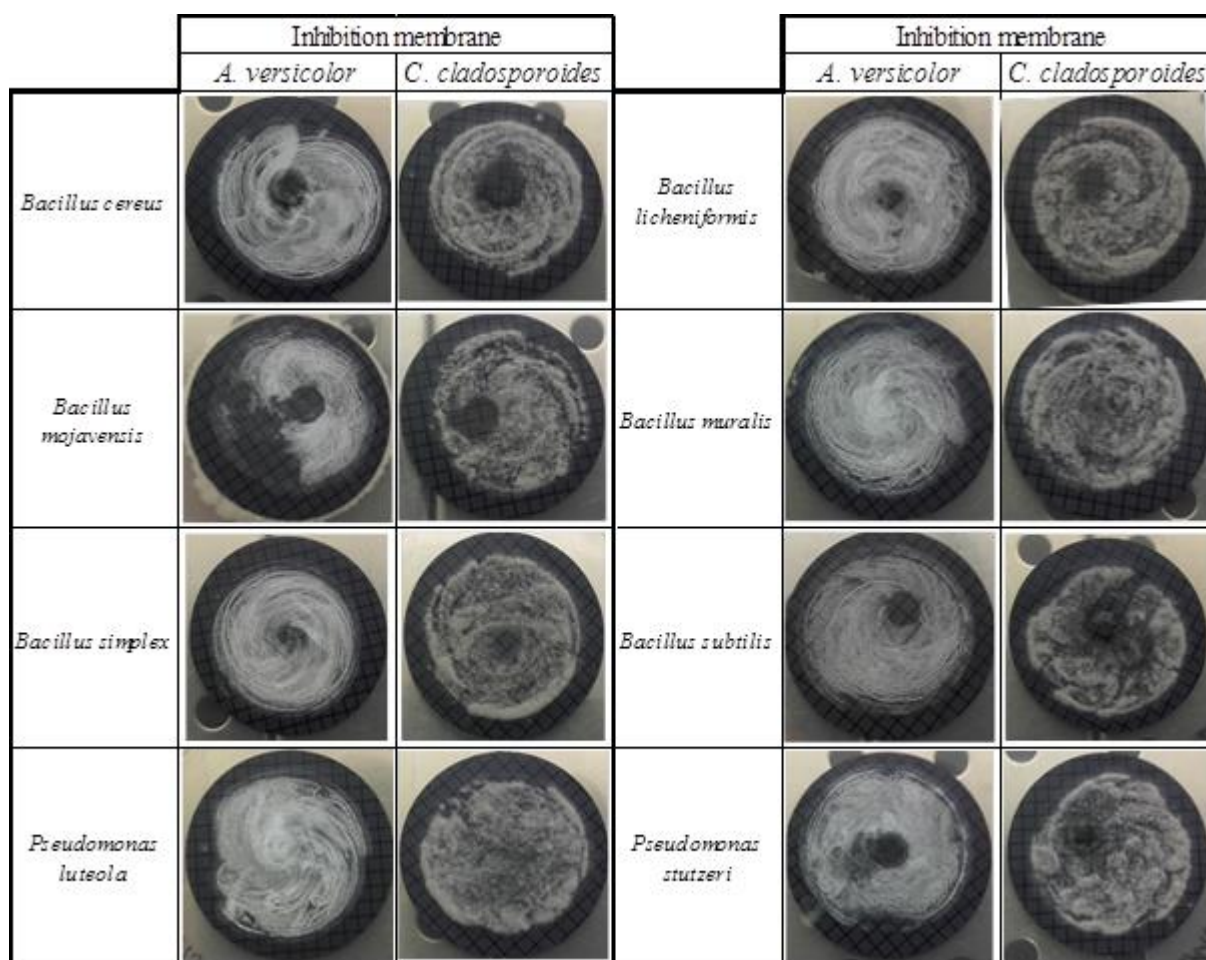


Figure 3.18 : Membranes portant les champignons et recouvrant les spots des isolats bactériens testés.

Tableau 3.11 : Inhibition sur membrane de la croissance des espèces fongiques en fonction de l'espèce des isolats testés.

- : pas d'inhibition ; + : inhibition de contact partielle ; ++ : inhibition de contact totale.

Espèce bactérienne	Genre	Bacillus					
	Espèce	cereus	licheniformis	mojavensis	muralis	simplex	subtilis
Espèce fongique	<i>A. versicolor</i>	++	+	++	-	+	++
	<i>C. cladosporoides</i>	++	++	++	-	+	++
Espèce bactérienne	Genre	Pseudomonas					
	Espèce	luteola	stutzeri				
Espèce fongique	<i>A. versicolor</i>	-	++				
	<i>C. cladosporoides</i>	-	++				

3.4.3. Discussion

Les problématiques de prolifération fongique sont rencontrées dans de nombreux domaines, que ce soit dans le domaine de l'agriculture ou celui des matériaux, dont les matériaux constructions, ayant pour conséquence la dégradation de la qualité de l'air intérieur.

Les solutions utilisées jusqu'à présent pour éliminer ces champignons correspondent souvent à des fongicides chimiques pouvant être nocifs pour l'environnement et l'homme, d'où la recherche de certaines alternatives. L'utilisation de microorganismes non pathogènes antagonistes des moisissures est une piste intéressante qui peut être envisagée dans le cas des matériaux de construction en terre crue.

Parmi les isolats bactériens obtenus à partir des prélèvements *in situ*, seuls les isolats des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont montré une activité antifongique de contact. Ces résultats ont pu être observés que ce soit par double-couche ou par membrane. Parmi les espèces de *Bacillus* testées, ce sont les espèces *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* et *B. mojavensis* qui ont présenté la meilleure activité inhibitrice. Pour *Pseudomonas*, seul *P. stutzeri* a présenté une inhibition de contact et indirecte.

Ces deux genres sont particulièrement décrits dans la littérature pour leur intérêt dans le biocontrôle des phytopathogènes du sol. Plusieurs études ont mis en évidence l'effet antagoniste de certaines espèces de *Bacillus*, et ceux par différentes voies métaboliques. Les filtrats de deux espèces de *Bacillus* (*subtilis* et *amyloliquefaciens*) issues du sol ont démontré une activité antifongique sur un champignon pathogène, *Aspergillus parasiticus*, en limitant fortement sa croissance ainsi qu'en supprimant sa production d'aflatoxines, témoignant de la présence dans les filtrats de molécules extracellulaires produites par les bactéries. (Siahmoshteh et al., 2017). Différents facteurs seraient alors affectés, comme la teneur en ergostérol de la membrane fongique ou l'activité déshydrogénase des mitochondries des cellules fongiques. L'isolat *Bacillus subtilis* B1 produit par exemple des lipopeptides aux propriétés antifongiques (iturine, fengycine, surfactine) (Sajitha et al., 2016). De la même manière, l'isolat *Bacillus amyloliquefaciens* VB7 a pu montrer un effet d'inhibition de la croissance fongique, notamment à travers la production de différents métabolites (iturine, bacilysine, surfactine, etc.) (Vinodkumar et al., 2017). *Bacillus mojavensis* produit aussi des lipopeptides inhibiteurs de la croissance de phytopathogènes (*Fusarium verticilloides*) (Snook et al., 2009). Ces activités antagonistes passent également à travers la production de COV pouvant inhiber la prolifération fongique (Arrebola et al., 2010; Baysal et al., 2013; Chaurasia et al., 2005; Fernando et al., 2005; Yuan et al., 2012). Une souche de *Bacillus subtilis* (NRRL B-30408) isolée du sol produit des COV qui conduisent à une déformation au niveau des hyphes et conidies fongiques, avec une efficacité plus importante par voie aérienne que par diffusion dans le milieu (Chaurasia et al., 2005). Une souche de *Bacillus subtilis* (CSTB 13-001) isolée à partir de matériaux de construction a également montré des activités

antifongiques (retard de croissance) contre différentes moisissures présentes dans l'habitat (*Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum* et *Stachybotrys chartarum*) (Paic Lacaze, 2016). Ces activités ont été évaluées par diffusion, sur milieu gélosé avec une co-culture bactérie / champignon, et par effet volatile, avec une co-culture à distance des deux organismes. En plus des COV, des enzymes peuvent également être impliquées dans ce processus. Une chitinase produite par *Bacillus subtilis* (TV-125A) a été extraite de cette bactérie et a démontré une activité antifongique significative (Senol et al., 2014). Des isolats de *Bacillus thuringiensis* (NM101-19) et de *Bacillus licheniformis* (NM120-17) ont également montré une production de chitinase ayant une activité antifongique (Gomaa, 2012). De même la souche *Bacillus cereus* QQ308, se développant sur des déchets marins, produit différentes enzymes antifongiques (chitinase, chitosanase, protéase, etc.) qui permettent d'inhiber la germination des spores et l'élongation du mycélium de plusieurs pathogènes fongiques (*Fusarium oxysporum* et *solani*, *Pythium ultimum*) (Chang et al., 2007). Le genre *Pseudomonas* est également impliqué dans ces processus de biocontrôle, en produisant de nombreux métabolites comme des antimicrobiens (phenazine, oomycine A, geldanamycine, etc.) et COV antifongiques (Fernando and Linderman, 1995; Fernando et al., 2005). Parmi différents isolats issus du sol, un isolat de *Pseudomonas stutzeri* (YPL-1) a présenté des effets significatifs contre *Fusarium solani* et notamment à travers la production de chitinase et β -1,3-glucanase pour lyser les parois cellulaires des champignons (Lim et al., 1991). L'ensemble des espèces isolées dans cette étude ayant montré un effet antifongique lors des essais en double couche et par membrane ont donc déjà démontré des activités antifongiques dans la littérature, et ce par différentes voies métaboliques. Les effets observés ici peuvent donc être dus à différentes molécules et de facteurs, et il pourrait être intéressant par la suite d'évaluer l'activité antifongique par diffusion aérienne (essentiellement COV) et de caractériser les modes d'action de ces isolats sur le développement fongique.

En effet, lors des essais menés dans cette étude, seules les inhibitions de contact ont été utilisées comme première étape du processus de sélection des isolats antagonistes. Par la suite, ces isolats seront également testés pour leur capacité d'inhibition en phase vapeur. L'émission de COV par les bactéries est un point important de leur capacité de biocontrôle en agriculture. Cependant, dans le cas de l'environnement intérieur, il sera important de vérifier leur innocuité sur l'homme. De plus, ces essais devront être étendus à d'autres espèces de champignons. Seuls *Aspergillus versicolor* et *Cladosporium cladosporioides* ont été testés lors

de cette première étape, car ils sont représentatifs d'une partie de la flore fongique intérieure. Mais l'efficacité d'inhibition des bactéries n'est pas la même sur toutes les espèces fongiques. Chaves-López *et al* (2015) ont évalué les effets antifongiques par COV de 75 isolats de *Bacillus* contre différentes moisissures. Leurs résultats ont montré qu'une espèce de *Bacillus* n'était pas efficace contre l'ensemble des champignons, et que différentes espèces avaient des spectres de champignons sensibles différents. L'effet antifongique et les espèces de champignons affectées seraient donc spécifiques selon l'espèce, voire l'isolat bactérien, ce qui est similaire aux résultats d'autres études (Senol et al., 2014; Wheatley, 2002). Dans notre cas, aucune différence significative n'a pu être observée entre les isolats d'une même espèce en termes d'effet antifongique, mais un faible nombre d'isolats ont été testés pour les espèces présentant la meilleure efficacité d'inhibition et seule l'inhibition de contact a été évaluée.

Les méthodes de biocontrôle peuvent être envisagées dans le cadre des matériaux en terre crue. Les flores bactériennes présentes sur les supports en terre comportent naturellement des bactéries aux propriétés antifongiques. Les espèces identifiées de *Bacillus* et *Pseudomonas* sont des microorganismes ubiquistes et non pathogènes pour l'homme. Ils pourraient donc être adaptés dans l'optique de biopréservation des murs, diminuant les risques de croissance des champignons et ainsi les éventuels impacts sanitaires sur les occupants. Pour cela, deux types d'approches peuvent être développés :

- une approche préventive : lors de la fabrication des matériaux en terre crue, il pourrait être possible d'enrichir ces matériaux de construction en endospores de bactéries antifongiques. Ces bactéries pourraient ainsi survivre aux différents traitements lors de la fabrication et resteraient en phase de dormance dans les matériaux soumis aux conditions environnementales normales de l'habitat. Ainsi, lorsque les conditions environnementales favorables au développement fongique sont rencontrées suite à un accident, la germination des spores pourrait conduire à une prolifération et surtout une activité métabolique potentiellement impliquée dans l'inhibition de la prolifération des champignons.
- Une approche curative qui consisterait à appliquer les bactéries antifongiques directement sous forme végétative à la surface de matériaux au décours d'un dégât des eaux ou présentant un début de développement de moisissures, à l'aide de spray par exemple. Les bactéries pourraient alors directement inhiber la croissance des champignons présents.

Après avoir sélectionné les meilleurs isolats antagonistes, il sera possible de tester directement au niveau des matériaux si l'ajout de ces microorganismes inhibe la majorité de la croissance fongique, que cela soit en les incluant dans les matériaux lors de leur fabrication ou en les déposant à la surface de zones contaminées.

Les approches de caractérisation par culture des flores bactériennes et fongiques restent cependant limitées. La composition des milieux de culture utilisés ne répond pas à l'ensemble des besoins nutritifs de la totalité des microorganismes présents dans l'échantillon, et conduit donc à un biais de la représentativité des organismes observés (Takahashi, 1997). De plus, l'utilisation de ces milieux ne permet l'isolement que des bactéries et champignons viables et cultivables, occultant les autres organismes viables / non cultivables qui peuvent représenter pourtant la principale fraction des microorganismes de l'environnement selon certains auteurs (Amann et al., 1995; Fabian et al., 2005). Il en résulte donc une sous-estimation de la densité et de la diversité microbienne (Hawksworth, 2001), c'est pourquoi, afin de contourner ces limites, des analyses de métabarcoding par séquençage haut-débit ont été effectuées sur les FAC et les prélèvements *in situ*.

Chapitre 4 - Analyse des communautés microbiennes par méthodes moléculaires

Les approches de caractérisation des communautés microbiennes par biologie moléculaire permettent une profondeur d'analyse plus importante qu'avec l'isolement par culture. L'utilisation des méthodes de métabarcoding est donc intéressante afin d'avoir une observation complémentaire et plus représentative de l'ensemble de la diversité des microorganismes présents. Plusieurs étapes sont nécessaires pour obtenir le profil de ces flores :

- L'ADN environnementale doit être extrait de manière homogène en limitant la présence de composés inhibiteurs (acides humiques, argiles, etc.).
- Les marqueurs génétiques présents sur les génomes extraits sont ensuite amplifiés et séquencés.
- Une fois les séquences des amplicons déterminées, il est alors possible de regrouper les séquences très similaires pour former des OTUs et ainsi définir :
 - la diversité alpha des microorganismes présents au sein de chaque échantillon,
 - la diversité beta entre échantillon,
 - le profil taxonomique de chaque site.

Les méthodes de métabarcoding ont été appliquées aux échantillons *in situ* afin d'étudier la flore microbienne de manière plus exhaustive qu'en culture. La combinaison des deux approches a ainsi permis de décrire les profils taxonomiques de chaque site et de comparer les diversités intra- et inter-sites afin d'évaluer l'existence ou non de profils spécifiques suivant la composition et / ou la localisation du matériau dans le bâtiment (habitat / grange et extérieur).

4.1. Matériels et méthodes

4.1.1. Extraction d'ADN

A partir des échantillons prélevés *in situ* (voir 3.1.2) stockés à -80°C et des FAC, 200 mg de terre ont été utilisés pour l'extraction d'ADN avec le kit ZymoBIOMICS. Ce kit a été sélectionné parmi plusieurs kits d'extraction commerciaux: FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio) et ZymoBIOMICS (Zymo Research). L'ADN contenu dans 18 prélèvements *in situ* issus de 7 sites différents a été extrait par ces kits, puis les extraits d'ADN ont été amplifiés pour le 16S et l'ITS1 (voir 4.1.2) et les amplicons ont été révélés sur gel d'agarose après migration électrophorétique. La qualité des extraits d'ADN a été évaluée en fonction de l'absence / présence d'amplicons révélés sur le gel de migration. Les amplifications à partir des extraits ZymoBIOMICS ont montré une efficacité plus importante que les autres kits (FastDNA : 8 amplifications ; PowerSoil : 14 amplifications; ZymoBIOMICS : 18 amplifications). La méthode d'extraction

d'ADN GnS-GII développée par la Plateforme GenoSol (Plassart et al., 2012b; Terrat et al., 2012, 2015b) a également été adaptée aux petites masses prélevées dans notre étude, mais la faible quantité d'ADN dans les prélèvements *in situ* ne permettait pas une bonne extraction par cette méthode.

4.1.2. Amplification PCR et séquençage

L'amplification PCR a été effectuée pour les bactéries et les champignons (Tableau 4.1). Le marqueur génétique bactérien ciblé a été la région V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S avec les amorces PCR1F_460 et PCR1R_460. La région fongique ITS1 a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces ITS1F et ITS2. L'amplification a été réalisée avec la MTP Taq DNA polymérase (Sigma-Aldrich, U.S.A) dans les conditions suivantes: 5 min à 94°C, 35 cycles de 30s à 94°C (dénaturation), 1 min à 55°C (hybridation), 30 s à 72°C (extension) et 7 min à 72°C. L'efficacité de l'amplification PCR a été évaluée par migration électrophorétique d'un volume de 10 µL d'amplicons sur un gel d'agarose 2 %. L'ADN génomique a été dilué à 1 : 2 et 1 : 10 pour diminuer la quantité d'éventuels inhibiteurs lorsque cela était nécessaire, permettant ainsi une amplification PCR. Malgré les dilutions, deux prélèvements du support Ba1 et un de Lb n'ont pas pu être amplifiés correctement pour les deux marqueurs (16S et l'ITS1), tandis qu'un prélèvement du support La et un de MaT n'ont pas pu être amplifiés uniquement pour l'ITS1. Les échantillons extraits par ZymoBIOMICS et analysés par métagénomique sont référencés dans le Tableau 4.2. Les témoins négatifs ont été inclus dans le séquençage afin de retirer les éventuels taxons qui apparaissent en contaminants (Emerson et al., 2015, 2017).

Tableau 4.1 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la région codant pour l'ARNr 16S et l'ITS1.

Organisme	Nom d'amorce	Séquence		Référence
		Adaptateur MiSeq	Amorce	
Bactérie	PCR1F_460	5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	ACGGRAGGCAGCAG-3'	Plateforme GeT, Toulouse
	PCR1R_460	5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	TACCAGGGTATCTAATCCT-3'	
Champignon	ITS1F	5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	(Gardes and Bruns, 1993) (White et al., 1990)
	ITS2	5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	

Tableau 4.2 : Nombres d'échantillons amplifiés pour la région 16S et ITS1 pour les différents sites et supports *in situ* en terre crue seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert) et pour la matière première des éprouvettes manufacturées (marron).

Site	Support	Localisation	Nombre de prélèvements amplifiés	
			16S	ITS1
A	AM	Habitation	6	6
	AJ	Habitation	6	6
B	Ba1	Habitation	2	2
	Ba2	Habitation	4	4
	Bb	Cellier	5	5
C	C1	Habitation	4	4
	C2	Habitation	4	4
D	DM	Habitation	3	3
	DJ	Habitation	3	3
E	E	Habitation	5	5
	EG	Grange	1	1
F	-	Grange	4	4
G	-	Cellier	4	4
H	H	Habitation	4	4
	Hext	Extérieur	1	1
I	-	Habitation	4	4
J	-	Bâtiment non habité	4	4
L	-	Habitation	3	2
	MaT	Habitation	2	1
M	MaB	Habitation	3	3
	Mb	Habitation	4	4
FAC	-	Matières premières	3	3
Total Habitation		Nombre de sites	Nombre de prélèvements	
			16S	ITS1
Terre seule		6	35	34
Terre avec inclusion biosourcée		5	26	25
Total Grange / Extérieur		Nombre de sites	Nombre de prélèvements	
			16S	ITS1
Terre seule		3	9	9
Terre avec inclusion biosourcée		3	10	10

Les amplicons ont été purifiés sur billes Clean PCR (MokaScience), puis leur qualité a été vérifiée par Fragment Analyser (Advanced Analytical Technologies). Les banques ont été multiplexées avec l'ajout d'un index afin de différencier les échantillons pour chaque région ciblée (16S, ITS1), chaque prélèvement *in situ* et chaque méthode d'extraction utilisée. La taille et concentration des amplicons a été estimée par Nanodrop (Thermo Scientific™) et Fragment Analyser, et un mélange équimolaire de chaque banque a été préparé pour le séquençage. Le séquençage « paired-end » (2 x 250pb) a été réalisé à l'aide d'un séquenceur MiSeq (Illumina, U.S.A.) à la Plateforme GeT de Toulouse, France.

4.1.3. Traitements des données de séquençage

Les séquences obtenues ont été réassignées par la plateforme de séquençage à chaque banque à l'aide de leur index. Les fichiers *fasta* des différentes banques ont été récupérés après retrait des index. Deux pipelines différents ont été utilisés entre les lectures des séquences du 16S et de l'ITS1 :

- Le module Microbial Genomics du logiciel CLC (QIAGEN Bioinformatics, U.S.A) a été utilisé pour les banques 16S. Les séquences paired-end ont été assemblées et leur taille a été automatiquement fixée à 401pb par trimming. Les séquences ayant une taille inférieure ont été éliminées. Les amorces ont été retirées par la fonction Trim Seq et le clustering des séquences en OTU a été basé sur la banque de données SILVA (Quast et al., 2013), en prenant en compte un pourcentage de similarité à 97 %. Les séquences non-clusterisées ont formé des clusters *de novo* à 80 %, et la détection de séquences chimériques a été effectuée en même temps que le clustering.
- Les séquences paired-end des banques ITS1 ont été assemblées avec un chevauchement d'au minimum 10pb, à l'aide du logiciel MOTHUR v.1.35.1 (Schloss et al., 2009). Les séquences avec une taille inférieure à 100pb ont été éliminées. Le clustering *de novo* à un pourcentage de similarité à 97 % ainsi que la détection des chimères ont été effectués avec l'algorithme UPARSE, implémenté dans USEARCH v10.0.240 (Edgar, 2013). Afin de n'étudier que la région ITS, les régions bordantes 5,8S en 5' et 28S en 3' ont été retirées en utilisant le « Hidden Markov Model » (HMM) (Bengtsson-Palme et al., 2013). La séquence représentative de chaque cluster (séquence la plus présente au sein de chaque OTU) a été utilisée pour l'annotation taxonomique. Ces séquences ont été assignées par la fonction `usearch_global` de USEARCH en se basant sur la banque de données UNITE (Kõljalg et al., 2005).

Au sein des tables d'OTUs du 16S et de l'ITS1, les OTUs singletons, soit moins de 2 séquences dans l'OTU, ont été retirées de l'analyse. Les OTUs contenant plus de 50 séquences et étant non assignées ou assignées à des niveaux taxonomiques supérieurs au genre ont été alignées sur la base de données non-redondantes GenBank avec BLAST 2.7.0 (Altschul et al., 1997) pour obtenir si possible une meilleure assignation. Les banques ITS1 contenaient 3 329 609 séquences réparties dans 3 691 OTUs, et les banques 16S contenaient 1 175 488 séquences réparties dans 9 601 OTUs.

4.1.4. Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués sur R v3.4.1. La taille en nombre de séquences des différentes banques était variable, allant de 4 051 à 40 622 séquences pour le 16S et de 27 084 à 83 297 séquences pour l'ITS1. Afin de comparer les différents sites, chaque banque a été normalisée par raréfaction au niveau de la banque contenant le moins de séquences pour chaque type d'amplicon. Après normalisation, un total de 320 029 séquences pour le 16S et 2 085 468 séquences pour l'ITS1 étaient réparties dans respectivement 7 740 OTUs et 3 544 OTUs. Deux indices d' α -diversité ont été calculés: i) Richesse (nombre d'OTUs), ii) Index de Shannon (base log e) (Shannon, 1948). Des tests de Kruskal-Wallis et Mann Whitney ont été réalisés pour comparer les indices de diversité au sein et entre les différentes conditions. Un test de corrélation de Spearman a été effectué entre les indices d' α -diversité des communautés bactériennes et fongiques.

Pour l'analyse des structures des communautés bactériennes et fongiques présentes dans les échantillons *in situ* de matériaux en terre crue, une matrice de distance Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) a été générée pour le 16S et l'ITS1 en utilisant la commande `vegdist` du package `vegan` v2.4-4 (Oksanen et al., 2017). L'abondance relative moyenne des OTUs par site a été déterminée, et des matrices de distance Bray-Curtis sur ces données ont également été calculées. Une représentation de la matrice de distance a été générée par positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS). Cette représentation a été préférée à la PCoA car elle est plus adaptée à l'analyse de données non-linéaires, comme l'abondance d'OTUs dans différents échantillons. Le stress des représentations obtenues était inférieur à 0,2. Une analyse de la variance par permutation (PERMANOVA) a été réalisée en utilisant la commande `adonis` (`vegan`) (9999 permutations), afin d'évaluer l'effet des différentes variables étudiées. La dispersion des profils des différents groupes a été calculée par la commande `betadisper` et leur homogénéité a été vérifiée par `permutest` (`vegan`).

4.2. Résultats

Les approches de métabarcoding ont été appliquées pour les différents prélèvements *in situ* et pour les FAC. Les séquences des banques d'amplicons, 16S pour les bactéries et ITS1 pour les champignons, ont pu être assemblées sous forme d'OTUs et analysées. La diversité alpha, c'est-à-dire la diversité au sein d'un seul prélèvement, a été comparée entre sites. Cela a permis d'évaluer l'éventuel rôle de la présence de fibres végétales ou de la localisation du matériau sur la diversité microbienne présente à sa surface. La similarité entre les profils des différents sites a également été calculée avec la beta diversité, et l'impact des différentes variables sur les communautés microbiennes prélevées a pu être validé par PERMANOVA. Enfin, les différentes OTUs générées au sein des banques ont été assignées taxonomiquement suivant les bases de données disponibles, permettant une correspondance entre une séquence nucléique séquencée et un genre bactérien ou fongique. Cela a conduit à la détermination de profils taxonomiques pour chaque site et chaque condition, et ainsi à visualiser des différences de présence/absence ou d'abondance pour certains genres suivant les sites de prélèvements.

4.2.1. Alpha diversité ou richesse spécifique

Les indicateurs de l' α -diversité utilisés dans cette étude sont la richesse (nombre d'OTUs détectées dans l'échantillon) et la diversité caractérisée par l'index de Shannon. Celui-ci permet de prendre en compte à la fois la richesse et la répartition des séquences parmi les différentes OTUs. Ainsi, la présence d'un grand nombre d'OTUs avec des séquences réparties de manière équitable conduit à un fort index de Shannon. A l'inverse, un faible nombre d'OTUs ou la présence d'une OTU extrêmement abondante dans l'échantillon conduit à un faible index de Shannon.

Champignons

Tout d'abord, la richesse des communautés fongiques a été caractérisée à partir des séquences ITS1 à 97 % de similarité (Figure 4.1). Les différents sites ont été regroupés en 4 groupes, selon 2 conditions :

- Composition du mur : Biosourcé / Terre seule.
- Localisation du mur : Habitation / Grange-Extérieur.

Le nombre d'OTUs varie de 26 à 360 pour la terre crue seule et de 47 à 515 pour la terre avec fibres végétales sur l'ensemble des sites. La moyenne d'OTUs est de 131 et 191 pour les supports dans les habitations respectivement pour la terre crue seule et pour la terre avec inclusion biosourcée (Figure 4.1.A), et de 76 et 302 pour les supports dans les granges ou à l'extérieur (Figure 4.1.B). Les supports prélevés dans les habitations présentent des richesses

significativement différentes entre les sites, témoignant d'une diversité de profils microbiens inter-sites (Kruskal-Wallis p-value < 0,05). A l'inverse, les échantillons de la condition Grange-Extérieur ne possèdent pas de différences significatives en termes de richesse, quelle que soit la composition (Kruskal-Wallis p-value > 0,05). Les nombres d'OTUs entre les matériaux en terre seule ou avec inclusion biosourcée ne sont pas significativement différents dans les habitations (Mann-Whitney p-value > 0,05) au contraire des sites granges / extérieurs (Mann-Whitney p-value < 0,05), soulignant le rôle de l'usage du bâtiment (occupation humaine, chauffage, etc.).

Concernant la diversité (Figure 4.2), les index de Shannon calculés sur l'ensemble des prélèvements intérieurs des supports biosourcés ont une moyenne par site de 3,14 (min : 2,05 – max : 4,21). Pour les supports intérieurs en terre crue, la moyenne par site est de 2,66, mais avec une plus grande dispersion des valeurs (0,23 – 4,47), notamment due au site D qui présente une très faible diversité. Les sites « Habitations » biosourcés et non biosourcés ne montrent donc pas de différence significative en termes de diversité pour les flores fongiques (Mann-Whitney p-value > 0,05). A l'inverse, pour les échantillons Grange-Extérieur, la diversité observée pour les supports biosourcés (moyenne : 3,16 ; 2,51 – 3,81) est significativement supérieure à celle des supports en terre crue (1,78 ; 0,45 – 2,84) (Mann-Whitney p-value < 0,01). L'index de Shannon des FAC (matière première analysée en laboratoire) est légèrement plus élevé que celui des prélèvements sur matériau en terre crue seule sur le site Grange-Extérieur (2,99 ; 2,70 – 3,16). Cette matière première ne présente toutefois pas une plus grande diversité fongique par rapport aux supports en terre crue seule à l'intérieur des habitats.

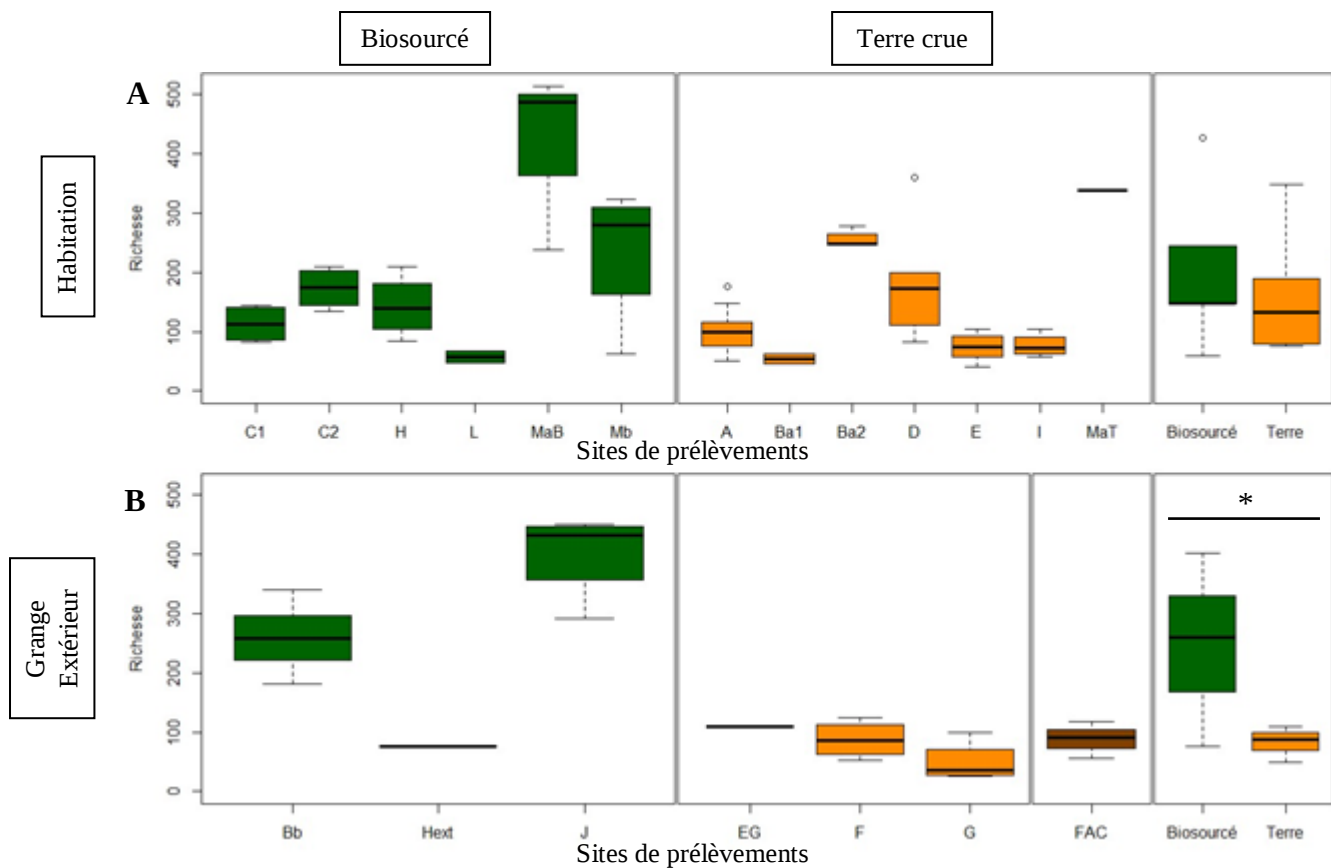


Figure 4.1 : Richesse spécifique (nombre d'OTUs définies à partir des régions ITS1) des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).

° : valeur extrême. * : test de Mann-Whitney significatif (p-value < 0,05)

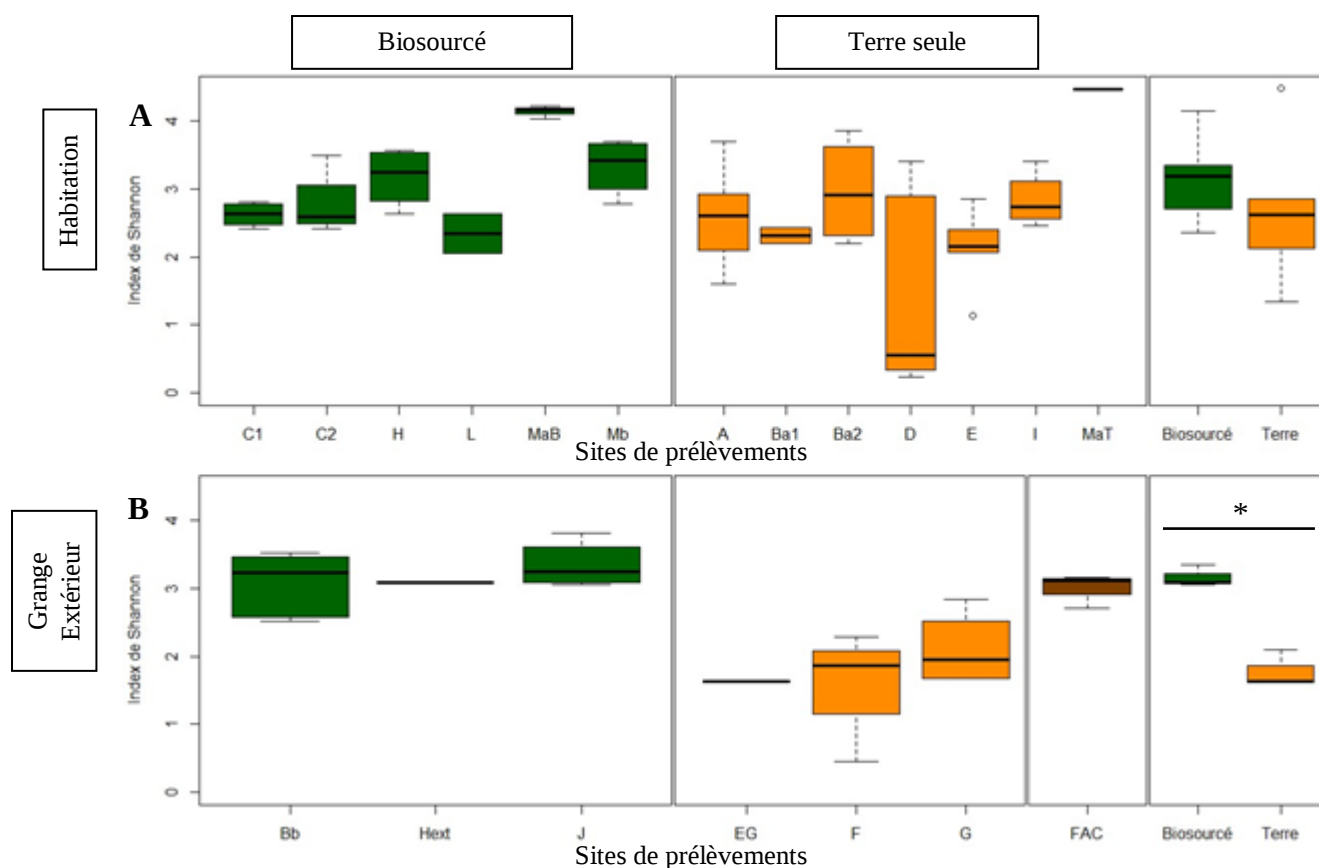


Figure 4.2 : Index de Shannon pour les banques ITS1 des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).

° : valeur extrême. * : test de Mann-Withney significatif (p-value < 0,05)

Bactéries

De la même manière, la richesse et la diversité ont été caractérisées respectivement en termes de nombre d'OTUs observées et de l'indice de Shannon à partir des séquences 16S à 97 % de similarité (respectivement Figure 4.3 et Figure 4.4). Le nombre d'OTUs varie de 34 à 830 pour la terre crue seule et de 93 à 1078 pour la terre crue avec inclusion biosourcée. La moyenne d'OTUs est de 354 et 398 pour les supports dans les habitations respectivement en terre crue seule et en terre avec inclusion biosourcée (Figure 4.3.A), et de 214 et 513 pour les supports dans les environnements hors habitation (Figure 4.3.B). Le nombre d'OTUs entre les différents sites varie significativement pour toutes les conditions de composition/localisation (Kruskal-Wallis p-value < 0,05). Plus globalement, le nombre d'OTUs entre les supports composés en terre seule et ceux biosourcés ne sont pas significativement différents en intérieur (Mann-Withney p-value > 0,05) au contraire de la localisation grange/extérieur (Mann-Withney p-value < 0,05), suggérant un rôle des conditions environnementales (température, exposition à l'humidité extérieur, etc.). Pour ce qui est de la diversité des communautés bactériennes (Figure 4.4), la moyenne par site de l'index de Shannon est de 3,88

(1,73 – 5,97) pour les supports biosourcés intérieurs. Une plus forte dispersion des diversités inter-sites est observée et significative (Kruskal-Wallis p-value < 0,05). Les supports terre crue seule dans les habitations présentent un index de Shannon moyen par site de 3,66 (1,23 – 5,93), avec une forte hétérogénéité inter-site (Kruskal-Wallis p-value < 0,01) et une faible diversité sur le site D. La diversité bactérienne entre les deux types de composition de murs pour les sites intérieurs n'est pas significativement différente (Mann-Whitney p-value > 0,05). Pour les supports prélevés dans les granges ou les sites extérieurs, les moyennes des index de Shannon sont de 2,05 (0,32 – 3,41) pour la terre crue seule et 4,49 (2,08 – 5,32) pour la terre crue avec inclusion biosourcée, avec une différence significative entre les deux types de composition pour cette localisation (Mann-Whitney p-value < 0,05). Tout comme dans le cas des champignons, l'index de diversité des bactéries contenues dans les FAC est supérieur à celui des matériaux en terre crue seule dans les granges ou à l'extérieur (4,72 ; 4,65-4,79), mais pas significativement différent de ceux de la condition « Habitations », que ce soit Terre crue avec inclusion biosourcée ou Terre crue seule.

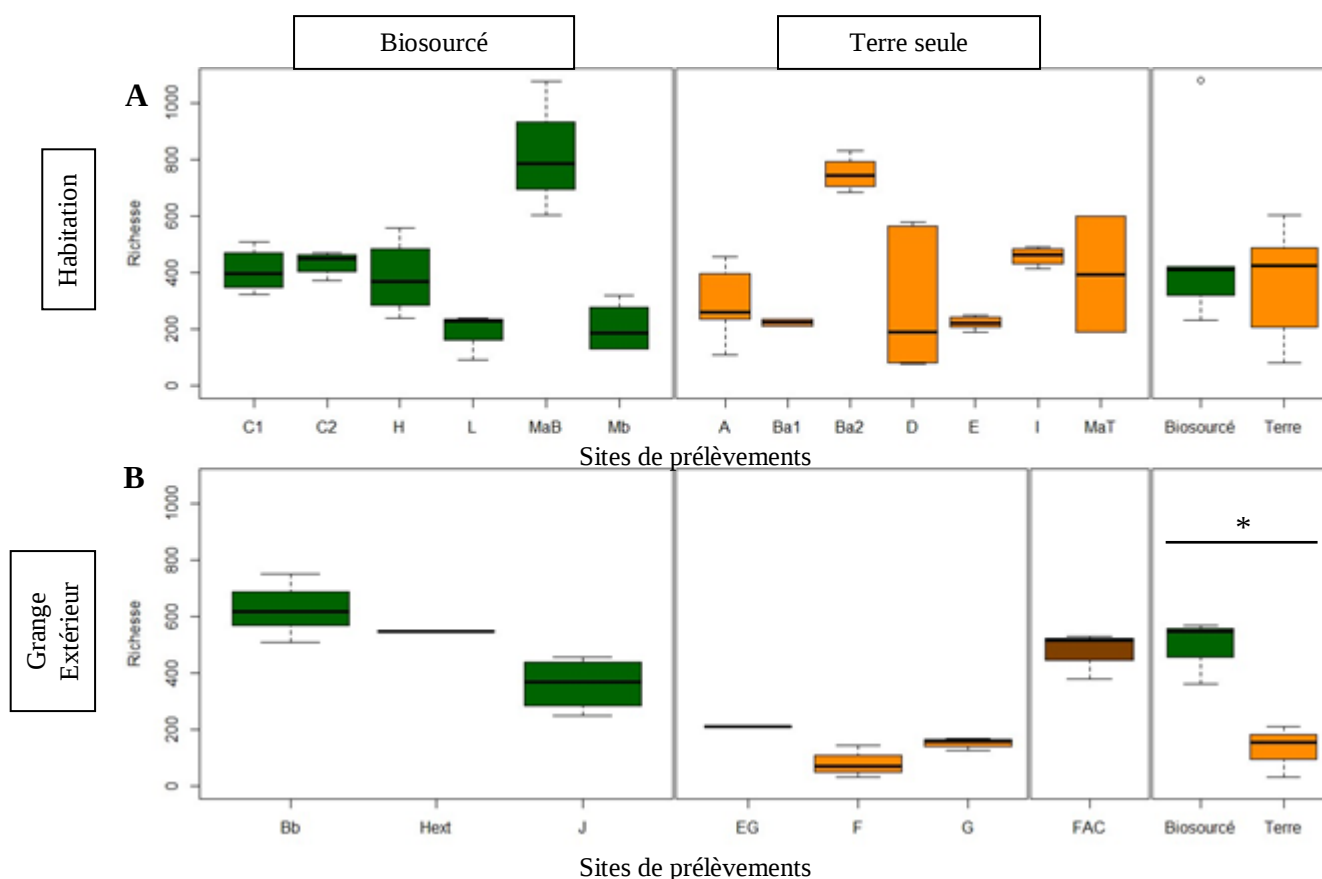


Figure 4.3 : Richesse spécifique (nombre d'OTUs définies à partir des régions 16S) des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).

° : valeur extrême. * : test de Mann-Whitney significatif (p-value < 0,05)

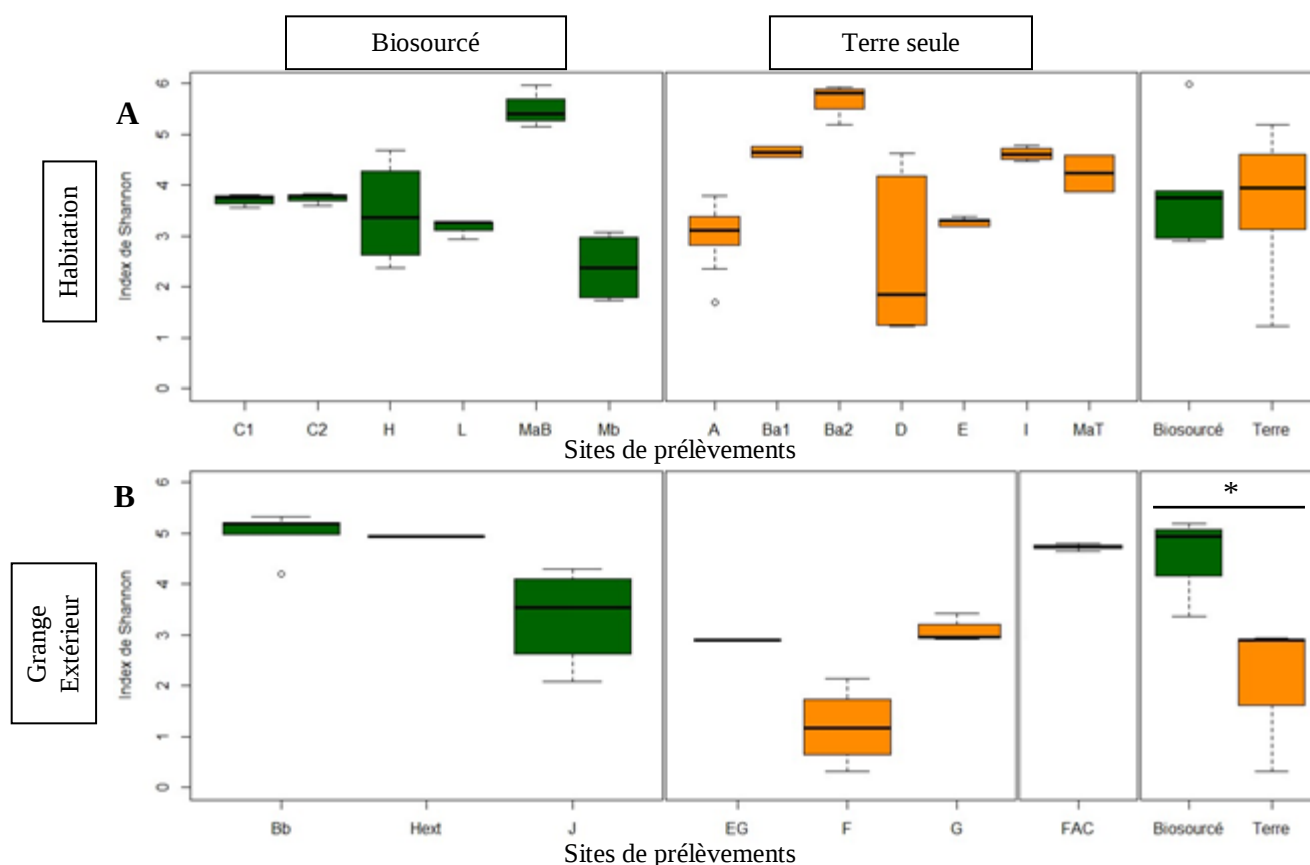


Figure 4.4 : Index de Shannon pour les banques 16S des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).

° : valeur extrême. * : test de Mann-Withney significatif (p-value < 0,05)

Une diversité globalement plus importante a été observée au sein des flores bactériennes (3,54 ; 1,23 – 5,97) par rapport aux flores fongiques (2,6 ; 1,33 – 4,47) (Mann-Withney p-value < 0,05). Les indices de diversité des communautés microbiennes ont été comparés afin d'évaluer une éventuelle corrélation entre la diversité des flores bactériennes et fongiques. Ainsi, il a été possible d'observer que la diversité de ces deux phyla de microorganismes était liée, que cela soit en se basant sur la richesse (Test de Spearman p-value < 0,05 ; rho : 0,55) ou l'index de Shannon (Test de Spearman p-value < 0,05 ; rho : 0,44). Cela signifie donc que lorsqu'une forte diversité bactérienne a été détectée sur un prélèvement, celui-ci présente également une importante diversité fongique. Cette corrélation n'a pu être observée par culture. Chaque site présenterait donc des conditions ou un historique qui agirait sur le développement ou le maintien d'une variété plus ou moins importante de microorganismes, bactéries et champignons. Dans les deux cas, la présence de fibres végétales dans le matériau à l'intérieur des habitats ne semble pas avoir d'influence sur la richesse et la diversité des communautés présentes à la surface des murs. A l'inverse, les échantillons avec inclusion

biosourcée prélevés dans des conditions extérieures présentent une richesse et une diversité significativement supérieures à celles des échantillons en terre crue seule. Toutefois, le faible nombre de sites et d'échantillons prélevés dans cette condition de localisation ne permet pas de conclure sur l'effet des fibres végétales sur la diversité microbienne présente sur le matériau en condition extérieure.

4.2.2. Beta diversité ou différentiel de diversité

La comparaison des communautés microbiennes entre les échantillons a été estimée par une matrice de distance Bray-Curtis et représentée en NMDS pour les différentes variables pour les banques ITS1 (Figure 4.5 et Tableau 4.3) et 16S (Figure 4.6 et Tableau 4.4).

La dispersion des profils des communautés fongiques intra-site semble relativement hétérogène, avec certains prélèvements fortement similaires pour un même site, comme les sites Bb, C ou G, tandis que d'autres sites possèdent des profils relativement distincts en fonction de l'échantillon analysé, comme les sites A, D, E ou I (Figure 4.5.A). Concernant la variabilité inter-sites, la majorité des échantillons semblent relativement proches les uns des autres, avec une distinction plus marquée pour les sites EG, F, G et L. Par la suite, les abondances relatives moyennes par site ont été utilisées pour le calcul des matrices de distances. Si la totalité des sites est prise en compte ou uniquement les habitations, la composition du support ne semble pas avoir d'influence sur le profil fongique détecté (PERMANOVA $P > 0,05$) (Figure 4.5.B). A l'inverse, les profils des communautés sur murs hors habitation sont significativement différents entre les supports terre crue seule et inclusion biosourcée (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,28$). Concernant les comparaisons entre les deux types de localisation pour une même composition de mur (Figure 4.5.C), les profils fongiques sont significativement différents (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,091$), avec un effet légèrement plus marqué dans le cas des supports terre seule (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,21$) par rapport aux supports biosourcés (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,16$). La présence de fibres végétales dans les matériaux en terre crue d'une habitation ne serait pas un facteur déterminant du maintien ou développement de flores fongiques spécifiques dans des conditions standards (hors dégâts des eaux). La différence de composition des matériaux dans une structure soumise à des conditions proches de l'extérieur semble au contraire influencer la composition des communautés fongiques présentes.

Tableau 4.3 : Résultats des tests PERMANOVA pour les banques ITS1 sur les variables de composition (Terre vs Biosourcé) et de localisation (Habitation vs Grange/Extérieur) pour la totalité des sites ou pour des sous-ensembles. Les résultats significatifs ($P < 0,05$) sont indiqués en gras.

Test PERMANOVA - ITS1			
Variable	Sites	R ²	P
Composition	Totaux	0,074	0,15
	Habitation	0,10	0,34
	Grange/Extérieur	0,28	0,01
Localisation	Totaux	0,091	0,012
	Terre	0,21	0,013
	Biosourcé	0,16	0,03

Dans le cas des communautés bactériennes, la variabilité intra-site semble être beaucoup moins importante que dans le cas des champignons, avec uniquement les sites A, D, L et MaT présentant une dispersion des profils notable (Figure 4.6.A). De même, à l'inverse des profils fongiques, les sites sont plus distincts les uns des autres. Lorsque les flores bactériennes de l'ensemble des différents sites sont comparés (Figure 4.6.B), leurs structures apparaissent significativement différentes entre les supports en terre seule ou en terre avec inclusion biosourcée (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,13$). Cette différence est observée à la fois pour les supports de la condition Habitation (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,16$) et de la condition Grange/Extérieur (PERMANOVA $P < 0,05$, $R^2 = 0,34$), avec un plus fort effet dans cette dernière condition. Pour ce qui est de la différence entre les supports intérieurs et les supports hors habitats, aucune différence significative n'a été observée sur l'ensemble des sites, y compris lorsque les différentes compositions sont prises en compte (PERMANOVA $P > 0,05$).

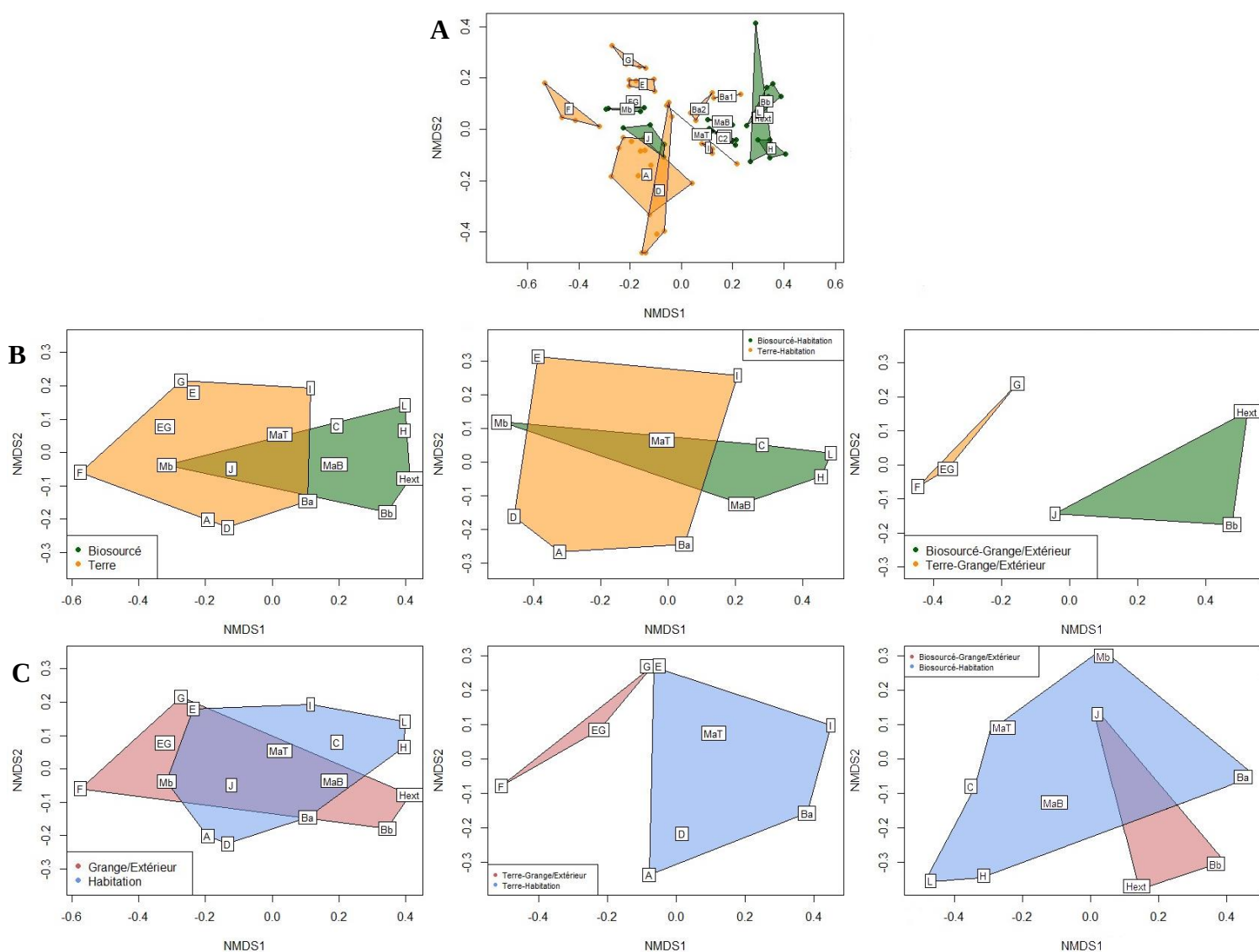


Figure 4.6 : Graphiques NMDS des matrices de dissimilarité Bray-Curtis des communautés 16S en fonction du site de prélèvement (A), de la composition du mur (B) ou de la localisation du prélèvement (C).

Tableau 4.4 : Résultats des tests PERMANOVA pour les banques 16S sur les variables de composition (Terre vs Biosourcé) et de localisation (Habitation vs Grange/Extérieur) pour la totalité des sites ou pour des sous-ensembles.

Les résultats significatifs ($P < 0,05$) sont indiqués en gras.

Test PERMANOVA - 16S			
Variable	Sites	R ²	P
Composition	Totaux	0,13	0,009
	Habitation	0,16	0,038
	Grange/Extérieur	0,34	0,010
Localisation	Totaux	0,077	0,180
	Terre	0,19	0,076
	Biosourcé	0,17	0,228

4.2.3. Assignment taxonomique

Champignons

A partir de la table d'OTUs obtenues après élimination des singletons, les banques ITS1 et 16S ont été alignées respectivement sur les bases de données UNITE et SILVA. Le taux d'assignation des séquences et des OTUs pour les tables d'abondances raréfiées est présenté dans le Tableau 4.5. Sur l'ensemble des séquences contenues dans les banques ITS1, 87,30 % ont été assignées jusqu'au genre, ne représentant que 57,65 % de l'ensemble des OTUs. Cet écart s'explique par la présence de très nombreuses OTUs à faible abondance qui n'ont pas été réassignées par BLAST en cas de non-assignation sur UNITE. Au total, 495 genres fongiques ont été identifiés sur l'ensemble des banques. Pour les banques 16S, une plus forte proportion des séquences et des OTUs ont été assignées jusqu'au genre, avec respectivement 93,22 % et 74,44 % d'assignation. Ces assignations ont permis la détection de 731 genres bactériens sur l'ensemble des échantillons.

Tableau 4.5 : Taux d'assignation des séquences et des OTUS aux différents niveaux taxonomiques pour l'ensemble des banques.

Région	Niveau	Class	Order	Family	Genus
ITS1	% de séquences	94,40	94,27	89,14	87,30
	% d'OTUs	64,10	63,29	59,90	57,65
16S	% de séquences	99,19	98,93	96,83	93,22
	% d'OTUs	93,09	91,14	83,02	74,44

Les séquences ITS1 ont majoritairement été assignées au phylum *Ascomycota* (76,26 %) ainsi qu'au phylum *Basidiomycota* (18,38 %). Tout autre phylum correspond à moins de 0,5 % des séquences. Les classes principales sont les *Dothideomycetes* (37,6 %), *Eurotiomycetes*

(19,95 %), *Sordariomycetes* (15,94 %), *Wallemiomycetes* (7,91 %) et *Tremellomycetes* (5,62 %).

Sur l'ensemble des séquences assignées jusqu'au genre, les taxons les plus abondants sont : *Cladosporium* (19,29 %), *Alternaria* (3,81 %), *Devriesia* (3,43 %) (*Dothideomycetes*); *Wallemia* (9,12 %) (*Wallemiomycetes*); *Aspergillus* (8,54 %), *Phialosimplex* (4,24 %), *Coccodinium* (3,09 %), *Penicillium* (2,23 %) (*Eurotiomycetes*) ; *Cryptococcus* (4,33 %) (*Tremellomycetes*) ; *Fusarium* (4,26 %), *Verticillium* (2,40 %) (*Sordariomycetes*). En ce qui concerne l'abondance relative moyenne, séquences non assignées incluses, *Cladosporium* est celui qui est le plus répandu, représentant en moyenne 17,10 % de l'abondance relative sur l'ensemble des sites (Figure 4.7). Ce genre a été détecté sur la totalité des sites de prélèvements avec une certaine variabilité inter-sites, notamment avec une prévalence sur les sites C, E, EG et Hext et une très faible présence sur les sites L, Mb et Bb. Les autres genres détectés sur la majorité des sites sont *Wallemia* (8,09 %), *Aspergillus* (7,57 %), *Cryptococcus* (3,84 %), *Fusarium* (3,78 %) et *Alternaria* (3,38 %). D'autres genres sont présents de manière importante seulement sur quelques sites, tels que *Phialosimplex* (3,76 %) sur les sites D et Mb, *Devriesia* (3,04 %) sur les sites C et Mb, et *Verticillium* (2,13 %) sur les sites C et L. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée entre l'ensemble des supports en terre crue seule et en terre avec inclusion biosourcée au sein des habitations (Mann-Withney p -value > 0,05) (Figure 4.8).

La variation inter-sites pour une même condition de composition des supports intérieurs conduit à des abondances relatives globales similaires entre terre crue seule et terre avec inclusion biosourcée. Les sites avec terre crue seule présentent toutefois certaines tendances, bien que non significatives, comme une plus grande abondance pour le genre *Wallemia* (T-Hab : 11,31 % $\pm$ 14,35 % ; B-Hab : 2,66 % $\pm$ 0,96 %), tandis que ceux avec terre avec inclusion biosourcée présentent une plus forte concentration en *Verticillium* (T-Hab : 0,50 % $\pm$ 0,72 % ; B-Hab : 5,47 % $\pm$ 5,93 %). En ce qui concerne les sites Grange/extérieur, les supports terre crue seule présentent une plus forte abondance des genres *Coccodinium* (T-Ext : 16,70 % $\pm$ 26,03 % ; B-Ext : 0,45 % $\pm$ 0,78 %), *Devriesia* (T-Ext : 12,94 % $\pm$ 13,93 % ; B-Ext : 0,11 % $\pm$ 0,18 %) et *Libertasomyces* (T-Ext : 7,99 % $\pm$ 7,24 % ; B-Ext : 0,41 % $\pm$ 0,72 %), alors que dans le cas des supports fibrés, les genres présentant une forte abondance sont les genres *Aspergillus* (T-Ext : 5,87 % $\pm$ 8,98 % ; B-Ext : 27,09 % $\pm$ 13,35 %) et *Wallemia* (T-Ext : 0,70 % $\pm$ 1,16 % ; B-Ext : 11,80 % $\pm$ 5,48 %). La faible quantité de sites prélevés et la

forte variation de profil inter-site rendent cependant les résultats de la condition Grange/Extérieur difficiles à étendre.

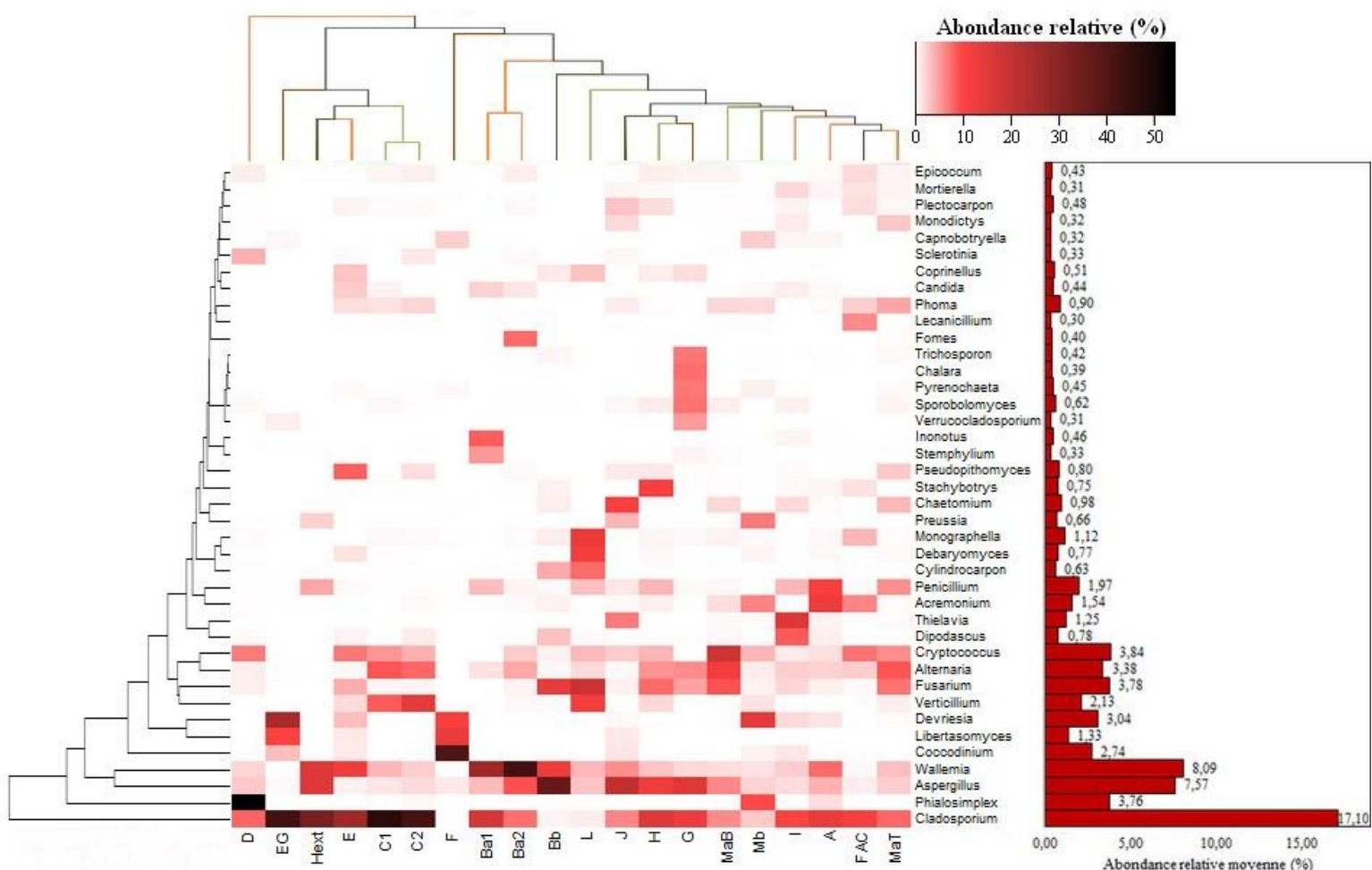


Figure 4.7 : Composition fongique et abondance relative moyenne des 40 genres majoritaires. Les taxons visualisés représentent 75,1 % des séquences de l'ensemble des banques ITS1.

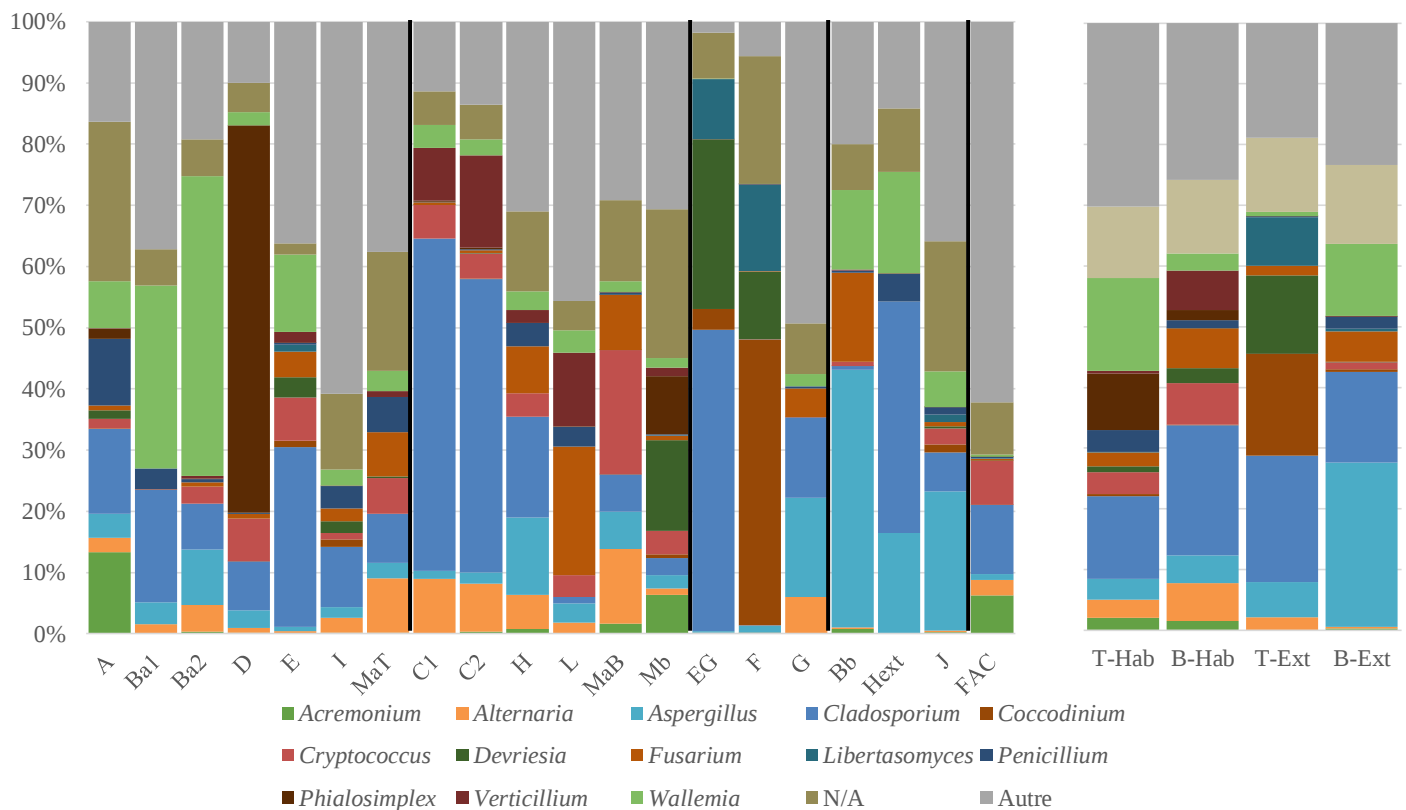


Figure 4.8 : Abondance relative des principaux genres fongiques selon les différents sites de prélèvements et les différentes conditions.

Bactéries

Concernant les flores bactériennes, sur la totalité des sites étudiés, les taxons majoritaires sont les suivants : *Actinobacteria* (47,05 %), composé d'*Actinobacteria* (42,60 %), de *Rubrobacteria* (1,73 %) et de *Thermoleophila* (1,64 %) ; *Firmicutes* (33,65 %), composé de *Bacilli* (31,88 %) et de *Clostridia* (1,60 %) ; *Proteobacteria* (15,06 %), composé d'*Alphaproteobacteria* (6,72 %), de *Gammaproteobacteria* (6,34 %) et de *Betaproteobacteria* (1,73 %) ; *Bacteroidetes* (3,25 %), composé de *Sphingobacteriia* (1,51 %) et de *Flavobacteriia* (1,27 %). Au niveau du genre, *Bacillus* (23,85 %) et *Arthrobacter* (13,92 %) sont les genres majoritairement détectés (Figure 4.9). Le genre *Actinomycetospora* (9,21 %) est principalement détecté sur les sites E, EG, F et Mb. De même, le genre *Saccharopolyspora* (5,09 %) est retrouvé essentiellement sur les sites A, D et J. En comparant les profils bactériens présents dans l'intérieur des habitations, certaines tendances suggèrent que la composition du support pourrait affecter l'abondance de certains genres (Figure 4.10). Le genre *Arthrobacter* est beaucoup plus présent sur les murs en terre comportant des fibres végétales (T-Hab : 7,49 % $\pm$ 6,97 % ; B-Hab : 31,34 % $\pm$ 22,81 %), tandis que le genre *Bacillus* serait associé de manière plus importante aux supports en terre crue seule (T-Hab :

33,39 % $\pm$ 23,58 % ; B-Hab : 13,33 % $\pm$ 15,79 %). Pour ce qui est des supports dans les granges ou à l'extérieur, les flores des supports en terre seule sont essentiellement composés des genres *Actinomyces* (T-Ext : 41,12 % $\pm$ 38,82 % ; B-Ext : 0,03 % $\pm$ 0,05 %) et *Bacillus* (T-Ext : 38,44 % $\pm$ 32,70 % ; B-Ext : 12,78 % $\pm$ 14,57 %). Dans le cas des murs biosourcés externes, les genres sont plus divers, avec notamment *Acinetobacter* (B-Ext : 10,44 % $\pm$ 9,56 %), *Arthrobacter* (B-Ext : 9,60 % $\pm$ 5,96 %), *Bacillus* (B-Ext : 12,78 % $\pm$ 14,57 %), *Saccharopolyspora* (B-Ext : 13,17 % $\pm$ 22,76 %) et *Trichococcus* (B-Ext : 4,35 % $\pm$ 5,75 %). Les variabilités inter-site pour une même condition de composition et de localisation ne permettent toutefois pas de dégager de variations significatives (Mann-Whitney p-value > 0,05).

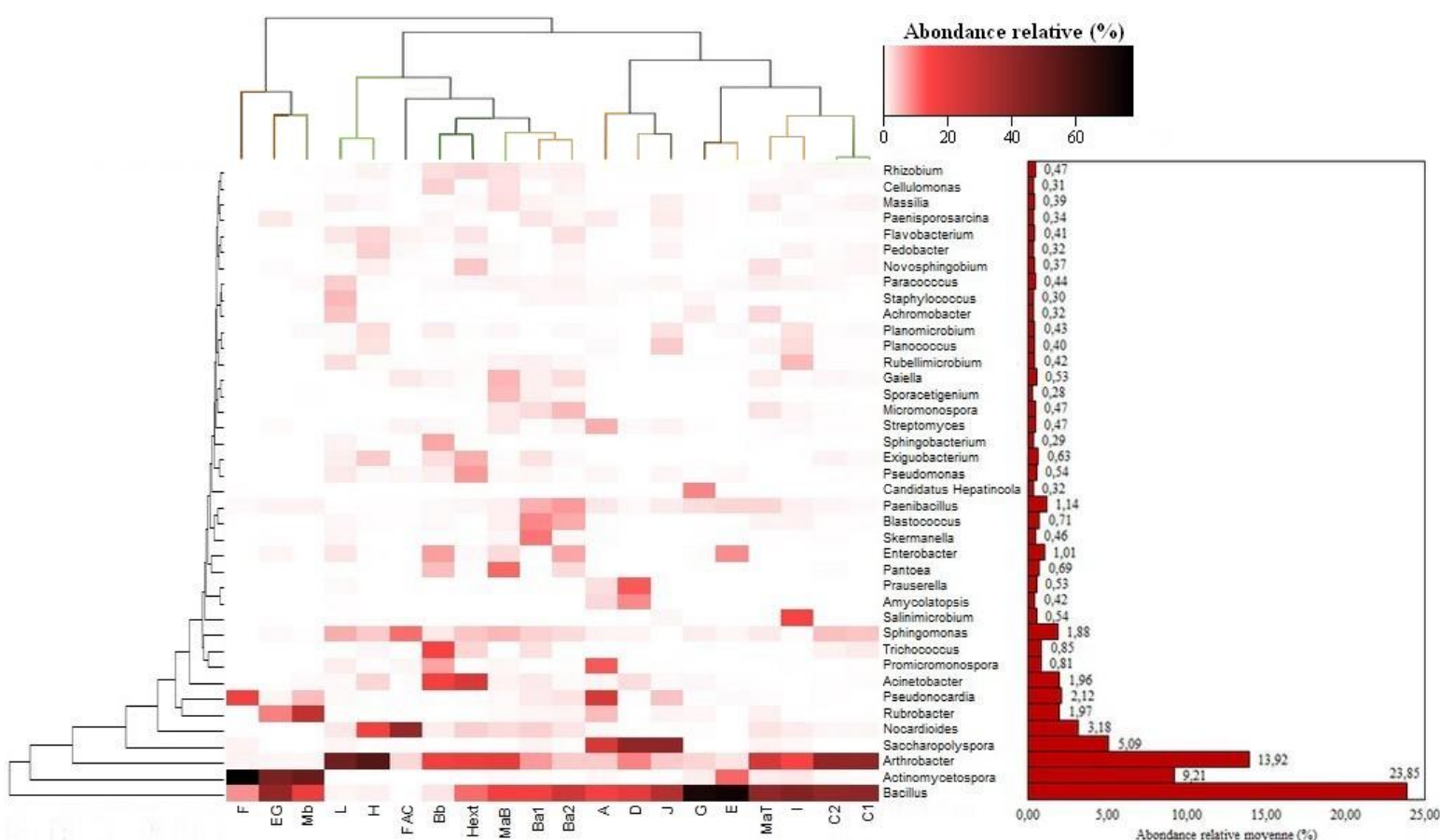


Figure 4.9 : Composition bactérienne et abondance relative moyenne des 40 genres majoritaires. Les taxons visualisés représentent 80,1 % des séquences de l'ensemble des banques 16S.

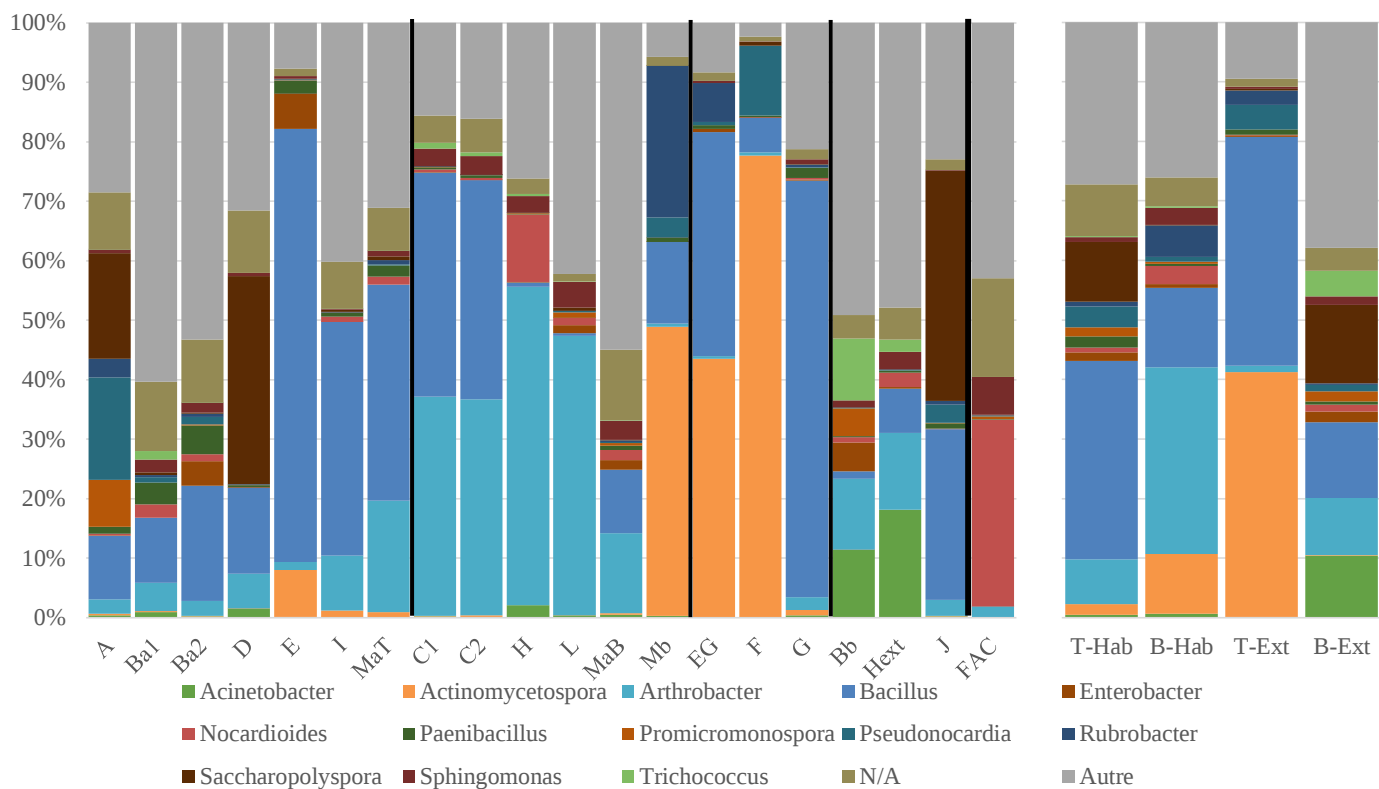


Figure 4.10 : Abondance relative des principaux genres bactériens selon les différents sites de prélèvements et les différentes conditions.

Comme observé sur les représentations NMDS des matrices de distance Bray Curtis au niveau des prélèvements, certains sites possèdent une forte dispersion si l'on considère les différents échantillons, et en particulier le site A. Lorsque les prélèvements sont observés individuellement, une différenciation peut être faite entre les hauteurs de prélèvements 190, 170, 150 et 70 cm d'une part et 120 et 100 cm d'autre part, qu'il s'agisse des prélèvements d'adobe ou de joint. Certains genres bactériens sont significativement plus abondants au sein des prélèvements à 120 cm et 100 cm que sur le reste du mur (Figure 4.11). Ainsi, parmi les genres avec une abondance relative supérieure à 1 % dans un prélèvement, les genres *Promicromonospora* (190-150 cm/70 cm : 0,18 % $\pm$ 0,26 % ; 120-100 cm : 25,96 % $\pm$ 10,58 %), *Streptomyces* (190-150 cm/70 cm : 0,44 % $\pm$ 0,41 % ; 120-100 cm : 11,87 % $\pm$ 7,96 %), *Arthrobacter* (190-150 cm/70 cm : 1,26 % $\pm$ 0,88 % ; 120-100 cm : 5,66 % $\pm$ 3,25 %) et *Paenisporosarcina* (190-150 cm/70 cm : 0,04 % $\pm$ 0,08 % ; 120-100 cm : 3,12 % $\pm$ 1,35 %) sont quasiment absents des prélèvements exceptés dans les échantillons 120-100 cm (Mann-Whitney p-value < 0,05). Ces genres peuvent être naturellement détectés dans le sol, et à l'exception de *Paenisporosarcina*, tous appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*. Les genres présents sur les autres hauteurs du mur sont également détectés sur cette zone et, bien

qu'étant en moyenne moins abondants, ne sont pas significativement différents sur l'ensemble du mur. Pour rappel le site A correspond à une ancienne étable.

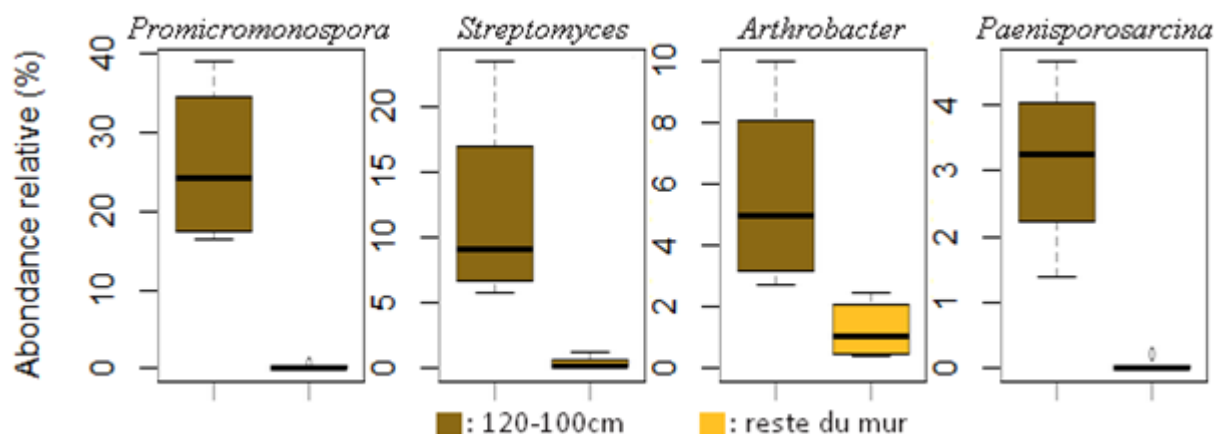


Figure 4.11 : Abondances relatives des genres bactériens significativement différentes entre les prélèvements à 120 et 100 cm d'une part et le reste du mur d'autre part sur le site A (Mann-Whitney p-value < 0,05).

De la même manière, le site D présente deux types de profils bactériens et fongiques sur un même mur. Les prélèvements des adobes à 160 et 110 cm possèdent une flore différente de ceux des joints aux mêmes hauteurs et de l'adobe et joint à 60 cm (Figure 4.12). Pour les genres bactériens, l'ensemble du mur présente une forte abondance de *Saccharopolyspora* (57,83 % ± 6,8 %), *Prauserella* (12,95 % ± 9,87 %) et *Amycolatopsis* (9,23 % ± 0,85 %), alors que ces genres sont quasiment absents sur les prélèvements d'adobe à 160 et 110 cm de hauteur (abondance relative < 2 %) et que ceux-ci sont plus abondants en *Bacillus* (44,77 ± 18,31 %) et diversifiés. Dans le cas des champignons, les prélèvements du mur contiennent essentiellement le genre *Phialosimplex* (94,76 % ± 2,32 %), témoignant d'un probable développement de cette moisissure sur le matériau, tandis que les adobes à 160 et 110 cm avaient à leur surface une flore beaucoup plus variée, avec notamment *Cladosporium* (23,28 % ± 11,4 %) et *Wallemia* (5,73 % ± 6,75 %). Certains murs présentent donc de fortes variations suivant la zone de prélèvement, ce qui peut compliquer les comparaisons des différents sites entre eux.

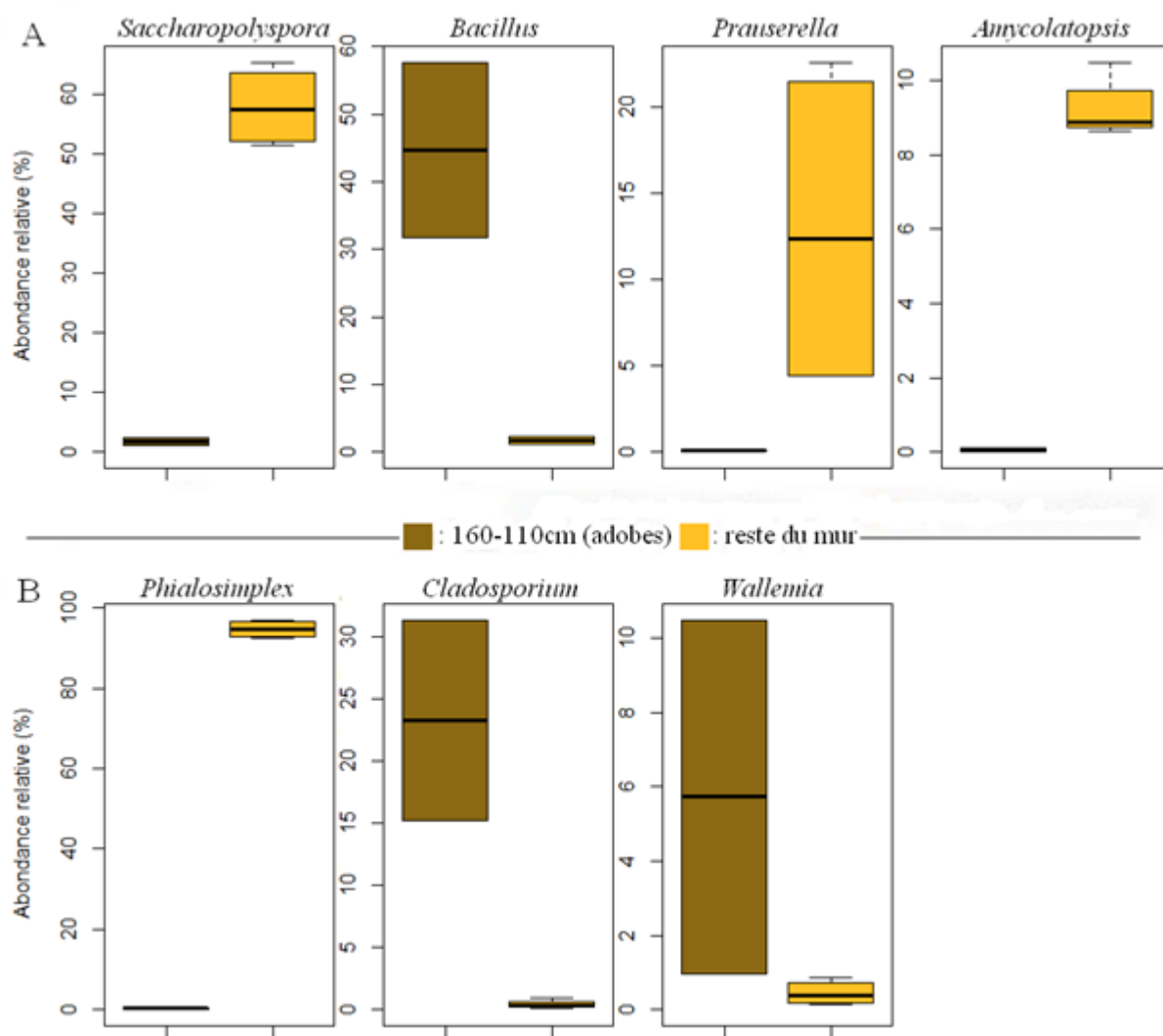


Figure 4.12 : Abondances relatives des genres bactériens (A) et fongiques (B) significativement différentes entre les prélèvements d’adobe à 160 et 110 cm d’une part et le reste du mur d’autre part sur le site D (Mann-Whitney p-value < 0,05).

4.3. Discussion

Un échantillonnage au sein de bâtiments du patrimoine a été effectué afin de caractériser les microorganismes cultivables présents sur des matériaux en terre crue dans l’habitat, et les flores bactériennes et fongiques présentes à la surface de ces supports (cultivables et non cultivables) ont été identifiées à l’aide d’approches de métabarcoding. Tous les supports étudiés étaient dans des conditions d’humidité normales au moment des prélèvements, i.e. soit ils ne présentaient pas de prolifération visible liée à une accumulation d’eau, soit dans le cas d’un site une accumulation d’eau antérieure avait causé le développement de moisissures mais le mur est depuis retourné à un état sec et sans moisissure visible. Les communautés bactériennes et fongiques des matières premières utilisées pour la fabrication des éprouvettes

en terre (FAC) ont également été caractérisées par les approches de culture pasteurienne et de métabarcoding.

Dans cette section sont discutés la diversité et la taxonomie des communautés microbiennes sur les matières premières et *in situ*, les variations intra et intersites et les paramètres influant, les enjeux sanitaires associées aux proliférations identifiées. Enfin, la discussion s'achève par une réflexion sur les limites des approches de métabarcoding.

Diversité et taxonomie des communautés microbiennes sur les matières premières

La diversité des communautés bactériennes et fongiques a été évaluée pour chaque matière première et support à travers l'index de Shannon (Haegeman et al., 2013). Concernant les FAC, ces indices sont pour les champignons et les bactéries de l'ordre de 2,99 et 4,72, respectivement, et sont similaires à ceux détectés dans les prélèvements à l'intérieur des habitations. Les principaux genres fongiques détectés sont *Cladosporium* (11,3 %), *Cryptococcus* (7,2 %), *Acremonium* (6,3 %), *Lecanicillium* (6,1 %), *Tetracladium* (5,5 %), *Pseudeurotium* (4,2 %) et *Monographella* (3,9 %). Mis à part *Cladosporium* et *Cryptococcus* qui sont largement répandus dans les autres échantillons *in situ*, *Acremonium* n'est détecté de manière abondante que sur les sites A et Mb, et les autres genres abondants dans les FAC ne sont pas partagés par les matériaux terre crue. La structure des communautés fongiques présentes dans les FAC est donc sensiblement différente de celles retrouvées sur les matériaux sur site. Les communautés bactériennes des FAC sont majoritairement constituées de *Nocardioides* (37,6 %), et d'une abondance plus faible de *Sphingomonas* (7,6 %), *Iamia* (5 %), *Microthrix* (3,8 %) et *Thiobacillus* (3,2 %). Près de 20 % des séquences de ces bibliothèques 16S sont non assignées, ce qui est plus élevé que pour les autres prélèvements (1 % - 13 %). Ces genres bactériens sont peu présents sur les matériaux terre crue, et les FAC présentent une très faible abondance en *Bacillus*, pourtant largement détecté sur sites. Les matières premières FAC ont donc des communautés bactériennes et fongiques significativement différentes de celles qui sont retrouvées dans les constructions *in situ*. Il est important de noter que les FAC sont des argiles issues d'un processus de lavage de calcaire, et ne présentent donc pas les mêmes caractéristiques que les terres habituellement prélevées en profondeur dans le sol et utilisées dans les constructions. Le calcaire extrait de carrières est lavé à l'eau et ce sont les boues résultant de ce lavage qui sont ensuite mises à sécher dans des bacs de sédimentation. Les effets potentiels des traitements de ces terres et l'apport de l'eau peuvent avoir fortement influencé les flores microbiennes présentes, celles-ci étant alors peu représentatives de celles

détectées sur les murs des habitations. L'historique des murs est également un facteur incontournable à prendre en compte. Cependant, les différences entre FAC et les prélèvements *in situ* dans leur ensemble sont plus importantes qu'entre les sites.

Diversité et taxonomie des communautés fongiques sur les matériaux *in situ*

Concernant les supports *in situ*, aucun impact significatif de la présence de fibres végétales dans les matériaux terre crue au sein des habitations n'a été observé sur la richesse ou la diversité des communautés microbiennes. Malgré la présence de fibres végétales pouvant favoriser le développement d'espèces fongiques dégradant notamment la cellulose ou plus difficilement la lignine (Hoang et al., 2010; Huang et al., 2015; Mensah-Attipoe et al., 2015), ces matériaux ne semblent donc pas entraîner une plus grande diversité microbienne, qu'elle soit bactérienne ou fongique, du moins sur sites en « conditions normales ». Dans le cas des prélèvements extérieurs aux lieux de vie, une plus forte diversité microbienne a pu être mesurée sur les supports biosourcés par rapport aux supports en terre crue seule. Une hypothèse est que l'exposition à l'humidité extérieure ou autres facteurs environnementaux (ombrage, vent,...) favoriserait l'apport et/ou le développement de diverses espèces en surface des murs, ce que pourrait confirmer une étude de sites de prélèvements sur un gradient climatique.

La comparaison entre les valeurs de diversité obtenues dans ces travaux avec celles présentées dans d'autres études est difficile car de nombreux facteurs - choix de la méthode de prélèvement, du type de support étudié (avec ou sans contamination), des marqueurs génétiques ciblés, de la technique de séquençage utilisée, du traitement des données - peuvent altérer le nombre d'OTUs obtenues et donc les scores de diversité calculés. Les mesures de diversité fongique sur les murs intérieurs en terre crue (1,33 – 4,47) semblent malgré tout supérieures à celles rapportées dans la littérature pour des surfaces d'autres natures à l'intérieur des habitations (rebord de fenêtre, carrelage, etc.), que cela soit avec présence de moisissures visibles (0,14 – 2,29) (An and Yamamoto, 2016) ou non (0,62 – 2,05) (Adams et al., 2013a). A l'inverse, les poussières à l'intérieur des habitations comporteraient des indices de diversités plus élevés (4,2-4,8) (Dannemiller et al., 2014a). De même, la diversité bactérienne du sol (4,74 – 7,16) (Fierer et al., 2012b; Nacke et al., 2011; Will et al., 2010) est plus élevée que celle mesurée sur les supports intérieurs en terre crue (1,23 – 5,97). Qu'ils soient biosourcés ou non, les matériaux en terre crue seraient donc un milieu favorable au maintien, voire au développement, d'une plus grande variété de champignons que ne peuvent

l'être les surfaces conventionnelles des habitats. L'effet de ce type de support sur la diversité fongique pourrait être en partie expliqué par l'origine du matériau terre crue. En effet, dans la mesure où la terre crue est extraite du sol puis utilisée dans le bâtiment, une partie des microorganismes, des nutriments et des minéraux initialement contenus dans le sol devraient se retrouver dans le matériau de construction final. A l'inverse, les matériaux usuellement utilisés dans le bâtiment sont souvent le résultat de nombreux processus industriels, altérant fortement les ressources disponibles pour le développement des microorganismes. Les matériaux terre crue sembleraient toutefois être un milieu moins riche et diversifié que ne peuvent l'être les poussières intérieures ou les sols dont la terre est issue, ceci en raison de traitements ultérieurs de la matière (séchage, etc.) et des conditions d'usage (HR, chauffage, entretien, etc.).

Sur l'ensemble des séquences obtenues pour les communautés fongiques, celles-ci ont été assignées principalement au phylum *Ascomycota* (76,26 %) et dans une moindre mesure au phylum *Basidiomycota* (18,38 %). Cette prédominance des Ascomycètes au sein des communautés intérieures correspond à ce qui a pu être observé sur d'autres prélèvements dans l'habitation, et en particulier dans les poussières intérieures (Amend et al., 2010a; Rocchi et al., 2017), tandis qu'à l'inverse une plus forte proportion de *Basidiomycota* avait été détectée dans l'air de garderies en Corée du Sud (Shin et al., 2015). Les genres majoritairement détectés sur les murs en terre crue correspondent à *Cladosporium*, *Wallemia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* et *Fusarium*, et dans une moindre mesure à *Alternaria*, *Devreisia*, *Coccodinium*, *Verticillium* et *Penicillium*. La plupart de ces taxons, comme *Cladosporium*, *Aspergillus* ou encore *Alternaria*, sont également identifiés dans d'autres études des flores fongiques intérieures, que cela soit par des méthodes culturales (Beguin and Nolard, 1994; Chao et al., 2002; Dassonville et al., 2008) ou par séquençage haut-débit (Adams et al., 2013c, 2013a; Amend et al., 2010a; Rocchi et al., 2017). Certains taxons sont difficilement isolés ou identifiés par culture, et en particulier dans le cas des Basidiomycètes. Les approches de métabarcoding ont permis ici de détecter sur la quasi-totalité des sites des taxons issus de ce phylum comme *Wallemia* (100 % des sites), *Cryptococcus* (88 % des sites) et *Sporobolomyces* (100 % des sites), qu'il aurait été plus difficile d'atteindre par culture et que nous n'avons pas détectés par cette méthode. Concernant l'origine des microorganismes, la quasi-totalité des taxons abondants est associée à l'environnement extérieur, et en particulier l'air (*Cladosporium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Penicillium*, etc.) (Adams et al., 2013c). A l'inverse, les taxons relatifs à la flore humaine sont très peu présents. Les levures *Candida* (Habitation : 0,55 % ; Grange/Extérieur : 0,05 %) et *Malassezia* (Habitation : 0,27 %

; Grange/Extérieur : 0 %) font partie des principaux champignons associés à l'homme (Grice et al., 2009), et bien que présents uniquement sur les sites habités ils sont très faiblement détectés. Cette prévalence des flores de l'air extérieur par rapport aux autres types de flores dans la composition des communautés fongiques sur les surfaces intérieures avait déjà été rapportée par Adams *et al* (2013a).

En se basant sur les profils moyens par habitation, aucune différence significative n'a été révélée entre les surfaces en terre crue seule ou biosourcée, mais il est tout de même possible de voir sur les représentations graphiques NMDS que les deux conditions restent relativement homogènes et dissociées. Bien que non significatives, certaines tendances peuvent être détectées en termes d'abondance de genres suivant les compositions. Ainsi, le genre *Wallemia* serait plus associé aux sites en terre crue. Ce genre est communément détecté dans la flore des bâtiments ou le sol (Zalar et al., 2005), et ne semble pas être associé aux plantes, que cela soit pour un comportement symbiotique ou phytopathogène. A l'inverse, les genres *Fusarium* et *Verticillium* sont plus abondants sur les sites biosourcés. Ces deux genres sont notamment présents dans les sols, et incluent certaines espèces phytopathogènes (Aoki et al., 2014; Barbara and Clewes, 2003), qu'il sera alors possible de retrouver à la surface de végétaux. Les végétaux utilisés pour la conception des matériaux biosourcés peuvent donc être une source de ces microorganismes lors de l'étape de fabrication, ou ces champignons peuvent se déposer au cours du temps et la présence de fibres végétales favoriserait leur maintien à la surface du mur. Toutefois, ces variations n'impliquent pas une discrimination nette des flores entre les deux types de matériaux.

Quelques prélèvements ont également été menés sur des supports en terre crue dans des conditions autre qu'une salle habitée, afin d'avoir un témoin externe dans notre analyse. Pour cette condition de localisation, les communautés fongiques sont significativement différentes suivant la présence ou non de fibres végétales. De plus, la localisation du prélèvement (Habitation vs Grange / Extérieur) serait un des facteurs impliqués dans la composition de ces communautés. Cette différence pouvait être attendue dans la mesure où les conditions environnementales (en particulier la température et l'humidité relative) sont fortement différentes entre ces deux catégories de bâtiments. Toutefois, la variabilité inter-site est particulièrement importante, et le faible nombre d'échantillons rend l'analyse de ce groupe limitée.

Diversité et taxonomie des communautés bactériennes sur les matériaux *in situ*

En ce qui concerne les analyses des flores bactériennes par métabarcoding, celles-ci ont montré une prévalence des *Actinobacteria*, des *Firmicutes* (principalement *Bacilli*) et des *Proteobacteria* (principalement α et γ -*proteobacteria*) sur les matériaux en terre crue. Ces taxons sont souvent détectés de manière importante dans les environnements intérieurs, qu'il s'agisse des particules en suspension dans l'air et les poussières (Hospodsky et al., 2012; Shin et al., 2015) ou des surfaces (Dunn et al., 2013). Les phylums *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (α , β et γ -*proteobacteria*) sont également présents dans différents échantillons de sols (Fierer et al., 2012b; Nacke et al., 2011; Thomson et al., 2015; Will et al., 2010). Toutefois, le phylum *Acidobacteria* présente une forte abondance au sein des communautés bactériennes du sol, alors qu'il est très faiblement représenté dans nos échantillons (0,25 %). La différence de composition de la terre crue par rapport au sol, notamment à travers les étapes de dessiccation, le pH, pourrait expliquer cette variation importante. Si l'analyse est portée en termes de genre, les genres *Bacillus* et *Arthrobacter* sont présents sur la totalité des sites, avec une très forte abondance par rapport aux autres genres. L'analyse des matrices de dissimilarités Bray-Curtis entre les communautés bactériennes a montré une différence significative entre les supports composés de terre crue seule et ceux composés de terre crue avec inclusion biosourcée. Ainsi, une plus forte présence de *Bacillus* a été mesurée sur les sites en terre crue seule, tandis qu'*Arthrobacter* est majoritairement associé aux sites en terre crue avec biosourcée. Ces deux genres sont largement répandus dans l'environnement, et notamment dans le sol, mais il semblerait que la présence de fibres végétales dans le matériau rendrait celui-ci plus favorable à la présence d'*Arthrobacter* par rapport à *Bacillus*. Dans la mesure où *Bacillus* est capable de sporuler en cas de stress, cela pourrait augmenter sa persistance sur des milieux plus faibles en nutriments comme les supports en terre sans fibres végétales, et ainsi expliquer sa prédominance sur ce type de matériaux. Les autres genres ayant des abondances fortement variables entre terre seule et terre biosourcée sont des taxons présents de manière abondante uniquement sur un ou deux sites, ne permettant pas de définir des structures générales pour ces matériaux.

La quasi-totalité des principaux genres détectés (*Actinomycetospora*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardioides*, *Paenibacillus*, *Rubrobacter*, *Sphingomonas*) a pour niche écologique le sol. Les flores bactériennes présentes sur les surfaces intérieures sont pourtant habituellement associées majoritairement aux flores humaines (Lax et al., 2014; Wilkins et al., 2016), en particulier dans le cas des surfaces touchées par les occupants (Dunn et al.,

2013). Dans le cas des matériaux en terre crue, le contact physique avec les occupants pourrait être considéré minime, et il est peu probable que des transferts directs sporadiques aient un impact durable sur les bactéries résidentes. Cependant, l'air et les poussières intérieurs sont également chargés en bactéries issues des microbiotes des occupants (Hospodsky et al., 2012; Meadow et al., 2014b; Shin et al., 2015; Täubel et al., 2009) et ces aérosols et particules peuvent se déposer à la surface des murs et ainsi se retrouver dans ces communautés. Par exemple, des genres tels que *Micrococcus* ou *Staphylococcus* peuvent être de bons indicateurs de flore humaine. Pourtant, bien que détectés, ces genres sont très peu présents sur les supports en terre crue, avec des abondances relatives inférieures à 1 %. Cette flore doit être jugée transitoire, sans réelle intégration aux écosystèmes considérés. Ces résultats indiquent donc que les communautés bactériennes présentes sur les matériaux en terre crue sont dominées par les genres associés au sol et non pas par ceux associés aux flores humaines. Cette structure de communauté bactérienne particulière pour une surface intérieure peut découler de plusieurs facteurs. Comme il a été possible de voir précédemment, la flore présente initialement dans la terre utilisée à la fabrication du matériau n'est pas ou seulement partiellement altérée (en surface), en fonction des étapes de fabrication, dont les séchages à plus de 100°C. Ainsi, une part des microorganismes environnementaux des matériaux de base se maintient à l'intérieur et à la surface du support final. De plus, dans la mesure où la composition de la terre n'est que peu modifiée, elle reste favorable au maintien ou au développement des bactéries issues du sol *via* l'air ou les saletés. Les flores humaines possèdent une résistance moindre au cours du temps lorsqu'elles sont soumises aux variations extracorporelles et avec peu de nutriments adaptés. Il est également possible que la flore environnementale déjà présente sur le matériau limite la colonisation par de nouvelles bactéries.

Variations intra et inter-sites

Les analyses de métabarcoding ont révélé une variation intra site différente suivant les bâtiments étudiés. Pour les champignons, les sites A, D, E et I présentaient parmi leurs différents prélèvements des communautés plus dispersées et variables que dans le cas des autres sites. De la même manière, les communautés bactériennes présentent sur les supports des sites A, D, L et MaT avaient une variabilité intra-site plus importante par rapport au reste des habitations. Cela témoigne d'une certaine hétérogénéité des communautés microbiennes présentes sur un même mur. Cet effet est particulièrement visible dans le cas du site A, avec

une prépondérance des genres bactériens *Promicromonospora*, *Streptomyces* et *Arthrobacter* sur les prélèvements à 120 et 100 cm, qu'il s'agisse de l'adobe ou du joint, alors que ces genres sont quasiment absents sur le reste du mur. De même, le site D possède des flores bactériennes et fongiques fortement différentes entre les adobes à 160 et 110 cm de hauteur et les joints aux mêmes hauteurs ainsi que les prélèvements à 60 cm. Ces portions de mur semblent donc avoir des communautés microbiennes significativement différentes de l'ensemble du support, qui peuvent être expliquées par un usage particulier ou par l'historique de l'habitation. Les variations de la flore fongique sur le site A ne semble toutefois pas être reliées à un phénomène de hauteur de prélèvement ou de type de support (adobe, joint). Différents facteurs peuvent donc intervenir sur la composition de ces flores sur un même mur, et la localisation de la zone de prélèvement a un impact important sur le profil microbien observé pour un site donné. Cette variabilité pose donc la nécessité d'effectuer les prélèvements sur des localisations représentatives de l'ensemble du mur, afin de saisir la globalité des microorganismes pouvant être présents sur le support et dans l'habitation. Alors que sur certains sites les flores microbiennes sont homogènes sur l'ensemble du mur, il est complexe d'atteindre une certaine exhaustivité dans d'autres constructions.

En plus des variations intra-sites, de nombreuses différences au sein des communautés microbiennes ont pu être observées entre les différentes constructions. Que cela soit les flores fongiques ou bactériennes, celles-ci sont soumises à l'intérieur des habitats à de nombreux facteurs induisant des variations. La variation inter-site est un défi important pour l'étude des flores intérieures, avec souvent une variabilité plus importante entre bâtiments qu'entre lieux prélevés au sein d'un même bâtiment (Emerson et al., 2017; Lax et al., 2014; Tringe et al., 2005). Plusieurs études ont établi un parallèle entre les communautés fongiques intérieures et les flores extérieures, avec notamment des variations suivant la localisation géographique des habitats (Barberán et al., 2015) ainsi que la période de prélèvement (Adams et al., 2013c; Fröhlich-Nowoisky et al., 2009; Pashley et al., 2012). Tout comme les communautés fongiques, les communautés bactériennes sont également soumises à des variations au cours du temps, que ce soit sur des périodes courtes ou sur des durées de l'ordre des saisons (Emerson et al., 2017; Fierer et al., 2008; Meadow et al., 2014b; Rintala et al., 2008), et à la localisation géographique du sol pouvant être utilisé pour les matériaux en terre crue, qui a également un rôle dans la variabilité des communautés bactériennes détectées (Fierer and Jackson, 2006).

Dans le cadre de notre étude, la majorité des prélèvements ont été effectués au cours de la période Octobre-Novembre, permettant de minimiser l'impact saisonnier. Les sites de la région lyonnaise (E, F et G) ont dû être prélevés en été pour des contraintes d'emploi du temps, et cette différence peut conduire à un biais en ce qui concerne la comparaison de la composition des communautés fongiques de ces sites avec les autres. La variabilité temporelle pour une même saison a pu être évaluée pour deux des sites de prélèvements (Ba et C), en effectuant des échantillonnages à un an d'intervalle. Le site Ba se caractérise par une plus grande abondance du genre *Wallemia* et *Fusarium* au détriment du genre *Cladosporium* pour l'échantillon un an plus tard, mais la structure de la communauté fongique reste sensiblement identique. Quelques variations ont également été observées pour la communauté bactérienne, avec une augmentation du genre *Trichococcus* et une diminution du genre *Enterobacter*. Dans le cas du site C, aucune différence significative n'est observée pour les communautés bactériennes et fongiques entre les deux périodes de prélèvement. Bien que le site Ba présente quelques variations, les deux sites restent stables entre les deux périodes d'échantillonnage. Il serait intéressant d'évaluer par la suite l'effet de la saison et du temps en prélevant les communautés microbiennes tout au long de l'année et sur plusieurs années.

Un autre facteur pouvant influencer les flores est la localisation géographique des sites, et celle-ci n'est pas uniforme dans notre étude. Une partie des sites a été prélevée dans la région de Toulouse, une autre dans le Tarn-et-Garonne et une dernière partie dans la région lyonnaise. Bien que, à part le site H, tous les bâtiments soient situés à la campagne, ces différences de localisation peuvent avoir une influence sur la flore présente sur le support. Il reste difficile ici de déterminer le réel impact de ces variations géographiques. En effet, lorsque les communautés sont comparées entre elles, une différence significative est observable, avec d'un côté les sites des régions toulousaines et du Tarn-et-Garonne, et de l'autre les sites de la région lyonnaise. Mais dans la mesure où la majorité des sites lyonnais sont des structures soumises aux conditions extérieures et où aucun site biosourcé n'a pu être prélevé dans cette région, cette dissimilarité au niveau de l'échantillonnage cause un fort biais sur l'évaluation de ce paramètre.

Une autre variable pouvant influencer de manière importante le type de flore présente au sein des échantillons est la composition du sol utilisé comme matière première. En effet, plusieurs paramètres physico-chimiques comme le pH (Rousk et al., 2010; Tedersoo et al., 2014; Thomson et al., 2015) ou la concentration en azote du sol (Fierer et al., 2012a) ont un rôle direct sur la structure des communautés microbiennes se développant dans ces

environnements. Il est donc fort probable que ces paramètres entrent également en compte dans le cas des matériaux en terre crue. Enfin, la profondeur de prélèvement des terres n'est pas connue et probablement pas uniforme suivant les sites, les bâtiments et leur âge, alors qu'elle peut déterminer la composition des communautés présentes (Will et al., 2010). Dans le cadre de cette étude, la quantité de matrice prélevée par échantillon reste très faible (entre 1 et 2g) et correspond essentiellement à la surface, en interaction avec l'environnement. Ceci ne permet pas d'évaluer réellement les caractéristiques des différentes terres crues. Il est donc complexe de dissocier tous ces paramètres afin de déterminer précisément lesquels sont impliqués dans la présence de certains taxons.

Enfin, l'historique du site comme des accidents hydriques ou l'utilisation du bâtiment au cours du temps (local ouvert ou fermé, activité agricole - comme la présence d'animaux ou le stockage de matières agricoles - apportant de l'humidité et des microorganismes spécifiques, etc.) peut avoir un fort impact sur les communautés microbiennes (Andersson et al., 1997; Boutin-Forzano et al., 2004; Dannemiller et al., 2014a; Pitkäranta et al., 2011; Santucci et al., 2007). Parmi les sites prélevés dans notre étude, seul le site Ba a connu un événement de prolifération de moisissures confirmé durant la vie du bâtiment suite à une humidification du mur par capillarité à cause d'un défaut de drain. Sur ce site, le genre fongique particulièrement abondant en culture était le basidiomycète *Wallemia*. Avec les approches moléculaires, il a été possible de confirmer cette observation, avec une abondance relative particulièrement importante pour ce genre sur le site Ba, que cela soit lors du premier prélèvement (17 % - 43 %) ou celui réalisé un an plus tard (12 % - 73 %). Ce champignon xérophile est capable de se développer à des humidités relatives inférieures à 80 % (Nguyen et al., 2015). Il est donc possible que lorsque l'accident hydrique est survenu, l'humidité à la surface du mur est devenue suffisante pour permettre le développement de *Fungi* incluant ce genre, avec une sélection de celui-ci lors du retour à la « normale ». Ce phénomène de persistance des flores suite à des dégâts des eaux et malgré une remédiation a été observé dans d'autres habitations (Emerson et al., 2015).

Enjeux sanitaires

D'un point de vue qualité de l'air, une partie des genres fongiques abondants appartient à des catégories au potentiel allergisant, comme les champignons filamenteux *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium* (Simon-Nobbe et al., 2008). Dans une

moindre mesure, d'autres genres potentiellement allergisants *Acremonium*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Stachybotrys* et *Cylindrocarpon* sont également présents. L'abondance de ceux-ci reste toutefois très faible, et ils ne sont détectés que sur certains sites particuliers. D'autres études ont révélé la forte abondance de ces genres potentiellement allergiques au sein des bâtiments. Dans leur étude des communautés fongiques des poussières d'appartement en Corée du Sud, An et Yamamoto (2016) ont détecté une forte abondance de *Cladosporium*, *Rhodotorula* et *Alternaria*. De même, de nombreux genres d'ascomycètes filamenteux au potentiel allergisant (*Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Leptosphaeria* et *Penicillium*) et des levures (*Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* et *Saccharomyces*) ont été identifiés dans des poussières d'universités et de garderies (Korpelainen and Pietiläinen, 2016). Ces genres sont largement répandus dans l'environnement extérieur (Dannemiller et al., 2014b) et intérieur (Amend et al., 2010a) mais ne conduisent généralement pas à un impact détectable sur les habitants. Un développement important de ces microorganismes dans un bâtiment, par exemple suite à un dégât des eaux, peut conduire à des problèmes sanitaires (Andersen et al., 2011; Andersson et al., 1997) qui pourrait être donc lié à une prolifération "anormale" d'une partie de la flore, avec généralement un développement visible de mycélium et de spores. Dans le cas des matériaux prélevés dans les habitats, aucun ne portait de signe extérieur d'une prolifération fongique. Au total, l'abondance relative de la totalité des genres potentiellement allergisants sur l'ensemble des habitations en terre crue prélevées est de l'ordre de 45 %, sans différence significative entre les supports terre crue seule et avec inclusion biosourcée. Il n'existe toutefois pas de corrélation absolue entre les mesures d'abondances relatives par métabarcoding et le nombre de cellules viables présentes, et donc entre les données de métabarcoding et l'exposition des individus aux microorganismes détectés (Dannemiller et al., 2014b), d'autant plus si l'on considère que le risque est lié à ceux disséminés dans l'air, assurant un contact quasi-permanent avec les habitants. De plus, bien que certains genres et espèces fongiques aient bien été déterminés comme étant des agents potentiels du développement d'allergies ou d'asthme, aucun consensus n'a permis de définir des compositions des flores fongiques à risques (Jacobs et al., 2014; Simoni et al., 2011).

Pour ce qui est des genres bactériens pouvant être impliqués dans les problèmes de santé, presque aucune mycobactérie n'a été détectée (0,08 % en moyenne), et le genre *Streptomyces* n'a été détecté au-dessus de 1 % d'abondance relative que sur le site A (4,25 %). La quasi-totalité des communautés bactériennes colonisant les supports en terre crue ne présenteraient

donc pas de risques pour les occupants. Dans les différents cas de prolifération de microorganismes sur des matériaux de construction présentés dans la littérature, ce sont essentiellement les *Fungi* qui sont étudiés pour leur impact sanitaire.

Enfin, comme présenté précédemment, les supports en terre crue présenteraient une plus grande diversité microbienne que les matériaux de constructions conventionnels. La présence de cette diversité initiale sur les matériaux de constructions en terre crue pourrait représenter un intérêt d'un point de vue qualité de l'air. Dans la mesure où ces communautés microbiennes semblent diverses et relativement stables au cours du temps, elles pourraient limiter la colonisation et le développement d'autres microorganismes pathogènes, en occupant par exemple la niche écologique ou par des mécanismes de compétition. Certaines études ont également démontré une corrélation positive entre la présence de faible diversité fongique au sein des poussières intérieures et l'augmentation des risques de développement d'asthme chez les enfants (Dannemiller et al., 2014a; Ege et al., 2011). La présence de matériaux en terre crue dans l'habitat pourrait permettre d'éviter ces problèmes sanitaires dus à des environnements intérieurs trop aseptiques. L'étude de l'impact de la terre crue sur ces aspects de qualité de l'air intérieur devrait être menée afin d'évaluer ces hypothèses.

Principaux enseignements des analyses microbiennes par biologie moléculaire

Les principales conclusions qui peuvent être tirées des analyses microbiennes par biologie moléculaire sont :

- La richesse et la diversité des flores microbiennes sur les matériaux en terre crue n'est pas ou peu dépendante de l'ajout ou non de fibres végétales.
- L'ajout de fibres végétales dans les matériaux en terre crue n'a pas d'impact significatif sur la composition des communautés fongiques.
- L'ajout de fibres végétales dans les matériaux en terre crue favorise le maintien ou le développement de certains genres bactériens (ex : *Arthrobacter*, *Sphingomonas*), par rapport à d'autres genres (ex : *Bacillus*).
- Les flores fongiques présentes sur les matériaux en terre crue seraient fortement associées à celles retrouvées au niveau du sol et de l'air extérieur.
- Les flores bactériennes présentes sur les matériaux en terre crue seraient essentiellement associées à celles du sol, et non pas à celles du microbiote humain comme dans le cas de l'air intérieur.
- Les matériaux soumis aux conditions environnementales extérieures présentent une flore fongique distincte de celles des habitats, tandis que la flore bactérienne n'est pas significativement différente. D'autres prélèvements seraient toutefois nécessaires en raison du faible nombre d'échantillons pour cette condition.
- Pour une même période de l'année, les flores bactériennes et fongiques des deux sites étudiés dans ces conditions ne varient pas significativement à 1 an d'intervalle.
- De nombreux paramètres dont l'historique du bâtiment (ancien accident hydrique, précédente utilisation du bâtiment en tant qu'étable, etc.) auraient un rôle important dans la composition des communautés microbiennes, d'où une importante variabilité inter et intra sites.

4.4. Mise en perspective des résultats obtenus par culture et par biologie moléculaire

L'analyse de la composition des communautés microbiennes présentes dans les matières premières et à la surface des supports en terre crue a pu être effectuée à la fois par culture et par métabarcoding. L'utilisation de ces deux méthodes a permis d'obtenir des informations complémentaires sur la composition et la structure des flores présentes sur les matériaux de construction.

L'utilisation combinée des méthodes culturales et moléculaires a pu mettre en avant l'hétérogénéité qui pouvait exister à la surface d'un mur. Les prélèvements du site A déposés sur milieu de culture ont révélé une forte variation en termes d'UFC/g suivant la hauteur de prélèvement, avec une forte quantité de bactéries sur la portion de mur à 120 – 100 cm de hauteur alors que le reste du mur était moins concentré de 2 à 3 log₁₀ d'UFC/g. Cette hétérogénéité a pu être confirmée par les analyses de métabarcoding, avec une forte abondance d' *Promicromonospora*, de *Streptomyces* et d'*Arthrobacter* dans les prélèvements à 120 – 100 cm alors que ces genres sont quasiment absents du reste du mur. Dans la mesure où les mêmes matériaux ont été utilisés sur l'ensemble du mur, et où le mur a probablement été soumis aux mêmes conditions environnementales, l'historique du mur et en particulier le fait qu'il s'agisse d'une ancienne ferme peut être une piste pour expliquer cette variation. L'hétérogénéité intra-site a également été détectée sur d'autres habitations, comme sur le site D avec une prépondérance de *Phialosimplex* et *Saccharopolyspora* sur une partie du mur tandis que la surface d'adobe à deux hauteurs différentes présentait des flores plus diversifiées. Bien que les supports sur chaque site soient considérés comme des surfaces uniformes, les murs ne sont pas homogènes, et de fortes disparités peuvent être observées au sein d'un même mur. Si l'ensemble du mur est théoriquement soumis aux mêmes conditions environnementales ambiantes (température, humidité), celles-ci peuvent varier localement au niveau du mur et de très nombreux autres paramètres peuvent entrer en compte sur la variation des flores microbiennes, comme l'utilisation du lieu ou l'historique du site. C'est pourquoi il est nécessaire de répartir les zones de prélèvements sur l'ensemble du mur lorsque cela est possible.

Toutefois, le prélèvement de murs en terre crue dans les habitats reste complexe pour plusieurs raisons. L'idéal serait de pouvoir répartir les prélèvements sur toute la hauteur et la largeur du mur afin d'être le plus représentatif possible, mais cela est dans les faits rarement possible. Les prélèvements doivent souvent rester discrets afin de ne pas altérer le visuel du mur pour les occupants. Pour cela, les méthodes de prélèvements dites « non-destructives »

comme le film adhésif peuvent être intéressantes (Urzi and De Leo, 2001). Dans cette étude, le film adhésif s'est révélé insuffisant pour récupérer la totalité des microorganismes adhérents, mais seuls les aspects quantitatifs ont été pris en compte. De plus, bien que cette méthode fonctionne dans le cas de la pierre, son utilisation sur les matériaux en terre crue conduit à retirer une légère couche de matières et rend alors la zone de prélèvements visible à l'œil nu. La méthode de prélèvement par scalpel permet un meilleur prélèvement sans les biais de récupération du film adhésif, mais reste une méthode destructive qui ne peut pas toujours être utilisée sur la totalité du mur. Les campagnes de prélèvements des flores microbiennes à l'échelle de murs en terre crue *in situ* restent donc complexes à mener.

L'ensemble des taxons détectés par culture et par biologie moléculaire a été reporté dans les Tableau 4.6 et Tableau 4.7 pour les sites pour lesquels les deux méthodes ont été utilisées. Dans la mesure où la flore cultivable est estimée autour de 1 % de la flore totale, seuls les taxons avec une abondance relative supérieure ou égale à 1 % ont été pris en considération.

Tableau 4.6 : Tableau récapitulatif des taxons fongiques détectés par culture et par métabarcoding (abondance relative ≥ 1 %) pour les sites étudiés selon les deux approches.

Site	Conditions		Taxons communs	Taxons uniquement Culture	Taxons uniquement Métabarcoding
	Composition	Localisation			
A	Terre	Habitation	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> ,	<i>Rhizopus</i> , <i>Ulocladium</i>	<i>Acremonium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Devriesia</i> , <i>Phialosimplex</i> , <i>Wallemia</i>
Ba1	Terre	Habitation	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Wallemia</i>	<i>Exophiala</i> ,	<i>Alternaria</i> , <i>Candida</i> , <i>Corticium</i> , <i>Dactylella</i> , <i>Galactomyces</i> , <i>Inonotus</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Phialosimplex</i> , <i>Scedosporium</i> , <i>Stemphylium</i> , <i>Thelonectria</i>
D	Terre	Habitation	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Wallemia</i>
C1	Biosourcé	Habitation	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Rhodotorula</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Phoma</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Wallemia</i>
Bb	Biosourcé	Grange-Cellier	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladophialophora</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i>	<i>Coprinellus</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Dipodascus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Wallemia</i>
FAC	Matières Premières		<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Ulocladium</i>	<i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Hydropisphaera</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Monographella</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Naganishia</i> , <i>Nectria</i> , <i>Pseudeurotium</i> , <i>Scytalidium</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Tetracladium</i>

Tableau 4.7 : Tableau récapitulatif des taxons bactériens détectés par culture et par métabarcoding (abondance relative ≥ 1 %) pour les sites étudiés selon les deux approches.

Site	Conditions		Taxons communs	Taxons uniquement Culture	Taxons uniquement Métabarcoding
	Composition	Localisation			
A	Terre	Habitation	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Paenisporsarcina</i> , <i>Prauserella</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Streptomyces</i>
Ba1	Terre	Habitation	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Cohnella</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microvirga</i> , <i>Nocardioideis</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Paenisporsarcina</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Ruminiclostridium</i> , <i>Skermanella</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Thermoflavimicrobium</i> , <i>Trichococcus</i>
D	Terre	Habitation	<i>Bacillus</i>		<i>Acinetobacter</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Prauserella</i> , <i>Saccharopolyspora</i>
C1	Biosourcé	Habitation	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Trichococcus</i>
Bb	Biosourcé	Grange-Cellier	<i>Bacillus</i>	<i>Solibacillus</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Trichococcus</i>
FAC	Matières Premières			<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Solibacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Gaiella</i> , <i>Iamia</i> , <i>Microthrix</i> , <i>Nocardioideis</i> , <i>Phycococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Thiobacillus</i>

Certains taxons majeurs ont été à la fois isolés sur milieu et identifiés par culture, comme les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Bacillus*. Ces microorganismes environnementaux sont présents en proportions importantes au sein des différents prélèvements, et sont facilement cultivables sur milieu. Comme attendu, les approches par métabarcoding ont permis d'atteindre une profondeur plus grande dans les genres bactériens et fongiques détectés. Comme dans le cas de précédentes études (Pitkäranta et al., 2008), une forte diversité a ainsi pu être mise en évidence sur les différents sites alors qu'elle n'a pas été détectée par les approches culturelles. Toutefois, certains des genres détectés par biologie moléculaire sont théoriquement cultivables et ne sont pas retrouvés dans les isolats obtenus. Par exemple, le genre *Cladosporium* a été détecté dans toutes les banques mais n'a réellement été isolé que sur 3 des 6 sites/matières premières étudiés par les deux méthodes. Il est possible

que ces microorganismes ne soient pas viables du fait d'un endommagement des cellules lors du prélèvement ou dans un état de stress ayant limité la croissance sur milieu gélosé.

Étonnamment, certains taxons isolés en culture sont très peu abondants voir non détectés dans les banques séquencées. Par exemple, plusieurs bactéries du genre *Bacillus* avait été isolées à partir des FAC mais ce genre représente une abondance relative très faible (0,1 %) dans ces échantillons. Sur les sites A et Ba, des isolats de *Pseudomonas* ont été retrouvés bien que l'abondance relative de cette bactérie dans les banques 16S pour ces sites soit de l'ordre de 0,5 %. Le genre *Penicillium* a été isolé sur l'ensemble des sites, alors qu'il ne représente sur les sites D, C1, Bb et FAC qu'une abondance relative inférieure à 0,5 %. De même, quelques isolats des genres *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Mucor* ou *Rhizopus* ont été obtenus à partir de prélèvements sur différents sites et sont pourtant quasiment absents des séquences assignées. Les approches par culture n'ont pas permis d'isoler tous les microorganismes dont les séquences sont majoritaires dans les banques, les milieux pouvant favoriser certains types de flores. Le fait que certains microorganismes très abondants soient non cultivables a très certainement conduit à la détection des genres plus faiblement représentés dans les banques.

Pour ce qui est de l'impact de l'ajout des fibres végétales dans les matériaux en terre crue dans l'habitat, les prélèvements de surface *in situ* ont indiqué que les profils des communautés fongiques ne sont significativement pas différents lorsque le matériau est biosourcé, que cela soit en termes de diversité ou de taxonomie. En effet, bien que certains genres comme *Verticillium* ou *Fusarium* tendent à être plus présents sur les supports biosourcés, les variations observées entre sites seraient dues à d'autres facteurs (localisation géographique, historique de l'habitat, etc.) qu'à la seule composition du matériau. Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, la source de nutriments pour les champignons que peuvent représenter ces fibres, notamment à travers la cellulose, n'induit pas une détection privilégiée de certaines moisissures se développant préférentiellement à l'aide de ces composés. Toutefois, lorsque des éprouvettes en terre crue sont placées dans des conditions d'humidité extrêmes (humidification par capillarité), un développement fongique plus prononcé est observé dans le cas des matériaux biosourcés. L'ajout de ces fibres végétales conduit à un apport de flore significatif si l'on considère les résultats obtenus par culture sur la composante végétale, ainsi qu'à une plus forte prolifération des champignons, probablement à travers différents mécanismes, comme la présence d'une source de nutriments supplémentaire (Hoang et al., 2010) ou l'augmentation de la porosité et donc de l'eau au sein du matériau. Dans nos essais

in vitro, en conditions stériles, seules les espèces ayant survécu au traitement thermique de 100°C ont pu se développer en condition d'humidité, et ces flores ne sont donc pas représentatives de l'ensemble des moisissures présentes sur ces matériaux lorsqu'ils sont utilisés dans l'habitat. Il serait donc nécessaire de placer des matériaux dans différents habitats afin de former des communautés fongiques proches de celles retrouvées naturellement dans ces conditions, puis de les humidifier fortement en laboratoire afin d'évaluer quels sont les genres et espèces favorisés sur les matériaux biosourcés ou non.

Chapitre 5 - Conclusion

La dégradation de la qualité de l'air intérieur en lien avec la prolifération microbienne est un problème de santé majeur. Le développement de microorganismes, et en particulier des moisissures, au sein des habitats implique des risques sanitaires pour les occupants, avec notamment le développement d'allergies, d'asthme voir d'infections. De nombreuses études se sont intéressées à caractériser la croissance microbienne à la surface des matériaux de construction conventionnels afin de déterminer les types de flores présentes et les conditions de leur développement. Toutefois, peu d'études se sont penchées sur la terre crue, alors que ce matériau connaît actuellement un fort regain d'intérêt au vue de ses atouts écologiques et économiques. Nos travaux ont donc permis d'identifier les microorganismes naturellement présents dans les matières premières (terre et inclusions biosourcées) et sur les murs de ces constructions, à la fois dans le lieu de vie ou dans des environnements aux conditions proches de celles de l'extérieur, et de mettre en avant certaines conditions nécessaires au développement de ces microorganismes.

Des méthodes de prélèvements ont été optimisées pour récupérer les microorganismes présents sur les matières premières et les matériaux en terre crue. Le recouvrement des cellules fongiques par suspension des matières premières dans un milieu de récupération est amélioré par l'ajout de Tween 80. L'utilisation d'un broyeur augmente également la quantité de microorganismes prélevés dans le cas des fibres végétales. Pour les prélèvements effectués directement sur les matériaux manufacturés, l'utilisation de film adhésif ne s'est pas révélée adaptée à la terre crue. La totalité des conidies fongiques adhérees au film n'est pas relarguée lors de l'agitation de celui-ci dans le milieu de récupération. De plus, l'avantage du film adhésif est sa propriété non-destructive, mais dans le cas des matériaux en terre crue, une fine couche d'argile, visible à l'œil nu, est retirée lors du prélèvement. Cette méthode nous a cependant permis de démontrer la persistance de cellules fongiques viables au sein des briques fabriquées en laboratoire. Les prélèvements par grattage ont donc été préférés pour les sites *in situ*, afin d'éviter les biais de relargage, d'interférences avec les méthodes de biologie moléculaire et de permettre le prélèvement d'une plus grande quantité de matrice.

L'évaluation par culture des microorganismes présents dans les matériaux fabriqués en laboratoire a permis de mettre en évidence leur survie à l'intérieur de la brique malgré une étape de séchage à 100°C. De plus, ces bactéries et champignons sont capables de se développer sous condition d'humidification par capillarité. Cela suggère que les flores initialement présentes dans les matières premières peuvent être une source de contamination

du matériau final. L'inclusion de fibres végétales dans le matériau favoriserait également la prolifération microbienne lorsque le matériau est soumis à une forte humidité.

Des prélèvements dans différents habitats en terre crue ont été réalisés et des isolats bactériens ont été obtenus par culture, permettant ainsi d'initier le développement et la mise en application du concept de lutte biologique à l'échelle du matériau de construction. L'hypothèse est que l'ajout d'une flore bactérienne positive permettrait de limiter, voire d'inhiber la croissance fongique lorsque le matériau connaît un événement de forte humidité accidentelle. Les essais réalisés dans le cadre de ces travaux ont permis la sélection d'isolats bactériens antifongiques obtenus à partir des prélèvements *in situ* sur les supports en terre crue. Des essais par co-culture en double couche et par inoculation sur membrane ont été réalisés, et des activités d'inhibition par contact et par diffusion ont été observées. Les isolats d'intérêts sont essentiellement reliés au genre *Bacillus*, et plus particulièrement les espèces *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* et *B. mojavensis*, largement décrites dans la littérature comme présentant des isolats qui produisent certaines molécules à activité antifongique (Gomaa, 2012; Siahmoshteh et al., 2017; Snook et al., 2009). Par la suite, ces isolats pourront être testés pour leur capacité à inhiber la prolifération à l'échelle du matériau et ainsi ouvrir des pistes à des traitements préventifs et/ou curatifs des problématiques de développement fongique sur les matériaux en terre.

De plus, les flores microbiennes présentes dans les prélèvements *in situ* ont été analysées par culture et par biologie moléculaire. L'isolement et la numération des microorganismes sur milieux de culture ont permis de montrer une variation significative de la densité microbienne à l'échelle du mur suivant différents facteurs (hauteur de prélèvement, joint ou brique, historique et utilisation de la pièce). L'ADN des microorganismes contenus dans ces prélèvements a été analysé par métabarcoding. Ces techniques ont révélé la présence d'une flore fongique environnementale similaire à celle retrouvée dans l'environnement intérieur d'autres bâtiments. Lorsque les murs sont en conditions de température et humidité ambiante normales, les principaux genres détectés à leur surface sont *Cladosporium*, *Wallemia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Devreisia*, *Coccodinium*, *Verticillium* et *Penicillium*. Ces genres ont été retrouvés dans de nombreuses études ayant analysé l'air (Adams et al., 2013c), des poussières (Amend et al., 2010a) ou des surfaces intérieures (Adams et al., 2013a). Ainsi, bien qu'ayant une composition et un mode de fabrication singulièrement différents des autres matériaux conventionnels, les matériaux de construction en terre crue ne semblent pas contribuer à la présence de flores plus nocives que celles

présentes dans les habitats classiques. Pour les flores bactériennes, une très forte présence des genres *Bacillus* et *Arthrobacter* a été observée, avec d'autres genres minoritaires comme *Nocardioïdes*, *Paenibacillus*, *Rubrobacter* ou encore *Sphingomonas*. Ces genres sont essentiellement associés à la flore bactérienne du sol. La composition de la terre crue pourrait conduire au maintien des bactéries initialement présentes dans le sol utilisé pour la construction, ou à celles un apport par l'air et les poussières extérieures, tandis que les bactéries associées à la flore humaine largement présentes dans l'air et les poussières seraient moins résistantes aux conditions environnementales et nutritionnelles de ce matériau et de ce fait peu détectées (fréquence et taux).

A partir des prélèvements de murs en terre crue à l'intérieur de 9 habitats, même si certains genres ont été retrouvés de manière systématique, une flore « type » globale n'a pu être définie. L'ajout de fibres végétales n'induit pas de changement radical dans la composition des communautés fongiques. Ainsi, bien que quelques genres phytopathogènes (*Verticillium*, *Fusarium*) soient plus présents sur les supports biosourcés, les variations observées dans le profil des flores fongiques ne paraissent pas dépendantes de la composition du matériau (ajout de fibres ou non). De nombreux autres paramètres sont impliqués dans les compositions des communautés microbiennes à l'intérieur des bâtiments, et en particulier la localisation géographique et le climat, la saison, l'historique du bâtiment et sa destination actuelle, ou encore l'environnement urbain / rural. De plus, si la flore présente dans les matériaux en terre crue est en partie composée des microorganismes initialement présents dans le sol, comme cela a pu être observé malgré un séchage à 100°C, alors les variations de communautés au sein des sols utilisés impacteront également les flores présentes une fois le mur construit. Une sélection d'un plus grand nombre de sites de prélèvements permettrait d'avoir une vision plus exhaustive des microorganismes potentiellement présents sur ce matériau. Toutefois, plusieurs problèmes peuvent être rencontrés. Les habitations en terre crue, bien que répandues dans certaines régions de France, ne sont pas forcément référencées et peuvent être compliquées à trouver. Leur historique ainsi que l'origine de la terre utilisée pour leur fabrication constituent également des paramètres difficiles à cerner. Une partie des habitations ont vu leurs murs en adobe recouverts d'enduits, avec par exemple de la chaux, ce qui altère fortement les communautés microbiennes présentes. De plus, l'absence de méthode non-destructive pour ces prélèvements peut rendre l'échantillonnage complexe, notamment vis-à-vis des limites posées par les occupants.

Lors de notre étude, il a été possible d'observer des modifications en termes de dominance de genres fongiques uniquement dans des conditions d'incidents, type dégâts des eaux. Parmi tous les sites étudiés, seul un mur était décrit comme ayant rencontré des problématiques de développement fongique, suite à des remontées capillaires. Lors de nos essais, les éprouvettes biosourcées et non biosourcées n'ont présenté des proliférations que lorsqu'elles étaient soumises à une humidification extrême. Dans les travaux de thèse d'Aurélié Laborel-Preneron (2017) réalisés au LMDC dans le cadre du projet Bioterra, des essais de prolifération ont été menés sur des échantillons de terre crue, biosourcée ou non, et placés à différentes températures et humidité. Même lorsque les échantillons étaient dans des conditions environnementales très défavorables (30°C - 93 % HR), aucune prolifération n'a pu être observée au bout de trois mois. Par contre, lorsque de faibles volumes d'eau liquide étaient ajoutés sur le matériau, des moisissures se développaient alors, mais uniquement aux conditions environnementales de 30°C et 93 % HR. Associés à nos observations, ces résultats confortent l'hypothèse que la seule présence d'eau sous forme de vapeur même à des valeurs de saturation ne suffit pas à induire à une prolifération fongique sur les matériaux en terre crue, mais que de l'eau liquide et disponible est nécessaire, ce qui peut apparaître suite à un accident hydrique (dégât des eaux, problème d'étanchéité, remontées capillaires, etc.) par exemple. Lorsque ces conditions sont rencontrées, les matériaux biosourcés sont plus sensibles au développement des champignons que les matériaux minéraux, ce qui avec à une croissance plus rapide, plus importante et sur une plus grande surface.

La sensibilité à la prolifération fongique des matériaux de construction conventionnels (bois, fibre de verre, plâtre, béton, etc.) a déjà été comparée pour différentes conditions environnementales (Gutarowska, 2010; Nielsen et al., 2004; Paic Lacaze, 2016). Dans le cadre de ce projet, seuls les matériaux à base de terre crue ont été étudiés. Il n'y a donc pas eu de comparaison avec des matériaux de construction traditionnels et il serait alors intéressant de comparer les cinétiques de prolifération des champignons sur les supports en terre crue versus matériaux conventionnels. Par exemple, les essais sur le plâtre ont montré une humidité relative minimum de 90% pour permettre un développement fongique (Nielsen et al., 2004). Dans le cas des échantillons en terre crue, aucune prolifération n'est observée à une humidité de 93% sans la présence d'eau liquide. La terre crue est capable d'absorber et de désorber la vapeur d'eau grâce à sa teneur en argile tandis que d'autres matériaux pourraient présenter des risques de condensation et donc de formation d'eau liquide. Ces évaluations permettraient de placer les matériaux en terre crue vis-à-vis des matériaux conventionnels en

termes de risques de prolifération en cas de condition humide, en évaluant d'un côté le risque associé à la présence de vapeur d'eau, d'une part, et d'eau liquide, d'autre part.

Cette étude a porté sur un faible échantillonnage d'habitats en terre crue et pourrait constituer la base de travaux supplémentaires, avec des prélèvements sur une échelle spatio-temporelle plus grande. En effectuant des campagnes de prélèvements sur les mêmes sites à différentes saisons d'une même année voir sur plus d'un an, il serait possible d'évaluer l'évolution des communautés microbiennes en fonction du temps. De tels effets ont déjà été démontrés sur la flore de l'air intérieur (Adams et al., 2013c; Emerson et al., 2017; Fierer et al., 2008; Rintala et al., 2008). Il pourrait être intéressant de vérifier si la surface des matériaux de construction en terre crue suit ce type de dynamique. De la même manière, le nombre d'habitations en terre crue étudiées ainsi que leur localisation pourraient être étendus afin d'avoir un ensemble de bâtiments plus représentatif, avec des structures localisées sur l'ensemble du territoire français, et ainsi pouvoir observer un éventuel effet géographique (Adams et al., 2013c; Amend et al., 2010a). Enfin, l'analyse génomique menée sur ces matériaux pourrait être approfondie avec, par exemple, la mise en évidence ou non de la présence de microorganismes à risque pour la Santé Publique. Cette approche pourrait être menée *via* des qPCR ciblées pour certaines espèces de champignons et bactéries à potentiel pathogène pour les habitants. La plus forte diversité microbienne présente sur les matériaux en terre crue par rapport aux matériaux conventionnels pourrait avoir un impact sur la qualité en l'air intérieur en limitant la colonisation d'espèces pathogènes ou en diminuant les risques de développement d'asthme (Dannemiller et al., 2014a; Ege et al., 2011). Il est donc nécessaire de poursuivre ces travaux afin de mettre en évidence l'impact potentiel de la terre crue sur les aspects sanitaires de l'habitat.

Bibliographie

- Abdelfattah, A., Malacrinò, A., Wisniewski, M., Cacciola, S.O., and Schena, L. (2017). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biol. Control*.
- Adams, R.I., Miletto, M., Taylor, J.W., and Bruns, T.D. (2013a). The Diversity and Distribution of Fungi on Residential Surfaces. *PLOS ONE* 8, e78866.
- Adams, R.I., Amend, A.S., Taylor, J.W., and Bruns, T.D. (2013b). A Unique Signal Distorts the Perception of Species Richness and Composition in High-Throughput Sequencing Surveys of Microbial Communities: a Case Study of Fungi in Indoor Dust. *Microb. Ecol.* 66, 735–741.
- Adams, R.I., Miletto, M., Taylor, J.W., and Bruns, T.D. (2013c). Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *ISME J.* 7, 1262–1273.
- Adams, R.I., Miletto, M., Lindow, S.E., Taylor, J.W., and Bruns, T.D. (2014). Airborne Bacterial Communities in Residences: Similarities and Differences with Fungi. *PLOS ONE* 9, e91283.
- Adams, R.I., Bateman, A.C., Bik, H.M., and Meadow, J.F. (2015). Microbiota of the indoor environment: a meta-analysis. *Microbiome* 3, 49.
- Adan, O.C.G., and Samson, R.A. (2011). *Fundamentals of Mold Growth in Indoor Environments and Strategies for Healthy Living* (Springer Science & Business Media).
- Afnor (2003). ISO 14698-1:2003 : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination, Partie 1: Principes généraux et méthodes.
- Afnor (2008). ISO 16000-16:2008 : Air intérieur, Partie 16 : Détection et dénombrement des moisissures - Échantillonnage par filtration.
- Allen, M.F. (1991). *The Ecology of Mycorrhizae* (Cambridge University Press).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Amend, A.S., Seifert, K.A., Samson, R., and Bruns, T.D. (2010a). Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13748–13753.
- Amend, A.S., Seifert, K.A., and Bruns, T.D. (2010b). Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol. Ecol.* 19, 5555–5565.
- An, C., and Yamamoto, N. (2016). Fungal compositions and diversities on indoor surfaces with visible mold growths in residential buildings in the Seoul Capital Area of South Korea. *Indoor Air* 26, 714–723.

- Andersen, B., Nielsen, K.F., and Jarvis, B.B. (2002). Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94, 392–403.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Thrane, U., Szaro, T., Taylor, J.W., and Jarvis, B.B. (2003). Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95, 1227–1238.
- Andersen, B., Frisvad, J.C., Søndergaard, I., Rasmussen, I.S., and Larsen, L.S. (2011). Associations between Fungal Species and Water-Damaged Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4180–4188.
- Andersson, M.A., Nikulin, M., Kõljalg, U., Andersson, M.C., Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E.L., and Salkinoja-Salonen, M. (1997). Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 387–393.
- ANSES, OQAI, and CSTB (2014). *Etude exploratoire du coût socio-économique des polluants de l'air intérieur*.
- Aoki, T., O'Donnell, K., and Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* 80, 189–201.
- Arfi, Y., Buée, M., Marchand, C., Levasseur, A., and Record, E. (2012). Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 433–444.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., and Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53, 122–128.
- Artz, R.R.E., Anderson, I.C., Chapman, S.J., Hagn, A., Schlöter, M., Potts, J.M., and Campbell, C.D. (2007). Changes in Fungal Community Composition in Response to Vegetational Succession During the Natural Regeneration of Cutover Peatlands. *Microb. Ecol.* 54, 508–522.
- ASEF (2012). *Pollution de l'air intérieur de l'habitat*.
- Auer, L., Mariadassou, M., O'Donohue, M., Klopp, C., and Hernandez-Raquet, G. (2017). Analysis of large 16S rRNA Illumina data sets: Impact of singleton read filtering on microbial community description. *Mol. Ecol. Resour.* 11.
- Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.* 5, 127–141.
- Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555.
- Bálint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., and Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecol. Evol.* 4, 2642–2653.
- Bálint, M., Bahram, M., Eren, A.M., Faust, K., Fuhrman, J.A., Lindahl, B., O'Hara, R.B., Öpik, M., Sogin, M.L., Unterseher, M., et al. (2016). Millions of reads, thousands of taxa: microbial community structure and associations analyzed via marker genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 686–700.
- Barbara, D.J., and Clewes, E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Mol. Plant Pathol.* 4, 297–305.

- Barberán, A., Ladau, J., Leff, J.W., Pollard, K.S., Menninger, H.L., Dunn, R.R., and Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5756–5761.
- Baxi, S.N., Portnoy, J.M., Larenas-Linnemann, D., and Phipatanakul, W. (2016). Exposure and Health Effects of Fungi on Humans. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4, 396–404.
- Baysal, Ö., Lai, D., Xu, H.-H., Siragusa, M., Çalışkan, M., Carimi, F., Silva, J.A.T. da, and Tör, M. (2013). A Proteomic Approach Provides New Insights into the Control of Soil-Borne Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *PLOS ONE* 8, e53182.
- Bazzicalupo, A.L., Bálint, M., and Schmitt, I. (2013). Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecol.* 6, 102–109.
- Beguín, H., and Nolard, N. (1994). Mould biodiversity in homes I. Air and surface analysis of 130 dwellings. *Aerobiologia* 10, 157.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Roussel, S., Grenouillet, F., Didier-Scherer, E., Dalphin, J.-C., and Millon, L. (2009). Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 260–266.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kausserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 10, 189.
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., et al. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* 4, 914–919.
- Berg, B., and McClaugherty, C. (2013). *Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration* (Springer Science & Business Media).
- Berge, B. (2009). *The Ecology of Building Materials* (Routledge).
- Bertrand, H., Poly, F., Van, V.T., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2005). High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *J. Microbiol. Methods* 62, 1–11.
- Bik, H.M., Porazinska, D.L., Creer, S., Caporaso, J.G., Knight, R., and Thomas, W.K. (2012). Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* 27, 233–243.
- Binici, H., Aksogan, O., Bodur, M.N., Akca, E., and Kapur, S. (2007). Thermal isolation and mechanical properties of fibre reinforced mud bricks as wall materials. *Constr. Build. Mater.* 21, 901–906.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Kirk, P.M., and Kausserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 218–224.
- Black, C., and Straube, J. (2007). Mould growth experiments of full scale wood frame wall assemblies. (Banff, Calgary), p.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98, 426–438.

- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W., and de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29, 358–367.
- Boone, S.A., and Gerba, C.P. (2007). Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1687–1696.
- Bornehag, C.G., Sundell, J., Bonini, S., Custovic, A., Malmberg, P., Skerfving, S., Sigsgaard, T., and Verhoeff, A. (2004). Dampness in buildings as a risk factor for health effects, EUROEXPO: a multidisciplinary review of the literature (1998–2000) on dampness and mite exposure in buildings and health effects. *Indoor Air* 14, 243–257.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., and Gauthier, S. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.*
- Bouillard, L., Michel, O., Dramaix, M., and Devleeschouwer, M. (2005). Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 12, 187–192.
- Bourdès, V., Boffetta, P., and Pisani, P. (2000). Environmental exposure to asbestos and risk of pleural mesothelioma: review and meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 411–417.
- Boutin-Forzano, S., Charpin-Kadouch, C., Chabbi, S., Bennedjai, N., Dumon, H., and Charpin, D. (2004). Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air* 14, 196–199.
- Bowers, R.M., Sullivan, A.P., Costello, E.K., Collett, J.L., Knight, R., and Fierer, N. (2011). Sources of Bacteria in Outdoor Air across Cities in the Midwestern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6350–6356.
- Bowers, R.M., Clements, N., Emerson, J.B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M.P., and Fierer, N. (2013). Seasonal Variability in Bacterial and Fungal Diversity of the Near-Surface Atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12097–12106.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., and Coissac, E. (2016). obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 176–182.
- Brasche, S., and Bischof, W. (2005). Daily time spent indoors in German homes – Baseline data for the assessment of indoor exposure of German occupants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 208, 247–253.
- Brasel, T.L., Martin, J.M., Carriker, C.G., Wilson, S.C., and Straus, D.C. (2005). Detection of Airborne *Stachybotrys chartarum* Macrocytic Trichothecene Mycotoxins in the Indoor Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7376–7388.
- Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325–349.
- Bridge, P., and Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil* 232, 147–154.
- Brown, A.D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 803–846.
- Brown, G. s., Betty, R. g., Brockmann, J. e., Lucero, D. a., Souza, C. a., Walsh, K. s., Boucher, R. m., Tezak, M. s., Wilson, M. c., Rudolph, T., et al. (2007). Evaluation of rayon swab surface sample collection method for *Bacillus* spores from nonporous surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1074–1080.

- Brown, S.P., Veach, A.M., Rigdon-Huss, A.R., Grond, K., Lickteig, S.K., Lothamer, K., Oliver, A.K., and Jumpponen, A. (2015). Scraping the bottom of the barrel: are rare high throughput sequences artifacts? *Fungal Ecol.* 13, 221–225.
- Brunekreef, B., Dockery, D.W., Speizer, F.E., Ware, J.H., Spengler, J.D., and Ferris, B.G. (1989). Home Dampness and Respiratory Morbidity in Children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1363–1367.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184, 449–456.
- Buée, M., Sentausa, E., and Murat, C. (2016). Molecular technologies applied to the ecology of ectomycorrhizal communities. In *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, (édité par Francis Martin), p. 323.
- Burroughs, S. (2008). Soil Property Criteria for Rammed Earth Stabilization. *J. Mater. Civ. Eng.* 20, 264–273.
- Buttigieg, P.L., and Ramette, A. (2014). A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 543–550.
- Buttner, M.P., Cruz, P., Stetzenbach, L.D., and Cronin, T. (2007). Evaluation of Two Surface Sampling Methods for Detection of *Erwinia herbicola* on a Variety of Materials by Culture and Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3505–3510.
- Campbell, B.J., Polson, S.W., Hanson, T.E., Mack, M.C., and Schuur, E.A.G. (2010). The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environ. Microbiol.* 12, 1842–1854.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., and 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.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L., and Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* 44, 104–109.
- Carlsen, T., Aas, A.B., Lindner, D., Vrålstad, T., Schumacher, T., and Kauserud, H. (2012). Don't make a mista(g)ke: is tag switching an overlooked source of error in amplicon pyrosequencing studies? *Fungal Ecol.* 5, 747–749.
- Chang, W.-T., Chen, Y.-C., and Jao, C.-L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresour. Technol.* 98, 1224–1230.
- Chao, H.J., Milton, D.K., Schwartz, J., and Burge, H.A. (2002). Dustborne fungi in large office buildings. *Mycopathologia* 154, 93–106.

- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., and Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol. Res.* 160, 75–81.
- Chen, W., Zhang, C.K., Cheng, Y., Zhang, S., and Zhao, H. (2013). A Comparison of Methods for Clustering 16S rRNA Sequences into OTUs. *PLOS ONE* 8, e70837.
- Chew, G.L., Wilson, J., Rabito, F.A., Grimsley, F., Iqbal, S., Reponen, T., Muilenberg, M.L., Thorne, P.S., Dearborn, D.G., and Morley, R.L. (2006). Mold and Endotoxin Levels in the Aftermath of Hurricane Katrina: A Pilot Project of Homes in New Orleans Undergoing Renovation. *Environ. Health Perspect.* 114, 1883–1889.
- Chikara, H., Iwamoto, S., and Yoshimura, T. (2009). Indoor air pollution of volatile organic compounds: indoor/outdoor concentrations, sources and exposures. *Nihon Eiseigaku Zasshi Jpn. J. Hyg.* 64, 683–688.
- Cho, J.-C., and Tiedje, J.M. (2000). Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5448–5456.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., and O’Toole, P.W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 38, e200–e200.
- Clark, N.M., Ammann, H.M., Brunekreef, B., Eggleston, P., Fisk, W.J., Fullilove, R., and Von Essen, S.G. (2004). *Damp indoor spaces and health* (Washington: DC: Institute of Medicine of the National Academies).
- Clarke, J.A., Johnstone, C.M., Kelly, N.J., McLean, R.C., anderson, J.A., Rowan, N.J., and Smith, J.E. (1999). A technique for the prediction of the conditions leading to mould growth in buildings. *Build. Environ.* 34, 515–521.
- Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. (1996). PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24, 3546–3551.
- Conseil Supérieur d’Hygiène Publique de France (2006). *Contaminations fongiques en milieux intérieurs. Diagnostic, effets sur la santé respiratoire, conduites à tenir.*
- Cooley, J.D., Wong, W.C., Jumper, C.A., and Straus, D.C. (1998). Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup. Environ. Med.* 55, 579–584.
- Corry, J. (1987). Relationships of water activity to fungal growth. In *Food and Beverage Mycology*, (New York: AVI Publishing Corp), pp. 51–88.
- Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A.G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.-P., Uroz, S., and Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Biochem.* 42, 679–698.
- Cramer, R., Garbani, M., Rhyner, C., and Huitema, C. (2014). Fungi: the neglected allergenic sources. *Allergy* 69, 176–185.
- Cristescu, M.E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* 29, 566–571.
- Crook, B., and Burton, N.C. (2010). Indoor moulds, Sick Building Syndrome and building related illness. *Fungal Biol. Rev.* 24, 106–113.

- Cruz-Perez, P., Buttner, M.P., and Stetzenbach, L.D. (2001). Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 15, 129–138.
- Cullen, D.W., and Hirsch, P.R. (1998). Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30, 983–993.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 10494–10499.
- Dales, R.E., Zwanenburg, H., Burnett, R., and Franklin, C.A. (1991). Respiratory Health Effects of Home Dampness and Molds among Canadian Children. *Am. J. Epidemiol.* 134, 196–203.
- D’Amore, R., Ijaz, U.Z., Schirmer, M., Kenny, J.G., Gregory, R., Darby, A.C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., and Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* 17, 55.
- Danielsen, L., Thürmer, A., Meinicke, P., Buée, M., Morin, E., Martin, F., Pilate, G., Daniel, R., Polle, A., and Reich, M. (2012). Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecol. Evol.* 2, 1935–1948.
- Dannemiller, K.C., Mendell, M.J., Macher, J.M., Kumagai, K., Bradman, A., Holland, N., Harley, K., Eskenazi, B., and Peccia, J. (2014a). Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 24, 236–247.
- Dannemiller, K.C., Lang-Yona, N., Yamamoto, N., Rudich, Y., and Peccia, J. (2014b). Combining real-time PCR and next-generation DNA sequencing to provide quantitative comparisons of fungal aerosol populations. *Atmos. Environ.* 84, 113–121.
- Dannemiller, K.C., Gent, J.F., Leaderer, B.P., and Peccia, J. (2016a). Indoor microbial communities: Influence on asthma severity in atopic and nonatopic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 76–83.e1.
- Dannemiller, K.C., Gent, J.F., Leaderer, B.P., and Peccia, J. (2016b). Influence of housing characteristics on bacterial and fungal communities in homes of asthmatic children. *Indoor Air* 26, 179–192.
- Dannemiller, K.C., Weschler, C.J., and Peccia, J. (2017). Fungal and bacterial growth in floor dust at elevated relative humidity levels. *Indoor Air* 27, 354–363.
- Danovaro, R., Luna, G.M., Dell’Anno, A., and Pietrangeli, B. (2006). Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5982–5989.
- Dassonville, C., Demattei, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V., and Momas, I. (2008). Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies’ homes. *Environ. Res.* 108, 80–85.
- Davidson, P.M., Taylor, T.M., and Schmidt, S.E. (2013). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. 765–801.
- Davis, K.E.R., Joseph, S.J., and Janssen, P.H. (2005). Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 826–834.

- Degnan, P.H., and Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME J.* 6, 183–194.
- Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Nishikawa, T., Suematsu, M., and Benno, Y. (2005). Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *J. Med. Microbiol.* 54, 1231–1238.
- Delinière, R., Aubert, J.E., Rojat, F., and Gasc-Barbier, M. (2014). Physical, mineralogical and mechanical characterization of ready-mixed clay plaster. *Build. Environ.* 80, 11–17.
- Delmont, T.O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P., and Vogel, T.M. (2011a). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J. Microbiol. Methods* 86, 397–400.
- Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P.R., and Vogel, T.M. (2011b). Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1315–1324.
- Deruelle, S. (1991). Rôle du support dans la croissance des microorganismes. *Mater. Struct.* 24, 163–168.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072.
- DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Moberg, J.P., Zubieta, I.X., Piceno, Y.M., and Andersen, G.L. (2007). High-Density Universal 16S rRNA Microarray Analysis Reveals Broader Diversity than Typical Clone Library When Sampling the Environment. *Microb. Ecol.* 53, 371–383.
- Doll, S.C. (2002). Determination of limiting conditions for fungal growth in the built environment. Harvard School of Public Health.
- D’Orazio, M., Cursio, G., Graziani, L., Aquilanti, L., Osimani, A., Clementi, F., Yéprémian, C., Lariccia, V., and Amoroso, S. (2014). Effects of water absorption and surface roughness on the bioreceptivity of ETICS compared to clay bricks. *Build. Environ.* 77, 20–28.
- Došen, I., Nielsen, K.F., Clausen, G., and Andersen, B. (2017). Potentially harmful secondary metabolites produced by indoor *Chaetomium* species on artificially and naturally contaminated building materials. *Indoor Air* 27, 34–46.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., and Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47, 187–200.
- Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y., and Wang, J. (2002). Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Its Methicillin Resistance by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 5487–5491.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001). Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 190–197.
- Dunn, R.R., Fierer, N., Henley, J.B., Leff, J.W., and Menninger, H.L. (2013). Home Life: Factors Structuring the Bacterial Diversity Found within and between Homes. *PLOS ONE* 8, e64133.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638.

- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998.
- Edgar, R.C. (2017a). UNBIAS: An attempt to correct abundance bias in 16S sequencing, with limited success. *BioRxiv* 124149.
- Edgar, R.C. (2017b). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *BioRxiv* 192211.
- Edmonds, J.M. (2009). Efficient methods for large-area surface sampling of sites contaminated with pathogenic microorganisms and other hazardous agents: current state, needs, and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 811–816.
- Edmonds, J.M., Collett, P.J., Valdes, E.R., Skowronski, E.W., Pellar, G.J., and Emanuel, P.A. (2009). Surface Sampling of Spores in Dry-Deposition Aerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 39–44.
- Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W.O.C.M., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., and von Mutius, E. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *N. Engl. J. Med.* 364, 701–709.
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., and Allen, E.B. (2007). Mycorrhizal Community Dynamics Following Nitrogen Fertilization: A Cross-Site Test in Five Grasslands. *Ecol. Monogr.* 77, 527–544.
- Ehrenreich, A. (2006). DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 255–273.
- Ellringer, P. j., Boone, K., and Hendrickson, S. (2000). Building Materials Used in Construction Can Affect Indoor Fungal Levels Greatly. *AIHAJ - Am. Ind. Hyg. Assoc.* 61, 895–899.
- Emerson, J.B., Keady, P.B., Brewer, T.E., Clements, N., Morgan, E.E., Awerbuch, J., Miller, S.L., and Fierer, N. (2015). Impacts of Flood Damage on Airborne Bacteria and Fungi in Homes after the 2013 Colorado Front Range Flood. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2675–2684.
- Emerson, J.B., Keady, P.B., Clements, N., Morgan, E.E., Awerbuch, J., Miller, S.L., and Fierer, N. (2017). High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance inside single-family residences. *Indoor Air* 27, 576–586.
- Eren, A.M., Borisy, G.G., Huse, S.M., and Welch, J.L.M. (2014). Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2875–E2884.
- Ettenauer, J.D., Piñar, G., Lopandic, K., Spangl, B., Ellersdorfer, G., Voitl, C., and Sterflinger, K. (2012). Microbes on building materials — Evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis. *Sci. Total Environ.* 439, 44–53.
- Fabian, M.P., Miller, S.L., Reponen, T., and Hernandez, M.T. (2005). Ambient bioaerosol indices for indoor air quality assessments of flood reclamation. *J. Aerosol Sci.* 36, 763–783.
- Falkinham, J.O. (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* 107, 356–367.
- Feinstein, L.M., Sul, W.J., and Blackwood, C.B. (2009). Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5428–5433.

- Fernando, W.G.D., and Linderman, R.G. (1995). Inhibition of *Phytophthora vignae* and Stem and Root Rot of Cowpea by Soil Bacteria. *Biol. Agric. Hortic.* 12, 1–14.
- Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., and Savchuk, S.C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37, 955–964.
- Ferro, A.R., Kopperud, R.J., and Hildemann, L.M. (2004). Source Strengths for Indoor Human Activities that Resuspend Particulate Matter. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1759–1764.
- Ficetola, G.F., Taberlet, P., and Coissac, E. (2016). How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol. Ecol. Resour.* 16, 604–607.
- Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser, R.E. (2002). Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506–526.
- Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 626–631.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., and Jackson, R.B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4117–4120.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R.A., Felts, B., Rayhawk, S., et al. (2007). Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7059–7066.
- Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernández, M., Knight, R., Henn, M., and Hernandez, M.T. (2008). Short-Term Temporal Variability in Airborne Bacterial and Fungal Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 200–207.
- Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A., and Cleveland, C.C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecol. Lett.* 12, 1238–1249.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Zhou, N., McDonald, D., Costello, E.K., and Knight, R. (2010). Forensic identification using skin bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6477–6481.
- Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., Owens, S., Gilbert, J.A., Wall, D.H., and Caporaso, J.G. (2012a). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 21390–21395.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A., and Knight, R. (2012b). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* 6, 1007–1017.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 85–102.
- Fisher, M.M., and Triplett, E.W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636.
- Fisk, W.J., Lei-Gomez, Q., and Mendell, M.J. (2007). Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air* 17, 284–296.

- Flament, C. (2013). Valorisation des fines de lavage de granulats : application à la construction en terre crue. Artois.
- Flores, G.E., Bates, S.T., Knights, D., Lauber, C.L., Stombaugh, J., Knight, R., and Fierer, N. (2011). Microbial Biogeography of Public Restroom Surfaces. *PLOS ONE* 6, e28132.
- Flores, G.E., Bates, S.T., Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Leff, J.W., Knight, R., and 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., and 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.02069-12.
- Fredricks, D.N., Smith, C., and Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5122–5128.
- Frey, S.D., Knorr, M., Parrent, J.L., and Simpson, R.T. (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For. Ecol. Manag.* 196, 159–171.
- Frisvad, J.C., Andersen, B., and Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112, 231–240.
- Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D.A., Després, V.R., and Pöschl, U. (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12814–12819.
- 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., et al. (2010). Man's best friend? The effect of pet ownership on house dust microbial communities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 410-412.e3.
- Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005). Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* 309, 1387–1390.
- Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z., and Blaser, M.J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2927–2932.
- Gardes, M., and Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- Garraway, M.O., and Evans, R.C. (1991). Nutrition as a Basis for the Study of Fungi. In *Fungal Nutrition and Physiology*, (New York: John Wiley and Sons), pp. 71–221.
- Garrett, M.H., Rayment, P.R., Hooper, M.A., Abramson, M.J., and Hooper, B.M. (1998). Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 28, 459–467.
- Gattinger, A., Ruser, R., Schlöter, M., and Munch, J.C. (2002). Microbial community structure varies in different soil zones of a potato field. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 421–428.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., and Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 419–431.

- Gibson, J., Shokralla, S., Porter, T.M., King, I., Konynenburg, S. van, Janzen, D.H., Hallwachs, W., and Hajibabaei, M. (2014). Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8007–8012.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., and Field, K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60–63.
- Glenn, T.C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 759–769.
- Gomaa, E.Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* 50, 103–111.
- Gomes, M.I., Gonçalves, T.D., and Faria, P. (2012). Earth-based repair mortars: experimental analysis with different binders and natural fibers. *Rammed Earth Conserv.* 661–668.
- Gomes, N.C.M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N.G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L., and Smalla, K. (2003). Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3758–3766.
- González, M.J., and García Navarro, J. (2006). Assessment of the decrease of CO₂ emissions in the construction field through the selection of materials: Practical case study of three houses of low environmental impact. *Build. Environ.* 41, 902–909.
- Górny, R. (2004). Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air--a review. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 11, 185–197.
- Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G.A., Vilgalys, R., et al. (2011). Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5934–5944.
- Graham, T. (2004). Wattle and daub: craft, conservation and Wiltshire case study. Master thesis. University of Bath.
- Grant, C., Hunter, C.A., Flannigan, B., and Bravery, A.F. (1989). The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int. Biodeterior.* 25, 259–284.
- Gravesen, S., Nielsen, P.A., Iversen, R., and Nielsen, K.F. (1999). Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 3, 505–508.
- Green, J.L., Holmes, A.J., Westoby, M., Oliver, I., Briscoe, D., Dangerfield, M., Gillings, M., and Beattie, A.J. (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432, 747–750.
- Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244–253.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Renaud, G., Young, A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Wolfsberg, T.G., Turner, M.L., and Segre, J.A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* 18, 1043–1050.

- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., et al. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190–1192.
- Griffiths, R.I., Thomson, B.C., James, P., Bell, T., Bailey, M., and Whiteley, A.S. (2011). The bacterial biogeography of British soils. *Environ. Microbiol.* 13, 1642–1654.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., and Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16, 493–500.
- Guillaud, H. (2008). Characterization of earthen materials. In *Terra Literature Review—an Overview of Research in Earthen Architecture Conservation*, (Los Angeles: The Getty Conservation Institute), pp. 21–31.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J., and Rölleke, S. (2000). Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 46, 229–239.
- Gutarowska, B. (2010). Metabolic activity of moulds as a factor of building materials biodegradation. *Pol. J. Microbiol.* 59, 119–124.
- Gutarowska, B., and Piotrowska, M. (2007). Methods of mycological analysis in buildings. *Build. Environ.* 42, 1843–1850.
- Gutarowska, B., and Żakowska, Z. (2002). Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 49, 299–305.
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307.
- Hacker, J.N., Holmes, M.J., Belcher, S.E., and Davies, G. (2005). *Climate Change and the Indoor Environment: Impacts and Adaptation* (London: Chartered Institution of Building Services Engineers).
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., and Weitz, J.S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J.* 7, 1092–1101.
- Handelsman, J., and Stabb, E. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* 8, 1855–1869.
- Hanski, I., Herten, L. von, Fyhrquist, N., Koskinen, K., Torppa, K., Laatikainen, T., Karisola, P., Auvinen, P., Paulin, L., Mäkelä, M.J., et al. (2012). Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8334–8339.
- Haverinen-Shaughnessy, U., Shaughnessy, R.J., Cole, E.C., Toyinbo, O., and Moschandreas, D.J. (2015). An assessment of indoor environmental quality in schools and its association with health and performance. *Build. Environ.* 93, 35–40.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 1422–1432.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313–321.

- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., and Waard, J.R. de (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, S96–S99.
- Herrera, M.L., Vallor, A.C., Gelfond, J.A., Patterson, T.F., and Wickes, B.L. (2009). Strain-Dependent Variation in 18S Ribosomal DNA Copy Numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1325–1332.
- Hewitt, K.M., Gerba, C.P., Maxwell, S.L., and Kelley, S.T. (2012). Office Space Bacterial Abundance and Diversity in Three Metropolitan Areas. *PLOS ONE* 7, e37849.
- Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., and Clark, I.M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 42, 878–887.
- Hoang, C.P., Kinney, K.A., Corsi, R.L., and Szaniszlo, P.J. (2010). Resistance of green building materials to fungal growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 104–113.
- Hoenen, T., Groseth, A., Rosenke, K., Fischer, R.J., Hoenen, A., Judson, S.D., Martellaro, C., Falzarano, D., Marzi, A., Squires, R.B., et al. (2016). Nanopore Sequencing as a Rapidly Deployable Ebola Outbreak Tool. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 331–334.
- Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F., Ekblad, A., Högberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M., and Read, D.J. (2001). Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* 411, 789–792.
- Hollingsworth, M.L., Andra Clark, A., Forrest, L.L., Richardson, J., Pennington, R.T., Long, D.G., Cowan, R., Chase, M.W., Gaudeul, M., and Hollingsworth, P.M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 439–457.
- Höppe, P., and Martinac, I. (1998). Indoor climate and air quality. *Int. J. Biometeorol.* 42, 1–7.
- Horak, B., Dutkiewicz, J., and Solarz, K. (1996). Microflora and Acarofauna of Bed Dust from Homes in Upper Silesia, Poland. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 76, 41–50.
- Horner, W.E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., and Lehrer, S.B. (1995). Fungal allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 161–179.
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W.W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismeni-Yazdi, H., and Peccia, J. (2012). Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *PLOS ONE* 7, e34867.
- Hospodsky, D., Yamamoto, N., Nazaroff, W.W., Miller, D., Gorthala, S., and Peccia, J. (2015). Characterizing airborne fungal and bacterial concentrations and emission rates in six occupied children’s classrooms. *Indoor Air* 25, 641–652.
- Hossain, M.A., Ahmed, M.S., and Ghannoum, M.A. (2004). Attributes of *Stachybotrys chartarum* and its association with human disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 200–208.
- Hotta, Y., Sato, J., Sato, H., Hosoda, A., and Tamura, H. (2011). Classification of the Genus *Bacillus* Based on MALDI-TOF MS Analysis of Ribosomal Proteins Coded in S10 and *spc* Operons. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5222–5230.
- Houben, H., and Guillaud, H. (1994). *Earth construction: a comprehensive guide* (Intermediate Technology Publications).
- Houben, H., and Guillaud, H. (2006). *Traité de construction en terre* (Marseilles: Parenthèses).

- Huang, H.-L., Lin, C.-C., and Hsu, K. (2015). Comparison of resistance improvement to fungal growth on green and conventional building materials by nano-metal impregnation. *Build. Environ.* 93, 119–127.
- Huffnagle, G.B., and Noverr, M.C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol.* 21, 334–341.
- Hugerth, L.W., and Andersson, A.F. (2017). Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Front. Microbiol.* 8.
- Hulin, M., Moularat, S., Kirchner, S., Robine, E., Mandin, C., and Annesi-Maesano, I. (2013). Positive associations between respiratory outcomes and fungal index in rural inhabitants of a representative sample of French dwellings. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 155–162.
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., and Sogin, M.L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12, 1889–1898.
- Husman, T. (1996). Health effects of indoor-air microorganisms. *Scand. J. Work. Environ. Health* 22, 5–13.
- Huttunen, K., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H., and Hirvonen, M.-R. (2003). Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ. Health Perspect.* 111, 85–92.
- Hyvärinen, A., Vahteristo, M., Meklin, T., Jantunen, M., Nevalainen, A., and Moschandreas, D. (2001). Temporal and Spatial Variation of Fungal Concentrations in Indoor Air. *Aerosol Sci. Technol.* 35, 688–695.
- Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A., and Nevalainen, A. (2002). Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials — concentrations and diversity. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 49, 27–37.
- Ihrmark, K., Bödeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677.
- İnceoğlu, Ö., Hoogwout, E.F., Hill, P., and Elsas, J.D. van (2010). Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3378–3382.
- Isaksson, T., Thelandersson, S., Ekstrand-Tobin, A., and Johansson, P. (2010). Critical conditions for onset of mould growth under varying climate conditions. *Build. Environ.* 45, 1712–1721.
- Jaakkola, J.J.K., Hwang, B.-F., and Jaakkola, M.S. (2010). Home Dampness and Molds as Determinants of Allergic Rhinitis in Childhood: A 6-Year, Population-based Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* 172, 451–459.
- Jacobs, J., Borràs-Santos, A., Krop, E., Täubel, M., Leppänen, H., Haverinen-Shaughnessy, U., Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Doekes, G., Zock, J.-P., et al. (2014). Dampness, bacterial and fungal components in dust in primary schools and respiratory health in schoolchildren across Europe. *Occup. Environ. Med.* 71, 704–712.
- Jahn, R., Blume, H.P., Asio, V.B., Spaargaren, O., and Schad, P. (2006). *Guidelines for soil description, 4th edition* (Rome: FAO).
- Jaquin, P.A. (2008). Analysis of historic rammed earth construction. Doctoral. Durham University.

- Jarvis, B.B. (2003). *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochemistry* 64, 53–60.
- Jarvis, B.B., and Miller, J.D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 367–372.
- Jarvis, J.Q., and Morey, P.R. (2001). Allergic Respiratory Disease and Fungal Remediation in a Building in a Subtropical Climate. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16, 380–388.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., and Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945–952.
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S.M., Edwards, D.P., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P.M., Woodcock, P., Edwards, F.A., et al. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol. Lett.* 16, 1245–1257.
- Jiménez Delgado, M.C., and Guerrero, I.C. (2007). The selection of soils for unstabilised earth building: A normative review. *Constr. Build. Mater.* 21, 237–251.
- Johanning, E., Biagini, R., Hull, D., Morey, P., Jarvis, B., and Landsbergis, P. (1996). Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68, 207–218.
- Johansson, P., Samuelson, I., Ekstrand-Tobin, A., Mjörnell, K., Sandberg, P.I., and Sikander, E. (2005). Microbiological growth on building materials - critical moisture levels. *State Art SP Swed. Natl. Test. Res. Inst.*
- Johansson, P., Ekstrand-Tobin, A., Svensson, T., and Bok, G. (2012). Laboratory study to determine the critical moisture level for mould growth on building materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 73, 23–32.
- Johansson, P., Svensson, T., and Ekstrand-Tobin, A. (2013). Validation of critical moisture conditions for mould growth on building materials. *Build. Environ.* 62, 201–209.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., and Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecol. Eng.* 36, 230–235.
- Jumpponen, A., Jones, K.L., David Mattox, J., and Yaege, C. (2010). Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Mol. Ecol.* 19, 41–53.
- Jussila, J., Komulainen, H., Huttunen, K., Roponen, M., Iivanainen, E., Torkko, P., Kosma, V.-M., Pelkonen, J., and Hirvonen, M.-R. (2002). *Mycobacterium terrae* isolated from indoor air of a moisture-damaged building induces sustained biphasic inflammatory response in mouse lungs. *Environ. Health Perspect.* 110, 1119–1125.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., and Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351–360.
- Kai, M., Hausteine, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., and Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1001–1012.
- Kang, S., and Mills, A.L. (2006). The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *J. Microbiol. Methods* 66, 242–250.

- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Karvala, K., Toskala, E., Luukkonen, R., Lappalainen, S., Uitti, J., and Nordman, H. (2010). New-onset adult asthma in relation to damp and moldy workplaces. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 83, 855–865.
- Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Rintala, H., Korppi, M., Täubel, M., Doekes, G., Gehring, U., Renz, H., Pfefferle, P.I., Genuneit, J., et al. (2014). Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy* 69, 1092–1101.
- Kembel, S.W., Jones, E., Kline, J., Northcutt, D., Stenson, J., Womack, A.M., Bohannon, B.J., Brown, G.Z., and Green, J.L. (2012). Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome. *ISME J.* 6, 1469–1479.
- Kembel, S.W., Meadow, J.F., O'Connor, T.K., Mhuireach, G., Northcutt, D., Kline, J., Moriyama, M., Brown, G.Z., Bohannon, B.J.M., and Green, J.L. (2014). Architectural Design Drives the Biogeography of Indoor Bacterial Communities. *PLOS ONE* 9, e87093.
- Kent, W.J. (2002). BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res.* 12, 656–664.
- Kettleson, E., Kumar, S., Reponen, T., Vesper, S., Méheust, D., Grinshpun, S.A., and 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., and Reponen, T. (2015). Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes. *Environ. Res.* 138, 130–135.
- Kildesø, J., Würtz, H., Nielsen, K.F., Kruse, P., Wilkins, K., Thrane, U., Gravesen, S., Nielsen, P.A., and Schneider, T. (2003). Determination of fungal spore release from wet building materials. *Indoor Air* 13, 148–155.
- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods* 84, 81–87.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., and Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 346–351.
- Kirchner, S., Buchmann, A., Cochet, C., Dassonville, C., Derbez, M., Leers, Y., Lucas, J.-P., Mandin, C., Ouattara, M., Ramalho, O., et al. (2011). *Qualité d'air intérieur, qualité de vie. 10 ans de recherche pour mieux respirer* (Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB)).
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1–e1.
- Knutsen, A.P., Bush, R.K., Demain, J.G., Denning, D.W., Dixit, A., Fairs, A., Greenberger, P.A., Kariuki, B., Kita, H., Kurup, V.P., et al. (2012). Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 280–291.
- Köljal, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., et al. (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 166, 1063–1068.

- Köljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22, 5271–5277.
- Korpelainen, H., and Pietiläinen, M. (2016). Diversity of indoor fungi as revealed by DNA metabarcoding. *Genome* 60, 55–64.
- Korpelainen, H., Pietiläinen, M., and Huotari, T. (2016). Effective detection of indoor fungi by metabarcoding. *Ann. Microbiol.* 66, 495–498.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120.
- Krieger, J., and Higgins, D.L. (2002). Housing and Health: Time Again for Public Health Action. *Am. J. Public Health* 92, 758–768.
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., and Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 47–58.
- Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E., and Camerlengo, T. (2011). Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS ONE* 6, e20956.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., and Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol.* 12, 118–123.
- Kunwufine, D. (2011). *Les propriétés des matériaux de construction en terre crue* (Laboratoire Matériaux et Durabilités des Constructions).
- Laborel-Préneron, A. (2017). Formulation and characterization of unfired clay bricks with plant aggregates. *Génie Civil*. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Laborel-Préneron, A., Aubert, J.E., Magniont, C., Tribout, C., and Bertron, A. (2016). Plant aggregates and fibers in earth construction materials: A review. *Constr. Build. Mater.* 111, 719–734.
- Langarica-Fuentes, A., Fox, G., and Robson, G.D. (2015). Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology* 161, 1921–1932.
- Latif, E., Ciupala, M.A., Tucker, S., Wijeyesekera, D.C., and Newport, D.J. (2015). Hygrothermal performance of wood-hemp insulation in timber frame wall panels with and without a vapour barrier. *Build. Environ.* 92, 122–134.
- Lax, S., Smith, D.P., Hampton-Marcell, J., Owens, S.M., Handley, K.M., Scott, N.M., Gibbons, S.M., Larsen, P., Shogan, B.D., Weiss, S., et al. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 345, 1048–1052.
- Lay, J.O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 20, 172–194.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., and Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82, 1016–1045.

- Lee, T.G. (2003). Health symptoms caused by molds in a courthouse. *Arch. Environ. Health* 58, 442–446.
- Lee, D.H., Zo, Y.G., and Kim, S.J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3112–3120.
- Leong, S. l., Hocking, A. d., and Scott, E. s. (2006). Effects of water activity and temperature on the survival of *Aspergillus carbonarius* spores in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 326–330.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 5, 37.
- Liebers, V., Raulf-Heimsoth, M., and Brüning, T. (2008). Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Arch. Toxicol.* 82, 203–210.
- Lim, H.-S., Kim, Y.-S., and Kim, S.-D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 510–516.
- Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølter, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., et al. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide. *New Phytol.* 199, 288–299.
- Lindgren, S.E., and Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 87, 149–163.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522.
- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F.M., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., et al. (2014). Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ. Microbiol.* 16, 2659–2671.
- Lugauskas, A., Levinskaitė, L., and Pečiulytė, D. (2003). Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 233–242.
- Lundin, D., Severin, I., Logue, J.B., Ostman, O., Andersson, A.F., and Lindström, E.S. (2012). Which sequencing depth is sufficient to describe patterns in bacterial α - and β -diversity? *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 367–372.
- Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N., Read, T., and Konstantinidis, K.T. (2012). Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLOS ONE* 7, e30087.
- Madsen, A.M., Kruse, P., and Schneider, T. (2006). Characterization of Microbial Particle Release from Biomass and Building Material Surfaces for Inhalation Exposure Risk Assessment. *Ann. Occup. Hyg.* 50, 175–187.
- Magan, N., and Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82, 83–93.

- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129–135.
- Marbury, M.C., and Krieger, R.A. (1991). Formaldehyde. In *Indoor Air Pollution*, (Baltimore: The Johns Hopkins University Press), pp. 223–251.
- Marcom, A. (2011). *Construire en terre-paille* (Mens: Terre vivante).
- Maron, P.-A., Mougel, C., and Ranjard, L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *C. R. Biol.* 334, 403–411.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., and Catroux, G. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354–2359.
- McElroy, K., Zagordi, O., Bull, R., Luciani, F., and Beerenwinkel, N. (2013). Accurate single nucleotide variant detection in viral populations by combining probabilistic clustering with a statistical test of strand bias. *BMC Genomics* 14, 501.
- McMullin, D.R., Renaud, J.B., Barasubiye, T., Sumarah, M.W., and Miller, J.D. (2017). Metabolites of *Trichoderma* species isolated from damp building materials. *Can. J. Microbiol.* 63, 621–632.
- McSpadden Gardener, B.B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology* 94, 1252–1258.
- Meadow, J.F., Altrichter, A.E., and Green, J.L. (2014a). Mobile phones carry the personal microbiome of their owners. *PeerJ* 2, e447.
- 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., et al. (2014b). Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air* 24, 41–48.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., et al. (2008). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1946–1954.
- Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A.D., Drake, R.R., Eigner, U., Fahr, A.M., He, Y., Ilina, E.N., Kostrzewa, M., et al. (2009). High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3732–3734.
- Mendell, M.J., Mirer, A.G., Cheung, K., Tong, M., and Douwes, J. (2011). Respiratory and Allergic Health Effects of Dampness, Mold, and Dampness-Related Agents: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Environ. Health Perspect.* 119, 748–756.
- Mensah-Attipoe, J., Reponen, T., Salmela, A., Veijalainen, A.-M., and Pasanen, P. (2015). Susceptibility of green and conventional building materials to microbial growth. *Indoor Air* 25, 273–284.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31.
- Mileto, C., Vegas, F., and Cristini, V. (2012). *Rammed Earth Conservation* (CRC Press).

- Miller, J.D. (2001). Mycological investigation of indoor environments. In *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*, (Londre et New York: Taylor & Francis Group), p.
- Miller, J.D., Sun, M., Gilyan, A., Roy, J., and Rand, T.G. (2010). Inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs induced by low molecular weight compounds from fungi from the built environment. *Chem. Biol. Interact.* 183, 113–124.
- Milstone, L.M. (2004). Epidermal desquamation. *J. Dermatol. Sci.* 36, 131–140.
- Minke, G. (2000). *Earth construction handbook : the building material earth in modern architecture* (WIT Press; Computational Mechanics).
- Minke, G. (2006). *Building with Earth: Design and Technology of a Sustainable Architecture* (Walter de Gruyter).
- Mitchell, J.I., and Zuccaro, A. (2006). Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20, 62–74.
- Mitchell, C.S., Zhang, J. (Jim), Sigsgaard, T., Jantunen, M., Liroy, P.J., Samson, R., and Karol, M.H. (2007). Current State of the Science: Health Effects and Indoor Environmental Quality. *Environ. Health Perspect.* 115, 958–964.
- Moran, M.A., Torsvik, V.L., Torsvik, T., and Hodson, R.E. (1993). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 915–918.
- Moran, N.A., McLaughlin, H.J., and Sorek, R. (2009). The Dynamics and Time Scale of Ongoing Genomic Erosion in Symbiotic Bacteria. *Science* 323, 379–382.
- Moreira, D., and López-García, P. (2002). The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol.* 10, 31–38.
- Morton, T. (2010). *Earth Masonry: Design and Construction Guidelines* (IHS BRE Press).
- Mudarri, D., and Fisk, W.J. (2007). Public health and economic impact of dampness and mold. *Indoor Air* 17, 226–235.
- Mueller, G.M., Schmit, J.P., Leacock, P.R., Buyck, B., Cifuentes, J., Desjardin, D.E., Halling, R.E., Hjortstam, K., Iturriaga, T., Larsson, K.-H., et al. (2007). Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodivers. Conserv.* 16, 37–48.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Murtoniemi, T., Hirvonen, M.-R., Nevalainen, A., and Suutari, M. (2003). The relation between growth of four microbes on six different plasterboards and biological activity of spores. *Indoor Air* 13, 65–73.
- Muyzer, G., and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141.
- Muyzer, G., Waal, E.C. de, and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.

- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schrumpf, M., and Daniel, R. (2011). Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLOS ONE* 6, e17000.
- Nguyen, H.D.T., Jančič, S., Meijer, M., Tanney, J.B., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., and Seifert, K.A. (2015). Application of the Phylogenetic Species Concept to *Wallemia sebi* from House Dust and Indoor Air Revealed by Multi-Locus Genealogical Concordance. *PLOS ONE* 10, e0120894.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., and Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572.
- Nielsen, K.F. (2002). Mould growth on building materials: Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Ph.D. thesis. SBI forlag.
- Nielsen, K.F., Hansen, M.Ø., Larsen, T.O., and Thrane, U. (1998a). Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 1–7.
- Nielsen, K.F., Thrane, U., Larsen, T.O., Nielsen, P.A., and Gravesen, S. (1998b). Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 9–16.
- Nielsen, K.F., Holm, G., Uttrup, L.P., and Nielsen, P.A. (2004). Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 325–336.
- Niemeier, R.T., Sivasubramani, S.K., Reponen, T., and Grinshpun, S.A. (2006). Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 262–273.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., and Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol. Bioinforma. Online* 4, 193–201.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., and Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 97–101.
- Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Schoch, C.L., Nylander, J.A.A., Bergsten, J., Porter, T.M., et al. (2012). Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycoKeys* 4, 37–63.
- Nocker, A., Burr, M., and Camper, A.K. (2007). Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microb. Ecol.* 54, 276–289.
- Norbäck, D. (2009). An update on sick building syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9, 55–59.
- O’Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.-M., and Vilgalys, R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5544–5550.
- Ogram, A., Sayler, G.S., and Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66.

- O'Hollaren, M.T., Yunginger, J.W., Offord, K.P., Somers, M.J., O'Connell, E.J., Ballard, D.J., and Sachs, M.I. (1991). Exposure to an Aeroallergen as a Possible Precipitating Factor in Respiratory Arrest in Young Patients with Asthma. *N. Engl. J. Med.* 324, 359–363.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., et al. (2017). *Vegan : Community Ecology Package*.
- Oliveira, P.M., Zannini, E., and Arendt, E.K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol.* 37, 78–95.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLOS ONE* 9, e97629.
- Pace, N.R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276, 734–740.
- Pacheco-Torgal, F., and Jalali, S. (2012). Earth construction: Lessons from the past for future eco-efficient construction. *Constr. Build. Mater.* 29, 512–519.
- Paic Lacaze, I. (2016). Etude des mécanismes de colonisation et de dégradation des produits de construction par les micromycètes appliquée à l'élaboration d'un traitement innovant. Université Paris Diderot - Paris 7.
- Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414.
- Park, D. (1982). Phylloplane fungi: Tolerance of hyphal tips to drying. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79, 174–178.
- Parra, R., and Magan, N. (2004). Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *J. Appl. Microbiol.* 97, 429–438.
- Pasanen, A.-L. (2001). A Review: Fungal Exposure Assessment in Indoor Environments. *Indoor Air* 11, 87–98.
- Pasanen, A.-L., Kalliokoski, P., Pasanen, P., Jantunen, M.J., and Nevalainen, A. (1991). Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environ. Int.* 17, 225–228.
- Pasanen, A.-L., Juutinen, T., Jantunen, M.J., and Kalliokoski, P. (1992a). Occurrence and moisture requirements of microbial growth in building materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 30, 273–283.
- Pasanen, A.-L., Heinonen-Tanski, H., Kalliokoski, P., and Jantunen, M.J. (1992b). Fungal microcolonies on indoor surfaces — an explanation for the base-level fungal spore counts in indoor air. *Atmospheric Environ. Part B Urban Atmosphere* 26, 117–120.
- Pasanen, A.-L., Yli-Pietilä, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P., and Tarhanen, J. (1999). Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 138–142.
- Pasanen, A.-L., Rautiala, S., Kasanen, J.-P., Raunio, P., Rantamäki, J., and Kalliokoski, P. (2000). The Relationship between Measured Moisture Conditions and Fungal Concentrations in Water-Damaged Building Materials. *Indoor Air* 10, 111–120.

- Pashley, C.H., Fairs, A., Free, R.C., and Wardlaw, A.J. (2012). DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biol.* 116, 214–224.
- Pastuszka, J.S., Kyaw Tha Paw, U., Lis, D.O., Wlazło, A., and Ulfig, K. (2000). Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmos. Environ.* 34, 3833–3842.
- Paul, E.A. (2014). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Academic Press).
- Peat, J.K., Dickerson, J., and Li, J. (1998). Effects of damp and mould in the home on respiratory health: a review of the literature. *Allergy* 53, 120–128.
- Peccia, J., and 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.
- Peltola, J., Andersson, M.A., Haahtela, T., Mussalo-Rauhamaa, H., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Samson, R.A., and Salkinoja-Salonen, M.S. (2001). Toxic-Metabolite-Producing Bacteria and Fungus in an Indoor Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3269–3274.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P. (1992). Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2717–2722.
- Signal, B. (2005). *Terre crue : techniques de construction et de restauration* (Paris: Eyrolles).
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A., and Rintala, H. (2008). Analysis of Fungal Flora in Indoor Dust by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Quantitative PCR, and Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 233–244.
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Lignell, U., and Rintala, H. (2011). Molecular profiling of fungal communities in moisture damaged buildings before and after remediation - a comparison of culture-dependent and culture-independent methods. *BMC Microbiol.* 11, 235.
- Pitt, J.I., and Christian, J.H.B. (1968). Water Relations of Xerophilic Fungi Isolated from Prunes. *Appl. Microbiol.* 16, 1853–1858.
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (Springer Dordrecht Heidelberg London New York).
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., et al. (2012a). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLOS ONE* 7, e44279.
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., et al. (2012b). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLOS ONE* 7, e44279.
- Pollock, S. (1999). *Ancient Mesopotamia* (Cambridge University Press).
- Portnoy, J.M., Barnes, C.S., and Kennedy, K. (2004). Sampling for indoor fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 189–198.

Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., and Immanuel, G. (2010). Production and Characterization of an Antifungal Compound (3-Phenyllactic Acid) Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Technol.* 3, 379–386.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188–7196.

Qian, J., Ferro, A.R., and Fowler, K.R. (2008). Estimating the Resuspension Rate and Residence Time of Indoor Particles. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 58, 502–516.

Qian, J., Hospodsky, D., Yamamoto, N., Nazaroff, W.W., and Peccia, J. (2012). Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom. *Indoor Air* 22, 339–351.

Qian, J., Peccia, J., and Ferro, A.R. (2014). Walking-induced particle resuspension in indoor environments. *Atmos. Environ.* 89, 464–481.

Quagliarini, E., Lenci, S., and Iorio, M. (2010). Mechanical properties of adobe walls in a Roman Republican domus at Suasa. *J. Cult. Herit.* 11, 130–137.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and de Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 537–547.

Radosevich, J. I., Wilson, W. J., Shinn, J. H., DeSantis, T. Z., and Andersen, G. I. (2002). Development of a high-volume aerosol collection system for the identification of air-borne micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 162–167.

Rainey, K. (2016). *First DNA Sequencing in Space a Game Changer*.

Rand, T.G., Giles, S., Flemming, J., Miller, J.D., and Puniani, E. (2005). Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *P. chrysogenum* Thom. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 87, 213–222.

Rand, T.G., Sun, M., Gilyan, A., Downey, J., and Miller, J.D. (2010). Dectin-1 and inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs by a toxic (1,3)-beta-D glucan. *Arch. Toxicol.* 84, 205–220.

Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., and Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 5, 1111–1120.

Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., and Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 303–329.

Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C., and Millon, L. (2009). Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* 19, 446–453.

Reboux, G., Bellanger, A.-P., Roussel, S., Grenouillet, F., and Millon, L. (2010). Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Rev. Fr. Allergol.* 50, 611–620.

Reeder, J., and Knight, R. (2009). The “rare biosphere”: a reality check. *Nat. Methods* 6, 636–637.

- Reenen-Hoekstra, E.S. van, Samson, R.A., Verhoeff, A.P., Wijnen, J.H.V., and Brunekreef, B. (1991). Detection and identification of moulds in dutch houses and non-industrial working environments. *Grana* 30, 418–423.
- Reller, L.B., Weinstein, M.P., and Petti, C.A. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1108–1114.
- Reponen, T., Lockey, J., Bernstein, D.I., Vesper, S.J., Levin, L., Khurana Hershey, G.K., Zheng, S., Ryan, P., Grinshpun, S.A., Villareal, M., et al. (2012). Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 639-644.e5.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* 38, 525–552.
- Rillig, M.C., and Mummey, D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171, 41–53.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S.A., Swan, B.K., Gies, E.A., et al. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter.
- Rintala, H., Nevalainen, A., and Suutari, M. (2002). Diversity of streptomycetes in water-damaged building materials based on 16S rDNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 439–443.
- Rintala, H., Hyvärinen, A., Paulin, L., and Nevalainen, A. (2004). Detection of streptomycetes in house dust – comparison of culture and PCR methods. *Indoor Air* 14, 112–119.
- Rintala, H., Pitkäranta, M., Toivola, M., Paulin, L., and Nevalainen, A. (2008). Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol.* 8, 56.
- Rintala, H., Pitkäranta, M., and Täubel, M. (2012). Microbial communities associated with house dust. *Adv. Appl. Microbiol.* 78, 75–120.
- Robbins, C.A., Swenson, L.J., Nealley, M.L., Kelman, B.J., and Gots, R.E. (2000). Health Effects of Mycotoxins in Indoor Air: A Critical Review. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 15, 773–784.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* 39, 183–190.
- Rocchi, S., Valot, B., Reboux, G., and Millon, L. (2017). DNA metabarcoding to assess indoor fungal communities: Electrostatic dust collectors and Illumina sequencing. *J. Microbiol. Methods* 139, 107–112.
- Rockland, L.B., Beuchat, and R, L. (1987). *Water activity : theory and applications to food* (M. Dekker).
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G., and Triplett, E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290.
- Röhlen, U., and Ziegert, C. (2013). *Construire en terre crue : Construction - Rénovation - Finitions* (Le Moniteur).
- Rose, L., Jensen, B., Peterson, A., Banerjee, S.N., and Arduino, M.J. (2004). Swab Materials and Bacillus anthracis Spore Recovery from Nonporous Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1023–1029.

- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., et al. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., and Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4, 1340–1351.
- Ruiz-Calderon, J.F., Cavallin, H., Song, S.J., Novoselac, A., Pericchi, L.R., Hernandez, J.N., Rios, R., Branch, O.H., Pereira, H., Paulino, L.C., et al. (2016). Walls talk: Microbial biogeography of homes spanning urbanization. *Sci. Adv.* 2, e1501061.
- Ruokolainen, L., von Hertzen, L., Fyhrquist, N., Laatikainen, T., Lehtomäki, J., Auvinen, P., Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Tillmann, V., Niemelä, O., et al. (2015). Green areas around homes reduce atopic sensitization in children. *Allergy* 70, 195–202.
- Rylander, R. (1995). Endotoxins in the environment. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392, 79–90.
- Rylander, R. (2002). Review: Endotoxin in the environment — exposure and effects. *J. Endotoxin Res.* 8, 241–252.
- Ryu, S.H., Moon, H.J., and Kim, J.T. (2015). Evaluation of the influence of hygric properties of wallpapers on mould growth rates using hygrothermal simulation. *Energy Build.* 98, 113–118.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Sajitha, K.L., Dev, S.A., and Florence, E.J.M. (2016). Identification and Characterization of Lipopeptides from *Bacillus subtilis* B1 Against Sapstain Fungus of Rubberwood Through MALDI-TOF-MS and RT-PCR. *Curr. Microbiol.* 73, 46–53.
- Saleh-Lakha, S., Miller, M., Campbell, R.G., Schneider, K., Elahimanesh, P., Hart, M.M., and Trevors, J.T. (2005). Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J. Microbiol. Methods* 63, 1–19.
- Salipante, S.J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D.R., Cummings, L.A., Sengupta, D.J., Harkins, T.T., Cookson, B.T., and Hoffman, N.G. (2014). Performance Comparison of Illumina and Ion Torrent Next-Generation Sequencing Platforms for 16S rRNA-Based Bacterial Community Profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7583–7591.
- Samson, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., and Adan, O.G.C. (1994). *Health implications of fungi in indoor environments* (Amsterdam: Elsevier).
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., and Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi* (Utrecht, Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.
- Santucci, R., Meunier, O., Ott, M., Herrmann, F., Freyd, A., and de Blay, F. (2007). Contamination fongique des habitations : bilan de 10 années d’analyses. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 47, 402–408.

- Sautour, M., Soares Mansur, C., Divies, C., Bensoussan, M., and Dantigny, P. (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 311–315.
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Fourquenot, V., Calinon, C., Paul, K., Valvin, S., Maurel, A., Aho, S., et al. (2009). Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci. Total Environ.* 407, 3766–3771.
- Schadt, C.W., Martin, A.P., Lipson, D.A., and Schmidt, S.K. (2003). Seasonal Dynamics of Previously Unknown Fungal Lineages in Tundra Soils. *Science* 301, 1359–1361.
- Schimel, J.P., and Bennett, J. (2004). Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology* 85, 591–602.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Schloss, P.D., Gevers, D., and Westcott, S.L. (2011). Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLOS ONE* 6, e27310.
- Schmidt, P.-A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., and Schmitt, I. (2013). Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol. Biochem.* 65, 128–132.
- Schmit, J.P., and Mueller, G.M. (2006). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers. Conserv.* 16, 99–111.
- Schnürer, J., and Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70–78.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., List, F.B.C.A., Bolchacova, E., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241–6246.
- Schwieger, F., and Tebbe, C.C. (1998). A New Approach To Utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4870–4876.
- Sedlbauer, K. (2001). Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components. Fraunhofer Institute for Building Physics.
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J.M., Colson, P., Lagier, J.-C., Gouriet, F., Fournier, P.E., Drancourt, M., Scola, B.L., and Raoult, D. (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* JCM.00492-13.
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., and Kotan, R. (2014). Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13, 35.
- Sessitsch, A., Hackl, E., Wenzl, P., Kilian, A., Kostic, T., Stralis-Pavese, N., Sandjong, B.T., and Bodrossy, L. (2006). Diagnostic microbial microarrays in soil ecology. *New Phytol.* 171, 719–736.
- Shannon, C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 623–656.

- Shelton, B.G., Kirkland, K.H., Flanders, W.D., and Morris, G.K. (2002). Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1743–1753.
- Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1135–1145.
- Shin, S.-K., Kim, J., Ha, S., Oh, H.-S., Chun, J., Sohn, J., and Yi, H. (2015). Metagenomic Insights into the Bioaerosols in the Indoor and Outdoor Environments of Childcare Facilities. *PLOS ONE* 10, e0126960.
- Shirakawa, M.A., Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., John, V., and Gambale, W. (2002). Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 165–173.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., and Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* 21, 1794–1805.
- Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., and Razzaghi-Abyaneh, M. (2017). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*.
- Sierra, P., Guillot, J., Jacob, H., Bussi  ras, S., and Chermette, R. (2000). Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 61, 158–161.
- Silva, S.M.D., Filliben, J.J., and Morrow, J.B. (2011). Parameters Affecting Spore Recovery from Wipes Used in Biological Surface Sampling. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2374–2380.
- Simoni, M., Cai, G.-H., Norback, D., Annesi-Maesano, I., Lavaud, F., Sigsgaard, T., Wieslander, G., Nystad, W., Canciani, M., Viegi, G., et al. (2011). Total viable molds and fungal DNA in classrooms and association with respiratory health and pulmonary function of European schoolchildren. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22, 843–852.
- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Poll, V., Rid, R., and Breitenbach, M. (2008). The Spectrum of Fungal Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145, 58–86.
- Sivasubramani, S.K., Niemeier, R.T., Reponen, T., and Grinshpun, S.A. (2004). Assessment of the aerosolization potential for fungal spores in moldy homes. *Indoor Air* 14, 405–412.
- Skinner, F.A., Jones, P.C., and Mollison, J.E. (1952). A comparison of a direct- and a plate counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 6, 261–271.
- Smith, D.P., and Peay, K.G. (2014). Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. *PLOS ONE* 9, e90234.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press).
- Snook, M.E., Mitchell, T., Hinton, D.M., and Bacon, C.W. (2009). Isolation and Characterization of Leu7-Surfactin from the Endophytic Bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a Biocontrol Agent for *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4287–4292.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., and Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120.

- Sordillo, J.E., Alwis, U.K., Hoffman, E., Gold, D.R., and Milton, D.K. (2011). Home Characteristics as Predictors of Bacterial and Fungal Microbial Biomarkers in House Dust. *Environ. Health Perspect.* 119, 189–195.
- Spengler, J.D., and Chen, Q. (2000). Indoor air quality factors in designing a healthy building. *Annu. Rev. Energy Environ.* 567–600.
- Spengler, J., Neas, L., Nakai, S., Dockery, D., Speizer, F., Ware, J., and Raizenne, M. (1994). Respiratory Symptoms and Housing Characteristics. *Indoor Air* 4, 72–82.
- Squinazi, F. (2002). La pollution de l'air à l'intérieur des bâtiments (allergènes exclus). *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 42, 248–255.
- Staats, M., Arulandhu, A.J., Gravendeel, B., Holst-Jensen, A., Scholtens, I., Peelen, T., Prins, T.W., and Kok, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 4615–4630.
- Starostin, K.V., Demidov, E.A., Bryanskaya, A.V., Efimov, V.M., Rozanov, A.S., and Peltek, S.E. (2015). Identification of Bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci. Rep.* 5.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Straus, D.C. (2011). The possible role of fungal contamination in sick building syndrome. *Front. Biosci. Elite Ed.* 3, 562–580.
- Straus, D.C., Cooley, J.D., Wong, W.C., and Jumper, C.A. (2003). Studies on the Role of Fungi in Sick Building Syndrome. *Arch. Environ. Health Int. J.* 58, 475–478.
- Szponar, B., and Larsson, L. (2000). Determination of Microbial Colonisation in Water-Damaged Buildings Using Chemical Marker Analysis by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Indoor Air* 10, 13–18.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., and Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 2045–2050.
- Takahashi, T. (1997). Airborne Fungal Colony-Forming Units in Outdoor and Indoor Environments in Yokohama, Japan. *Mycopathologia* 139, 23.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLOS ONE* 9, e105592.
- Täubel, M., Rintala, H., Pitkäranta, M., Paulin, L., Laitinen, S., Pekkanen, J., Hyvärinen, A., and Nevalainen, A. (2009). The occupant as a source of house dust bacteria. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 834-840.e47.
- Taylor, H.R., and Harris, W.E. (2012). An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 377–388.
- Tebbe, C.C., and Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657–2665.
- Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., and Larsson, K.-H. (2003). Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytol.* 159, 153–165.

- Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G., and Kõljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol.* 188, 291–301.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., et al. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys* 10, 1–43.
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., et al. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5, 135–141.
- Terrat, S., Plassart, P., Bourgeois, E., Ferreira, S., Dequiedt, S., Adele-Dit-De-Renseville, N., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P.-A., et al. (2015a). Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. *Microb. Biotechnol.* 8, 131–142.
- Terrat, S., Plassart, P., Bourgeois, E., Ferreira, S., Dequiedt, S., Adele-Dit-De-Renseville, N., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P.-A., et al. (2015b). Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. *Microb. Biotechnol.* 8, 131–142.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Mac Siúrtáin, M., Egan, D., and Doohan, F.M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1390–1403.
- Thomas, T., Gilbert, J., and Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3.
- Thomson, B.C., Tisserant, E., Plassart, P., Uroz, S., Griffiths, R.I., Hannula, S.E., Buée, M., Mougél, C., Ranjard, L., Van Veen, J.A., et al. (2015). Soil conditions and land use intensification effects on soil microbial communities across a range of European field sites. *Soil Biol. Biochem.* 88, 403–413.
- Tiedje, J.M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biol. Anaerob. Microorg.* 179–244.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., and Flynn, S.J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 13, 109–122.
- Toivola, M., Alm, S., Reponen, T., Kolari, S., and Nevalainen, A. (2002). Personal exposures and microenvironmental concentrations of particles and bioaerosols. *J. Environ. Monit.* 4, 166–174.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLOS ONE* 7, e40863.
- Torsvik, V., and Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240–245.

- Torsvik, V., Øvreås, L., and Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science* 296, 1064–1066.
- Torvinen, E., Meklin, T., Torkko, P., Suomalainen, S., Reiman, M., Katila, M.-L., Paulin, L., and Nevalainen, A. (2006). Mycobacteria and Fungi in Moisture-Damaged Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6822–6824.
- Tran, T.H., Govin, A., Guyonnet, R., Grosseau, P., Lors, C., Garcia-Diaz, E., Damidot, D., Devès, O., and Ruot, B. (2012). Influence of the intrinsic characteristics of mortars on biofouling by *Klebsormidium flaccidum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 70, 31–39.
- Tringe, S.G., and Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 442–446.
- Tringe, S.G., Mering, C. von, Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C., et al. (2005). Comparative Metagenomics of Microbial Communities. *Science* 308, 554–557.
- Tringe, S.G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W.H., Yap, J., Yao, F., Suan, S.T., Ing, S.K., Haynes, M., et al. (2008). The Airborne Metagenome in an Indoor Urban Environment. *PLOS ONE* 3, e1862.
- Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E.-L., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kähkölä, P., Mussalo-Rauhamaa, H., and Haahtela, T. (2000). Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1899–1904.
- Urzì, C., and Albertano, P. (2001). Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments. In *Methods in Enzymology*, R.J. Doyle, ed. (Academic Press), pp. 340–355.
- Urzi, C., and De Leo, F. (2001). Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *J. Microbiol. Methods* 44, 1–11.
- Vacher, S., Hernandez, C., Bärtschi, C., and Poussereau, N. (2010). Impact of paint and wall-paper on mould growth on plasterboards and aluminum. *Build. Environ.* 45, 916–921.
- Valentini, A., Pompanon, F., and Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24, 110–117.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., et al. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 25, 929–942.
- Van den Bulcke, J., Van Acker, J., and Stevens, M. (2007). Laboratory testing and computer simulation of blue stain growth on and in wood coatings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 137–147.
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., and Van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310.
- Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S.L., Leyval, C., Straczek, J., and Young, J.P.W. (2002). Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. *Science* 295, 2051–2051.
- Vassilev, N., Vassileva, M., and Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 137–144.

- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., et al. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.
- Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., and Roques, C. (2014). A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Build. Environ.* 80, 136–149.
- Verhoeff, A.P., and Burge, H.A. (1997). Health Risk Assessment of Fungi in Home Environments. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 78, 544–556.
- Verhoeff, A.P., Strien, V., T, R., Wijnen, V., H, J., and Brunekreef, B. (1995). Damp Housing and Childhood Respiratory Symptoms: The Role of Sensitization to Dust Mites and Molds. *Am. J. Epidemiol.* 141, 103–110.
- Vesper, S. (2011). Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 15–24.
- Vesper, S., McKinstry, C., Haugland, R., Wymer, L., Bradham, K., Ashley, P., Cox, D., Dewalt, G., and Friedman, W. (2007). Development of an Environmental Relative Moldiness index for US homes. *J. Occup. Environ. Med.* 49, 829–833.
- Vesper, S.J., Varma, M., Wymer, L.J., Dearborn, D.G., Sobolewski, J., and Haugland, R.A. (2004). Quantitative polymerase chain reaction analysis of fungi in dust from homes of infants who developed idiopathic pulmonary hemorrhaging. *J. Occup. Environ. Med.* 46, 596–601.
- Viegi, G., Simoni, M., Scognamiglio, A., Baldacci, S., Pistelli, F., Carrozzi, L., and Annesi-Maesano, I. (2004). Indoor air pollution and airway disease [State of the Art]. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 1401–1415.
- Viitanen, H., and Ojanen, T. (2007). Improved Model to Predict Mold Growth in Building Materials.
- Viitanen, H., Vinha, J., Salminen, K., Ojanen, T., Peuhkuri, R., Paajanen, L., and Lähdesmäki, K. (2010). Moisture and Bio-deterioration Risk of Building Materials and Structures. *J. Build. Phys.* 33, 201–224.
- Vijay, H.M., Abebe, M., Kumar, V., DeVouge, M., Schrader, T., Thaker, A., Comtois, P., and Escamilla-Garcia, B. (2005). Allergenic and mutagenic characterization of 14 *Penicillium* species. *Aerobiologia* 21, 95–103.
- Vinodkumar, S., Nakkeeran, S., Renukadevi, P., and Malathi, V.G. (2017). Biocontrol Potentials of Antimicrobial Peptide Producing *Bacillus* Species: Multifaceted Antagonists for the Management of Stem Rot of Carnation Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* 8.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., and Vivanco, J.M. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol.* 132, 44–51.
- Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLOS ONE* 4, e7401.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., et al. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27.

- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., and Thomashow, L.S. (2002). Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–348.
- Wheatley, R.E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 357–364.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. Guide Methods Appl.* 18, 315–322.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6578–6583.
- Wiktor, V., De Leo, F., Urzì, C., Guyonnet, R., Grosseau, P., and Garcia-Diaz, E. (2009). Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 1061–1065.
- Wilimzig, M., and Bock, E. (1994). Attack of mortar by bacteria and fungi. *Werkst. Korros.-Mater. Corros.* 2, 117–118.
- Wilkins, K. (1996). Volatile metabolites from actinomycetes. *Chemosphere* 32, 1427–1434.
- Wilkins, D., Leung, M.H., and Lee, P.K. (2016). Indoor air bacterial communities in Hong Kong households assemble independently of occupant skin microbiomes. *Environ. Microbiol.* 18, 1754–1763.
- Wilkins, D., Leung, M.H.Y., and Lee, P.K.H. (2017). Microbiota fingerprints lose individually identifying features over time. *Microbiome* 5, 1.
- Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumpf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Buscot, F., and Daniel, R. (2010). Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German Grassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6751–6759.
- Williams, C., Goodhew, S., Griffiths, R., and Watson, L. (2010). The feasibility of earth block masonry for building sustainable walling in the United Kingdom. *J. Build. Apprais.* 6, 99–108.
- World Health Organization (2009). *WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness and Mould* (WHO Regional Office Europe).
- Wu, P.-C., Su, H.-J.J., and Ho, H.-M. (2000). A Comparison of Sampling Media for Environmental Viable Fungi Collected in a Hospital Environment. *Environ. Res.* 82, 253–257.
- Xu, L., Ravnskov, S., Larsen, J., Nilsson, R.H., and Nicolaisen, M. (2012). Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biol. Biochem.* 46, 26–32.
- Yamamoto, N., and Bibby, K. (2014). Clustering of fungal community internal transcribed spacer sequence data obscures taxonomic diversity. *Environ. Microbiol.* 16, 2491–2500.
- Yamamoto, N., Shendell, D.G., and Peccia, J. (2011). Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR. *Indoor Air* 21, 521–530.

- Yamamoto, N., Bibby, K., Qian, J., Hospodsky, D., Rismani-Yazdi, H., Nazaroff, W.W., and Peccia, J. (2012). Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *ISME J.* 6, 1801–1811.
- Yamamoto, N., Nazaroff, W.W., and Peccia, J. (2014). Assessing the aerodynamic diameters of taxon-specific fungal bioaerosols by quantitative PCR and next-generation DNA sequencing. *J. Aerosol Sci.* 78, 1–10.
- Yang, B., Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 135.
- Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., and Hinton, S.M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-Agarose Gel Electrophoresis Purification of Polymerase Chain Reaction-Amplifiable DNA from Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1972–1974.
- Yu, D.W., Ji, Y., Emerson, B.C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., and Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol. Evol.* 3, 613–623.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., and Huang, Q. (2012). Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5942–5944.
- Zalar, P., Hoog, G.S. de, Schroers, H.-J., Frank, J.M., and Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 311–328.
- Zami, M.S., and Lee, A. (2010). Stabilised or unstabilised earth construction for contemporary urban housing? (Ningbo), pp. 227–240.
- Zelles, L., and Alef, K. (1995). Biomarkers. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, (Londres: Academic Press), pp. 422–439.
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., and Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol. Control* 65, 200–206.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316–322.
- Zhou, X., Li, Y., Liu, S., Yang, Q., Su, X., Zhou, L., Tang, M., Fu, R., Li, J., and Huang, Q. (2013). Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *GigaScience* 2, 4.

Table des Figures

Figure 2.1 : Répartition des architectures en terre crue dans le monde (©CRAterre)	21
Figure 2.2 : Différents types d'horizons d'un profil de sol (adapté de http://sparkcharts.sparknotes.com/gensci/envsci/section3.php).....	23
Figure 2.3 : Mur en pisé (https://fr.wikipedia.org/wiki/Pisé).....	27
Figure 2.4 : Mur en bauge (http://www.totem-terre-couleurs.fr).....	28
Figure 2.5 : Mur porteur en adobe (http://www.lesguepesmaconnes.fr).....	29
Figure 2.6 : Mur en torchis (http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1104936).....	30
Figure 2.7 : Murs recouvert d'un enduit en terre crue (http://www.asterre.org).....	31
Figure 2.8 : Schéma des approches culturelles et moléculaires pour l'identification des microorganismes environnementaux.....	42
Figure 2.9 : Pyroséquençage utilisant une plateforme Titanium 454 (Roche) (Metzker, 2010).	62
Figure 2.10 : Séquençage utilisant la chimie Illumina (Solexa).....	64
Figure 2.11 : Représentation schématique de la séquence codant pour l'ARNr 16S avec les régions conservées (vert) et hypervariables (bleu). Adaptée de (Singer <i>et al.</i> , 2016).....	69
Figure 2.12 : Représentation schématique des différentes régions variables du gène codant pour l'ARNr 16S.	70
Figure 2.13 : Carte de la région ribosomale comportant les ITS 1 et 2 ainsi que les amorces utilisées par Terdersoo <i>et al.</i> (2015). Adaptée de (Tedersoo <i>et al.</i> , 2015).	71
Figure 2.14 : Schéma de la structure des communautés fongiques de l'air.	84
Figure 3.1 : Eprouvettes cylindriques FAC-S0 % (gauche) et FAC-S3 % (droite)	119
Figure 3.2 : Localisation des sites de prélèvement <i>in situ</i> , avec prélèvements sur matériaux composés de terre seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert).	121
Figure 3.3 : Méthode de prélèvement des sites Bb (gauche) et D (droite) par grattage au scalpel.....	122
Figure 3.4 : Sites d'échantillonnage de bâtiments en terre crue seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert).	124
Figure 3.5 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de FAC en fonction du temps d'agitation (A) (concentration en détergent finale 5 % ; ratio 1g/10mL), de la concentration en détergent (B) (temps d'agitation de 10 minutes ; ratio 1g/10mL) ou du ratio masse de matériau / volume de milieu de récupération (C) (temps d'agitation de 10 minutes ; concentration en détergent finale 5 %).	130
Figure 3.6 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de paille en fonction du temps d'agitation (A) (concentration en détergent finale 5 %), de la concentration en détergent (B) (temps	

d'agitation de 10 minutes) ou de la concentration en détergent et du temps d'agitation lors de l'utilisation du broyeur Smasher™ (C).	130
Figure 3.7 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écart-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) d' <i>A.brasiliensis</i> recouvrées depuis le film adhésif en fonction de la durée d'agitation.....	132
Figure 3.8 : Schéma du système d'humidification par capillarité.....	135
Figure 3.9 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types ; trois essais indépendants en triplicats techniques) par gramme de FAC (orange) et de paille (vert).	138
Figure 3.10 : Observations par microscopie optique d'isolats d' <i>Aspergillus</i> sp. (A), <i>Penicillium</i> sp. (B) et <i>Rhizopus</i> sp. (C) après coloration au bleu coton (G x400).	140
Figure 3.11 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types; trois essais indépendants en triplicats techniques) par cm ² prélevé obtenues lors des prélèvements à la surface des éprouvettes non séchées (A) ou séchées (B).	141
Figure 3.12 : Isolats obtenus après 7 jours d'incubation à 22,5°C à partir des prélèvements réalisés par adhésif à la surface (à gauche) et à l'intérieur (à droite) des éprouvettes FAC-S0 % (A) et FAC-S3 % (B) séchées.	141
Figure 3.13 : Observations d'éprouvettes FAC-S0 % (A) et FAC-S3 % (B) après incubation à température ambiante pendant deux mois en condition humide (à gauche sur les photos) et en condition sèche (à droite sur les photos).	142
Figure 3.14 : Unités formant colonies (moyennes $\pm$ écarts-types; deux éprouvettes par condition) de bactéries (A) et de champignons (B) par cm ² obtenues lors des prélèvements à la surface et à l'intérieur des éprouvettes en fonction de leur condition d'humidité.	143
Figure 3.15 : Unités formant colonie (moyennes $\pm$ écarts-types; n=6 pour AM et AJ, n=5 pour Bb, n=4 pour Ba et C, n=3 pour DM et DJ) de bactéries (A) et de champignons (B) par gramme de matériau prélevé en fonction du milieu de culture utilisé.	145
Figure 3.16: Types d'inhibition de la croissance fongique observés pour les différents isolats bactériens.....	157
Figure 3.17 : Boîtes des milieux double-couche des isolats présentant une activité antifongique.....	158
Figure 3.18 : Membranes portant les champignons et recouvrant les spots des isolats bactériens testés.....	160
Figure 4.1 : Richesse spécifique (nombre d'OTUs définies à partir des régions ITS1) des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).	174
Figure 4.2 : Index de Shannon pour les banques ITS1 des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).	175
Figure 4.3 : Richesse spécifique (nombre d'OTUs définies à partir des régions 16S) des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée	

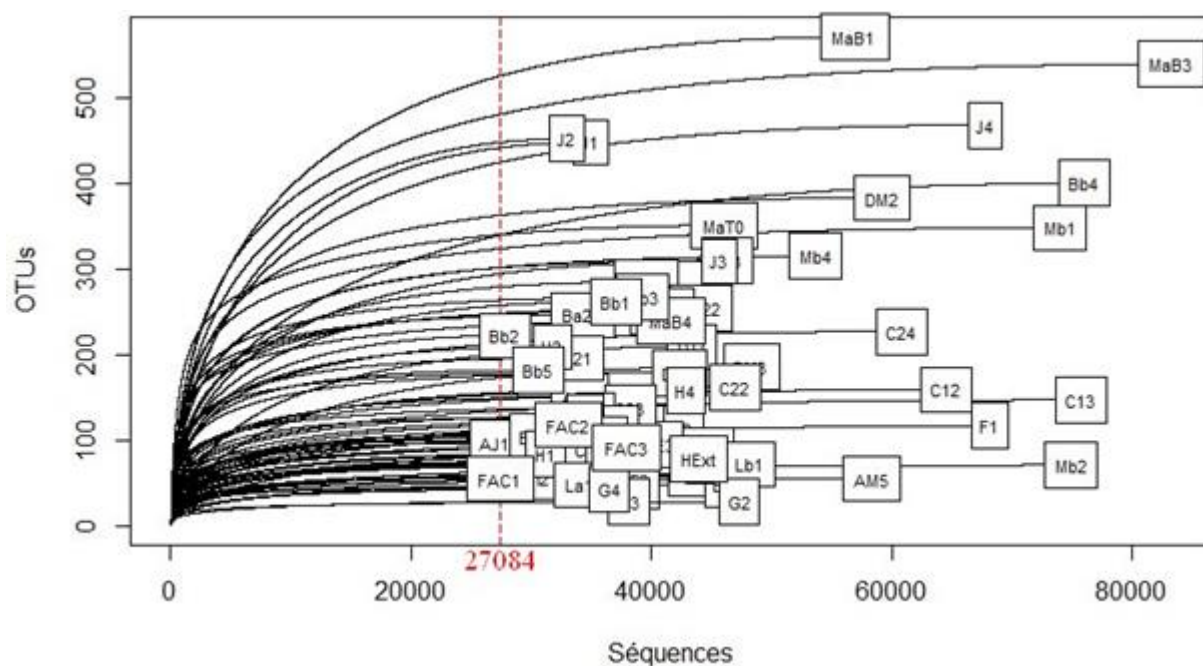
(vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).....	176
Figure 4.4 : Index de Shannon pour les banques 16S des sites « Habitations » (A) ou « Grange / Extérieur » (B) composés de terre avec inclusion biosourcée (vert) ou seule (orange) et pour les matières premières des éprouvettes manufacturées (marron).	177
Figure 4.5 : Graphiques NMDS des matrices de dissimilarité Bray-Curtis des communautés ITS1 en fonction du site de prélèvement (A), de la composition du mur (B) ou de la localisation du prélèvement (C).	179
Figure 4.6 : Graphiques NMDS des matrices de dissimilarité Bray-Curtis des communautés 16S en fonction du site de prélèvement (A), de la composition du mur (B) ou de la localisation du prélèvement (C).	181
Figure 4.7 : Composition fongique et abondance relative moyenne des 40 genres majoritaires. Les taxons visualisés représentent 75,1 % des séquences de l'ensemble des banques ITS1.	184
Figure 4.8 : Abondance relative des principaux genres fongiques selon les différents sites de prélèvements et les différentes conditions.....	185
Figure 4.9 : Composition bactérienne et abondance relative moyenne des 40 genres majoritaires. Les taxons visualisés représentent 80,1 % des séquences de l'ensemble des banques 16S.....	186
Figure 4.10 : Abondance relative des principaux genres bactériens selon les différents sites de prélèvements et les différentes conditions.....	187
Figure 4.11 : Abondances relatives des genres bactériens significativement différentes entre les prélèvements à 120 et 100 cm d'une part et le reste du mur d'autre part sur le site A (Mann-Withney p-value < 0,05).....	188
Figure 4.12 : Abondances relatives des genres bactériens (A) et fongiques (B) significativement différentes entre les prélèvements d'adobe à 160 et 110 cm d'une part et le reste du mur d'autre part sur le site D (Mann-Withney p-value < 0,05).....	189

Liste des Tableaux

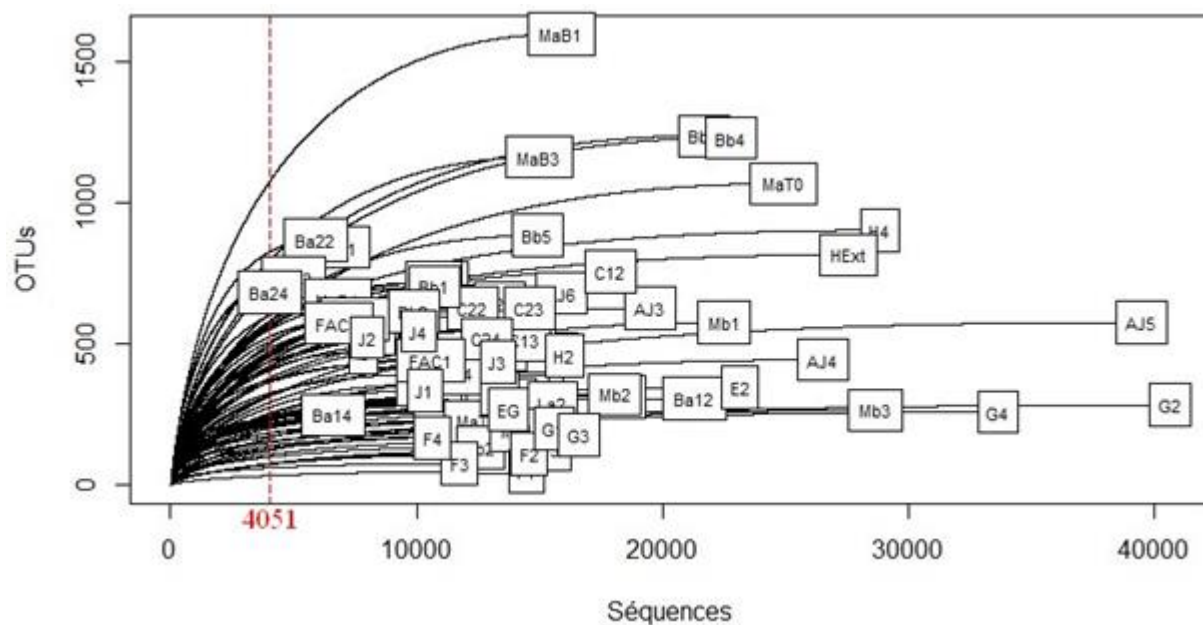
Tableau 2.1 : Liste des milieux de culture couramment utilisés pour l'isolement de microorganismes dans les intérieurs de bâtiments.	45
Tableau 2.2 : Systèmes de séquençage nouvelle génération et leurs caractéristiques.	66
Tableau 2.3 : Principaux taxons microbiens détectés dans différents types de sols.	81
Tableau 2.4 : Principaux taxons fongiques détectés dans différents environnements de l'habitat intérieur (air, poussières, surfaces).	86
Tableau 2.5 : Principaux taxons bactériens détectés dans différents environnements de l'habitat intérieur (air, poussières, surfaces).	89
Tableau 2.6 : Principaux taxons microbiens détectés dans différents environnements de l'habitat intérieur humide (air, poussières, surfaces) définis selon la littérature.	94
Tableau 3.1 : Liste des sites de prélèvements <i>in situ</i> et caractéristiques.	120
Tableau 3.2 : Liste des milieux de cultures utilisés lors de l'optimisation des méthodes de prélèvements.	126
Tableau 3.3 : Conditions optimales de traitement pour la récupération des microorganismes en fonction des matières premières.	131
Tableau 3.4 : Liste des milieux de cultures utilisés pour les prélèvements réalisés <i>in situ</i>	136
Tableau 3.5 : Identification des isolats bactériens (morphologie et signature MALDI TOF) et fongiques (identification morphologique) obtenus après isolement respectivement sur milieu TSA et milieu PDA pour les matières premières.	139
Tableau 3.6 : Identification par MALDI-TOF des isolats bactériens après isolement sur milieu TSA à partir des les prélèvements <i>in situ</i>	146
Tableau 3.7 : Identification morphologique des isolats fongiques après isolement sur milieux PDA, MEA et DG18 à partir des prélèvements <i>in situ</i>	146
Tableau 3.8 : Liste des isolats utilisés pour les essais de biocontrôle par double-couche.	154
Tableau 3.9 : Liste des isolats utilisés pour les essais de biocontrôle sur membrane.	154
Tableau 3.10 : Inhibition par double-couche de la croissance des espèces fongiques en fonction de l'espèce d'appartenance des isolats testés.	159
Tableau 3.11 : Inhibition sur membrane de la croissance des espèces fongiques en fonction de l'espèce des isolats testés.	160
Tableau 4.1 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la région codant pour l'ARNr 16S et l'ITS1.	168
Tableau 4.2 : Nombres d'échantillons amplifiés pour la région 16S et ITS1 pour les différents sites et supports <i>in situ</i> en terre crue seule (orange) ou avec inclusion biosourcée (vert) et pour la matière première des éprouvettes manufacturées (marron).	169
Tableau 4.3 : Résultats des tests PERMANOVA pour les banques ITS1 sur les variables de composition (Terre vs Biosourcé) et de localisation (Habitation vs Grange/Extérieur) pour la	

totalité des sites ou pour des sous-ensembles. Les résultats significatifs ($P < 0,05$) sont indiqués en gras.....	180
Tableau 4.4 : Résultats des tests PERMANOVA pour les banques 16S sur les variables de composition (Terre vs Biosourcé) et de localisation (Habitation vs Grange/Extérieur) pour la totalité des sites ou pour des sous-ensembles.....	182
Tableau 4.5 : Taux d'assignation des séquences et des OTUS aux différents niveaux taxonomiques pour l'ensemble des banques.	182
Tableau 4.6 : Tableau récapitulatif des taxons fongiques détectés par culture et par métabarcoding (abondance relative ≥ 1 %) pour les sites étudiés selon les deux approches.	203
Tableau 4.7 : Tableau récapitulatif des taxons bactériens détectés par culture et par métabarcoding (abondance relative ≥ 1 %) pour les sites étudiés selon les deux approches.	204

Annexes



Annexe 1 : Courbes de raréfaction des banques ITS et seuil fixé lors de la normalisation (affiché en rouge).



Annexe 2 : Courbes de raréfaction des banques 16S et seuil de la normalisation (affiché en rouge).

Taxonomie des genres fongiques majoritaires				
Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_fam_Incertae_sedis	Acremonium
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium
Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Coccodiniaceae	Coccodinium
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Devriesia
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporales_fam_Incertae_sedis	Libertasomyces
Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariales_fam_Incertae_sedis	Monographella
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Phialosimplex
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Thielavia
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae_ord_Incertae_sedis	Plectosphaerellaceae	Verticillium
Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellales_fam_Incertae_sedis	Cryptococcus
Basidiomycota	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae	Wallemia

Annexe 3 : Taxonomies des genres fongiques majoritaires (Abondance relative moyenne sur l'ensemble des sites ≥ 1 %).

Taxonomie des genres bactériens majoritaires				
Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres
Actinobacteria	Actinobacteria	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	Actinomycetospora
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	Nocardioides
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporaceae	Promicromonospora
Actinobacteria	Actinobacteria	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	Pseudonocardia
Actinobacteria	Rubrobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteriaceae	Rubrobacter
Actinobacteria	Actinobacteria	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	Saccharopolyspora
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Trichococcus
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas

Annexe 4 : Taxonomies des genres bactériens majoritaires (Abondance relative moyenne sur l'ensemble des sites $\geq 0,75$ %).

Nom de milieu	Référence	Composition (g/L)
DG18	Oxoid (Ref : CM0729)	Peptone : 5,0 Glucose : 10,0 Dihydrogénophosphate de potassium : 1,0 Dichloran : 0,002 Agar : 15,0 Glycérol : 220 pH 5,6 ± 0,2
MEA	Biokar (Ref : BK045HA)	Extrait de malt : 30,0 Agar : 15,0 pH 5,6 ± 0,2
PDA	Oxoid (Ref : CM0139)	Peptone : 5,0 Glucose : 10,0 Dihydrogénophosphate de potassium : 1,0 Sulfate de magnésium : 0,5 Dichloran : 0,002 Agar : 15,0 pH 5,6 ± 0,2
TSA	Biomérieux (Ref : 51044)	Hydrolysat pancréatique de caséine : 15,0 Hydrolysat enzymatique de soja : 5,0 Chlorure de sodium : 5,0 Agar : 15,0 pH 7,3 ± 0,2

Annexe 5 : Composition des milieux de culture utilisés.

Liste des publications et communications

Publication dans un journal à comité de lecture indexé dans Web of Science

- Simons, A. ; Laborel-Préneron, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Magniont, C. ; Roux, C. ; Roques C. (2015). Development of bio-based earth products for healthy and sustainable buildings: characterization of microbiological, mechanical and hygrothermal properties. *Matériaux & Techniques* 103, 206.

Publications lors de conférences internationales à comité de lecture et actes publiés et référencés

- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Development of microorganism sampling methods on bio-based earth products intended for healthy, sustainable buildings. 1st International Conference on Bio-based Building Materials (ICBBM 2015), Clermont-Ferrand. RILEM Proceedings PRO 99, 182-188.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Développement de méthodes de prélèvements des microorganismes sur des produits biosourcés à base de terre crue pour des bâtiments sains et durables. Conférence Internationale Francophone NoMaD 2015, Douai.

Communications Orales

- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Roux, C. ; Roques C. (2016). Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables. XIII^{ème} Forum « Biodétérioration des matériaux » du CEFRACOR, Toulouse.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Développement de méthodes de prélèvements des microorganismes sur des produits biosourcés à base de terre crue pour des bâtiments sains et durables. Conférence Internationale Francophone NoMaD 2015, Douai.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Characterization and control of microbial proliferation on bio-based products for healthy and durable buildings. 1st International Conference on Bio-based Building Materials (ICBBM 2015), Clermont-Ferrand.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2014). Projet ANR Bioterra : Caractérisation et maîtrise de la prolifération

microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables. XII^{ème} Forum Jeunes chercheurs « Biodétérioration des matériaux » du CEFRACOR, La Rochelle.

Posters

- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Roux, C. ; Roques, C. (2017). Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables. 8^{ème} colloque du Réseau National Biofilms (RNB), Clermont-Ferrand.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2016). Caractérisation de la microflore de produits de construction biosourcés. 1^{er} journée BacTouBac, Toulouse.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Roux, C. ; Roques, C. (2016). Characterization and control of microbial proliferation on earthen bio-based products to build healthy and sustainable buildings. XIIth World Congress on Earthen Architecture, Lyon.
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Caractérisation de la microflore de produits de construction biosourcés. 7^{ème} colloque du Réseau National Biofilms (RNB), Toulouse. [Prix du meilleur poster]
- Simons, A. ; Bertron, A. ; Aubert, J.E. ; Laborel-Préneron, A. ; Roux, C. ; Roques, C. (2015). Caractérisation de la microflore de produits de construction biosourcés. Congrès National de la Société Française de Microbiologie 2015, Paris.

Abstract

AUTHOR: Alexis SIMONS

TITLE: Characterization and control of microbial proliferation on bio-based products for healthy and sustainable buildings

THESIS SUPERVIZORS: Christine ROQUES, Alexandra BERTRON

ABSTRACT: Impacts of building on environment and on health of inhabitants are nowadays priority issues. The interest for earthen materials is increasing for many reasons (ecological, economical, etc.), but some questions are raised about their fungal proliferation sensitivity considering the quality of indoor air.

This work consists in characterizing by cultural and metabarcoding methods the fungal and bacterial communities on the surface of earthen building materials, biobased or not, and raw materials. Detected fungi are related to those which are identified in conventional buildings. The addition of vegetal fibers don't modify the fungal communities structure, but make the material more favorable for proliferation. The fungal development appears only under water damage condition. Biocontrol methods with bacteria have been initiated in order to inhibit the fungal proliferation on these materials.

KEYWORDS: Biobased construction materials; earthen materials; microbial ecology; high-throughput sequencing; biocontrol.

FIELD: Microbiology

Thesis realised in the Laboratoire de Génie Chimique, Equipe BioSym, UMR 5503, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des maraichers, 31062 Toulouse cedex 4.

Résumé

AUTEUR : Alexis SIMONS

TITRE : Caractérisation et maîtrise de la prolifération microbienne dans des produits biosourcés pour des bâtiments sains et durables

DIRECTRICES DE THESE : Christine ROQUES, Alexandra BERTRON

RESUME : Les impacts de la construction sur l'environnement et sur la santé des habitants sont aujourd'hui des enjeux prioritaires. Les matériaux en terre crue connaissent un essor important pour de nombreuses raisons (écologique, économique, etc.), mais des questions se posent sur leur sensibilité à la prolifération des moisissures vis-à-vis de la qualité de l'air intérieur.

Au cours de ces travaux, les flores bactériennes et fongiques présentes sur des supports en terre crue, biosourcés ou non, au sein d'habitations, ainsi que dans les matières premières, ont été caractérisées selon des méthodes par culture et par métabarcoding. Les champignons détectés sont similaires à ceux présents dans les habitations conventionnelles. L'ajout de fibres végétales ne modifie pas la structure des communautés fongiques mais rend le matériau plus sensible à la prolifération. Celle-ci n'intervient qu'en condition d'accident hydrique. Des approches de lutte biologique à partir de bactéries ont été initiées pour inhiber la prolifération fongique sur ces matériaux.

MOTS-CLES : Matériaux de construction biosourcés ; terre crue ; écologie microbienne ; séquençage haut-débit ; lutte biologique.

DISCIPLINE : Microbiologie

Thèse réalisée au sein du Laboratoire de Génie Chimique, Equipe BioSym, UMR 5503, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des maraichers, 31062 Toulouse cedex 4.