

THESE DE DOCTORAT DE

L'ÉCOLE DES HAUTES ÉTUDES
EN SANTÉ PUBLIQUE DE RENNES

ÉCOLE DOCTORALE N° 637
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : *Microbiologie, Virologie, Parasitologie*

Par

Gaëtan PAVARD

Développement d'une méthodologie d'étude de la contamination microbiologique de l'air intérieur de bureaux par l'analyse des filtres de centrale de traitement d'air

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 2 juin 2023

Unité de recherche : EHESP Rennes, Inserm, IRSET, UMR_S 1085
IMT Atlantique Nantes, GEPEA, CNRS UMR 6144

Thèse N° : NNT 2023HESP0002

Thèse préparée dans le cadre du Réseau Doctoral en Santé Publique animé par l'EHESP

Rapporteurs avant soutenance :

Evelyne GONZE : Professeure des Universités, Université Savoie Mont-Blanc
Jérémy POURCHEZ : Directeur de recherche, École des Mines de Saint-Etienne

Composition du Jury :

Président :	Jean-Pierre GANGNEUX	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Rennes
Examineur :	Jean-Pierre GANGNEUX	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Rennes
Dir. de thèse :	Pierre LE CANN	Professeur, EHESP Rennes
Co-dir. de thèse :	Yves ANDRES	Professeur, IMT Atlantique Nantes
Encadrante :	Aurélié JOUBERT	Maître Assistante HDR, IMT Atlantique Nantes

Remerciements

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse est né d'une collaboration entre l'IMT Atlantique Nantes et l'EHESP de Rennes. Je remercie ces deux institutions d'avoir porté et financé ce projet de recherche autour de la qualité de l'air l'intérieur et des centrales de traitement d'air. Je souhaite remercier l'ensemble des membres du personnel de ces établissements, ainsi que l'école doctorale SVS et le Réseau Doctoral en Santé Publique, animé par l'EHESP, pour l'accompagnement de ma scolarité pendant ce doctorat.

Je remercie infiniment mon directeur de thèse Pierre LE CANN pour tous les échanges, les suggestions pertinentes, sa disponibilité et sa rigueur scientifique qu'il m'a apporté pour accomplir ce travail. Je remercie également mon co-directeur de thèse Yves ANDRES pour son aide, tant par ses réflexions que par sa disponibilité et son expertise au laboratoire. C'était une grande chance de pouvoir discuter des résultats expérimentaux aussi souvent. Enfin je remercie grandement Aurélie JOUBERT, encadrante. Grâce à sa rigueur, son regard critique, ses exigences rédactionnelles et les nombreux conseils qu'elle m'a donnés tout au long de ce projet, j'ai pu m'améliorer et gagner en expérience pour ma future vie professionnelle. Son aide et son soutien ont été essentiels à la réussite de cette thèse.

Je remercie Evelyne GONZE, professeure des Universités, Université Savoie-Mont-Blanc, ainsi que Jérémie POURCHEZ, directeur de recherche, Ecole des Mines de Saint-Etienne, pour avoir accepté le travail de rapporteur de ma thèse. Je remercie Jean-Pierre GANGNEUX, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Rennes, d'avoir accepté d'être membre du jury de thèse.

Je remercie Laurence LE COQ et Philippe DUQUENNE d'avoir été membres de mon comité de suivi individuel au cours de ces trois dernières années. J'ai apprécié les échanges et leurs conseils pour avancer dans cette thèse.

Mes remerciements vont auprès des équipes techniques qui ont participé grandement à la réussite de cette thèse. Je pense notamment à l'équipe de l'IMT Atlantique composée d'Yvan GOURIOU, Jérôme MARTIN, François-Xavier BLANCHET, Éric CHEVREL, Patrick BRION et Katell CHAILLOU. Je pense aussi à l'équipe du LERES et particulièrement à Anne GERARD, Sophie PAYET et Hélène RENAUD pour leur expertise lors des manipulations de biologie moléculaire. Merci également à la société ENGIE COFELY d'avoir collaboré pour l'utilisation de la CTA du bâtiment J d'IMT Atlantique.

Je voudrais remercier Dominique BRIAND et Ludivine SAHRAOUI, assistantes administratives, pour leur efficacité et leur aide. Ainsi qu'Emmanuelle DENIEUL et Karine LABOUX, organisation du Réseau Doctoral en Santé Publique, d'avoir été toujours présentes pour les tâches administratives de l'EHESP.

Ces années de thèse ont été particulièrement agréables grâce aux autres doctorants, stagiaires et post-doctorants du laboratoire. Mes premières pensées vont à mes collègues de bureaux Emmanuel et Morgane avec qui j'ai su garder le parfait équilibre entre discussions scientifiques et parfois plus légères. Je remercie également, Hasbi, Moeen, Walid, Nouha, Mayumi, Rita, Corentin, Siavoche, Angela, Millicent, Christelle, Tahriri.

Enfin, j'ai apprécié le soutien apporté par mes colocataires Debashish, Pronobesh, Aditya. Celui apporté par mes amis Valentin, Nahuel, Antoine, Marwin, Camille, Sachin, Sylvain, Julien, Fabien, Nathan, Gary et tous ceux qui sont passés me voir à Nantes. Un grand merci à ma mère et mon père qui m'ont soutenu depuis toujours, ainsi qu'à l'ensemble de ma famille. Je finis en remerciant profondément Camille, merci de m'avoir soutenu dans tous les moments afin de réussir cette thèse.

Résumé

Les bioaérosols dégradent la qualité de l'air intérieur (QAI) et peuvent affecter la santé et le bien-être des personnes. L'échantillonnage d'aérosols microbiens dans l'air intérieur est essentiel mais la quantification/identification des microorganismes en faibles concentrations est difficile. Les filtres installés dans les centrales de traitement d'air (CTA) peuvent être considérés comme un échantillonneur à long terme accumulant la contamination microbienne pour évaluer la QAI. Ces travaux de thèse ont permis de développer une méthodologie pour analyser l'exposition aux contaminants microbiens de l'air intérieur dans des bureaux en utilisant les filtres de CTA. La méthodologie de prélèvement par coupons de média filtrant déposés sur les filtres d'extraction des CTA a été appliquée pendant 13 mois sur un bâtiment basse consommation. Des tests préliminaires ont montré que la présence des coupons à la surface du filtre n'augmentait pas la perte de charge et que l'efficacité de collecte des particules submicrométriques était de l'ordre de 50% en masse. Les comptages en unités formant colonies (UFC) et analyses par qPCR, RTqPCR et séquençages 16S/ITS ont été menés. Les concentrations microbiennes sur le filtre sont restées pratiquement stables au cours des 13 mois (entre 102 et 103 UFC/cm²). Les résultats par qPCR ont révélé des concentrations plus élevées comparé aux méthodes culturales. Les genres fongiques et bactériens identifiés correspondent à l'occupation du bâtiment (*Micrococcus*) mais aussi de l'air extérieur. Deux virus respiratoires ont été identifiés sur le filtre (*Adenovirus* et *Coronavirus*). Les filtres de CTA peuvent permettre d'analyser la contamination microbiologique de l'air intérieur. Cependant, d'autres études devront être menées pour optimiser cette méthodologie, notamment le rendement d'extraction des acides nucléiques.

Abstract

Bioaerosols deteriorate indoor air quality (IAQ) and can affect human health and well-being. Sampling of microbial aerosols in indoor air is critical but quantification/identification of microorganisms at low concentrations is difficult. Filters used in air handling units (AHUs) can be considered as a long-term sampler accumulating microbial contamination to assess IAQ. This PhD work aimed to develop a methodology to analyse exposure to microbial pollutants in indoor air in offices using AHU filters. A sampling methodology using filter media coupons on AHU filters was applied over 13 months. Preliminary tests showed that the presence of the coupons on the filter surface did not increase the pressure drop and that the collection efficiency of submicrometer particles was about 50% by mass. Colony-forming unit (CFU) counts and analyses by qPCR, RT-qPCR and 16S/ITS sequencing were conducted. Microbial concentrations on the filter remained almost stable over the 13 months (between 10^2 and 10^3 CFU/cm²). The qPCR results revealed higher concentrations compared to the cultural methods. The fungal and bacterial genera identified corresponded to the occupancy of the building (*Micrococcus*) but also to the outdoor air. Two respiratory viruses were identified on the filter (*Adenovirus* and *Coronavirus*). AHU filters can be used to analyze the microbiological contamination of indoor air. However, other studies will have to optimize this methodology, especially the extraction yield of nucleic acids.

Productions scientifiques

Publication dans une revue internationale avec comité de lecture

Pavard, G. ; Joubert, A. ; Andrès, Y. ; Le Cann, P. Analysis of Particulate and Microbiological Filtration Performance of Air Handling Unit Filters in a Low-Energy Office Building over 12 Months. *Buildings* 2022, 12, 1475. <https://doi.org/10.3390/buildings12091475>

Communications dans un congrès international ou national

Gianluigi Farru, Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Pierre Le Cann and Yves Andrès (2020). Airborne microbial contamination in indoor environments – comparison of sampling technologies for enumeration by cultivable method. *Indoor Air 2020 – Congrès en visioconférence* (Présentation orale)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. Evaluation d'une méthodologie utilisant les filtres de reprise des centrales de traitement d'air pour qualifier la qualité microbiologique de l'air intérieur des bureaux. *Congrès Français sur les Aérosols CFA 2022 – Paris, France* (Présentation orale)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. Tracking microbial and particle filtration efficiencies of air handling unit filters. *Indoor Air 2022 - Kuopio, Finlande* (Présentation orale)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. New methodology to qualify office microbial air quality with air-handling-unit-filters. *Indoor Air 2022 - Kuopio, Finlande* (Présentation orale)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. Développement d'une méthodologie d'analyse de la contamination de l'air intérieur de bureaux par l'étude des filtres de centrale de traitement d'air. *Journée SFGP Ouest « Virus et Procédés » 2021 – Séminaire en visioconférence* (Présentation orale)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. Développement d'une méthodologie d'analyse de la contamination microbiologique de l'air intérieur de bureaux par l'étude des filtres de centrale de traitement d'air. *Rencontres Scientifiques du Réseau Doctoral en Santé Publique 2021 (EHESP) – Rennes, France* (Courte présentation et poster)

Gaëtan Pavard, Aurélie Joubert, Yves Andrès, Pierre Le Cann. Développement d'une méthodologie d'analyse de la contamination microbiologique de l'air intérieur de bureaux par l'étude des filtres de centrale de traitement d'air. *Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale 2022 – Brest, France* (Poster)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	18
CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART	23
1. QUALITE DE L' AIR INTERIEUR : POLLUANTS ET SOURCES.....	24
1.1. Les polluants chimiques et physiques.....	24
1.2. Les contaminants biologiques	30
1.3. Impact sur la santé des occupants.....	31
2. CARACTERISATION DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE.....	33
2.1. Échantillonneurs pour l'analyse de la contamination microbiologique	33
2.1.1 Les impacteurs	34
2.1.2 Les impingers – échantillonneurs en milieu liquide.....	36
2.1.3 Technique par filtration.....	37
2.2. Analyses par culture microbienne et biologie moléculaire	38
2.3. Conclusions	40
3. TRAITEMENT DE L' AIR DANS LES BATIMENTS	41
3.1. Ventilation des bâtiments	41
3.2. Centrales de Traitement d'Air (CTA).....	42
3.3. Filtration de l'air.....	43
4. ÉTUDES REALISEES SUR LES CTA	45
5. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	49
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE ET METHODES.....	51
1. METHODOLOGIE GENERALE.....	52
1.1. Introduction et Principe général - stratégie	52
1.2. Méthodologie d'analyse avec prélèvement de coupons.....	53
1.2.1. Conception et description de la méthode d'échantillonnage par coupon.....	53
1.2.2. Analyses au laboratoire des échantillons.....	56
2. CARACTERISTIQUES DU BATIMENT, DE LA CTA ET DES FILTRES.....	58
2.1. Description du bâtiment	58
2.2. Description de la CTA et des filtres.....	59
2.2.1. Schéma de la CTA	59
2.2.2. Capteurs mis en œuvre.....	59
2.2.3. Caractéristiques des filtres et caractérisation du média filtrant	60
3. MATERIELS ET METHODES POUR L'ANALYSE DES PARTICULES ET AEROSOLS MICROBIENS	64
3.1. Mise au point de la méthodologie d'échantillonnage par coupon	64
3.1.1. Caractérisation du flux d'air au niveau du coupon.....	64
3.1.2. Caractérisation du flux d'air dans les filtres du compartiment d'extraction de la CTA	65
3.2. Caractérisation des particules	69
3.2.1. Concentration massique des particules	69

3.2.2. Distribution granulométrique des particules	69
3.3. <i>Caractérisation des aérosols microbiens</i>	71
3.3.1. Analyse des aérosols microbiens viables par impacteur Andersen	71
3.3.2. Échantillonnage par cassettes de filtration	74
3.3.3. Analyses en biologie moléculaire	74
4. CONCLUSIONS.....	79

CHAPITRE 3 : EFFICACITE DE FILTRATION DE LA CTA 80

1. INTRODUCTION	81
2. CONDITIONS CLIMATIQUES	81
3. MESURES DE LA CONCENTRATION ET DE LA DISTRIBUTION DES PARTICULES.....	85
4. MESURES DE LA CONCENTRATION MICROBIENNE	86
5. PERFORMANCE DE FILTRATION.....	90
5.1. <i>Perte de charge des filtres et efficacités de filtration particulière</i>	90
5.2. <i>Comparaison de l'efficacité de la filtration microbienne (EFM) fractionnée et de l'efficacité de filtration des particules (EFP).....</i>	93
5.3. <i>Identification bactérienne et fongique</i>	97
5.4. <i>Analyse des filtres des cassettes de filtration</i>	99
6. CONCLUSIONS.....	99

CHAPITRE 4 : CAMPAGNE DE PRELEVEMENT SUR LES FILTRES DE LA CTA 100

1. INTRODUCTION	101
2. CARACTERISATION DES AEROSOLS MICROBIENS PAR ECHANTILLONNAGE DANS L' AIR INTERIEUR ET ANALYSES CULTURALES ET GENOMIQUES	101
2.1. <i>Description de l'étude</i>	101
2.2. <i>Prélèvement des aérosols microbiens dans l'air par impacteur Andersen et analyse culturale</i>	103
2.3. <i>Prélèvement des aérosols microbiens dans l'air par cassette filtrante et analyse génomique</i>	105
2.4. <i>Conclusions</i>	105
2.5. <i>Prélèvement des coupons et empoussièremment du filtre</i>	106
3. RESULTATS DES ANALYSES PAR CROISSANCES MICROBIENNES.....	110
3.1. <i>Concentration en microorganismes cultivables</i>	110
3.2. <i>Comparaisons des microorganismes cultivables prélevés sur le filtre et en amont dans la gaine d'extraction</i>	113
3.3. <i>Identification des genres</i>	114
4. ANALYSES PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	116
4.1. <i>Concentration en ADN total sur les coupons et le filtre</i>	116
4.1.1 <i>Analyses bactériennes et fongiques en équivalent UFC/cm²</i>	117
4.1.2 <i>Analyses qPCR et RTqPCR des virus</i>	119
4.2. <i>Analyses des résultats de séquençage</i>	120
4.2.1 <i>Analyses des génomes bactériens</i>	121

4.2.2 Analyses séquençage des moisissures.....	126
5. COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES ET CONCLUSIONS	130
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.....	133
REFERENCES	139
ANNEXES	154

Liste des Figures

Figure 1-1 : Gammes de taille des particules et aérosols dans l'air, figure adaptée de (Rault, 1991) et (Dickenson,1997).....	29
Figure 1-2 : Principaux polluants et leurs origines dans une maison (adapté de González-Martín et al., 2021).....	30
Figure 1-3 : Voies de contamination par aérosols entre individus (adapté de Delikhoon et al., 2021).....	32
Figure 1-4 : Exemple d'un impacteur Andersen 6 étages.....	34
Figure 1-5 : Exemple d'un échantillonneur Mas-100.....	35
Figure 1-6 : Photographie d'un Biosampler SKC.....	36
Figure 1-7 : Photographie d'un μ -coriolis (Bertin).....	37
Figure 1-8 : Exemple de cassette de filtration.....	37
Figure 1-9 : Schéma d'une VMC à simple flux dans un logement collectif.....	42
Figure 1-10 : Exemple de composition d'une CTA (Bailly et al., 2001).....	43
Figure 1-11 : Les mécanismes de capture des particules dans un média fibreux (Berry et al., 2023).....	45
Figure 2-1 : Schéma de la méthodologie générale.....	53
Figure 2-2 : Photographies de deux méthodologies de prélèvement par coupons testées précédemment au GEPEA.....	54
Figure 2-3 : Filtre et coupons de média filtrant fixés à la surface des poches intérieures (A et B). Méthodologie d'analyse des coupons récupérés pendant la campagne d'échantillonnage (C.).....	55
Figure 2-4 : Efficacité et croissance de <i>S. epidermidis</i> après extraction d'un coupon inoculé avec une suspension bactérienne.....	57
Figure 2-5 : Photographie du Bâtiment d'IMT Atlantique Nantes hébergeant la CTA.....	58
Figure 2-6 : Schéma simplifié de la CTA étudiée et des différents points de prélèvement.....	59
Figure 2-7 : Photographie de la CTA étudiée.....	60
Figure 2-8 : Photographie d'un filtre à poches neuf mis en œuvre dans la CTA étudiée.....	60
Figure 2-9 : Bilan de trois tests de perméabilité du média filtrant.....	63
Figure 2-10 : Photographie du filtre avec les coupons avant les tests de perméabilité.....	64
Figure 2-11 : Schéma représentant la masse de fluorescéine déposée sur le média filtrant et sur les coupon (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).....	65

Figure 2-12 : Photographie de l'AGK2000 pendant la génération de fluorescéine en amont du compartiment d'extraction d'air	66
Figure 2-13 : Photographie des filtres après génération de fluorescéine	66
Figure 2-14 : Représentation de la répartition de la fluorescéine dans les poches des filtres neufs après quantification par spectrophotométrie	67
Figure 2-15 : Cartographie des coupons fixé dans les poche 2, 3 et 4 du filtre n°1 du compartiment d'extraction	68
Figure 2-16 : Représentation de la répartition de la fluorescéine dans les poches des filtres colmatés après quantification par spectrophotométrie	69
Figure 2-17 : Photographie du TEOM 1405 (A) et de l'APS (B).....	70
Figure 2-18 : Schéma de la méthodologie adoptée pour l'extraction des acides nucléiques. ..	75
Figure 2-19 : Workflow utilisé pour l'analyse des séquences.....	78
Figure 3-1 : Températures mesurées en amont et en aval des deux compartiments de la CTA. Moyenne glissante des données sur 24 heures.	83
Figure 3-2 : Humidités relatives mesurées en amont et aval du compartiment de l'air neuf et en amont du compartiment de l'air extrait. Moyenne glissante des données sur 24h.....	84
Figure 3-3 : Aérosols microbiens cultivables avec des milieux favorisant la croissance bactérienne. Prélèvements dans l'air neuf et extrait en amont des filtres de la CTA, sur 13 mois.	87
Figure 3-4 : Concentration des aérosols fongiques cultivables prélevés dans l'air neuf et extrait en amont des filtres de la CTA pendant 13 mois.	87
Figure 3-5 : Perte de charge du filtre sur 13 mois. Moyenne glissante des données sur 24 h..	90
Figure 3-6 : Efficacité totale de la filtration des particules (EFP_{tot}) sur 13 mois.	91
Figure 3-7 : Efficacité de filtration totale des particules et efficacité de filtration pour les aérosols de 0,5 μ m et 1 μ m de diamètre dans les compartiments d'air neuf (haut) et d'air extrait (bas) sur 13 mois.	92
Figure 3-8 : Efficacité de filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux bactériens en mai 2021 pour les compartiments de l'air neuf (haut) et de l'air extrait (bas).	93
Figure 3-9 : Efficacités de filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux fongiques en mai 2021 pour les compartiments frais (haut) et extraits (bas).	94

Figure 3-10 : Efficacités de filtration fractionnées pour les particules et les aérosols microbiens cultivables avec des milieux bactériens en février 2022 pour les compartiment air neuf (haut) et extraits (bas).	96
Figure 3-11 : Efficacité de la filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux fongiques en février 2022 pour les compartiments neuf (haut) et extraits (bas).	97
Figure 4-1 : Photographies de la salle du rez-de-chaussée du bâtiment J avec les impacteurs Andersen installés	101
Figure 4-2 : Photographies de la salle du rez-de-jardin du bâtiment J avec les impacteurs Andersen installés.	102
Figure 4-3 : Concentrations en aérosols microbiens cultivables dans les deux salles du bâtiment J prélevés par impaction sur milieux gélosés (impacteurs Andersen). Prélèvements en février 2021. N=1 ± 7%	103
Figure 4-4 : Concentrations en aérosols microbiens cultivables dans les deux salles du bâtiment J prélevés par impaction sur milieux gélosés (impacteurs Andersen). Prélèvements en février 2022. N=1 ± 7%	104
Figure 4-5 : Résultats par impaction Andersen dans le bâtiment et dans les gaines en amont du compartiment d'extraction Février 2021 à gauche et Février 2022 à droite	105
Figure 4-6 : Photographies du filtre avec les coupons après les prélèvements de mars 2021.	107
Figure 4-7 : Photographies du filtre à la fin de la campagne en février 2022.	107
Figure 4-8 : Évolution de la masse moyenne de la poussière collectée par les trois coupons prélevés chaque mois durant la campagne. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type des mesures (N=3 pour Fev21 à Fev22 et N=6 pour Fev22 filtre).	108
Figure 4-9 : Graphique représentant la perte de charge associée à la masse de poussière collectée sur le coupon (perte de charge de la journée précédant le jour de collecte).	109
Figure 4-10 : Évolution des concentrations en microorganismes cultivables par surface de coupon en UFC/cm ² extraits des coupons au cours de la campagne, extraction avec une solution de MgSO ₄ (0,01M).	110
Figure 4-11 : Évolution des concentrations en microorganismes cultivables par surface de coupon en UFC/cm ² extraits des coupons au cours de la campagne, extraction avec une solution de MgSO ₄ (0,01M) + Tween 20 (0,25%).	111
Figure 4-12 : Résultats des extractions d'ADN des coupons. Incertitude non représentée de ± 2 ng/μL, données fournisseur, soit 64 ng/cm ² après conversion.	116

Figure 4-13 : Résultats des qPCR avec les amorces fongiques.....	118
Figure 4-14 : Courbes de raréfaction pour le séquençage 16S.....	121
Figure 4-15 : Courbes du nombre de séquences pour le séquençage 16S.....	121
Figure 4-16 : Heat map (ou carte de chaleur) au niveau du phylum pour le séquençage 16S	123
Figure 4-17 : Répartition des taxons par échantillon au niveau du genre bactérien	125
Figure 4-18 : Courbes de raréfaction pour le séquençage ITS	126
Figure 4-19 : Courbes du nombre de séquences pour le séquençage ITS	127
Figure 4-20 : Indices de Shannon et Simpson pour le séquençage ITS	127
Figure 4-21 : Heat map au niveau du phylum pour le séquençage ITS	128
Figure 4-22 : Répartition des taxons par échantillon au niveau du genre de fungi.....	129
Figure 4-23 : Diagramme de parité avec UFC/cm ² mesuré par extraction Tween 20 sur DG18 et en abscisse les équivalents UFC/cm ² de <i>C. cladosporioides</i>	131

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Exemples de microorganismes pathogènes et des symptômes associés	33
Tableau 1-2 : Milieux de culture couramment utilisés pour l'analyse des aérosols microbiens	39
Tableau 1-3 : Exemples de protocole pour des analyses en biologie moléculaire à partir de filtres	39
Tableau 1-4 : Synthèse des avantages et inconvénients par techniques d'analyses des aérosols microbiens	40
Tableau 1-5 : Diamètres optiques des particules pour les classes de la norme ISO 16890.....	44
Tableau 1-6 : Synthèse des études menées sur les filtres de CTA pour l'analyse de la contamination microbienne	47
Tableau 2-1 : Photographies des observations au MEB des 3 couches du média filtrant.....	62
Tableau 2-2 : Données sur les tailles des fibres des couches du média filtrant	62
Tableau 2-3 : Milieux utilisés pour les impacteurs Andersen	72
Tableau 2-4 : Programme du thermocycleur pour les cibles <i>A. niger</i> et <i>P. chrysogenum</i>	76
Tableau 2-5 : Programme du thermocycleur pour les cibles <i>C. cladosporioides</i> et <i>S. aureus</i> . 76	
Tableau 2-6 : Programme du thermocycleur pour la cible <i>P. aeruginosa</i>	76
Tableau 2-7 : Virus ciblés par la trousse qPCR et RT-qPCR.....	77
Tableau 2-8 : Programme du thermocycleur pour le kit RT-qPCR.	77
Tableau 2-9 : Programme du thermocycleur pour le kit SARS-CoV-2	78
Tableau 3-1 : Statistiques sur la concentration massique des particules (moyenne, écart-type, percentiles).	85
Tableau 3-2 : Diamètres médians, écart-types géométriques et concentrations en nombre des particules dans l'air neuf et l'air extrait.	86
Tableau 3-3 : Diamètres moyens des aérosols microbiens cultivables (AMC) mesurés par impaction sur les cinq milieux.	88
Tableau 3-4 : Identification de colonies fongiques par observations microscopiques ou PCR sur colonies.....	98
Tableau 3-5 : Identification de colonies bactériennes par PCR sur colonies	98
Tableau 4-1 : Comparaison des données UFC/m ³ mesurés dans les gaines et par coupon.	113
Tableau 4-2 : Résultats des qPCR et RTqPCR avec les cibles virales.....	119
Tableau 4-3 : Présentation du nom des échantillons donnés pour les résultats de séquençage	120

Tableau 4-4 : Indices de Shannon et Simpson pour le séquençage 16S..... 122

Liste des annexes

Annexe 1 : Plan des deux étages du bâtiment J avec les surfaces des bureaux traités par la CTA Bureaux	155
Annexe 2 : Schémas aérauliques de la CTA Bureaux du bâtiment J	157
Annexe 3 : Données techniques des filtres de la CTA Bureaux (https://www.afprofilters.com)	159

Liste des abréviations

AHU	–	Air Handling Units
AMC	–	Aérosols Microbiens Cultivables
ASV	–	Amplicon Sequence Variant
BBC	–	Bâtiment Basse Consommation
COV	–	Composés Organiques Volatils
Cp	–	Concentration en Particules
CTA	–	Centrale de Traitement d’Air
EFM	–	Efficacité de Filtration Microbienne
EFP	–	Efficacité de Filtration Particulaire
ERP	–	Etablissement Recevant du Public
FMDs	–	Filter Media Disks
HCSP	–	Haut Conseil de la Santé Publique
ITS	–	Internal Transcribed Spacer
LQ	–	Limite de Quantification
MEB	–	Microscope Electronique à Balayage
MERV	–	Minimum Efficiency Reporting Value
OMS	–	Organisation Mondiale pour la Santé
OTU	–	Operational Taxonomic Unit
PBS	–	Phosphate-Buffered Saline
PM	–	Particulate Matter
QAI	–	Qualité de l’Air Intérieur
qPCR	–	quantitative Polymerase Chain Reaction
PSD	–	Particle Size Distribution
TCID	–	Tissue Culture Infectious Dose
RPM	–	Rotations Par Minute
RSD	–	Règlement Sanitaire Départemental
RT-PCR	–	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
UFC	–	Unités Formant Colonies
VGAI	–	Valeur Guide de l’air Intérieur
VMC	–	Ventilation Mécanique Contrôlée
VN	–	Ventilation Naturelle

Introduction générale

L'air que nous respirons à l'intérieur des bâtiments peut avoir un impact significatif sur notre santé et notre bien-être. La qualité de l'air intérieur (QAI) dépend de plusieurs facteurs, tels que la ventilation et la présence de sources de polluants. Les aérosols microbiens, en particulier, sont des particules en suspension dans l'air qui peuvent être des bactéries, des virus ou des moisissures. Ces aérosols peuvent être inhalés par les occupants d'un bâtiment. La présence de ces aérosols peut être à l'origine de problèmes de santé tels que les allergies, l'asthme, les infections respiratoires et même la transmission de certaines maladies toxiques.

Depuis le début de la pandémie de COVID-19, il a été montré que les aérosols jouent un rôle important dans la transmission des particules virales. Les particules virales peuvent rester en suspension dans l'air pendant de longues périodes et se propager dans les espaces intérieurs mal ventilés. La QAI est devenue un enjeu majeur pour prévenir la propagation de virus dans les espaces intérieurs. Des études ont montré que les systèmes de ventilation et de filtration de l'air peuvent réduire la concentration de particules virales dans l'air et contribuer à limiter la transmission de virus. En plus des mesures de ventilation et de filtration, d'autres mesures préventives telles que le port du masque, la distanciation sociale, les gestes barrières et le lavage régulier des mains restent essentielles pour prévenir la transmission des virus notamment respiratoires. Une bonne QAI est devenue un des aspects importants pour prévenir la propagation des aérosols microbiens dans les espaces clos.

Afin de maintenir une QAI convenable, des systèmes de ventilation mécanique sont mis en place. Ils présentent deux intérêts : renouveler l'air des environnements intérieurs et extraire les polluants présents. Les centrales de traitement d'air (CTA) sont des équipements essentiels pour maintenir une bonne QAI dans les bâtiments. Les CTA permettent de filtrer l'air entrant dans le bâtiment, d'ajuster la température et l'humidité de l'air, et de ventiler les espaces intérieurs pour évacuer les contaminants, avec la possibilité de recycler l'air extrait. La ventilation est particulièrement importante pour réduire la concentration des particules virales en suspension dans l'air, comme cela a été constaté pendant la pandémie liée à SARS-CoV-2. On retrouve des CTA dans des bâtiments tels que les hôpitaux, les locaux industriels, les bâtiments accueillant du public ou des bureaux par exemple. De plus, les CTA permettent d'améliorer la QAI en réduisant la concentration d'autres contaminants tels que les polluants atmosphériques, les allergènes, les composés organiques volatils (COV), et les particules fines.

Afin d'éliminer les particules de l'air insufflé dans les bâtiments, le procédé de séparation le plus utilisé est la filtration. Les CTA possèdent des filtres afin d'épurer les

particules en suspension dans l'air. L'efficacité de ce procédé est intéressante, le fonctionnement et la maintenance sont relativement simples à mettre en œuvre. Enfin il existe différents média filtrants et différentes géométries pouvant s'adapter aux installations. Plusieurs considérations sont à prendre en compte pour le choix des filtres selon la nature des polluants à capter, les performances énergétiques et la qualité d'air recherchée dans les espaces intérieurs.

Pour déterminer si les performances de filtration sont convenables et que la QAI est suffisante pour le bien-être des occupants et l'intégrité du bâtiment, des analyses de l'air peuvent être effectuées. Concernant la mesure des aérosols microbiens, des échantillonneurs ou collecteurs sont actuellement disponibles. Cependant, ces échantillonneurs ne sont pas parfaitement représentatifs de la contamination microbiologique réelle de l'air intérieur. Car plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette limitation, tels que la position choisie pour la collecte. L'emplacement peut influencer les résultats des mesures. Les collecteurs placés trop près d'une source de contamination peuvent surévaluer la concentration de bioaérosols, tandis que les échantillonneurs placés trop loin peuvent sous-estimer la concentration de bioaérosols. Suivant les mécanismes de collecte, certains échantillonneurs peuvent être spécifiques à une classe d'aérosol microbien propre. Ils peuvent avoir une certaine sélectivité envers certains types de microorganismes. Ce qui peut entraîner une sous-représentation ou une surestimation de la contamination en fonction des contaminants recherchés. Le débit d'air des collecteurs peut également être limitant. Les échantillonneurs de bioaérosols ont un débit d'air limité et ne peuvent parfois pas réaliser des prélèvements sur une grande durée de temps. Cela peut conduire à une sous-estimation de la contamination microbienne de l'air intérieur, surtout lorsque les contaminants microbiens sont peu nombreux. L'activité qui réside dans les pièces à analyser mais aussi l'ouverture des fenêtres peut influencer grandement sur la concentration et la qualité des contaminants pouvant être collectés.

La représentativité de l'échantillonnage est alors à interpréter avec précaution lors de l'analyse des résultats. Afin de proposer une nouvelle approche d'échantillonnage pour l'investigation de la QAI microbiologique d'un bâtiment, le laboratoire IRSET de l'EHESP à Rennes et le laboratoire GEPEA d'IMT Atlantique à Nantes se sont associés pour une étude sur les filtres de CTA. Le concept proposé représente le fruit de plusieurs travaux de thèse réalisés auparavant sur les CTA, leurs filtres et leurs performances. Ces filtres de CTA sont en place et en exploitation sur des périodes allant jusqu'à plusieurs mois. Ils accumulent pendant cette période l'ensemble des particules en suspension dans l'air collectées. Cette fonction d'accumulation des aérosols sur le long-terme peut donc être utilisée pour évaluer la présence

des bioaérosols microbiens dans les environnements intérieurs. Le travail de thèse développé dans ce manuscrit a consisté à **Développer une méthodologie d'étude de la contamination microbiologique de l'air intérieur de bureaux par l'analyse des filtres de centrale de traitement d'air**. Les espaces intérieurs étudiés sont des bureaux car cette étude a été menée sur une CTA traitant l'air de bureaux d'un bâtiment basse consommation (BBC) d'IMT Atlantique sur le campus de Nantes.

Ces travaux de thèse visent deux principaux objectifs lors d'une campagne terrain de 13 mois :

- Caractériser la CTA, ses performances de filtration vis-à-vis des particules, aérosols microbiens et les conditions de température et d'humidité relative.
- Développer une méthode permettant d'échantillonner la contamination microbiologique de l'air intérieur en utilisant les filtres de CTA.

Le premier chapitre présente les différents éléments bibliographiques sur la QAI avec les polluants et leurs sources, la caractérisation de la contamination microbiologique, le traitement de l'air dans les bâtiments. Enfin, le chapitre présente les études précédemment réalisées à l'échelle des CTA pour l'analyse de l'air intérieur.

Le deuxième chapitre décrit la méthodologie générale déployée pour cette étude, et les différentes étapes qui ont été réalisées afin d'adopter le protocole le mieux adapté à la CTA étudiée.

Le troisième chapitre présente les résultats concernant les conditions climatiques et les efficacités de filtration particulaire et microbiologique de la CTA étudiée à partir de mesures dans les gaines de ventilation en amont/aval des filtres de soufflage et d'extraction.

Le quatrième chapitre est dédié aux résultats des analyses microbiologiques de la campagne de prélèvement des coupons disposés sur le filtre d'extraction de la CTA, d'une part les analyses par cultures microbiennes, puis celles réalisées par biologie moléculaire.

Enfin, le manuscrit rappelle les principales conclusions des différents chapitres et les résultats marquants obtenus après la campagne terrain de 13 mois, pour finir en décrivant les pistes d'études et perspectives d'utilisation de cette nouvelle méthodologie d'analyse de la QAI.

Chapitre 1 : État de l'art

Ce premier chapitre a pour but de présenter dans un premier temps les différents polluants de l'air intérieur et les enjeux de santé publique liés à leur exposition. Une deuxième partie concerne la caractérisation des polluants particulaires de l'air intérieur et particulièrement les aérosols microbiens. La partie suivante présente les différentes stratégies mises en place dans les bâtiments pour l'aération et l'amélioration de la qualité de l'air intérieur. Une quatrième partie présente les études réalisées sur les Centrales de Traitement d'Air (CTA) pour analyser la contamination microbiologique de l'air intérieur. Enfin une dernière partie conclut ce chapitre et détaille les objectifs fixés pour ces travaux de thèse.

1. Qualité de l'air intérieur : polluants et sources

La pollution de l'air intérieur et les différents éléments qui la compose peuvent être classés selon leur nature :

- les polluants chimiques et physiques
- les contaminants biologiques

Les polluants majoritaires retrouvés dans l'air intérieur sont détaillés dans les prochains paragraphes. Les origines ou sources de ces polluants sont résumées avec un focus particulier sur les contaminants biologiques.

1.1. Les polluants chimiques et physiques

Les études sur la qualité de l'air intérieur ont principalement été menées sur les polluants à l'état de gaz et particulaire. On retrouve une grande diversité de polluants chimiques avec plus de 400 différents composés identifiés avec de grandes variations en termes de concentrations et de propriétés (Gale et al., 2009). Parmi les principaux polluants chimiques, certains peuvent être cités.

Le dioxyde de carbone (CO₂) est utilisé fréquemment comme indicateur pour apprécier le niveau de confinement et du besoin de ventilation dans un espace occupé. En France, la valeur limite réglementaire indicative d'exposition moyenne sur 8 h est de 5000 ppm (9000 mg/m³) pour le CO₂ (ANSES - *Concentrations de CO₂ dans l'air intérieur et effets sur la santé. 2013.*) Le HCSP (Haut Conseil de la Santé Publique) a rédigé un avis en accord avec le titre III des règlements sanitaires départementaux (RSD) et fixe un seuil en CO₂ de 1000 ppm dans des conditions normales d'occupation avec une tolérance à 1300 ppm dans les locaux où fumer est

interdit. Il n'y a pas de fondement sanitaire explicite dans ces deux valeurs (*HCSP 2022 - Avis relatif à la mesure du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'air intérieur des établissements recevant du public (ERP)*).

Lorsque les niveaux de concentration en CO₂ sont élevés, les occupants sont plus susceptibles d'être dérangés par la sensation de mauvaises odeurs et développer des problèmes cutanés ou symptômes sur des muqueuses et voies respiratoires inférieures et de présenter des maux de tête et une diminution des performances cognitives (Erdmann & Apte, 2004; Hou et al., 2021).

Le monoxyde de carbone (CO) est un gaz toxique par inhalation provenant de processus de combustion incomplets. Ce gaz est émis principalement par des appareils de cuisson et de chauffage défectueux, les gaz des véhicules dans les garages et la fumée de tabac (Chowdhury et al., 2013; Fazlzadeh et al., 2015). Le CO se fixe à l'hémoglobine dans le sang avec une plus grande affinité que celle de l'oxygène. Cette fixation diminue le transport de l'O₂ dans l'organisme et conduit à une hypoxie tissulaire. Les dommages peuvent être des problèmes cardiovasculaires, neurologiques ou respiratoires pouvant entraîner la mort, en fonction de la concentration et de la durée d'exposition (Chenoweth et al., 2021).

Le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) sont les plus communs et les plus importants oxydes d'azote. Le NO est produit dans une plus large mesure et est ensuite oxydé en NO₂ en présence d'oxygène, d'ozone ou de COV. Les sources intérieures les plus fréquentes de NO_x sont les appareils à gaz comme les cuisinières, les fours ou les chauffe-eaux. La fumée de cigarette et les cheminées peuvent également contribuer aux émissions de NO_x. L'air extérieur influence fortement les niveaux intérieurs, en particulier à courte distance des routes ou des zones industrielles à forte densité (Hwang & Park, 2020). Le NO₂ inhalé est transformé en acide nitrique dans les poumons, ce qui entraîne des dommages aux cellules et au système immunitaire. L'inhalation peut provoquer des dysfonctionnements respiratoires en lien avec d'autres pathologies. Le NO₂ peut également provoquer une irritation des yeux par contact direct (Gillespie-Bennett et al., 2011).

L'ozone (O₃) est un produit de réaction photochimique dans les atmosphères polluées, mais il peut également être libéré par des appareils tels que les purificateurs ioniques d'air, les générateurs d'ozone, les filtres électrostatiques, les imprimantes et les photocopieurs entre autres. Des températures plus élevées peuvent favoriser la formation de O₃ et également accélérer la réaction entre différents précurseurs et leurs produits intermédiaires, en particulier

les radicaux libres (Coates et al., 2016). De faibles quantités d'O₃ peuvent provoquer une irritation des yeux, des troubles visuels, des maux de tête, des vertiges, une sécheresse de la bouche et de la gorge, une oppression thoracique et de la toux (Hwang & Park, 2020). L'exposition à des concentrations relativement élevées de ce gaz a été associée à des douleurs thoraciques, la toux, la difficulté à respirer et l'irritation des voies respiratoires, ainsi qu'à l'aggravation de l'asthme.

Le benzène est un composé organique volatil (COV) largement utilisé dans l'industrie. Les sources intérieures de benzène comprennent les fumées de tabac, les dispositifs de combustion et les matériaux de construction tels que les meubles en polymère, les moquettes, les peintures, les solvants, les différents plastiques et la proximité d'un garage (essence) (Campagnolo et al., 2017; Carazo Fernández et al., 2013). Les émissions de benzène se dégradent avec le temps, ainsi les niveaux sont beaucoup plus élevés dans les bâtiments neufs ou rénovés. Les risques pour la santé en cas d'intoxication aiguë sont faibles (par exemple, des maux de tête pour une exposition de 5 h à 150-500 mg/m³), bien que le benzène soit un produit chimique cancérigène et génotoxique avéré en cas d'exposition chronique. Le benzène peut également induire des maladies du sang et des problèmes neurologiques et reproductifs (Falzone et al., 2016; Snyder et al., 1993). Aucun niveau d'exposition sans danger n'est recommandé. Le niveau le plus élevé de benzène a été enregistré dans les zones commerciales (2,5 - 48 µg/m³), suivi des bureaux (1,4 - 5,5 µg/m³), des habitations (0,7 - 4,4 µg/m³) et des écoles (0,5 - 3 µg/m³) (Dodson et al., 2008; Du et al., 2015).

Le toluène, présent dans l'essence, les peintures, les résines, les adhésifs, les cosmétiques et les revêtements, est l'un des polluants de l'air intérieur les plus courants et le plus abondant parmi les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène). Les sources intérieures comprennent l'infiltration de l'air extérieur, la fumée de tabac, les dispositifs de combustion et divers produits ménagers (Carazo Fernández et al., 2013; Du et al., 2015; Robert et al., 2021). Le toluène n'est pas une substance cancérigène confirmée, et donc aucun effet sur la santé à long terme n'a encore été étudié. L'exposition au toluène augmente les risques de développer de l'asthme et d'autres affections respiratoires, tandis que l'exposition à court et à long terme peut affecter le système nerveux central. Les complexes commerciaux présentent les concentrations de toluène les plus élevées (15 - 164 µg/m³) (Robert et al., 2021), suivis des bureaux (6 - 32 µg/m³) (Mandin et al., 2017) et des habitations (3 - 20 µg/m³) (Dodson et al., 2008; Du et al., 2015). La présence de toluène dans les écoles est marginale (1,8 µg/m³). Les concentrations sont généralement plus élevées dans les bâtiments neufs ou récemment rénovés en raison des

nouveaux matériaux installés (Broderick et al., 2017; Dodson et al., 2008; Du et al., 2015; Mandin et al., 2017).

Le formaldéhyde est un gaz hautement réactif émis lors de la réaction incomplète des hydrocarbures. Le formaldéhyde est également produit par l'oxydation d'autres COV avec de l'ozone ou des radiations (Campagnolo et al., 2017). Ce produit chimique est largement utilisé dans les résines, les colles, les peintures, les produits en papier, les cosmétiques, les équipements électroniques, les agents de nettoyage et les tissus. Le formaldéhyde est présent dans les matériaux de construction tels que les mousses isolantes ou les matériaux à base de bois utilisés dans les planchers ou les meubles. Cependant, les émissions de ces matériaux (par exemple, le contreplaqué, les panneaux de particules ou de fibres) se décomposent généralement en quelques semaines (Carazo Fernández et al., 2013). Le formaldéhyde est rapidement absorbé par le système respiratoire ou gastro-intestinal. Les effets d'une exposition aiguë comprennent une odeur, une irritation, des maux de tête et de l'eczéma. Le formaldéhyde est un produit chimique cancérigène et génotoxique connu, dont l'exposition à long terme peut être à l'origine d'un cancer du nasopharynx et d'une leucémie myéloïde. Le niveau d'exposition dans les maisons, les bureaux et les écoles est comparable (7,7-30, 8-17, 9-17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Broderick et al., 2017; Canha et al., 2017; Dodson et al., 2008; Mandin et al., 2017; Prasauskas et al., 2016). Une valeur guide de qualité d'air intérieur (VGAI) a été fixée par l'ANSES à 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

L'alpha-pinène est un terpène liquide naturellement présent dans les plantes et un constituant commun des huiles essentielles. L'alpha-pinène est utilisé comme solvant dans certaines peintures et substances imperméables, et on le retrouve dans les produits de parfumerie, les désodorisants et les produits de nettoyage. Les émissions de pinène peuvent également provenir de matériaux en bois comme les meubles ou les revêtements de sol, notamment ceux fabriqués à partir de bois de pin (Campagnolo et al., 2017; Luengas et al., 2015). Si une exposition aiguë à une forte concentration peut produire une irritation et une inflammation, aucun risque d'exposition chronique n'a encore été signalé. Des risques sanitaires pourraient être attendus en présence d'ozone ou d'autres radicaux réactifs, en raison de leur forte réactivité avec le pinène et d'autres molécules insaturées (Hubbard et al., 2005 ; Kotzias et al., 2005 ; Leung, 2015). Ces sous-produits de réaction produiraient une irritation des yeux et des voies aériennes supérieures de manière plus étendue que le pinène lui-même. Les concentrations de pinène les plus importantes sont observées dans les habitations (11-32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) et les bibliothèques (10-30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), tandis que les bureaux et les écoles présentent des

concentrations atteignant respectivement 6,3 et 1,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Dodson et al., 2008 ; Langer et al., 2015 ; Mandin et al., 2017).

Le limonène est un terpène naturel et peut être utilisé dans une grande variété de produits ménagers comme les agents de nettoyage, les résines, les désodorisants, les parfums et les shampooings (Campagnolo et al., 2017; Luengas et al., 2015). Ce terpène se retrouve également dans l'alimentation comme additif en raison de son odeur et de sa saveur citrique. L'absorption de limonène se fait par inhalation ou par ingestion. Ce polluant a une faible toxicité aiguë, aucun symptôme autre que l'irritation des yeux ou de la peau n'a été décrit. Les effets chroniques du limonène sur la santé n'ont pas été étudiés. Les risques sanitaires sont associés à la réaction avec l'ozone ou les radicaux réactifs, qui forment des sous-produits tels que des aldéhydes, des acides carboxyliques et des peroxydes, responsables d'irritations et de nuisances olfactives à de faibles concentrations. Des concentrations maximales de 32, 19 et 11 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ont été enregistrées respectivement dans les maisons, les bureaux et les écoles (Dodson et al., 2008; Du et al., 2015; Mandin et al., 2017).

Dans le groupe des polluants physiques on retrouve les particules en suspension dans l'air que l'on appelle aérosols. Les aérosols peuvent être définis comme des particules liquides ou solides en suspension dans l'air ou dans un milieu gazeux, ou bien déposées sur une surface et susceptibles d'être mis en suspension dans des conditions normales de température, humidité et pression (Le Coq, 2006). Les aérosols sont de composition chimique, de forme et de taille variées, dont les diamètres s'échelonnent du nanomètre à 100 μm ; ils ont aussi une vitesse limite de chute négligeable (Renoux & Boulaud, 1998). Dans ce groupe, on peut y retrouver les poussières, les suies et fumées, les brumes et brouillards, les gouttelettes et les particules avec un matériel biologique. Les aérosols sont importants dans la physicochimie de l'atmosphère, notamment dans le processus de formation des nuages et des précipitations. Ils sont également impliqués dans le trou dans la couche d'ozone stratosphérique et le réchauffement climatique.

Les PM (*Particulate Matter*) sont des particules en suspension dans l'air. On retrouve dans les PM les fibres telles que des fibres de verre ou des fibres d'amiante qui peuvent être incluses dans ce groupe (Carazo Fernández et al., 2013). Les PM présents dans l'air intérieur peuvent provenir de l'extérieur par la ventilation des bâtiments. Ces particules peuvent également avoir comme origine des sources liées à l'utilisation de combustible lors de l'utilisation de four, systèmes de chauffage, la consommation de tabac notamment. Les PM

peuvent aussi être formés par des réactions entre l’ozone et des COV présents dans l’air par exemple.

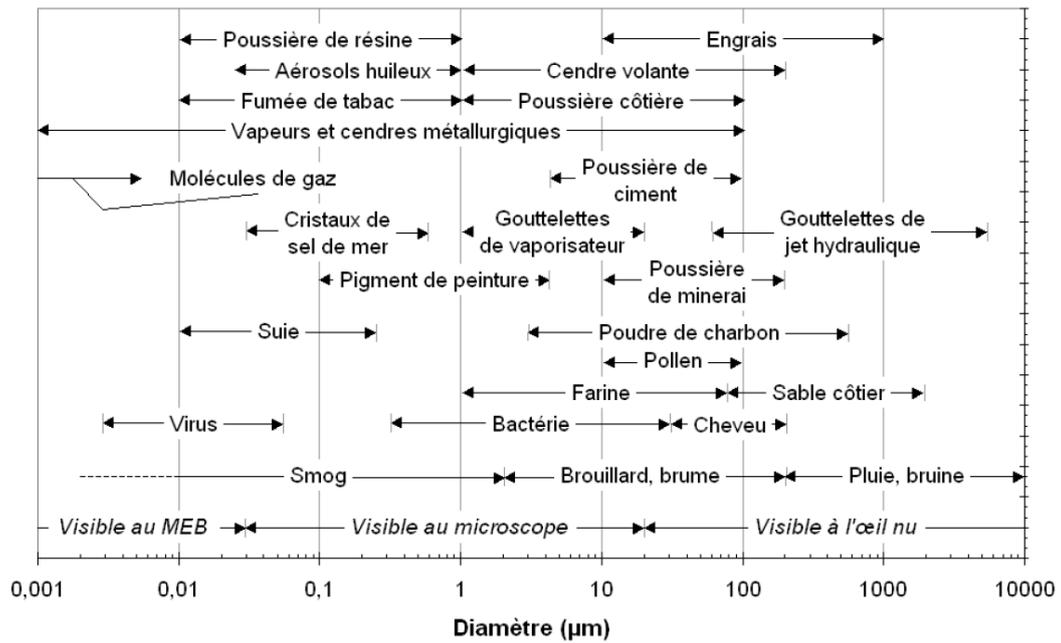


Figure 1-1 : Gammes de taille des particules et aérosols dans l’air, figure adaptée de (Rault, 1991) et (Dickenson, 1997).

La Figure 1-1 présente différents aérosols atmosphériques en fonction de leur taille. On retrouve les tailles des virus et des bactéries pour les comparer aux autres aérosols communs.

La Figure 1-2 présente les sources typiques de polluants retrouvés dans l’air intérieur d’une habitation. Ces polluants, dont les PM, CO, NO_x, O₃ et les COV ont été sélectionnés en fonction de leur présence dans les espaces intérieurs.

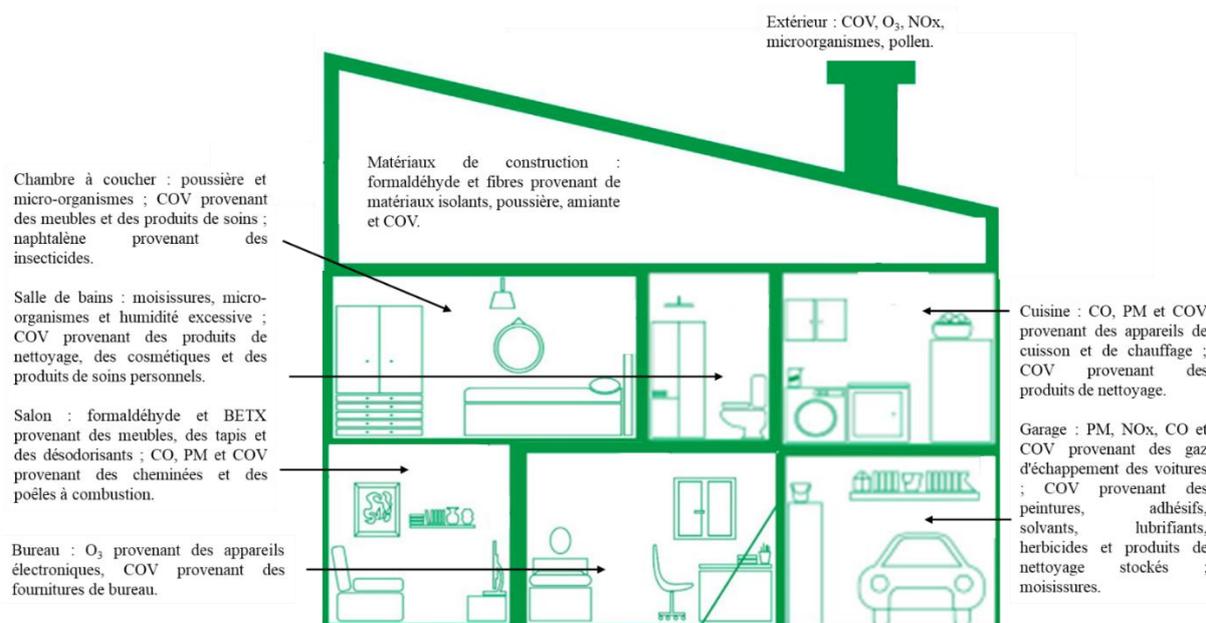


Figure 1-2 : Principaux polluants et leurs origines dans une maison (adapté de González-Martín et al., 2021).

1.2. Les contaminants biologiques

Les aérosols ayant pour origine une source biologique sont appelés des bioaérosols. Les bioaérosols sont définis comme des particules d'origine microbienne, animale ou végétale en suspension dans l'air (Duquenne & Greff-Mirguet, 2005). Parmi les bioaérosols, il est possible de trouver des fragments biologiques, tels que les pollens, les fragments d'insectes, les enzymes, les cellules de peau, les allergènes, des poils, et des organismes protozoaires. Une autre catégorie retrouvée est celle des aérosols microbiens. Dans cette catégorie on retrouve les virus, les moisissures, les bactéries et certaines archées.

Les bactéries, les virus et les moisissures peuvent avoir différentes caractéristiques :

- Ils peuvent être viables et cultivables
- Viables mais non-cultivables
- Non-viables (microorganismes morts)

Le milieu aérien est un environnement qui n'est pas naturellement propice à la survie des microorganismes. Beaucoup de microorganismes ne peuvent pas subsister pendant de longues périodes dans l'air à cause de la dessiccation et du rayonnement UV notamment. Les impacts de ces aérosols microbiens sont développés dans la partie suivante.

1.3. Impact sur la santé des occupants

La pollution de l'air et l'exposition à une mauvaise qualité de l'air est un enjeu de santé publique des plus importants ces dernières années. Selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Maynard et al., 2017), à échelle mondiale, une personne sur dix décède à cause de la pollution de l'air. Plusieurs études ont montré l'impact de la pollution atmosphérique sur la santé des occupants, mais aussi plus récemment ses impacts sur la qualité de l'air intérieur. Voici premièrement un exemple d'étude concernant l'impact des PM.

Les PM_{2,5} présents dans tous les environnements urbains sont principalement d'origine humaine et dépassent souvent les limites réglementaires fixées par l'OMS. L'exposition à ces particules constitue une menace récente pour la santé humaine. Dans le cas de la pollution atmosphérique par les particules fines, leur petite taille signifie que leurs effets vont au-delà des réactions inflammatoires dans les poumons. La pénétration des particules ultrafines dans le système sanguin produit des effets qui peuvent se répandre sur l'entièreté du corps humain, effets qui sont encore peu étudiés. L'impact sur la santé de l'utilisation de la ventilation naturelle dans les espaces de travail situés dans de grands environnements urbains pollués, et la diminution de l'espérance de vie qui en résulte a été étudiée. Cette diminution de l'espérance de vie peut aller de 7 à 12 mois dans les environnements très pollués comme à New Delhi, à 1 à 2 mois dans les villes européennes et californiennes (Martins & Carrilho da Graça, 2020). De plus, il est communément acté que l'activité physique réduit le risque de maladie cardiovasculaire, mais dans le cas d'une exposition longue de travailleurs aux particules fines PM_{2,5} associée à une activité physique augmente les réactions inflammatoires.

Les aérosols microbiens peuvent être à l'origine de transmission de maladies, notamment lors des épisodes d'épidémies de pathologies respiratoires. Par convention, la transmission des maladies infectieuses est classée en trois voies : par voie aérienne, par contact et par gouttelettes. Des procédures de lutte contre les infections et des équipements de protection individuelle uniques sont recommandés pour chaque voie. La transmission par voie aérienne est définie comme résultant de l'inhalation de petites particules, souvent appelées noyaux de gouttelettes et considérées comme ayant un diamètre de 5 µm ou moins.

Des personnes sont infectées par transmission aérienne uniquement lorsqu'elles se trouvent à une certaine distance, relativement longue, de la source infectieuse. La transmission par contact peut être directe ou indirecte. Dans le cas d'un contact direct, l'agent pathogène est transféré directement d'une personne infectieuse à une personne sensible, alors que dans le cas

d'un contact indirect, l'agent pathogène est transmis à la personne sensible par le biais d'un autre objet, comme une surface contaminée. La transmission par gouttelettes est un type de contact direct impliquant des gouttelettes émises par les voies respiratoires d'une personne infectée, comme indiqué dans la Figure 1-3 (Jones & Brosseau, 2015). Les particules émises par les voies respiratoires d'une personne infectieuse, généralement considérées comme ayant un diamètre supérieur à $5\ \mu\text{m}$, peuvent se déplacer directement vers la muqueuse faciale d'une personne sensible.

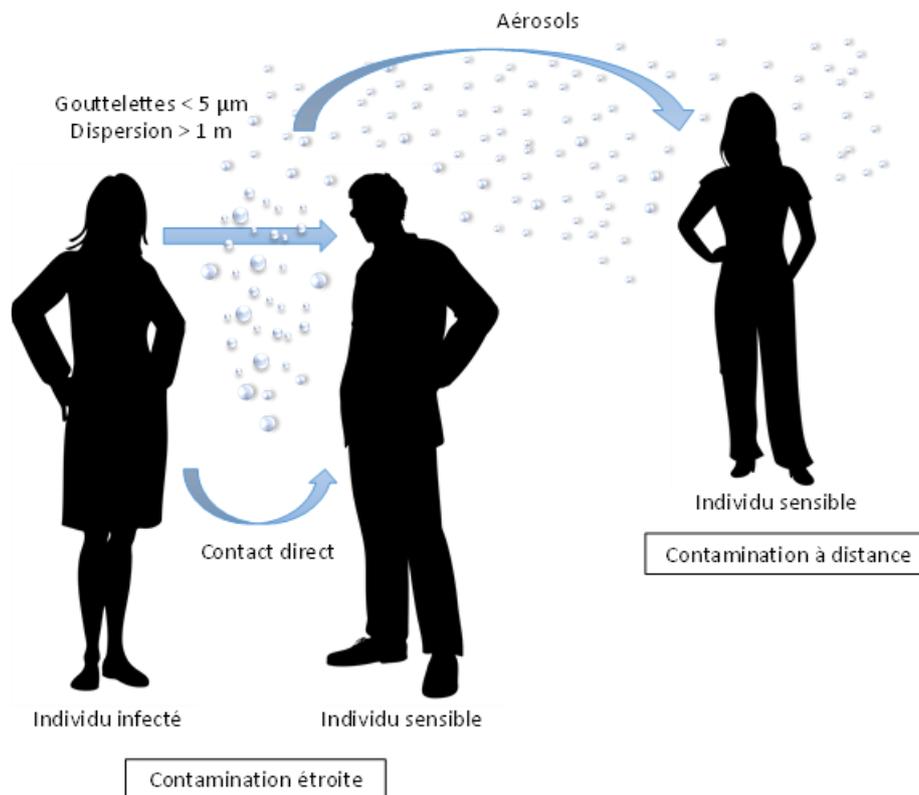


Figure 1-3 : Voies de contamination par aérosols entre individus (adapté de Delikhoon et al., 2021).

La pandémie COVID-19 a justement mis en avant l'importance de la contamination des voies respiratoires par les aérosols (Santarpia et al., 2020). La ventilation des bâtiments et l'entretien des installations pour maintenir une bonne qualité de l'air intérieur sont des sujets qui ont été remis en avant à la suite de la pandémie de SARS-CoV-2. Les autorités sanitaires ont communiqué sur les bonnes pratiques à adopter au quotidien pour prévenir la propagation des virus dans l'air. Les particules virales sont l'un des nombreux polluants auxquels nous sommes exposés par contact direct et/ou en respirant l'air intérieur (Y. Li et al., 2007; Qian et al., 2021; Szekeres et al., 2022).

Microorganismes	Symptômes
<i>Legionella pneumophila</i>	Légionellose
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
<i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus</i>	Allergies broncho-pulmonaires, asthme
<i>Influenza</i>	Grippe
<i>Rhinovirus</i>	Rhume, asthme, inflammation des voies aériennes
<i>SARS-Cov-2</i>	Maladies à coronavirus

Tableau 1-1 : Exemples de microorganismes pathogènes et des symptômes associés

Le Tableau 1-1 présente des exemples de microorganismes pathogènes et responsables des symptômes associés. Ces microorganismes peuvent être présents sous forme d'aérosols dans l'air et participer à la transmission des maladies. Une très faible concentration de ces aérosols microbiens est nécessaire à leur propagation. Ces niveaux de contaminations peuvent être en dessous du seuil de détection des collecteurs disponibles et par conséquent les agents pathogènes ne sont pas détectés malgré la contamination des occupants inhalant l'air intérieur.

2. Caractérisation de la contamination microbiologique

2.1. Échantillonneurs pour l'analyse de la contamination microbiologique

Afin d'analyser la qualité microbiologique de l'air, des échantillonneurs ont été développés pour réaliser des prélèvements. Les échantillonneurs sont conçus pour collecter une fraction des bioaérosols en suspension en fonction des contraintes liées à l'environnement, les conditions climatiques, les microorganismes ciblés. Pour répondre à ces problématiques, différents mécanismes de capture de ces aérosols sont utilisés :

- Technique par impaction
- Collecte en milieu liquide – impingers
- Filtration

2.1.1 Les impacteurs

Les impacteurs utilisent la technique par impaction pour collecter les aérosols microbiens. Avec cette technique, un flux d'air est créé et passe à travers des orifices et les particules s'impactent sur une surface. Les caractéristiques techniques des orifices, la vitesse du flux d'air (débit de prélèvement) et la surface d'impaction sont des facteurs importants à prendre en compte pour cibler des microorganismes en particulier. L'efficacité d'échantillonnage est également liée à ces paramètres.

Il existe deux types d'échantillonneurs par impaction : les impacteurs mono-étage et les impacteurs en cascade permettant de discriminer les aérosols impactés en fonction de leur diamètre. Les différents étages possèdent une limite basse et une limite haute du diamètre aérodynamique des aérosols allant s'impactant sur la surface du plateau. Les particules d'un diamètre élevé vont s'impacter sur le premier obstacle (appelé également plateau) tandis que les particules plus légères continueront sur le plateau inférieur.

De multiples études ont été menées en utilisant les impacteurs Andersen (Tish Environmental Inc., USA) en cascade tel que celui présenté en exemple sur la Figure 1-4.



Figure 1-4 : Exemple d'un impacteur Andersen 6 étages

L'impaction permet de collecter les bioaérosols directement sur une boîte de Petri avec un milieu gélosé. Les particules sont séparées du flux d'air et récoltées sur la gélose pour s'assurer de l'efficacité de la collecte. La viabilité des bioaérosols est également garantie pendant l'échantillonnage pour obtenir des niveaux représentatifs d'exposition des individus aux agents pathogènes présents dans l'air. Les impacteurs en cascade Andersen comporte 6 ou

8 étages dont une succession d'orifices permet de classer des plus grosses jusqu'aux plus fines particules (Andersen, 1958). Le débit de fonctionnement de l'impacteur est de 28,3 L/min. L'impacteur à 6 étages comporte une surface gélosée qui permet de minimiser le rebond des particules pour garantir un échantillonnage efficace (Chang & Wang, 2015; Pastuszka et al., 2000; Zhao et al., 2021).

La méthode utilisée permet le dénombrement des microorganismes cultivables, c'est-à-dire ceux qui ont la capacité de se développer sur les milieux de culture utilisés et aux conditions de croissance fournies (température, oxygène, humidité, lumière, etc.) dans le laboratoire. L'impacteur à 6 étages permet en plus de séparer les particules en fonction de leur taille, allant de plus de 8 μm sur l'étage du haut à moins de 1 μm sur l'étage du bas.



Figure 1-5 : Exemple d'un échantillonneur Mas-100

L'échantillonneur d'air MAS-100® (Merck, Darmstadt, Germany) présenté dans la Figure 1-5, est un échantillonneur basé sur le principe d'impaction. L'air ambiant est aspiré à travers un couvercle perforé et les particules, dont les microorganismes, s'impactent sur la surface du milieu de croissance dans une boîte de Pétri standard de 90 -100 mm ou des plaques de contact de 55 - 60 mm. Les microorganismes adhèrent au milieu de culture et, après une période d'incubation appropriée, les colonies sont comptées et analysées. Le débit d'air échantillonné est régulé à une valeur constante de 100 L/min (Adams & Dancer, 2020; Engelhart et al., 2007; Łukaszuk et al., 2017).

2.1.2 Les impingers – échantillonneurs en milieu liquide



Figure 1-6 : Photographie d'un Biosampler SKC

Le BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA) est un dispositif de collecte en verre qui nécessite une pompe à flux sonique de grand volume pour piéger les microorganismes en suspension dans l'air dans un liquide collecteur. C'est le principe de fonctionnement des échantillonneurs liquides appelés aussi *impinger*. La conception de l'entrée du BioSampler permet la collecte des particules en suspension dans l'air. L'échantillonneur est utilisé avec une pompe à air fonctionnant à débit constant de 12,5 L/min. Le liquide collecteur capte les particules en créant un vortex via l'orientation des buses à la surface du liquide.

Le BioSampler peut être utilisé avec des liquides de collecte non évaporant dont la viscosité est supérieure à celle de l'eau comme des huiles minérales spéciales pour l'échantillonnage des bioaérosols. Il est alors possible d'effectuer des prélèvements avec des temps d'échantillonnage plus conséquents. Les Biosamplers ont été utilisés dans différentes études pour la collecte d'aérosols microbiens tel que les virus (Kutter et al., 2021; J. Li et al., 2018; Truyols Vives et al., 2022; Zupin et al., 2021).



Figure 1-7 : Photographie d'un μ -Coriolis (Bertin)

L'échantillonneur d'air μ -Coriolis (Bertin Technologies, France) permet d'échantillonner l'air intérieur et extérieur. C'est un échantillonneur impinger ayant un volume du liquide de collecte de 15 mL. La durée d'échantillonnage peut varier de quelques minutes seulement en raison du débit d'air élevé (100 à 300 L/min) à plus de 6 h pour une surveillance prolongée de l'air.

Le μ -Coriolis permet l'analyse de la QAI en milieu médical ou sanitaire, l'échantillonnage des virus et le contrôle des risques sanitaires. Il est possible d'effectuer des analyses en biologie moléculaire et des analyses culturales sur le liquide de collection après échantillonnage (Abeykoon et al., 2022; Silva et al., 2022; Watt et al., 2020).

2.1.3 Technique par filtration



Figure 1-8 : Exemple de cassette de filtration

La filtration est une approche utilisée pour la collecte d'aérosols non biologiques mais il est aussi possible de l'utiliser pour la collecte d'aérosols microbiens. Elle permet notamment

de collecter les microorganismes résistants à la dessiccation, comme certaines espèces fongiques et bactériennes formant des spores. La méthode consiste à séparer les particules de l'air en les faisant passer à travers un média filtrant. Il est possible d'utiliser plusieurs types de filtres : poreux en fibre de verre et sous forme de membranes en éther de cellulose, ou en polycarbonate par exemple. Il existe aussi des filtres en gélatine pour la collecte d'aérosols microbiens qui peuvent maintenir la viabilité des microorganismes avec leur humidité. Le filtre peut alors être dissout pour réaliser des analyses en culture ou des analyses de biologie moléculaire (Chang & Chou, 2011; Engelhart & Exner, 2002).

Il existe des cassettes de 37 mm pour le contrôle de l'air (Figure 1-8). Elles permettent le support de filtres. Elles peuvent être à usage unique ou réutilisables après décontamination. Certaines cassettes sont préassemblées avec les membranes de type MF (esters de cellulose) avec des pores de 0,45 μm et 0,8 μm de diamètre. Les cassettes sont fabriquées en trois sections pour le maintien du filtre en place lorsque la cassette est ouverte pour l'échantillonnage de l'air libre. Différents types de filtres peuvent être utilisés en fonction des analyses à effectuer (Chang & Wang, 2015).

Ces cassettes de filtration permettent de réaliser des prélèvements pour des analyses en biologie moléculaire principalement. Différents protocoles peuvent être appliqués pour ensuite extraire les microorganismes des filtres.

2.2. Analyses par culture microbienne et biologie moléculaire

Différents milieux de culture peuvent être utilisés pour l'analyse en culture des microorganismes. Ces milieux de cultures permettent de favoriser ou de limiter la croissance de certaines bactéries ou moisissures en fonction des besoins analytiques. Le 1-2 présente des exemples de milieux de culture couramment utilisés dans les analyses microbiologiques de l'air intérieur.

Nom du milieu	Microorganismes	Caractéristiques
MEA	Moisissures	Malt Extract Agar - Milieu non sélectif pour l'énumération des levures et moisissures
DRBC	Moisissures	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol - Milieu sélectif pour la croissance des levures et moisissures, inhibant les bactéries et limitant l'étalement des colonies
DG18	Moisissures	Dichloran Glycérol - Milieu sélectif ayant une faible activité en eau pour la croissance des moisissures xérophiles
TSA	Bactéries	Tryptone-caséine Soja Agar - Milieu universel utilisé pour le dénombrement des bactéries

Tableau 1-2 : Milieux de culture couramment utilisés pour l'analyse des aérosols microbiens

Différentes techniques peuvent être utilisées afin d'analyser les échantillons prélevés avec les différents collecteurs. Le Tableau 1-3 présente les possibilités d'extraction à partir de filtres pour des analyses en biologie moléculaire.

Référence	Echantillons	Technique d'extraction du filtre	Analyse
Betelli et al., 2013	Conditions contrôlées en laboratoire. Génération de <i>T. vulgaris</i> et prélèvement sur cassette filtrante avec filtre en polycarbonate	Extraction liquide avec 10 mL de Tween80 (0,1 g/L) et peptones (1 g/L). Agitation 20 minutes à 2000 rpm.	Analyses par qPCR
Bandaly et al., 2017	Filtres F7 CTA en condition de laboratoire contaminé par <i>Mengovirus</i>	Filtre rincé deux fois par un milieu de culture (MEME) sous agitation 250 tr/min et centrifugation	Analyses par qPCR
Chang & Chou, 2011	Cassettes de filtration fermées avec des filtres en polycarbonate, en conditions contrôlées de laboratoire avec génération de <i>L. pneumophila</i>	Les échantillons sont agités au Vortex dans 10 mL de solution de Tween 80 (0,01%) et peptones (0,1%)	Analyses par qPCR

Tableau 1-3 : Exemples de protocole pour des analyses en biologie moléculaire à partir de filtres

Les protocoles fournis par les fabricants de kit d'extraction sont parfois adaptés afin d'augmenter les efficacités d'extraction.

2.3. Conclusions

Le Tableau 1-4 récapitule les avantages et inconvénients des différentes techniques d'analyse des aérosols microbiens utilisés de nos jours.

	Avantages	Inconvénients
Analyses par croissances	<ul style="list-style-type: none"> - Quantification des bactéries et moisissures - Simple à mettre en œuvre 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse seulement de la flore bactérienne et fongique cultivable - Nécessite l'utilisation de milieux différents pour couvrir une grande diversité - Temps entre le prélèvement et le comptage des boîtes - Temps d'échantillonnage court par impaction - Analyse des virus difficile
Analyses par biologie moléculaire	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement sur une durée plus grande par cassette de filtration - Accès à une grande diversité microbienne (notamment les virus) - Analyse plus rapide par qPCR 	<ul style="list-style-type: none"> - Quantification possible mais compliqué car cela nécessite des cibles précises - Banques de données sont incomplètes pour l'analyse - Méthodologie d'extraction des échantillons difficile (filtre par exemple)

Tableau 1-4 : Synthèse des avantages et inconvénients par techniques d'analyses des aérosols microbiens

On observe que les différentes possibilités d'analyse ne sont pas parfaites. Suivant la nature de l'échantillon et les microorganismes recherchés l'analyse par croissance ou par biologie moléculaire est plus appropriée. Les contaminants microbiens sont présents en concentrations variables dans l'air. Tous les échantillonneurs ne sont pas performants pour analyser les faibles niveaux de contaminations en aérosols microbiens. Pourtant certains de ces aérosols microbiens peuvent être pathogènes à de très faibles concentrations. En 2022, un rapport de Santé Publique France sur la prévalence des maladie nosocomiales a montré que 7,90 % des infections sont causées par SARS-CoV-2 (*Principaux résultats de l'enquête nationale de prévalence 2022 des infections nosocomiales*). L'échantillonnage des aérosols de SARS-CoV-2 est difficile avec les collecteurs disponibles (Borges et al., 2021).

D'une façon générale les temps de prélèvement des échantillonneurs sont courts. Les cassettes de filtration permettent de prélever sur des temps plus long. Mais cette technique est

plus adaptée aux analyses par biologie moléculaire, et donc sujette aux inconvénients liés à ces analyses. Il est donc nécessaire de bien déterminer sa stratégie d'analyse avant les prélèvements.

3. Traitement de l'air dans les bâtiments

3.1. Ventilation des bâtiments

Les polluants de l'air intérieur s'accumulent et les concentrations peuvent atteindre des valeurs nocives pour la santé des occupants. Le renouvellement de l'air permet d'améliorer la qualité de l'air intérieur. Ce renouvellement de l'air est assuré par la ventilation des bâtiments. Cette ventilation peut être réalisée de différentes façons :

- 1) La VN (Ventilation Naturelle)
- 2) La VMC (Ventilation Mécanique Contrôlée)

La VN d'un bâtiment se produit grâce à des ouvertures disposées à des endroits stratégiques et à l'ouverture des fenêtres. Les gradients de température, le vent, la taille et la disposition des aérations permettent de renouveler l'air intérieur avec des taux de renouvellement variables.

La VMC permet de ventiler un bâtiment en maintenant le taux de renouvellement sans les variations liées aux facteurs de la VN. La VMC permet d'assurer le confort et le bien-être des occupants et de préserver le bâtiment. Il existe deux systèmes différents de VMC : la VMC simple flux et la VMC double-flux.

La VMC simple flux est utilisée notamment dans les bâtiments de type habitation en collectif (Figure 1-9). L'air neuf entre par les pièces principales (séjour, chambre) et transite par les couloirs dans les pièces de service comme la cuisine, les toilettes ou la salle de bain. Un caisson d'extraction permet de rejeter l'air vers l'extérieur. On retrouve trois familles principales pour ces VMC : autoréglable, hygroréglable et gaz. Il existe également des VMC simple flux par insufflation, l'air est alors soufflé dans le bâtiment et sort passivement par les ouvertures (aérations, fenêtres...). Pour ce type de ventilation, l'air soufflé extrait n'est pas traité.

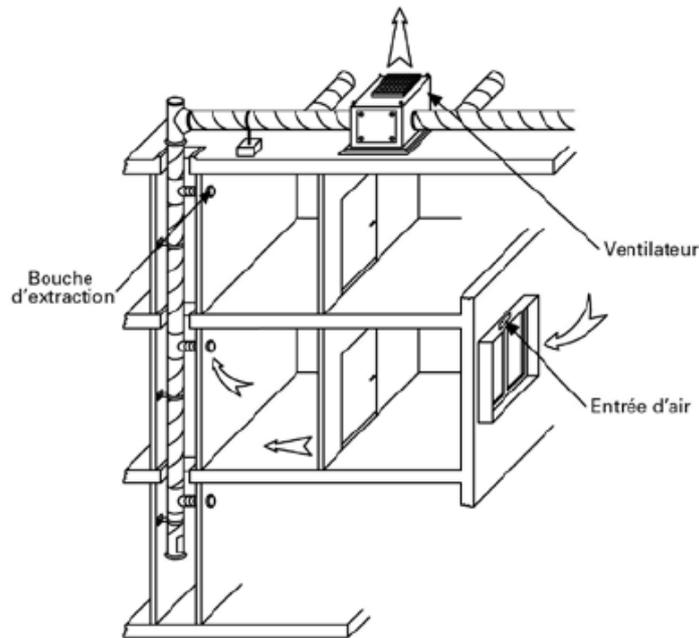


Figure 1-9 : Schéma d'une VMC à simple flux dans un logement collectif

Les VMC double flux diffèrent des VMC simple flux car l'air extérieur est filtré puis insufflé dans les pièces des bâtiments. D'autres bouches d'aération vont ensuite extraire l'air vicié et le souffler vers l'extérieur du bâtiment. Certaines VMC sont équipées d'un échangeur thermique permettant de récupérer les calories de l'air intérieur extrait et transférer cette énergie à l'air frais extérieur soufflé. Un recyclage de l'air est également possible en respectant un ratio air neuf/air recyclé. Les différents éléments composant les VMC doubles flux nécessitent un entretien tels que le remplacement des filtres et le nettoyage des bouches d'aération par exemple.

3.2. Centrales de Traitement d'Air (CTA)

Dans les bâtiments du secteur tertiaire ayant une grande taille, la ventilation est assurée par une ou plusieurs CTA. Ces CTA assurent le renouvellement de l'air intérieur et permettent également la filtration des aérosols, le chauffage ou la climatisation avec le maintien d'une humidité relative adaptée.

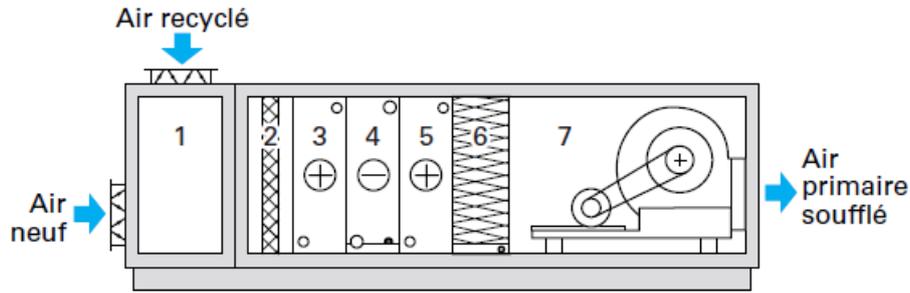


Figure 1-10 : Exemple de composition d'une CTA (Bailly et al., 2001).

La Figure 1-10 présente les différents éléments pouvant composer une CTA. Il est possible de retrouver un caisson de mélange (1) où l'air neuf et l'air recyclé arrivent, un ou plusieurs filtres (2), une batterie chaude permettant de préchauffer l'air (3), une batterie froide (4), une autre batterie chaude permettant le chauffage (5), une section avec un humidificateur (6) et un ou plusieurs ventilateurs (7). Toutes les CTA ne possèdent pas un compartiment permettant de recycler l'air intérieur. C'est le cas des CTA « tout air neuf » qui insufflent de l'air provenant uniquement de l'extérieur.

3.3. Filtration de l'air

La filtration de l'air permet de protéger les différents organes de la CTA des problèmes d'encrassement par les particules en suspension dans l'air. Ces filtres retiennent ces particules et permettent d'assainir l'air qui est délivré à l'intérieur du bâtiment pour conserver une qualité d'air intérieur conforme au bien-être des occupants.

Les filtres utilisés sont constitués d'un média fibreux permettant de retenir les aérosols. Ce média fibreux peut être de différentes natures : en fibres organiques (fibre végétale, cellulose), en fibres synthétiques (polymères formant les fibres) ou en fibres inorganiques comme les fibres minérales, en carbone ou en fibres de verre. Depuis 2016, la norme internationale ISO 16890 est utilisée pour la classification des filtres pour les systèmes de ventilation générale. Cette norme prend en compte les efficacités de filtration des filtres pour des classes de particules de tailles différentes (tableau 1-5). Auparavant la norme EN 779 – 2012 était en vigueur et prenait en compte l'efficacité de filtration pour des particules ayant un diamètre défini ($0,4 \mu\text{m}$).

Efficacité	Plage de dimension (μm)
ePM ₁₀	$0,3 \leq x \leq 10$
ePM _{2,5}	$0,3 \leq x \leq 2,5$
ePM ₁	$0,3 \leq x \leq 1$

Tableau 1-5 : Diamètres optiques des particules pour les classes de la norme ISO 16890

Les particules retenues par le média fibreux des filtres dans les CTA font intervenir différents mécanismes résumés dans la Figure 1-11. Les principaux mécanismes sont les suivants : l'impaction inertielle, l'interception directe et la diffusion brownienne (Davies, 1973).

L'impaction inertielle est un mécanisme impliquant les particules ayant une inertie qui ne leur permettent pas de suivre les lignes de courant passant autour des fibres du média. Les particules sont alors collectées en adhérant à la fibre en l'impactant.

L'interception directe se produit pour les particules ayant une faible inertie et qui suivent les lignes de courant autour de la fibre. Si la particule passe à la surface de la fibre à une distance inférieure à celle de son rayon, elle est interceptée.

Enfin la diffusion brownienne concerne les particules de petites tailles ayant un diamètre inférieur à $0,1 \mu\text{m}$. Ces particules suivent une trajectoire libre se rapprochant du comportement des molécules de l'air. Ces trajectoires sont liées aux mouvements browniens du courant porteur, elles finissent par être captées par les fibres du média.

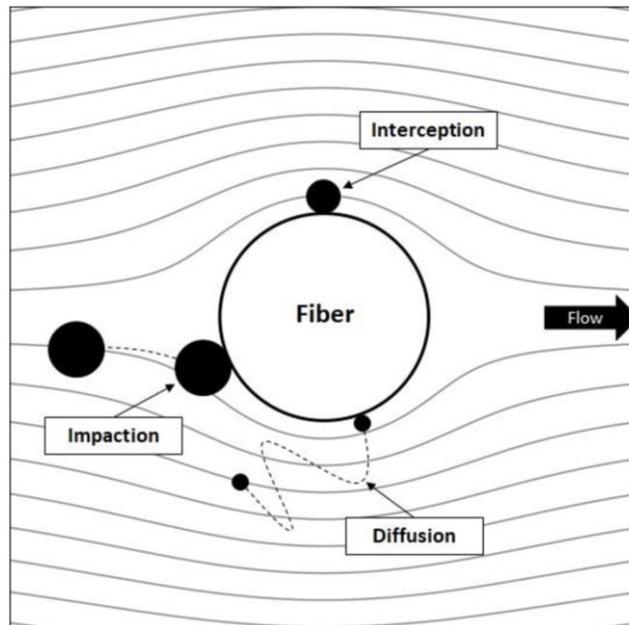


Figure 1-11 : Les mécanismes de capture des particules dans un média fibreux (Berry et al., 2023)

Il existe aussi d'autres mécanismes de capture qui peuvent influencer sur l'efficacité de filtration d'un média, notamment des forces électrostatiques. Elles interviennent quand les particules et/ou les fibres sont porteuses de charges.

4. Études réalisées sur les CTA

Au cours de leur utilisation, les filtres de CTA accumulent dans le média filtrant les contaminants particulaires présents dans l'air. Parmi les aérosols captés, les microorganismes aéroportés se retrouvent également piégés dans les fibres du filtre. Quelques études ont été menées pour exploiter ces filtres de CTA dans le but d'effectuer des analyses microbiologiques.

En 2006, une étude a été réalisée dans le but d'utiliser les filtres de CTA pour analyser à haut débit des bactéries et des virus aérosolisés dans une installation contrôlée en laboratoire (Farnsworth et al., 2006). Une espèce bactérienne (*Bacillus subtilis var. niger*) et trois virus différents (TGEV, APV, FPV) ont été utilisés pour contaminer un filtre. Des prélèvements avec des impingers ont été réalisés pour déterminer l'efficacité de collecte du filtre. Le filtre a été ensuite analysé après une extraction liquide par analyse culturale pour les bactéries et par test TCID₅₀ pour les virus. Les efficacités de collecte reportées étaient d'environ 97% pour les aérosols bactériens par le filtre MERV 14. Les efficacités de filtration des virus n'ont pas été calculées car aucun virus n'a été échantillonné en aval du filtre. Les efficacités extractions des bactéries du filtre étaient de 105 ± 19 %. Les efficacités d'extraction des virus étaient faibles

pour les trois virus. Le protocole utilisé pour extraire les virus du filtre n'était pas optimal selon les auteurs.

Des études ont également été menées sur l'utilisation des CTA et des filtres pour analyser les risques suite à une possible attaque biologique. Ces données peuvent être utilisées pour déterminer si des bâtiments et leurs occupants ont été infectés (Ackelsberg et al., 2011; Hong & Gurian, 2012; Van Cuyk et al., 2012).

D'autres études ont été menées sur l'analyse des filtres de CTA pour déterminer les différents microorganismes captés sur le filtre. Les différentes méthodologies employées dans ces études sont résumées dans le Tableau 1-6.

Tableau 1-6 : Synthèse des études menées sur les filtres de CTA pour l'analyse de la contamination microbienne

Filtre utilisé	Site d'échantillonnage	Techniques d'extraction du filtre	Kit d'extraction ADN/ARN	Analyses	Références
Filtres plans	CTA centres commerciaux	<p>Biologie moléculaire - Lavage avec 10 L de PBS Filtration avec un filtre papier Whatman Concentration par filtration tangentielle 0,2 µm Centrifugation à 9500g puis culot resuspendu avec 10 mL PBS Croissance - Le filtre est placé dans une seringue de 50 mL pour forcer la sortie du liquide</p>	<p>PURE-GENE® DNA extraction kit (protocole kit) 1 µg d'ADN par préparation Electrophorèse agarose 1% puis excision de l'ADN du gel et purification Qiaquick® Gel Extraction Kit</p>	<p>PCR 16S Séquençage Shotgun séquençage - Taux de croissance des cellules par observation au microscope à épifluorescence puis par incorporation de leucine et thymidine marquées au tritium Culture sur boîte et coloration de Gram</p>	Tringe et al., 2008
Filtre F7 fibre polypropylène	CTA en laboratoire - aérosols atmosphériques	<p>Filtre placé dans 50 mL d'une solution d'extraction MgSO₄ pendant 2h sous agitation à 300 RPM Puis passage 1 min aux ultrasons</p>	-	Dénombrement sur boîte de culture	Joubert et al., 2021
Filtre plan plissé G4 et filtre à poche F7	CTA bâtiment tertiaire	<p>Coupon de même média que celui du filtre (5x5cm) disposé à la surface du filtre, extraction liquide MgSO₄ 0,01M + Tween 20 (1,2%) agitation 2h à 250 RPM</p>	-	Dénombrement sur boîte de culture	Gonzalez H., 2014

Filtre plissé MERV 14	CTA en laboratoire - aérosols contrôlés (bactéries, virus)	Bactéries : Filtre découpé stérilement (2,5x2,5cm) extraction 10 mL Tween 80 (0,02%) agitation manuelle Virus : filtre découpé stérilement (3x8cm) extraction 5mL BE (BeefExtract) (3%) + 0,05M glycine agitation 3 x vortex 30"	-	Dénombrement (bactéries) TCID ₅₀ (virus)	Farnsworth et al., 2006
Filtre plissé en polyester MERV 8	CTA d'une bibliothèque d'université	Extraction d'ADN directement sur le filtre découpé (10 cm ²)	MOBIO Power Water kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)	qPCR et séquençage Illumina MiSeq	Luhung et al., 2018

5. Conclusions et objectifs de l'étude

Les nouveaux enjeux sanitaires, écologiques, économiques mettent en avant de nouvelles problématiques, notamment sur les aspects de la qualité de l'air intérieur. La pandémie liée aux contaminations virales SARS-CoV-2 a permis de prendre conscience de la facilité de propagation des virus respiratoires dans des environnements clos, peu ventilés, sans protections individuelles (Delikhoon et al., 2021; Qian et al., 2021). La ventilation des bâtiments, qu'elle soit naturelle ou mécanique, permet de diluer et d'abaisser l'exposition aux polluants chimiques, physiques ou d'origine biologique tel que rappelé avec le virus de la Covid-19 (Hiwar et al., 2022; Rayegan et al., 2023).

Il est donc important de pouvoir correctement mesurer les risques lorsque l'on est exposé à une mauvaise qualité de l'air intérieur. L'analyse des aérosols microbiens nécessite une étape d'échantillonnage. Le principe de fonctionnement des échantillonneurs repose sur des mécanismes de collecte des aérosols différents en fonction des technologies qui ont des avantages et des inconvénients. Le choix de l'échantillonneur est alors déterminé par la nature des microorganismes recherchés mais aussi l'environnement où est réalisé le prélèvement. Il n'existe pas à ce jour de technique d'échantillonnage pouvant couvrir tout le spectre des bactéries, moisissures ou virus par exemple. Les durées de prélèvement sont un facteur souvent limitant pour essayer d'obtenir des résultats représentatifs dans des ambiances où les concentrations en microorganismes sont assez faibles.

Dans les bâtiments ayant une taille conséquente, l'emploi de CTA est nécessaire pour le confort des occupants et le maintien d'un environnement sain à l'intérieur du bâtiment. Ces CTA possèdent des filtres permettant d'une part de protéger ses organes sensibles comme le ventilateur, mais aussi d'assainir l'air qui est insufflé dans le bâtiment. Les filtres employés sont des médias fibreux. Les fibres de ce média collectent les particules avec différents niveaux d'efficacité en fonction de la taille des particules, et sont classés selon la norme ISO 16890.

Ces filtres accumulent sur toute leur durée de vie les aérosols. Ils permettent donc de cumuler des informations concernant les particules de l'air insufflé dans le bâtiment ou extrait vers l'extérieur. Des équipes de recherche ont mené des études sur la potentielle utilisation de ces filtres comme moyen d'échantillonner l'air (Gonzalez H., 2014; Luhung et al., 2018; Tringe et al., 2008). Hormis ces études sur des CTA de centres commerciaux ou de bibliothèque, il y

a peu d'analyses microbiologiques sur les filtres de CTA et de plus réalisées sur des espaces tels que des bureaux.

L'objectif de ces travaux de thèse est de proposer une nouvelle méthodologie d'analyse de la contamination microbiologique de l'air intérieur par l'utilisation des filtres d'extraction d'une CTA d'un bâtiment d'IMT Atlantique (campus de Nantes). L'intérêt de cette étude est d'utiliser une CTA dans les conditions réelles d'utilisation. De plus, cette CTA réelle traite l'air de bureaux, et son accès facilité permet de réaliser des mesures sur toute la vie d'un filtre. Les résultats seront comparés aux études déjà menées sur d'autres environnements.

Le travail réalisé peut se découper en deux parties et dont les objectifs sont :

Caractérisation de la CTA

- Analyser les concentrations en particules et microorganismes en amont et en aval des filtres de soufflage et d'extraction de la CTA en fonction de l'évolution des conditions de température et d'humidité de l'air
- Quantifier les efficacités de filtration des filtres vis-à-vis des particules et des aérosols microbiens

Développement d'une méthode d'analyse de la contamination microbiologique de l'air utilisant les filtres de CTA

- Créer un protocole permettant l'échantillonnage des microorganismes et leur analyse sans perturber les performances de filtration de la CTA
- Qualifier la méthodologie
- Quantifier et qualifier les différents microorganismes collectés sur les filtres en fonction du temps

Chapitre 2 : Méthodologie générale et méthodes

1. Méthodologie générale

1.1. Introduction et Principe général - stratégie

Pour étudier la contamination de l'air ambiant des bureaux avec une nouvelle approche utilisant les filtres des CTA, une méthodologie de prélèvement par les disques de média filtrant a été proposée et mise en œuvre en conditions réelles lors d'une campagne de 13 mois de février 2021 à février 2022 dans un bâtiment d'IMT Atlantique sur le campus de Nantes. Mensuellement, différents prélèvements ont été réalisés au niveau de la CTA dans les gaines mais également par le biais des coupons déposés sur le filtre d'extraction. Des mesures, présentées en introduction du Chapitre 4, ont également été réalisées directement dans l'air de bureaux.

Des disques de média filtrant ont été fixés à l'intérieur des poches d'un filtre situé dans le compartiment de l'air extrait des bureaux. Chaque mois, des disques ont été prélevés puis analysés au laboratoire. Deux protocoles différents ont été mis en place pour analyser les microorganismes collectés par le média filtrant. Des disques ont servi à des analyses microbiologiques en culture sur différents milieux gélosés, d'autres ont été conservés à -20°C puis analysés par des techniques de biologie moléculaire.

En parallèle, des mesures d'efficacité de filtration des filtres ont été menés pour les deux compartiments de la CTA, celui de l'air frais soufflé vers les bureaux et celui de l'air extrait des bureaux. Les efficacités de filtration des particules et des aérosols microbiens ont été mesurées et comparées. Les différents appareils de mesure utilisés pour réaliser ces mesures sont détaillés dans les prochains paragraphes.

La méthodologie générale mise en œuvre pour répondre aux objectifs de ces travaux de thèse est résumée dans la Figure 2-1.

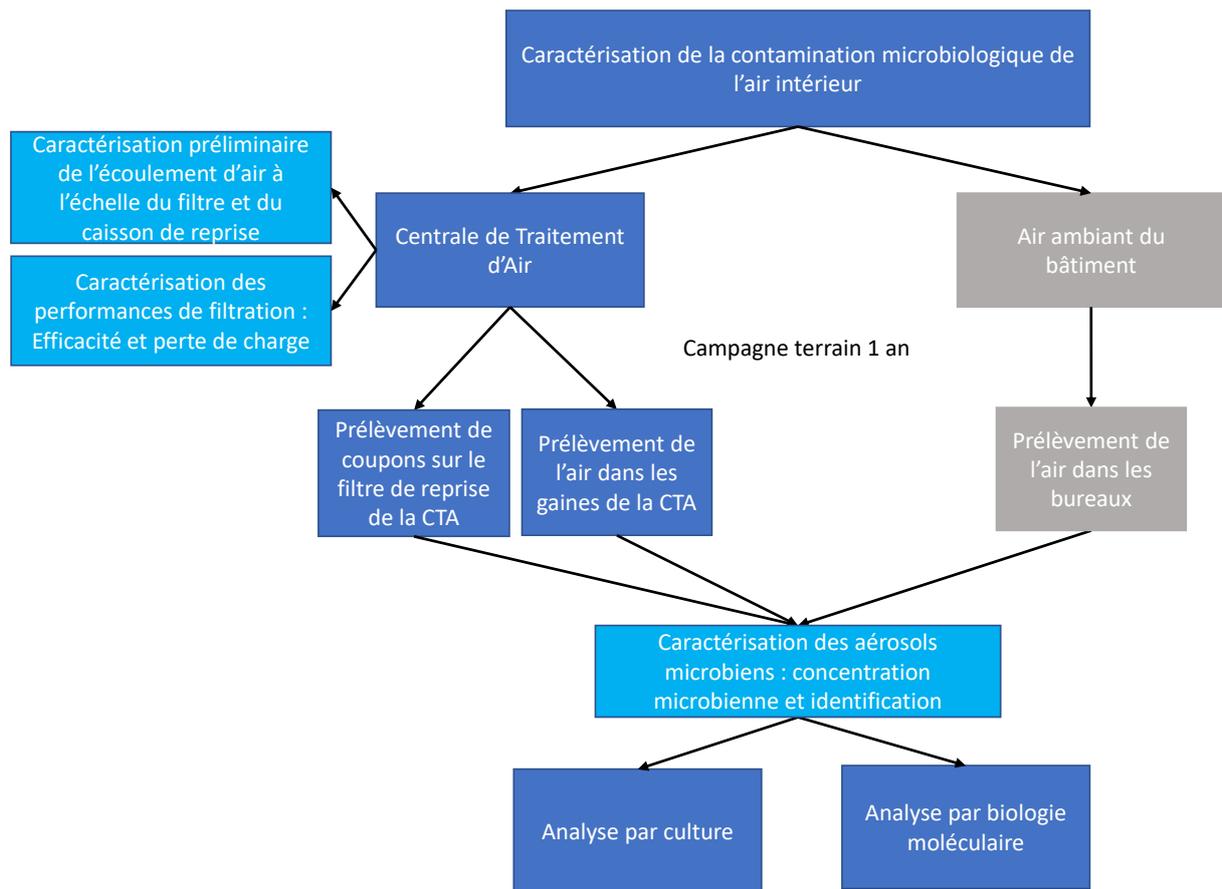


Figure 2-1 : Schéma de la méthodologie générale

1.2. Méthodologie d'analyse avec prélèvement de coupons

1.2.1. Conception et description de la méthode d'échantillonnage par coupon

La méthodologie de prélèvement par coupons sur des filtres de CTA est une méthode qui a été mise au point et testée préalablement au sein du laboratoire GEPEA lors de précédents travaux de thèse.



A.



B.

Figure 2-2 : Photographies de deux méthodologies de prélèvement par coupons testées précédemment au GEPEA.

La photographie A de la Figure 2-2 présente la méthodologie employée par Gonzalez H.L. (Gonzalez H. 2014) et la photographie B la méthodologie employée par Abd Ali S. (Abd Ali, 2018). Ces deux précédentes études ont permis de tester cette nouvelle technique pour analyser la contamination microbologique de l'air filtré par des filtres dans une CTA.

Ces premiers essais ont permis de construire la méthodologie qui a été mise en place pour la campagne de mesure présentée dans ces travaux de thèse. Cette méthodologie est présentée dans la Figure 2-3.

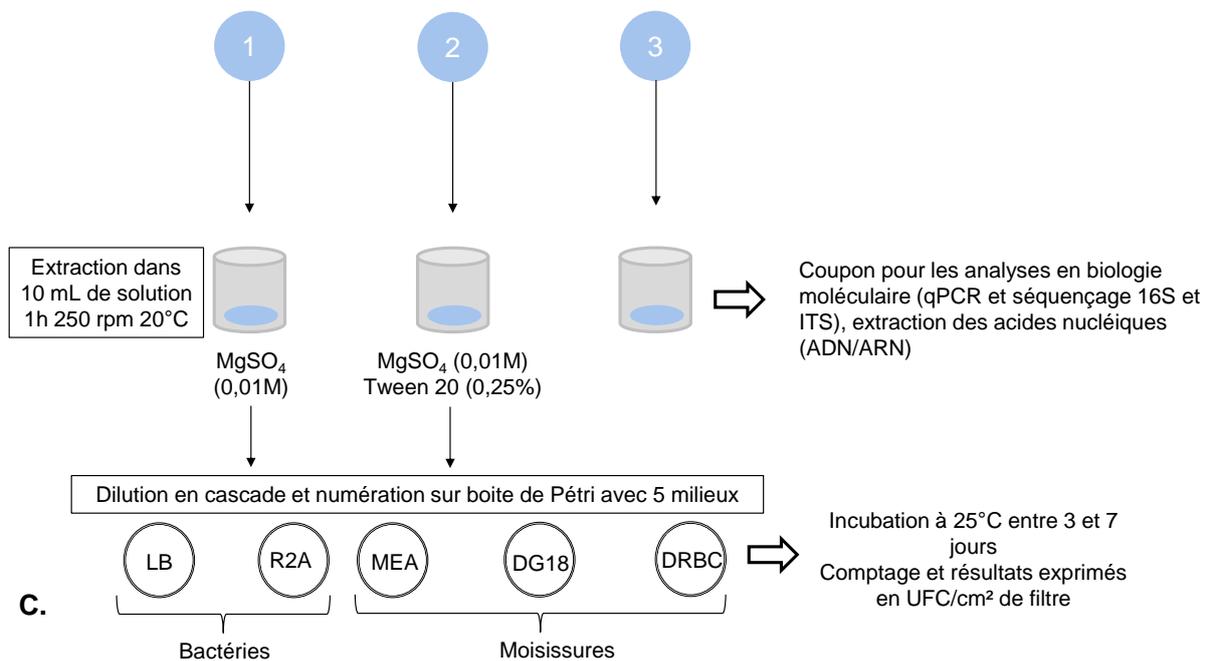


Figure 2-3 : Filtre et coupons de média filtrant fixés à la surface des poches intérieures (A et B). Méthodologie d'analyse des coupons récupérés pendant la campagne d'échantillonnage (C.)

Les photos A et B de la Figure 2-3 présentent la technique employée pour la fixation des coupons de média filtrant. Les coupons ont été préparés en utilisant le média filtrant d'un filtre neuf. Le filtre utilisé est identique à ceux utilisés dans la CTA. Le média filtrant a été découpé par poinçonnage pour obtenir des disques de 4 cm de diamètre. Ces manipulations ont

été réalisées afin d'obtenir des disques identiques, et elles ont été réalisées avec le port de gants et en désinfectant les outils afin de limiter au maximum de contaminer les coupons. Ces coupons sont pesés avant d'être fixés sur le filtre.

Pour que les coupons restent en place tout au long de la campagne de prélèvement, il a été décidé de les fixer sur la face intérieure des poches du filtre avec un fil. Un fil de couture en polyester noir a permis de fixer les coupons à plat sur le filtre et de façon à ce qu'il ne soit pas possible qu'ils se décollent par l'action du flux d'air.

La campagne d'échantillonnage a duré 13 mois. Chaque mois, 3 coupons de média filtrant ont été récupérés. Trente-six coupons ont été fixés sur le filtre au début de la campagne. Trois coupons supplémentaires ont été fixés, ils ont servi de témoins négatifs et ont été prélevés juste avant la mise en place des filtres. Ces coupons ont permis de connaître la contamination microbiologique initialement présente sur le média filtrant neuf. Ces 3 témoins ont été analysés en suivant le même protocole que les 36 coupons destinés à la campagne d'échantillonnage.

1.2.2. Analyses au laboratoire des échantillons

Le schéma C de la Figure 2-3 présente la méthodologie d'analyse des coupons récupérés chaque mois de la campagne d'échantillonnage. Chaque mois, 3 coupons sont prélevés en utilisant des pinces et des ciseaux préalablement décontaminés à l'alcool à 70%. Ces coupons sont ensuite pesés au laboratoire. Deux coupons sont réservés aux analyses microbiologiques par culture en boîte de Pétri. Une étape d'extraction liquide des microorganismes des coupons est menée en utilisant une solution d'extraction différente par coupon. Le premier est extrait dans une solution de $MgSO_4$ (0,01 M), le deuxième dans une solution identique mais additionnée d'un agent tensioactif le Tween 20 (0,25% v/v). Après cette étape, les solutions d'extraction des deux coupons sont diluées en cascade avant d'être étalées sur des milieux gélosés en boîte de Pétri à raison de 100 μ l par boîte. Les milieux sélectionnés sont décrits dans le Tableau 2-3. Les boîtes sont incubées à 25°C et des comptages sont effectués entre 3 et 7 jours. Les résultats sont exprimés en UFC/cm² de filtre.

Le troisième coupon récupéré est destiné aux analyses en biologie moléculaire. Le détail de ces analyses est précisé dans le paragraphe 3.3.3. Les échantillons ont été conservés à -20°C avant d'être traités ensemble à la fin de la période d'échantillonnage.

Des tests préliminaires ont été réalisés afin d'évaluer la méthodologie d'extraction des coupons. Le protocole mis en place est précisé dans la Chapitre 2. Les résultats sont présentés dans la Figure 2-4.

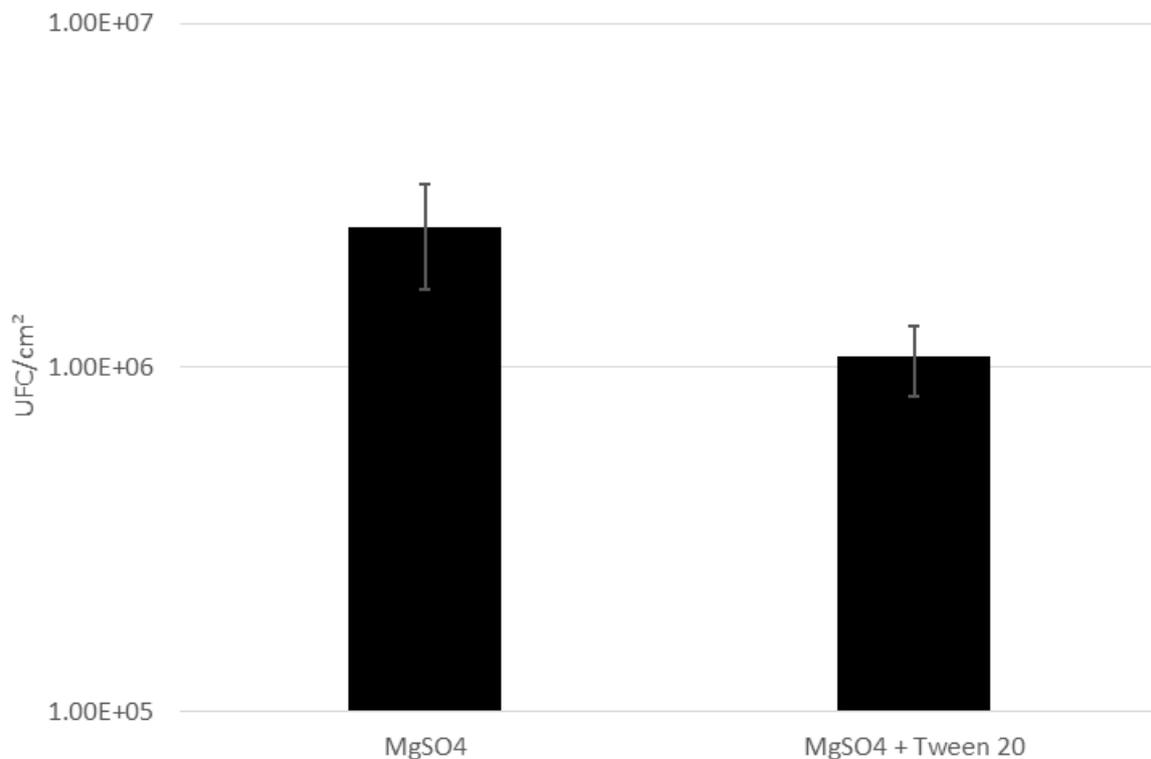


Figure 2-4 : Efficacité et croissance de *S. epidermidis* après extraction d'un coupon inoculé avec une suspension bactérienne.

Les essais ont été réalisés en triplicat et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type. L'extraction avec MgSO₄ permet une meilleure collecte des bactéries *S. epidermidis*, plutôt qu'avec Tween 20. En effet il semblerait qu'une quantité supérieure de bactéries *S. epidermidis* a été extraite en utilisant une solution d'extraction contenant uniquement du MgSO₄ par rapport à la condition où le Tween 20 a été ajouté. Le faible nombre de colonies comptées peut être dû à l'action du surfactant Tween 20 qui agit sur la croissance et l'organisation des colonies, en modifiant les protéines membranaires (Castro et al., 2009). Le Tween 20 permet à contrario une meilleure extraction des spores de moisissures qui présentent un caractère hydrophobe. Le protocole d'extraction des coupons avec les deux différentes solutions d'extraction a donc été conservé pour l'étude en accord avec ces données.

2. Caractéristiques du bâtiment, de la CTA et des filtres

2.1. Description du bâtiment

La CTA étudiée est située dans un bâtiment d'IMT Atlantique à Nantes (Figure 2-5). Le bâtiment est constitué de deux étages, et a été construit en 2014. Il est doté d'un toit végétal et respecte les normes des "Bâtiments Basse Consommation" (BBC) pour les bâtiments nouvellement construits. Ce bâtiment est conforme à la norme RT2012 (réglementation thermique applicable à la construction des bâtiments neufs). À l'intérieur du bâtiment se trouve des salles de classe, des salles de réunion, des bureaux, des salles de travaux pratiques et des laboratoires. La CTA étudiée, appelée CTA Bureaux, traite l'air des bureaux, tandis qu'une autre CTA filtre l'air des autres salles.



Figure 2-5 : Photographie du Bâtiment d'IMT Atlantique Nantes hébergeant la CTA

Cette CTA Bureaux souffle et extrait l'air de 47 bureaux répartis sur les deux étages du bâtiment. La surface totale des bureaux alimentés en air neuf est de 802 m², chaque bureau d'une surface moyenne de 17 m². Les bureaux accueillent entre 1 et 3 personnes. Le taux de renouvellement d'air par heure ou taux de brassage est de 1,2. La CTA se situe au sous-sol du bâtiment (Annexe 1 et Annexe 2).

2.2. Description de la CTA et des filtres

2.2.1. Schéma de la CTA

Un schéma de la CTA est présenté sur la Figure 2-6, avec les différents composants ainsi que les points d'échantillonnage.

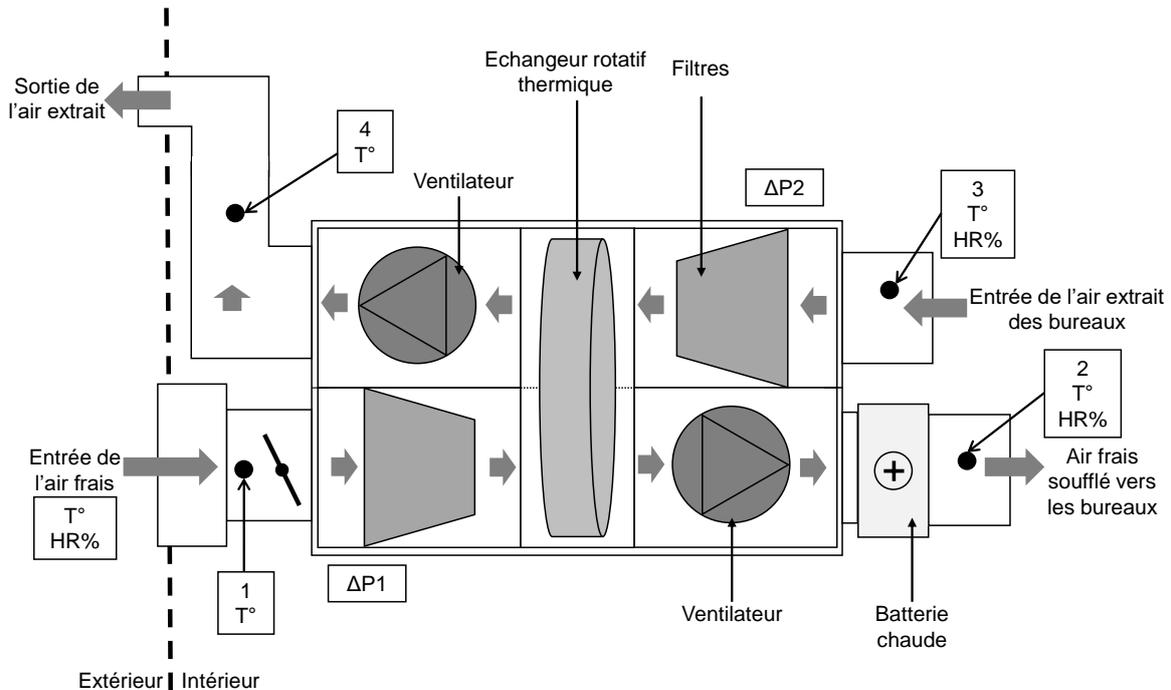


Figure 2-6 : Schéma simplifié de la CTA étudiée et des différents points de prélèvement

La CTA, de modèle Gold RX (Swegon Ltd, Angleterre) (Figure 2-7), fonctionne avec un débit théorique constant de $2450 \text{ m}^3/\text{h}$. Elle est composée de deux compartiments, un pour l'air frais et l'autre pour l'air extrait des bureaux, avec un échangeur de chaleur rotatif entre les deux compartiments. Chaque compartiment contient deux filtres à poches disposés en parallèle. Une batterie chaude, située en aval du compartiment de l'air frais, régule la température de l'air soufflé vers les bureaux.

2.2.2. Capteurs mis en œuvre

Différents capteurs ont été installés dans la CTA et les gaines en amont. Deux capteurs de pression différentielle reliés à un *datalogger* permettent d'enregistrer en continu les pertes de charge des filtres des deux compartiments.

Des sondes de température ont été installées aux points 1, 2, 3 et 4 en amont/aval des caissons de soufflage (points 1/2) et de reprise d'air (points 3/4). Des thermo-hygromètres ont été placés à l'extérieur devant l'entrée de l'air frais et aux points 2 et 3.



Figure 2-7 : Photographie de la CTA étudiée

2.2.3. Caractéristiques des filtres et caractérisation du média filtrant



Figure 2-8 : Photographie d'un filtre à poches neuf mis en œuvre dans la CTA étudiée

Les filtres utilisés dans la CTA Bureaux de marque AFRO Filters (Alkmaar, Pays-Bas) sont classés ISO ePM1 60% selon la norme ISO 16890 (Annexe 3). Cette nouvelle norme identifie l'efficacité de filtration d'un média filtrant pour des tailles de particules précises. Dans

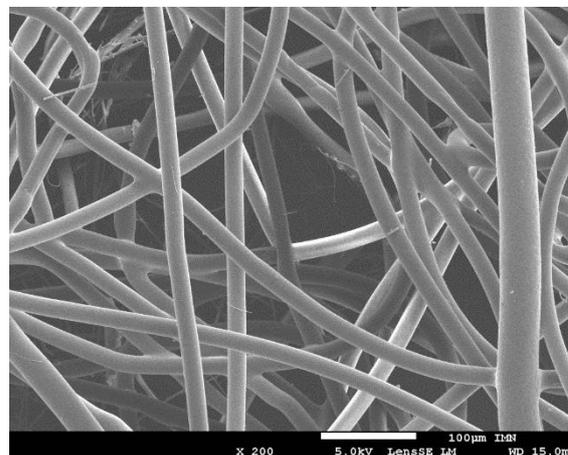
le cas des ePM1 60%, cela signifie que le filtre est efficace à 60% pour des particules dont la taille est inférieure à 1 μm . Ces filtres sont composés de 4 poches. Le média filtrant possède trois couches : une couche support en maille de polyester cardé, une couche de filtration en microfibres de verre à haute efficacité, et une couche préfiltre en fibres synthétiques. La surface de filtration de chaque filtre est de 1,5 m^2 .

2.2.3.1. Observations du média filtrant au Microscope Electronique à Balayage

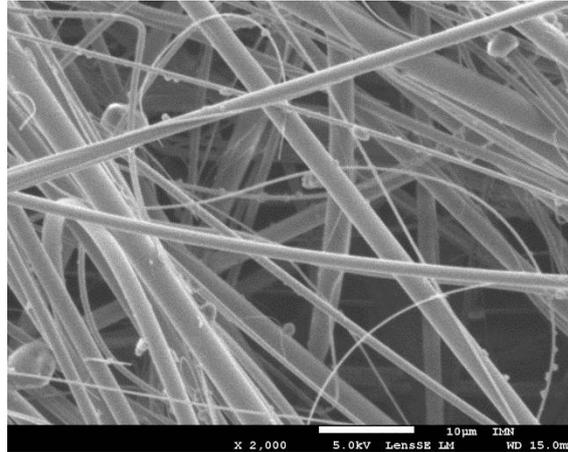
Les différents composants du média filtrant ont été observés par microscopie électronique à balayage (MEB). Les trois couches du média filtrant ont été séparées pour être observées individuellement au MEB. Le flux d'air traversant le média filtrant passe à travers les trois couches dans cet ordre : une pré-couche appelée *synthetic pre-layer* qui est une membrane permettant de maintenir les fibres de verre, puis la couche de microfibres de verre et une troisième couche en polyester qui sert de maintien en retenant les fibres de verre de l'autre côté du filtre.

Le Tableau 2-1 présente les images qui ont été obtenues avec les observations au MEB à divers grossissement. Ces images ont permis de déterminer un diamètre moyen des fibres de chaque couche du média filtrant en utilisant le logiciel open source ImageJ.

Synthetic pre-layer - couche de préfiltration



Couche de
microfibre de
verre



Polyester carded
web – couche de
maintien en
polyester



Tableau 2-1 : Photographies des observations au MEB des 3 couches du média filtrant

Les tailles des fibres sont récapitulées dans le Tableau 2-2 suivant.

Nom de la couche	Taille moyenne des fibres (μm)
<i>Synthetic pre-layer</i>	19,3
Microfibres de verre	1,8
<i>Polyester carded web</i>	35,7

Tableau 2-2 : Données sur les tailles des fibres des couches du média filtrant

2.2.3.2. Épaisseur et grammage du média filtrant

Concernant l'épaisseur du média filtrant, les données du fabricant indiquent que le média mesure entre 3,5 et 4,5 mm d'épaisseur. Au laboratoire, des mesures ont été réalisées sur la couche de préfiltration avec une épaisseur d'environ 100 μm et sur la couche de maintien en

polyester d'une épaisseur de 130 μm . La couche de microfibre de verre est trop fragile et trop hétérogène pour mesurer une épaisseur avec l'outil utilisé au laboratoire.

Le grammage du média filtrant est de $105 \pm 5 \text{ g/m}^2$ selon les données du constructeur. Il a été pesé au laboratoire et une valeur de $107,6 \text{ g/m}^2$ a été obtenue.

2.2.3.3. Perméabilité du média filtrant

Des premiers tests ont été réalisés au laboratoire sur un banc d'essai afin d'effectuer des mesures de perméabilité du média filtrant (échantillons de filtres en géométrie plane). Ces mesures de perméabilité ont permis de mesurer la perte de charge initiale des filtres non colmatés en fonction de la vitesse de filtration de l'air. Un échantillon de média filtrant est prélevé d'un filtre et est installé sur la veine d'air ayant une section de $274 \times 274 \text{ mm}$. Un capteur de pression différentiel ayant une gamme de 0 à 700 Pa mesure la différence de pression (perte de charge) entre l'amont et l'aval du média filtrant. La courbe de perméabilité est obtenue en augmentant graduellement la vitesse du ventilateur et par conséquent le flux d'air qui traverse le média filtrant.

La Figure 2-9 présente les résultats obtenus de perméabilité. Selon le modèle de Darcy, la perméabilité du média est de : $1,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2$.

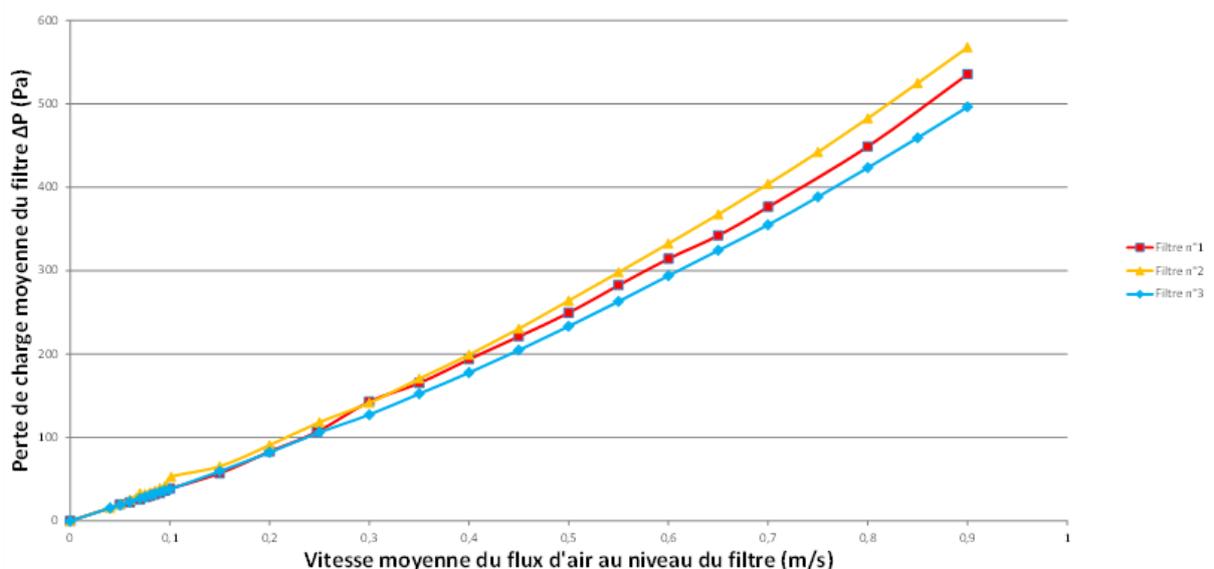


Figure 2-9 : Bilan de trois tests de perméabilité du média filtrant

3. Matériels et méthodes pour l'analyse des particules et aérosols microbiens

3.1. Mise au point de la méthodologie d'échantillonnage par coupon

3.1.1. Caractérisation du flux d'air au niveau du coupon

La méthodologie d'analyse avec des disques de média filtrant (coupon) a nécessité des tests préliminaires au laboratoire. L'influence de la présence des coupons fixés à la surface du filtre a été étudiée. Le but de ces manipulations était de déterminer si la double épaisseur de filtre au niveau des coupons pouvait avoir une influence sur les paramètres de filtration. Le premier paramètre qui a été pris en compte est la perte de charge et le second était la répartition du flux d'air.

Des disques de 4 cm de diamètre ont été fixés sur un morceau de média filtrant neuf et la perméabilité a été mesurée et comparée à un filtre sans coupons. L'espace occupé par la double épaisseur est surévaluée en termes de cm^2 par rapport à la surface occupée par les coupons fixés sur le filtre qui sera en place dans la CTA. Les tests réalisés sur le banc d'essai n'ont pas révélé de différence de perte de charge avec ou sans coupon fixé sur le média filtrant.



Figure 2-10 : Photographie du filtre avec les coupons avant les tests de perméabilité

Des expériences ont été réalisées pour déterminer si la double épaisseur de média filtrant avait une influence sur la répartition du flux d'air. Pour cela un traceur particulière a été généré en amont des filtres dans un banc d'essai, et les écoulements ont été estimés au niveau des disques fixés. Le traceur utilisé est de la fluorescéine. Après capture par le média filtrant, il est possible de quantifier la masse de fluorescéine déposée par spectrophotométrie.

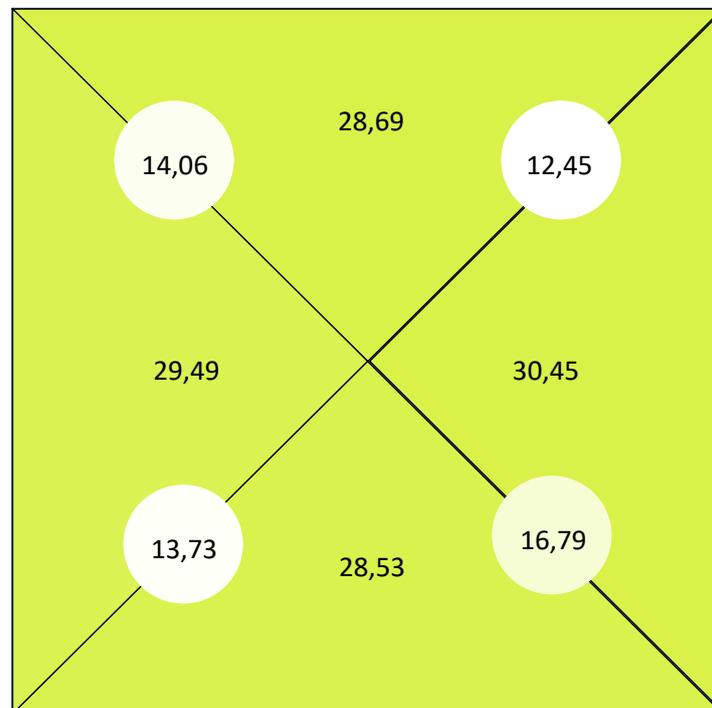


Figure 2-11 : Schéma représentant la masse de fluorescéine déposée sur le média filtrant et sur les coupon (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

En comparant l'écart entre les masses de fluorescéine captées par les coupons et les masses du média filtrant, on observe environ 50 % en moins de fluorescéine sur les coupons. La présence de coupons à la surface du média filtrant a un impact sur la répartition du flux d'air au niveau des coupons mais permet un échantillonnage de l'air d'environ 50%.

3.1.2. Caractérisation du flux d'air dans les filtres du compartiment d'extraction de la CTA

Afin de pouvoir positionner les disques de média filtrant dans les meilleures conditions pour échantillonner les aérosols microbiens présents dans l'air extrait des bureaux, des tests de détermination des écoulements d'air ont été réalisés. Des expériences en injectant de la fluorescéine en amont du compartiment ont été réalisées avec deux filtres neufs dans ce compartiment.



Figure 2-12 : Photographie de l'AGK2000 pendant la génération de fluorescéine en amont du compartiment d'extraction d'air

La géométrie des filtres dans la CTA n'étant pas la même que la géométrie plane des filtres analysés au laboratoire dans le banc d'essai, il était nécessaire de déterminer si les mesures du laboratoire étaient semblables à celles dans la CTA réelle.



Figure 2-13 : Photographie des filtres après génération de fluorescéine



Figure 2-14 : Représentation de la répartition de la fluorescéine dans les poches des filtres neufs après quantification par spectrophotométrie

La Figure 2-14 représente la répartition des écoulements d'air à travers les filtres à poches neufs à partir de la quantité de fluorescéine collectée par le média. Plus précisément, la figure représente l'écart par rapport à un écoulement idéalement réparti à la surface du média : une valeur > 0 signifie une surface avec un passage préférentiel de l'écoulement d'air, une valeur < 0 signifie une zone moins exposée au flux d'air. L'échelle de couleur est représentée en dessous de la figure : vert pour les zones avec un écoulement préférentiel, rouge pour les zones moins exposées et blanc pour les zones exposées dans des conditions de flux proches d'un flux idéalement réparti (i.e. de façon équivalente à la surface du média sans considérations de géométrie du filtre ou des effets de bords). Les résultats ont montré que la répartition de la fluorescéine était principalement concentrée au niveau de la gaine où arrive l'air extrait des bureaux. Sur ces filtres neufs, le flux d'air était donc majoritaire sur le filtre n°1 (de droite) et dans les poches n°2, 3 et 4.

Pour augmenter les chances de collecter des aérosols microbiens il a été choisi de placer les coupons dans les poches où le flux d'air était le plus important.

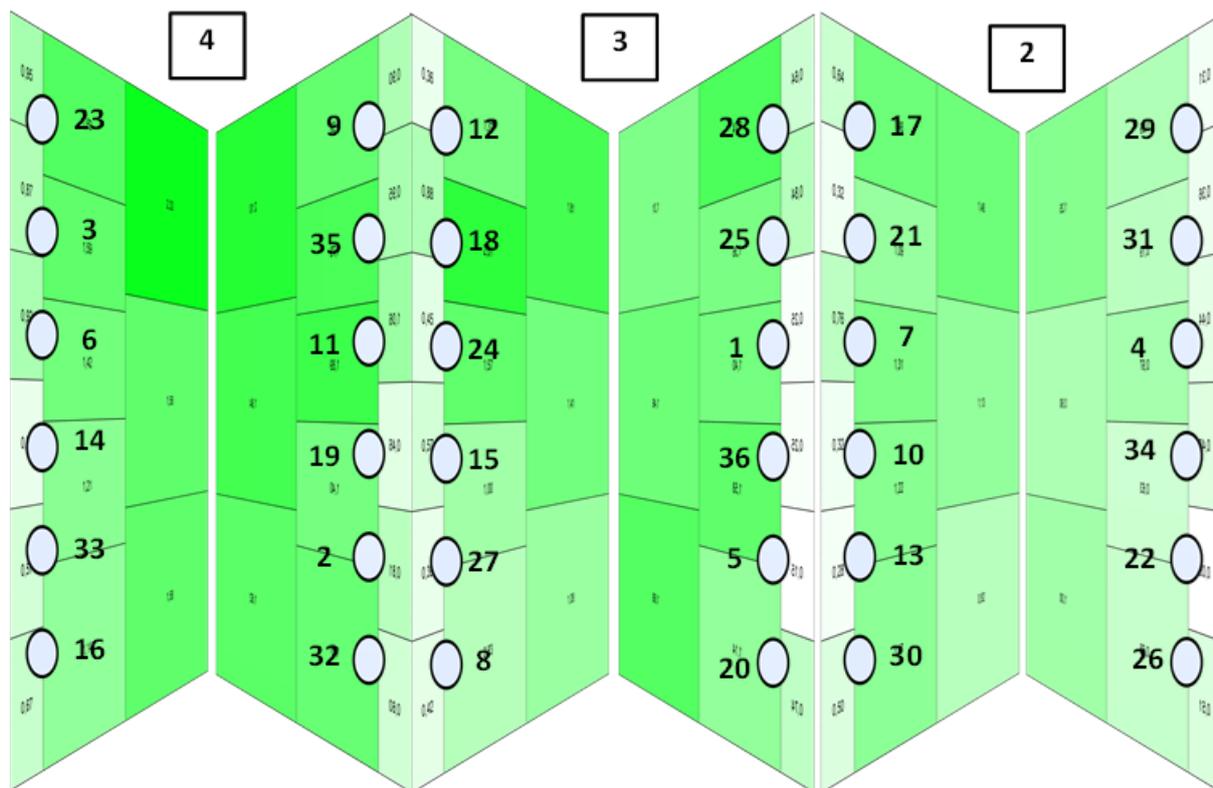


Figure 2-15 : Cartographie des coupons fixés dans les poches 2, 3 et 4 du filtre n°1 du compartiment d'extraction

Les coupons ont été répartis de façon à être suffisamment éloignés les uns des autres lors des prélèvements. Et il a été choisi de placer majoritairement les premiers coupons à prélever assez proches des zones où le flux d'air est le plus important. Ce choix a été fait en prenant en compte que cette zone avec un fort flux d'air sera colmatée préférentiellement et qu'un équilibre avec les zones où le flux est plus faible s'établira pendant les semaines à suivre.

La même expérience de génération de fluorescéine a été répétée à la fin des 13 mois d'échantillonnage sur les filtres colmatés (Figure 2-16). On observe toujours une quantité de fluorescéine plus importante sur les poches 2, 3 et 4 du filtre n°1, comme sur les filtres neufs. Mais la répartition semble plus homogène avec la présence de zone ayant reçues plus de fluorescéine dans le filtre n°2 avec ces filtres colmatés, contrairement aux neufs. Il semble donc qu'il y a bien un phénomène d'homogénéisation de la répartition du flux d'air à la surface des filtres lors du processus de colmatage.



Figure 2-16 : Représentation de la répartition de la fluorescéine dans les poches des filtres colmatés après quantification par spectrophotométrie

3.2. Caractérisation des particules

3.2.1. Concentration massique des particules

La concentration massique de particules dans l'air extérieur a été mesurée en continu. Pour cela un TEOM™ 1405 (Thermo Scientific™, USA) a été placé sur le point de prélèvement numéro 1 en amont du compartiment de l'air frais soufflé vers les bureaux (Figure 2-17). Il s'agit d'un moniteur de particules ambiantes qui mesure la masse des particules avec une microbalance oscillante. Il permet de mesurer des concentrations allant de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ jusqu'à plusieurs g/m^3 .

3.2.2. Distribution granulométrique des particules

Les efficacités de filtration particulaire des filtres des deux compartiments de la CTA ont été mesurées avec l'Aerosol Particle Sizer (APS™, USA) 33321. Cet appareil permet de mesurer la distribution en taille des particules (Particle Size Distribution, PSD) en amont et en aval des compartiments de la CTA (aux emplacements de mesure 1, 2, 3 et 4). Ce spectromètre fournit des mesures aérodynamiques en temps réel et à haute résolution de particules d'un diamètre compris entre $0,5$ et $20 \mu\text{m}$ environ (Figure 2-17).



A.



B.

Figure 2-17 : Photographie du TEOM 1405 (A) et de l'APS (B)

Les résultats obtenus avec l'APS ont été exprimés en utilisant les équations suivantes.

L'efficacité de filtration particulaire totale (EFP_{tot}) a été calculée en utilisant l'équation (1), en tenant compte de la somme des particules comptées en amont et en aval des filtres sur les $j = 52$ canaux de l'APS, liés aux diamètres des particules $< 0,523 \mu\text{m}$ à $19,81 \mu\text{m}$, avec $Cp_{amt,j}$ et $Cp_{aval,j}$ les concentrations en particules en amont et en aval des filtres, mesurées avec l'APS pour les particules ayant un diamètre/canal dp_j . Les incertitudes relatives associées à EFP_{tot} étaient comprises dans un écart de 5%.

$$EFP_{tot} = 1 - \frac{\sum_{j=1}^{52} Cp_{amt,j}}{\sum_{j=1}^{52} Cp_{aval,j}} \quad (1)$$

Les efficacités fractionnelles de filtration des particules EFP_j , associées aux particules ayant un diamètre dp_j , ont été calculées en utilisant l'équation (2).

$$EFP_j = 1 - \frac{Cp_{aval,j}}{Cp_{amt,j}} \quad (2)$$

Les efficacités moyennes de filtration fractionnelle des particules \overline{EFP}_i ont été calculées pour plusieurs gammes de diamètres de particules correspondant aux étages de l'impacteur Andersen : 7 μm et plus ; 4,7 - 7,0 μm ; 3,3 - 4,7 μm ; 2,1 - 3,3 μm ; 1,1 - 2,1 μm et 0,65-1,1 μm , ce qui correspond respectivement aux étages 1 à 6.

En pratique, les \overline{EFP}_i ont été calculées pour les étages 2 à 6 et lorsque le nombre de particules comptées en amont du filtre était suffisamment élevé pour calculer une efficacité. \overline{EFP}_i a été calculée en faisant la moyenne des \overline{EFP}_j entre 5,05 et 6,73 μm (5 canaux), entre 3,52 et 4,7 μm (5 canaux), entre 2,29 et 3,28 μm (6 canaux), entre 1,2 et 2,13 μm (9 canaux), et entre 0,67 et 1,11 μm (8 canaux).

Les incertitudes absolues $\Delta\overline{EFP}_i$ ont été calculées avec l'écart-type des \overline{EFP}_i , équation (3).

$$\Delta\overline{EFP}_i = \sqrt{\frac{\sum_{\text{min } dp \text{ étage } i}^{\text{max } dp \text{ étage } i} (EFP_j - \overline{EFP}_i \mu_{EFP_i})^2}{N}} \quad (3)$$

Avec N le nombre de canaux de l'APS pris en compte pour le calcul des \overline{EFP}_i pour les particules ayant une gamme de diamètre/étage i de l'impacteur.

3.3. Caractérisation des aérosols microbiens

3.3.1. Analyse des aérosols microbiens viables par impacteur Andersen

Les concentrations en aérosols bactériens et fongiques cultivables ont été mesurées avec deux impacteurs en cascade Andersen à 6 étages (Tisch Environmental Inc., USA). Les prélèvements ont été réalisés en amont et en aval des deux compartiments de la CTA, aux points d'échantillonnage 1, 2, 3 et 4. Le débit d'air lors de l'échantillonnage était de 28,3 L/min. Les échantillons ont été prélevés pendant 10, 15 et 20 min sur des boîtes de Pétri avec des milieux gélosés permettant de favoriser la croissance bactérienne ou fongique. Entre chaque prélèvement les impacteurs ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70%.

Les différents milieux utilisés pour les prélèvements sont présentés dans le Tableau 2-3.

Milieux bactériens	Milieux fongiques
--------------------	-------------------

<p>LB (Luria Bertani)</p> <p>Milieu non-sélectif pour l'isolation des bactéries aérobies mésophiles.</p>	<p>MEA (Malt Extract Agar)</p> <p>Milieu non-sélectif pour le dénombrement des levures et moisissures. Milieu utilisé dans la détermination de la contamination fongique de l'air.</p>
<p>R2A (Reasoner's 2A agar)</p> <p>Milieu non-sélectif pour la croissance des bactéries inhibées sur des milieux organiques riches.</p>	<p>DG18 (Dichloran-Glycerol)</p> <p>Milieu sélectif à faible disponibilité en eau pour les moisissures xérophiles. Milieu utilisé dans la détermination de la contamination fongique de l'air.</p>
	<p>DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol)</p> <p>Milieu sélectif pour la croissance des levures et des moisissures (inhibe les bactéries et empêche la propagation des colonies).</p>

Tableau 2-3 : Milieux utilisés pour les impacteurs Andersen

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 25°C avec une lecture au bout de 48h puis une surveillance des boîtes jusqu'à 5 jours. Les concentrations en aérosols microbiens cultivables ont été exprimés en utilisant les équations suivantes.

Les concentrations d'aérosols microbiens cultivables (AMC) en amont et en aval des filtres ont été déterminées à partir de deux échantillonnages en parallèle avec les deux impacteurs Andersen, puis en dénombrant les colonies sur les 6 étages des impacteurs.

Les concentrations en aérosols microbiens cultivables échantillonnés en amont et en aval des filtres pour les étages i des impacteurs, $C_{AMC_{amt,i}}$ et $C_{AMC_{aval,i}}$ sont présentés dans l'équation (4).

$$C_{AMC_{amt\ ou\ aval,i}} = \frac{Nb_{colonie,i}}{V_{air}} \quad (4)$$

Avec V_{air} le volume d'air échantillonné (m^3) et $Nb_{colonie,i}$ le nombre de colonies dénombrées sur le plateau i de l'impacteur.

Les concentrations microbiennes totales échantillonnées en amont ou en aval des filtres $C_{AMC_{amt}}$ et $C_{AMC_{aval}}$ (UFC/ m^3) sont calculées en utilisant les 6 étages des impacteurs, selon l'équation (5).

$$C_{AMC_{tot}} = \frac{\sum_{i=1}^6 Nb_{colonie,i}}{V_{air}} \quad (5)$$

L'efficacité de filtration microbienne totale EFM_{tot} et l'efficacité de filtration microbienne fractionnelle EFM_i , telle que l' EFM associée au plateau i , sont calculées en utilisant l'équation (6).

$$EFM_{tot \text{ ou } i} = 1 - \frac{C_{AMC_{aval,tot \text{ ou } i}}}{C_{AMC_{amt,tot \text{ ou } i}}} \quad (6)$$

L'équation (7) a été utilisée pour calculer les incertitudes relatives des efficacités de filtration fractionnelles microbiennes $\frac{\Delta EFM_i}{|EFM_i|}$.

$$\frac{\Delta EFM_i}{|EFM_i|} = \left| \frac{1}{C_{AMC_{amt,i}}} \right| \times \Delta C_{AMC_{aval,i}} + \left| \frac{C_{AMC_{aval,i}}}{(C_{AMC_{amt,i}})^2} \right| \times \Delta C_{AMC_{amt,i}} \quad (7)$$

Avec $\Delta C_{AMC_{amt \text{ ou } aval,i}}$ l'incertitude absolue liée à la concentration microbienne de l'étage i . Selon (Macher, 1989) une incertitude relative de $x = 7\%$ peut être appliquée pour une concentration microbienne avec ce type d'impacteur à six étapes. L'incertitude relative des concentrations microbiennes fractionnelles échantillonnées en amont et en aval des filtres était déterminée par l'équation 5.

$$\frac{\Delta C_{AMC_{amt,i}}}{C_{AMC_{amt,i}}} = \frac{\Delta C_{AMC_{aval,i}}}{C_{AMC_{aval,i}}} = x = 7\% \quad (8)$$

Les incertitudes absolues de la concentration microbienne fractionnelle ont été exprimées à l'aide de l'équation (9) lorsque le nombre de colonies dénombrées en aval du compartiment était supérieur à 0.

$$\frac{\Delta EFM_i}{|EFM_i|} = 2 \times \frac{C_{AMC_{aval,i}}}{C_{AMC_{AMT,i}}} \times x \quad (9)$$

Les incertitudes relatives des concentrations microbiennes totales échantillonnées en amont et en aval des filtres et l'efficacité de filtration microbienne totale (EFM) ont été calculées à l'aide des équations (10) et (11).

$$\frac{\Delta C_{AMC_{amt,tot}}}{C_{AMC_{amt,tot}}} = \frac{\Delta C_{AMC_{aval,tot}}}{C_{AMC_{aval,tot}}} = 6 \times x \quad (10)$$

$$\frac{\Delta EFM_{tot}}{|EFM_{tot}|} = 2 \times \frac{C_{AMC_{aval,tot}}}{C_{AMC_{amt,tot}}} \times 6 \times x \quad (11)$$

3.3.2. Échantillonnage par cassettes de filtration

Les cassettes filtrantes ont été utilisées pour réaliser des prélèvements en simultané en amont et en aval de chaque compartiment de la CTA. Les cassettes de 37 mm (Gelman Sciences Inc., USA) étaient reliées à une pompe permettant de maintenir un débit de prélèvement de 12,5 L/min. Les prélèvements étaient effectués pendant une durée de 6h. Les filtres utilisés étaient des filtres GF/F de chez Whatman™ (Whatman plc., Royaume-Uni) en fibre de verre borosilicate de porosité 0,7 µm. Les filtres ont ensuite été conditionnés pour être conservés à -20°C.

3.3.3. Analyses en biologie moléculaire

3.3.3.1. Extraction des acides nucléiques

Les coupons de média filtrant ont été traités avec un protocole particulier avant de procéder à l'extraction des acides nucléiques. La Figure 2-18 présente la méthode utilisée afin d'augmenter l'efficacité des extractions des acides nucléiques. Les filtres des cassettes de filtration n'ont pas été découpés et ont été utilisés entièrement pour les extractions.

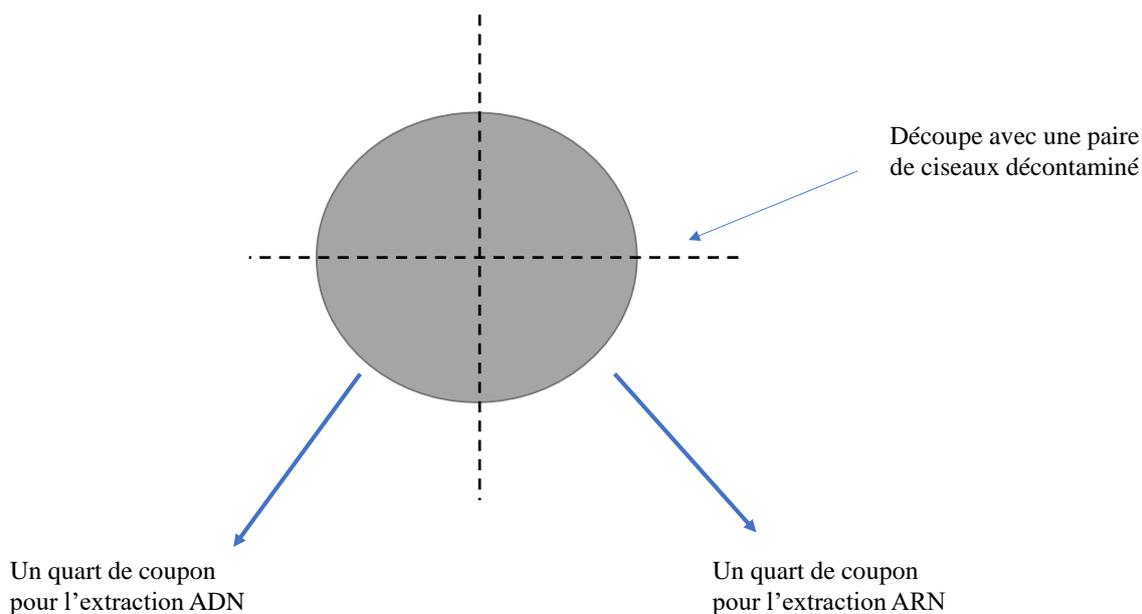


Figure 2-18 : Schéma de la méthodologie adoptée pour l'extraction des acides nucléiques.

La première étape des protocoles des kits d'extraction implique de mettre en contact une solution de lyse des microorganismes pour libérer les acides nucléiques, avec les filtres utilisés comme échantillon. Le kit d'extraction utilisé pour les ADN est le kit DNeasy PowerWater (Qiagen, Allemagne) pour extraction ADN. Pour les extractions des ARN le kit MagMAX Microbiome (Thermo Fisher Scientific, États-Unis) a été sélectionné. Ces kits sont conçus et compatibles pour extraire des acides nucléiques à partir d'échantillons tels que des filtres membrane pour la filtration d'échantillon d'eau. Les coupons présentent des caractéristiques différentes par rapport à un filtre membrane. Le média filtrant des coupons est épais et a un pouvoir absorbant important. Après des tests préliminaires, il a été décidé d'utiliser un quart de coupon pour l'extraction des ADN et un second quart de coupon pour l'extraction des ARN. Le demi-coupon restant est conservé à -20°C .

Pour les deux types d'extraction, le quart de coupon est divisé en deux. Avec deux pinces décontaminées, le média filtrant est séparé en deux parties et ils sont placés dans le tube de lyse contenant les billes pour le *bead-beating*. Le processus de *bead-beating* permet de libérer les acides nucléiques des microorganismes ayant des parois cellulaires robustes. Des microbilles de verre ou de céramique vont briser ces parois avec une forte agitation du tube. Le protocole fourni avec les kits d'extraction est appliqué pour la suite des étapes.

Les extraits d'ADN sont dosés avec un spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, États-Unis). Les extraits d'ARN ne sont pas dosés car le volume d'élution (50 μL) était trop faible et il était préférable de le conserver pour les analyses.

3.3.3.2. Protocole qPCR et RTqPCR

Une analyse par PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur les extraits ADN des coupons. *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été sélectionnées comme cibles. Le kit qPCR QuantiNova (Qiagen, Allemagne) a été utilisé. Des gammes de concentration des spores par culture et comptage sur lame ont été réalisées pour les cibles moisissures et par comptage sur boîte de Pétri pour les bactéries. Ces gammes ont été analysées par qPCR, et une correspondance a été établie entre le nombre de cycles de qPCR des échantillons et un équivalent UFC/cm² ou spores/cm² de filtre. Les programmes qPCR suivants ont été utilisés :

	Nombre de cycles	Durée du cycle	Température
Activation PCR initiale	1	2 minutes	95°C
Dénaturation	45	5 secondes	95°C
Hybridation + polymérisation		5 secondes	57,2°C

Tableau 2-4 : Programme du thermocycleur pour les cibles *A. niger* et *P. chrysogenum*

	Nombre de cycles	Durée du cycle	Température
Initial PCR activation	1	2 minutes	95°C
Dénaturation	40	5 secondes	95°C
Hybridation + polymérisation		5 secondes	60°C

Tableau 2-5 : Programme du thermocycleur pour les cibles *C. cladosporioides* et *S. aureus*

	Nombre de cycles	Durée du cycle	Température
Initial PCR activation	1	3 minutes	95°C
Dénaturation	40	15 secondes	95°C
Hybridation + polymérisation		30 secondes	60°C

Tableau 2-6 : Programme du thermocycleur pour la cible *P. aeruginosa*

Une trousse qPCR / RTqPCR a été sélectionnée pour l'analyse des virus respiratoires, il s'agit du kit Respiratory Panel IV Viasure RTPCR Detection kits (CerTest Biotec, Espagne). Cette trousse permet l'identification et la différenciation clinique d'un panel de virus respiratoires. Ce kit est une trousse prête à l'emploi contenant tous les réactifs lyophilisés préparés dans des tubes à réhydrater. Le kit permet de cibler les virus présentés dans le Tableau 2-7.

<i>Influenza A and Influenza B (Flu A and/or B)</i>	<i>human Adenovirus (AdV)</i>
<i>Influenza A (H1N1)2009</i>	<i>Metapneumovirus (MPV)</i>
<i>Respiratory Syncytial Virus type A and/or B (RSV A and/or B)</i>	<i>Bocavirus (BoV)</i>
<i>Parainfluenza 1 (PIV-1)</i>	<i>Human rhinovirus (HRV)</i>
<i>Parainfluenza 2 (PIV-2)</i>	<i>Human enterovirus (HEV)</i>
<i>Parainfluenza 3 (PIV-3)</i>	<i>Coronavirus (CoV) 229E, NL63, OC43, HKU1</i>
<i>Parainfluenza 4 (PIV-4)</i>	

Tableau 2-7 : Virus ciblés par la trousse qPCR et RTqPCR

Le thermocycleur utilisé pour les toutes les amplifications est le CFX96 (Biorad, États-Unis). Le programme utilisé est le suivant (Tableau 2-8).

	Nombre de cycles	Durée du cycle	Température
RT	1	15 minutes	45°C
Activation enzyme	1	2 minutes	95°C
Dénaturation	45	10 secondes	95°C
Data collection		50 secondes	60°C

Tableau 2-8 : Programme du thermocycleur pour le kit RTqPCR.

Un second kit RTqPCR a été sélectionné pour l'identification et la différenciation du SARS-CoV-2. Le kit SARS-CoV-2 Viasure RTqPCR Detection kits (CerTest Biotec, Espagne) a été utilisé pour réaliser ces identifications. Le protocole du kit a été appliqué et le programme pour les cycles du thermocycleur est le suivant (Tableau 2-9) :

	Nombre de cycles	Durée du cycle	Température
RT	1	15 minutes	45°C

Activation enzyme	1	2 minutes	95°C
Dénaturation	45	10 secondes	95°C
Data collection		50 secondes	60°C

Tableau 2-9 : Programme du thermocycleur pour le kit SARS-CoV-2

3.3.3.3. Séquençage 16S, 18S et ITS

Les extraits d'ADN ont été transmis à la société Helixio (Saint-Beauzire, France). Un séquençage utilisant la technique Illumina (Illumina Inc, États-Unis) a été réalisé. Les quantités d'ADN envoyées étaient très faibles et ont nécessité des étapes de concentration des échantillons. Les séquençages 16S et ITS ont été réalisés mais les quantités d'ADN restantes étaient trop faibles pour le séquençage 18S.

Après le séquençage, les fichiers bruts sont générés par le séquenceur Illumina NextSeq 500 et sont fournis par le prestataire de séquençage (Eurofins genomics) en format fastq. Deux fichiers fastq sont disponibles par échantillon : un pour chaque read (R1 et R2 pour chaque sens de séquençage). Les génomes bactériens sont séquencés sur le gène 16S en utilisant les amorces V3-V4 (Klindworth et al., 2013) et les génomes de moisissures en utilisant les amorces ITS2 (White et al., 1990) et se trouvent dans un même fichier.

La Figure 2-19 présente les différentes étapes de l'analyse des séquences.

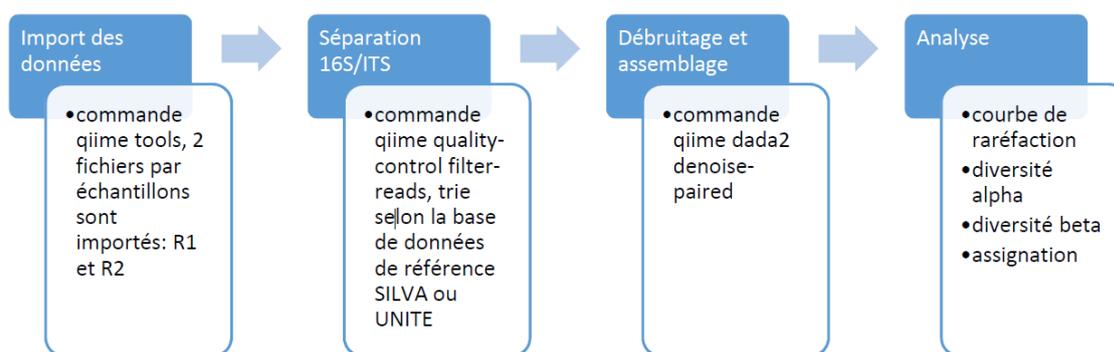


Figure 2-19 : Workflow utilisé pour l'analyse des séquences

L'utilisation de cette méthode d'analyse des séquences donne des résultats exprimés en ASV (*Amplicon Sequence Variants*) ce qui correspond à un équivalent OTU mais avec l'outil DADA2.

4. Conclusions

Les grandes étapes méthodologiques ont été de (i) caractériser le média filtrant des filtres, (ii) déterminer l'influence du coupon et de la double épaisseur de média filtrant sur la perméabilité et la répartition du flux d'air, (iii) apprécier la répartition du flux d'air dans le compartiment d'extraction de la CTA, (iv) mettre au point la méthodologie d'échantillonnage et d'analyse pendant 13 mois.

Les premières étapes de cette étude étaient nécessaires afin d'adapter dans les meilleures conditions un protocole à suivre pour la campagne de mesure. La caractérisation du média filtrant et l'observation d'une diminution du flux d'air d'environ 50% au niveau des coupons est un élément important à prendre en considération dans les analyses des résultats.

La cartographie des zones préférentielles du passage du flux d'air dans les filtres du compartiment d'extraction était une donnée importante pour la répartition des coupons sur la surface de filtration.

Ces différents points mis en avant pendant les étapes préliminaires à l'analyse de la contamination de l'air intérieur par les coupons sont déterminant, et ont été importants pour appréhender les résultats présentés dans les chapitres suivants.

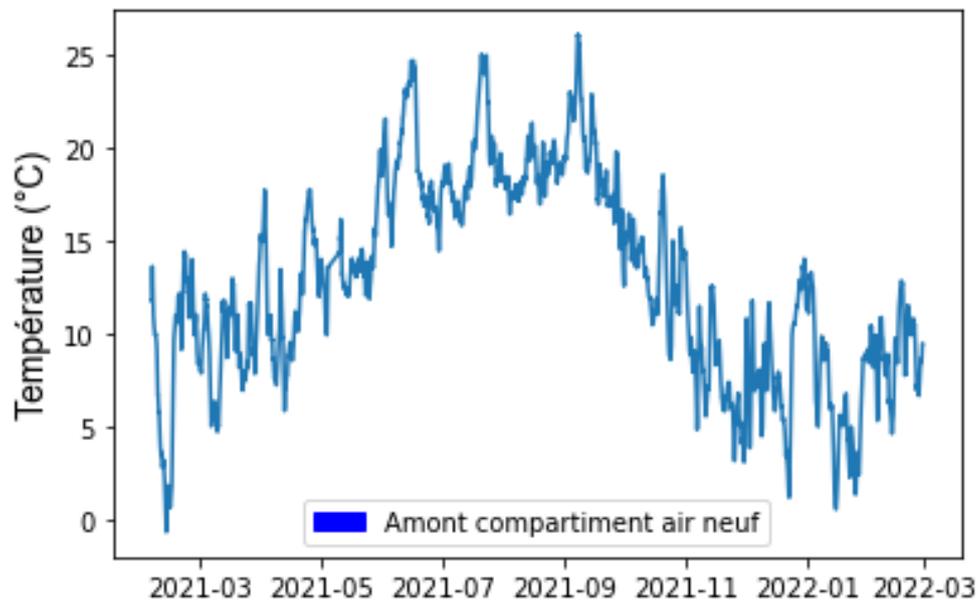
Chapitre 3 : Efficacité de filtration de la CTA

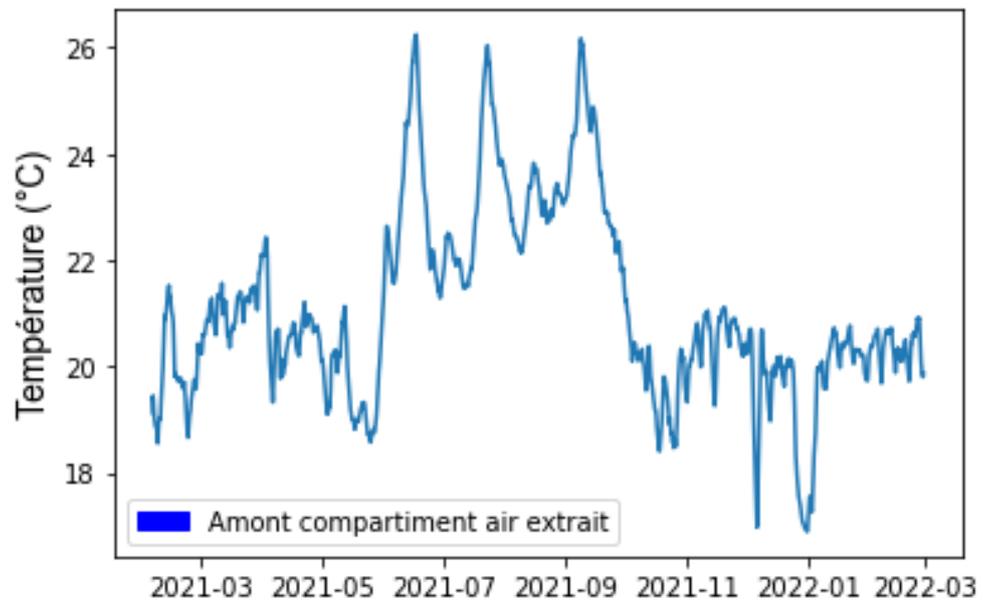
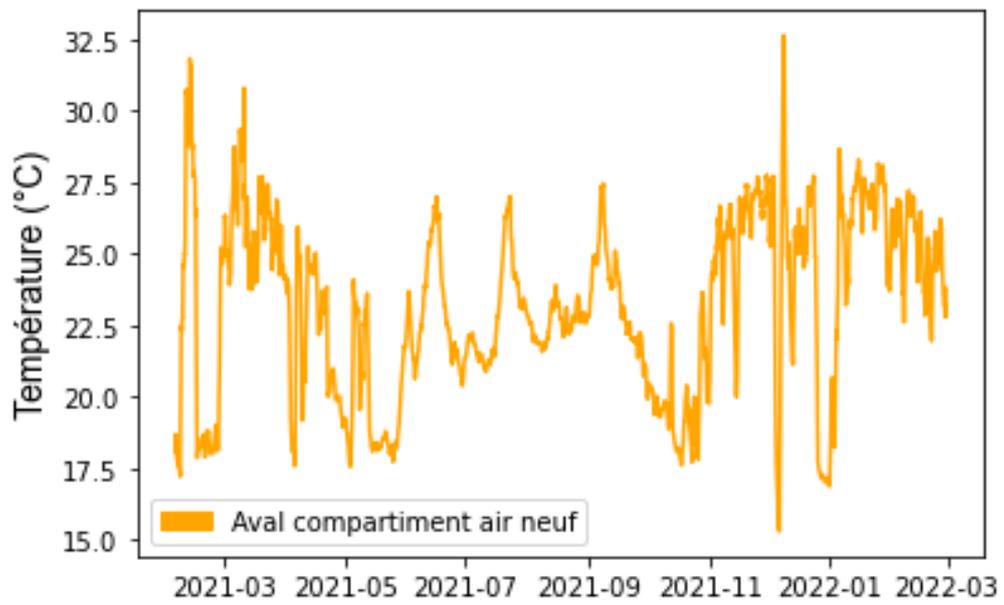
1. Introduction

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent de répondre aux objectifs suivants : (i) évaluer les conditions climatiques de l'air circulant dans la CTA sur une période de 13 mois, (ii) étudier l'évolution de la perte de charge dans les filtres, (iii) de quantifier l'évolution des efficacités de filtration particulaire et microbiologique, et (iv) établir si les efficacités de filtration microbiologique et particulaire sont liées. Ces résultats obtenus en conditions réelles pendant 12 mois sont comparés à des études antérieures réalisées en conditions de laboratoire avec des aérosols contrôlés.

2. Conditions climatiques

La Figure 3-1 montre les variations de température mesurées pendant l'étude pour l'air neuf insufflé dans les bureaux et l'air extrait des bureaux en amont et en aval des deux compartiments.





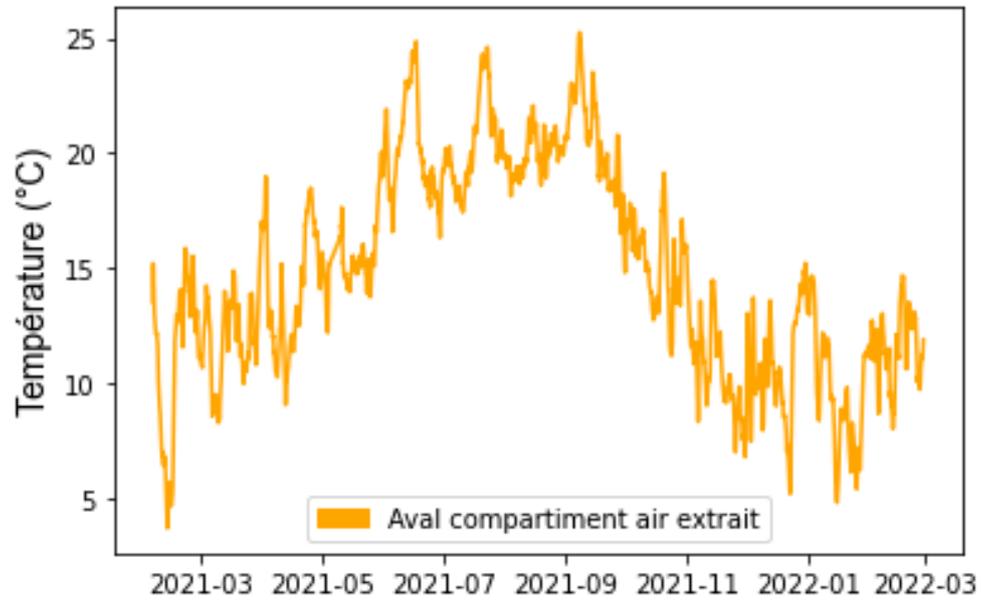
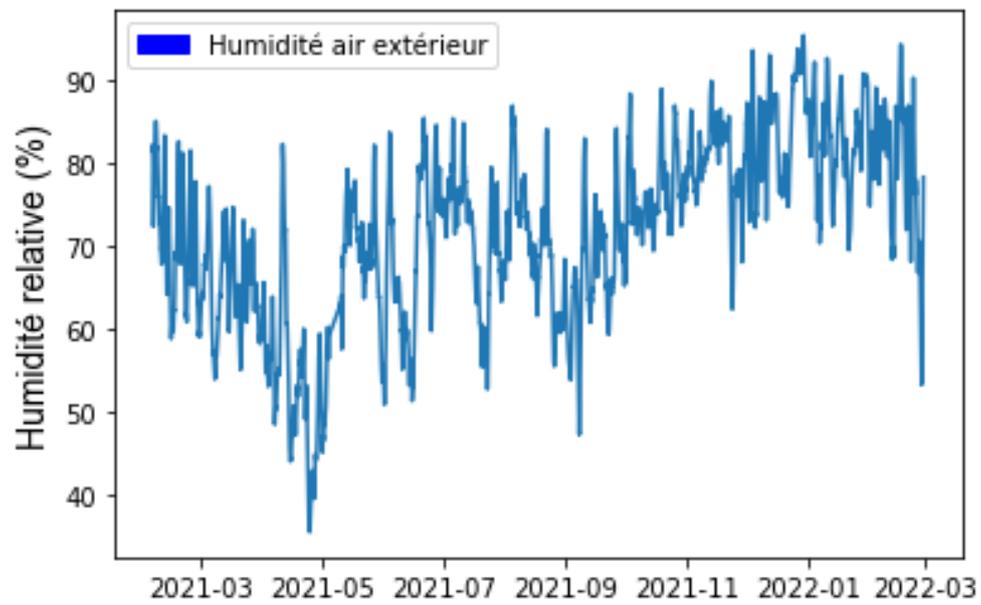


Figure 3-1 : Températures mesurées en amont et en aval des deux compartiments de la CTA. Moyenne glissante des données sur 24 heures.



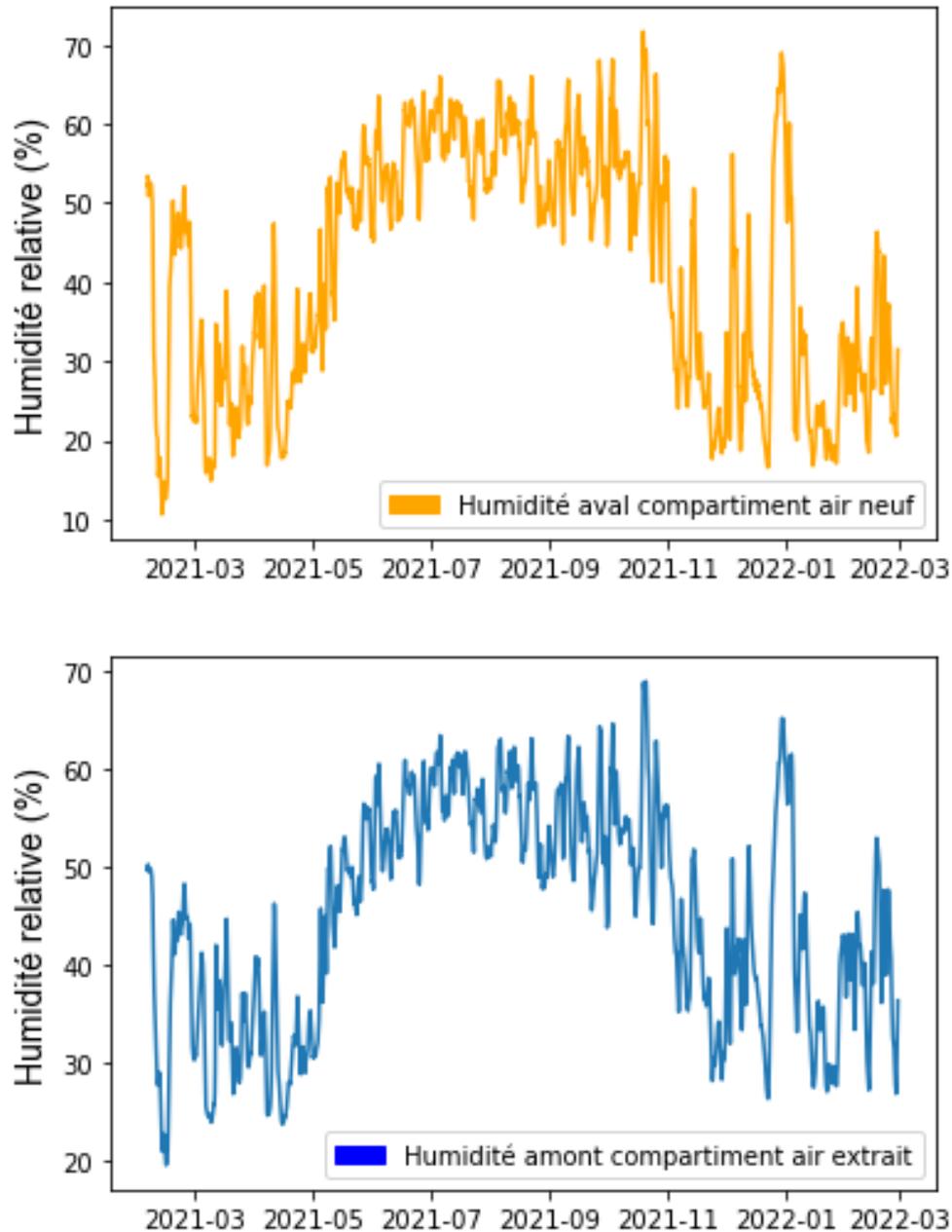


Figure 3-2 : Humidité relatives mesurées en amont et aval du compartiment de l'air neuf et en amont du compartiment de l'air extrait. Moyenne glissante des données sur 24h.

La température de l'air frais (25% 9,0°C ; moyenne 13,2°C ; 75% 18,3°C) était inférieure à celle de l'air extrait des bureaux (25% 20,1°C ; moyenne 20,6°C ; 75% 21,1°C), et l'humidité relative était plus élevée que dans l'air extrait (air frais 25% 63,6 (%) ; moyenne 75,6(%) ; 75% 83,2(%) et air extrait 25% 28,9 (%) ; moyenne 32,3(%) ; 75% 37,3(%)) (Figure 3-2). En été, il y avait moins de différences entre l'air frais et l'air extrait. L'humidité relative de l'air extrait des bureaux était plus élevée entre juin et novembre. La température a évolué en fonction de la saison, la température de l'air extérieur présentant une plus grande amplitude. Les filtres des deux compartiments ont été exposés à deux environnements différents en termes de température

et d'humidité. La température et l'humidité relative de l'air extrait ont suivi un schéma logique, la batterie de chauffage et l'échangeur de chaleur rotatif assurant le confort thermique des occupants du bâtiment (HR entre 30% et 60%).

3. Mesures de la concentration et de la distribution des particules

Le Tableau 3-1 montre les résultats obtenus par la mesure TEOM en amont du compartiment de l'air neuf.

La concentration massique des particules dans l'air frais entrant dans la CTA a fluctué autour de 12,5 g/m³ au cours des 12 mois. Des pics isolés ont également été observés, avec une augmentation moyenne de la valeur allant jusqu'à 150 g/m³ sur 24 h. Le Tableau 3-1 montre que 50 % des concentrations massiques de particules se situaient entre 7,2 et 16,6 g/m³.

Le Tableau 3-2 montre les données sur la distribution granulométrique et la concentration en nombre des particules dans l'air neuf et l'air extrait en amont et en aval des compartiments. Ces données ont été obtenues avec les mesures APS.

	Concentration massique des particules (g/m ³)
Moyenne	12.5
Écart-type	9.7
25%	7.2
50%	11.3
75%	16.6

Tableau 3-1 : Statistiques sur la concentration massique des particules (moyenne, écart-type, percentiles).

Diamètre médian en μm (écart-type géométrique) / Concentration en nombre des particules ($\#/\text{cm}^3$)				
Date du prélèvement	Amont compartiment air neuf	Aval compartiment air neuf	Amont compartiment air extrait	Aval compartiment air extrait
17 Mars 2021	0.923 (1,474) /12,02	0,786 (1,303) /2,85	0,855 (1,377) /4,32	0,774 (1,316) /1,29
23 Avril 2021	0.764 (1,558) /12,55	0,650 (1,292) /3,39	0,746 (1,404) /2,31	0,656 (1,283) /1,01
17 Juin 2021	0.646 (1,510) /19,30	0,604 (1,265) /7,44	0,642 (1,440) /9,70	0,604 (1,246) /4,31
27 Août 2021	0.801 (1,532) /16,83	0,704 (1,301) /7,51	0,766 (1,453) /9,88	0,689 (1,283) /4,42
23 Septembre 2021	0.681 (1,234) /96,65	0,664 (1,192) /40,42	0,687 (1,341) /22,97	0,670 (1,200) /9,90
28 Octobre 2021	0.685 (1,448) /16,01	0,653 (1,243) /7,59	0,654 (1,324) /7,98	0,640 (1,217) /3,36
11 Février 2022	0.669 (1,374) /41,97	0,642 (1,211) /15,26	0,644 (1,287) /8,98	0,631 (1,228) /3,84
25 Février 2022	0.770 (1,506) /27,29	0,717 (1,308) /6,59	0,812 (1,397) /5,73	0,727 (1,303) /2,48

Tableau 3-2 : Diamètre médians, écart-types géométriques et concentrations en nombre des particules dans l'air neuf et l'air extrait.

Les profils de distribution de la taille des particules (PSD : *particle size distribution*) dans l'air extrait à l'entrée de la CTA étaient similaires pour les différents échantillons de l'étude. Il y avait une distribution monomodale polydispersée des particules ; le diamètre modal moyen se situait entre 0,6 μm et 0,7 μm . Les PSD étaient plus variées pour l'air frais à l'entrée de la CTA, avec des diamètres modaux variant plus largement que pour le compartiment d'air extrait (Tableau 3-2). Dans les deux cas, la majorité des particules avaient un diamètre médian inférieur à 1 μm . Il était difficile de déterminer le diamètre modal des particules car il était proche du diamètre minimal de l'APS (0,5 μm). Un autre échantillonneur permettant une analyse plus large de l'APS aurait pu permettre l'investigation de particules de plus petits diamètres.

Les mesures APS ont montré que la concentration de particules était plus élevée dans l'air entrant dans le compartiment d'air neuf que dans l'air des bureaux entrant dans le compartiment d'air extrait de la CTA. Les filtres du compartiment d'air neuf ont réduit la quantité de particules soufflées dans les bureaux. Une comparaison des concentrations de particules à la sortie du compartiment neuf et à l'entrée du compartiment de l'air extrait a révélé que l'occupation des bureaux et les activités qui s'y déroulent n'entraînent pas d'augmentation significative des particules.

4. Mesures de la concentration microbienne

Les Figure 3-3 et Figure 3-4 et le Tableau 3-3 montrent les concentrations d'aérosols microbiens cultivables (AMC) analysées dans l'air neuf et l'air extrait à partir des numérations sur boîte avec des milieux favorisant la croissance bactérienne ou fongique.

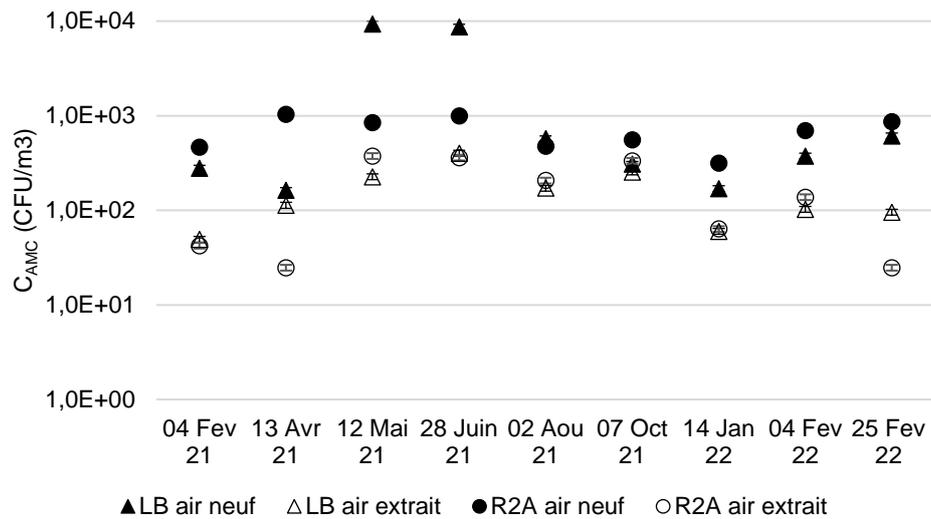


Figure 3-3 : Aérosols microbiens cultivables avec des milieux favorisant la croissance bactérienne. Prélèvements dans l'air neuf et extrait en amont des filtres de la CTA, sur 13 mois.

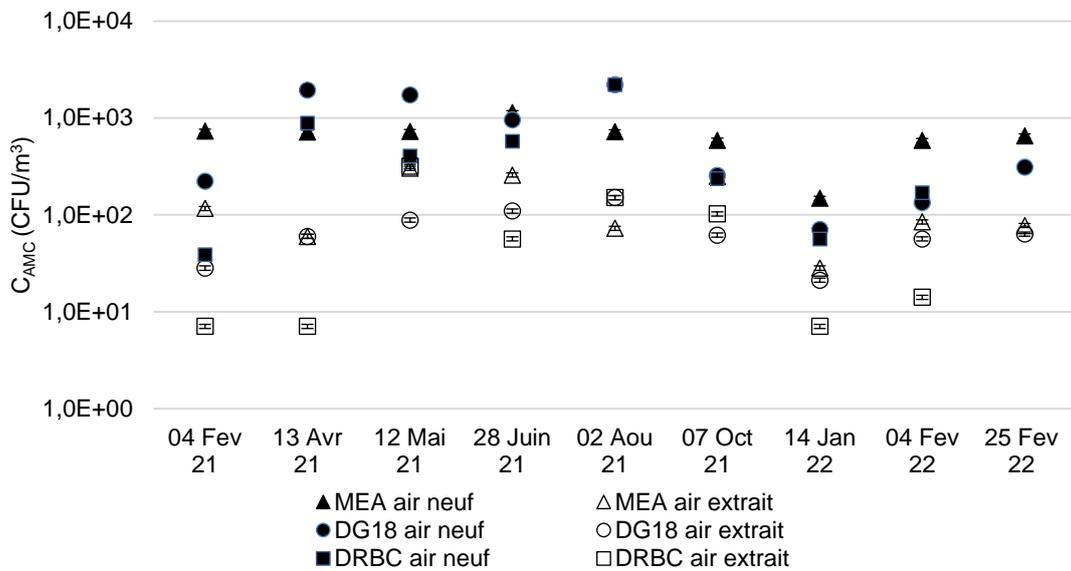


Figure 3-4 : Concentration des aérosols fongiques cultivables prélevés dans l'air neuf et extrait en amont des filtres de la CTA pendant 13 mois.

Diamètre moyen des AMC (μm)	LB		R2A		MEA		DG18		DRBC	
	Entrée air frais	Entrée air extrait								
4 Février 2021	2,74	2,68	2,24	2,69	2,70	2,66	3,34	2,73	2,72	2,15
13 Avril 2021	2,99	2,44	4,49	1,34	4,21	3,61	4,14	5,56	4,14	4,28
12 Mai 2021	3,98	2,49	4,24	1,94	4,64	2,36	2,21	2,62	4,23	3,16
28 Juin 2021	4,57	3,58	3,07	2,00	3,94	2,86	3,33	3,13	3,40	3,18
2 Août 2021	3,04	2,52	4,08	2,38	3,69	3,66	4,45	2,68	4,02	2,70
7 Octobre 2021	2,75	2,76	2,81	2,42	3,63	3,05	3,27	3,44	4,43	2,60
14 Janvier 2022	3,39	1,99	4,62	3,36	3,02	2,29	3,56	2,52	3,36	1,60
4 Février 2022	2,70	2,80	3,24	2,54	3,03	2,52	2,92	2,94	3,98	3,03
25 Février 2022	2,68	3,14	2,95	2,63	3,12	2,22	3,28	3,05	N.d.	N.d.

Tableau 3-3 : Diamètres moyens des aérosols microbiens cultivables (AMC) mesurés par impaction sur les cinq milieux.

Pour les bactéries, les concentrations de micro-organismes cultivables dans l'air étaient plus élevées dans l'air neuf que dans l'air extrait (Figure 3-3). Pour l'air neuf, les concentrations étaient comprises entre 10^2 et 10^3 UFC/m³. Une augmentation de la concentration en aérosols microbiens de type bactérien a été observée pour les mois de mai et juin 2021 sur milieu LB, avec un pic à 10^4 UFC/m³. Ce phénomène a également été observé par (Frankel et al., 2012).

Les concentrations de moisissures étaient plus élevées pour les trois milieux (MEA, DG18 et DRBC) dans l'air neuf (Figure 3-4) ; les niveaux de concentration étaient d'environ 10^3 UFC/m³ pour l'air neuf. Les concentrations d'aérosols fongiques cultivables dans l'air extrait étaient comprises entre 10^1 et 10^2 UFC/m³ ; ces concentrations étaient stables tout au long de l'échantillonnage au cours des différents mois. Il semble que le milieu MEA répond et montre une concentration microbienne légèrement supérieure aux autres milieux fongiques.

Les concentrations de micro-organismes cultivables dans l'air extérieur étaient plus élevées que celles mesurées dans l'air extrait des bureaux (10^2 et 10^3 UFC/m³ contre environ 10^2 UFC/m³ respectivement). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans la littérature pour les concentrations en UFC/m³ dans l'air extérieur et les échantillons prélevés dans les bureaux ou autres bâtiments (Anua et al., 2020; Chao et al., 2002; Pastuszka et al., 2000; Sautour et al., 2009). Les milieux de culture utilisés LB et R2A ont été utilisés pour favoriser la croissance des genres bactériens, et MEA DG18 et DRBC pour les genres fongiques. Cela peut également donner des réponses et des résultats différents. Les milieux fongiques DRBC et DG18 sont des milieux sélectifs ; un composé du milieu inhibe la croissance des bactéries. Comme les bactéries ne peuvent pas se multiplier, seules les espèces fongiques ont été mesurées sur ces milieux. Le

milieu MEA ne contient pas d'inhibiteur de la croissance bactérienne, mais ses nutriments favorisent principalement la croissance des levures et des moisissures. Les milieux bactériens sélectionnés ne contiennent pas d'inhibiteurs de la croissance fongique, mais contiennent des nutriments qui favorisent la croissance bactérienne. Les colonies bactériennes et fongiques ont été comptées sur les boîtes contenant ces milieux. Les résultats doivent être interprétés avec prudence, car on peut s'attendre à des concentrations plus élevées d'aérosols bactériens dans l'air extrait des bureaux. En effet, l'occupation des bureaux par le personnel génère des aérosols bactériens issus du microbiome de l'occupant, tel est le cas dans des habitations (Dunn et al., 2013).

Les diamètres moyens des AMC mesurés par impaction sur les cinq milieux variaient entre 1,35 μm et 5,56 μm selon le milieu de culture, le jour et le lieu d'échantillonnage. Le diamètre moyen était de $3,13 \pm 0,77 \mu\text{m}$ (écart-type). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études. Les auteurs ont déterminé avec un impacteur Andersen à 6 étages que la valeur moyenne des diamètres des aérosols fongiques était comprise entre 2,1 μm et 4,7 μm (Pastuszka et al., 2000) ou entre 1,1 μm et 3,3 μm (Jeong et al., 2022). Le diamètre limite des aérosols bactériens était inférieur à 2,1 μm (Jeong et al., 2022).

Pour l'air extrait, les diamètres moyens des AMC des milieux fongiques ($2,95 \pm 0,76 \mu\text{m}$) semblent être plus élevés que ceux des milieux bactériens ($2,54 \pm 0,53 \mu\text{m}$) avec un niveau de confiance de 98 %. Pour l'air neuf, les résultats indiquent que les diamètres moyens des AMC issus des milieux fongiques ($3,57 \pm 0,62 \mu\text{m}$) n'étaient pas significativement plus élevés (avec un niveau de confiance de 98%) que ceux issus des milieux bactériens ($3,37 \pm 0,76 \mu\text{m}$). Ce résultat est cohérent avec le fait que les moisissures peuvent se développer sur les milieux bactériens.

Les diamètres moyens des AMC dans l'air neuf étaient significativement plus élevés que ceux de l'air extrait, avec un niveau de confiance supérieur à 99 % pour les milieux bactériens et fongiques. La croissance des espèces fongiques sur les milieux LB et R2A a interféré avec l'observation des colonies bactériennes. De plus, les aérosols bactériens sont plus sensibles à la dessiccation que les spores fongiques, et la collecte par impaction directe peut générer un stress, pouvant également affecter les résultats.

5. Performance de filtration

5.1. Perte de charge des filtres et efficacités de filtration particulaire

La Figure 3-5 montre les pertes de charge des filtres de la CTA mesurées pendant l'étude. Les courbes représentant les pertes de charge des deux compartiments ont des profils similaires (Figure 3-5). Du début de l'étude jusqu'en septembre, les pertes de charge des deux filtres étaient stables, entre 65 et 70 Pa. En septembre, après environ 6 mois de fonctionnement, la perte de charge a montré une augmentation linéaire, atteignant environ 90 Pa pour l'air neuf et 80 Pa pour l'air extrait. Cette évolution de la perte de charge a suivi un profil classique, avec deux phases de colmatage (Novick et al., 1992). La première étape correspondait à un colmatage en profondeur. Le média filtrant en fibre de verre capture les particules dans sa profondeur. Dans cette période, la perte de charge n'a pas changé et est restée stable. Ensuite, on a observé une augmentation de la perte de charge des filtres, liée au colmatage et à la formation d'un gâteau de particules à la surface du média filtrant. Les pertes de charge de juin et juillet sont liées aux opérations de maintenance et aux coupures de courant.

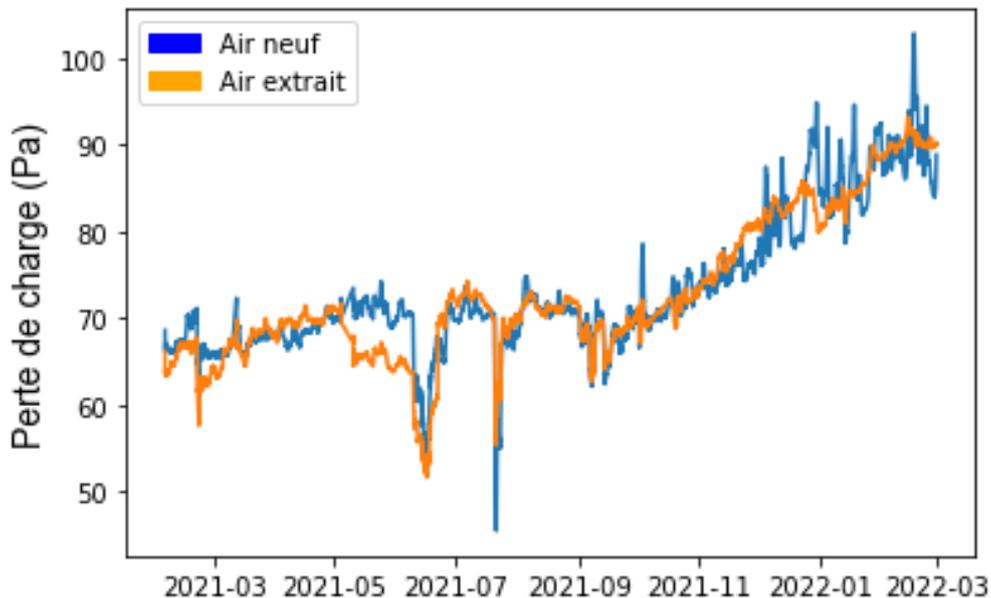


Figure 3-5 : Perte de charge du filtre sur 13 mois. Moyenne glissante des données sur 24 h.

La Figure 3-6 montre les résultats de l'efficacité de filtration des particules totales (EFP) et les diamètres médians correspondants en amont des compartiments. Figure 3-7 montre les EFP fractionnées pour des diamètres de 0,5 μm et 1 μm .

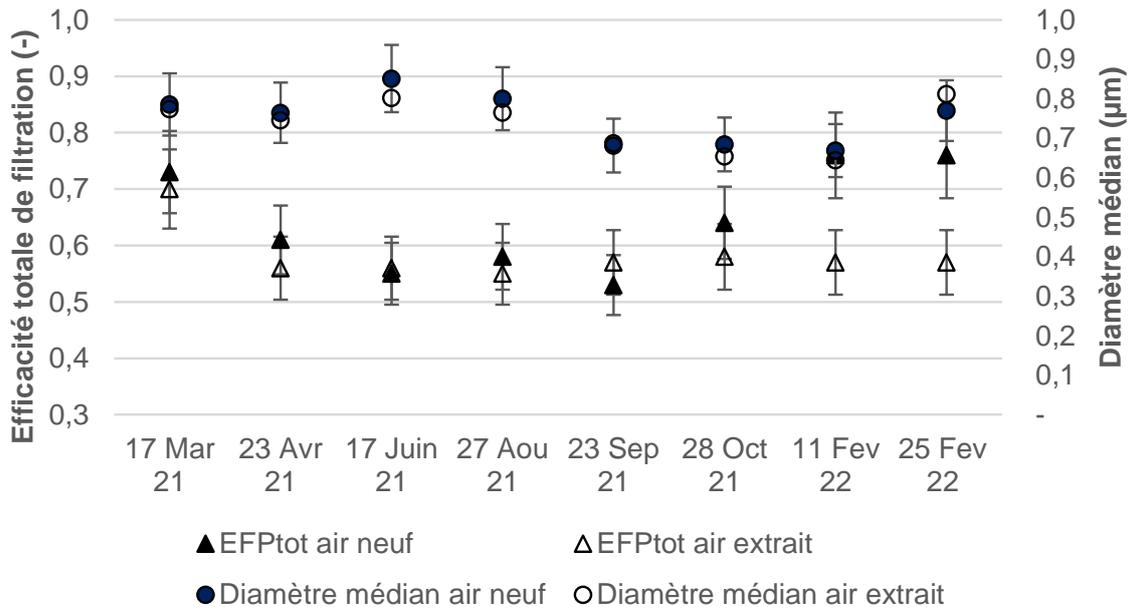
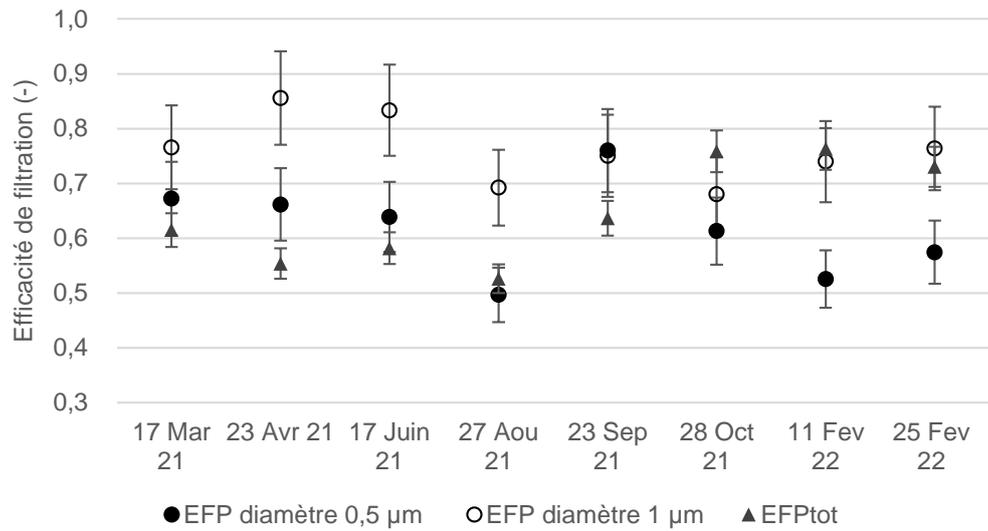


Figure 3-6 : Efficacité totale de la filtration des particules (EFP_{tot}) sur 13 mois.



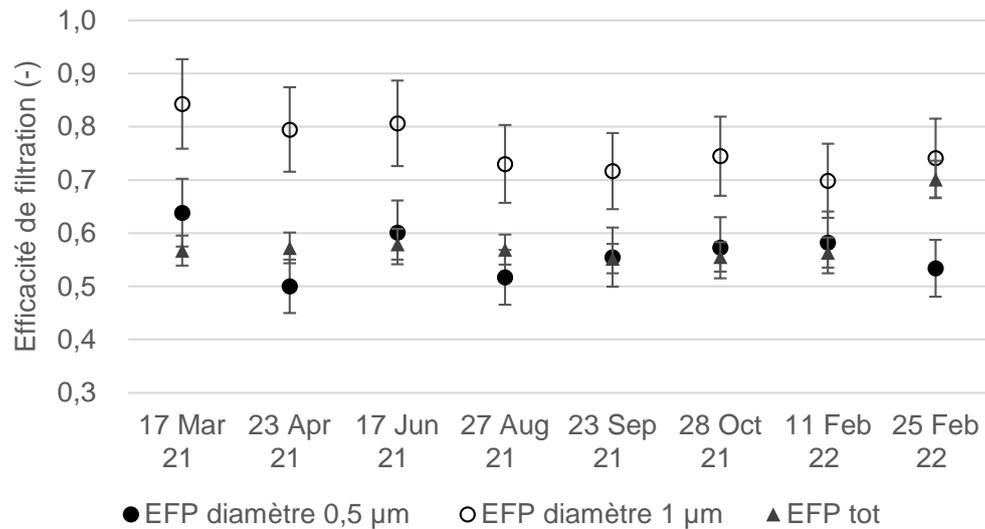


Figure 3-7 : Efficacité de filtration totale des particules et efficacité de filtration pour les aérosols de 0,5 µm et 1 µm de diamètre dans les compartiments d'air neuf (haut) et d'air extrait (bas) sur 13 mois.

Les efficacités de filtration des particules totales des deux compartiments variaient entre 50% et 80% (Figure 3-6). Le diamètre médian des particules était compris entre 0,7 et 0,9 µm. Aucune augmentation de EFP_{tot} n'a été observée au cours de l'étude, malgré le colmatage des filtres et l'augmentation de la perte de charge. Les efficacités de filtration des particules à 0,5 µm et 1 µm ont également été stables tout au long de l'étude. Une augmentation de l'efficacité de filtration des particules d'un filtre est généralement observée avec le colmatage du filtre et la formation d'un gâteau de particules sur le média filtrant (Novick et al., 1992). Il est possible que les filtres n'aient pas été suffisamment colmatés pour que cela soit observé. Augmenter la durée d'échantillonnage sur une plus longue période de temps aurait mis en évidence l'augmentation de l'efficacité.

L'efficacité de filtration des particules d'un diamètre proche de 1 µm se situait entre 70% et 80%. L'efficacité de filtration des particules de 1 µm de diamètre était supérieure à celle des particules de 0,5 µm de diamètre (Figure 3-7), tant dans le compartiment d'air neuf que celui de l'air extrait des bureaux. Dans cette gamme de diamètres, les particules sont collectées principalement par le mécanisme d'impaction, dont l'efficacité augmente avec le diamètre ou l'inertie des particules (Davies, 1973; Novick et al., 1992). L'efficacité de filtration avec l'air extrait pour les particules de 0,5 µm de diamètre était proche de l'efficacité de filtration des particules totales.

5.2. Comparaison de l'efficacité de la filtration microbienne (EFM) fractionnée et de l'efficacité de filtration des particules (EFP).

La Figure 3-78 montre les résultats de l'EFP et de l'EFM fractionnés avec un milieu favorisant la croissance bactérienne en mai 2021.

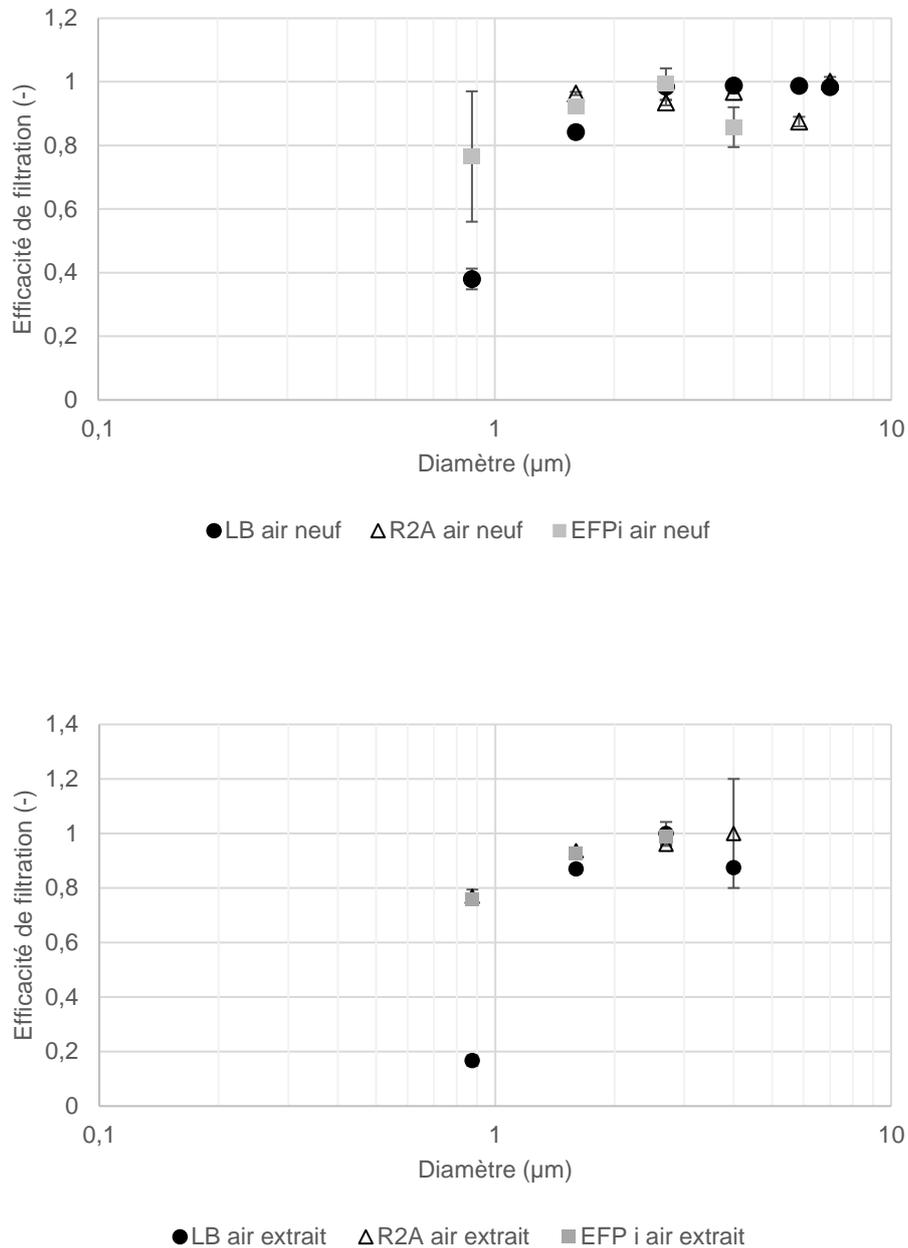


Figure 3-8 : Efficacité de filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux bactériens en mai 2021 pour les compartiments de l'air neuf (haut) et de l'air extrait (bas).

Les efficacités de filtration des AMC bactériens et particulaire étaient plus faibles lorsque le diamètre des aérosols diminuait. Cet effet est observé en lien avec le mécanisme de collecte par impaction. Des concentrations plus faibles en aérosols en amont du compartiment

d'air extrait ont donné des résultats plus contrastés. Pour les AMC de type bactérien d'un diamètre supérieur à 1 μm , les efficacités de filtration fractionnée étaient comprises entre 80 % et 100 % pour les deux compartiments. En dessous de 1 μm , les efficacités étaient inférieures à 80 %.

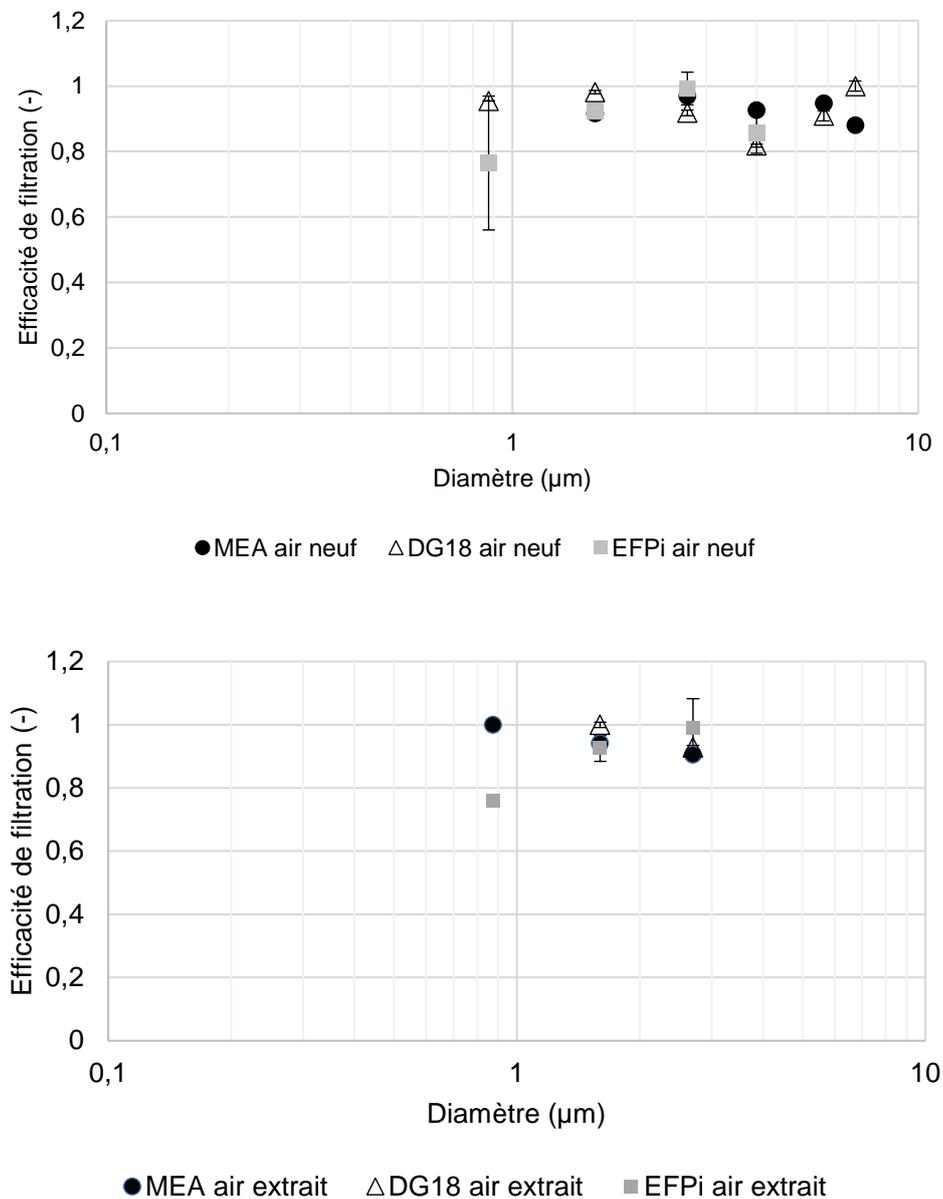


Figure 3-9 : Efficacités de filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux fongiques en mai 2021 pour les compartiments frais (haut) et extraits (bas).

La Figure 3-9 montre les résultats d'EFP et d'EFM fractionnés avec des milieux fongiques en mai 2021.

L'EFM fractionnée des aérosols fongiques pour les milieux MEA et DG18 était compris entre 80 % et 100 % pour le compartiment d'air neuf. Contrairement aux résultats obtenus avec

les aérosols bactériens, il n'y a pas eu de diminution de l'EFM fractionné pour les aérosols fongiques cultivables d'un diamètre inférieur à 1 μm .

Les résultats pour le compartiment de l'air extrait étaient similaires pour l'EFP et l'EFM fractionnés, dans les milieux DG18 et MEA. De plus, il n'y a pas eu de diminution de l'EFM fractionnée pour les aérosols fongiques cultivables analysés dans le milieu MEA pour les diamètres inférieurs à 1 μm , mais les faibles concentrations en amont du compartiment de l'air extrait ont donné des résultats plus contradictoires.

La Figure 3-10 présente les résultats de l'EFP et de l'EFM fractionnés avec des milieux favorisant la croissance bactérienne en février 2022.

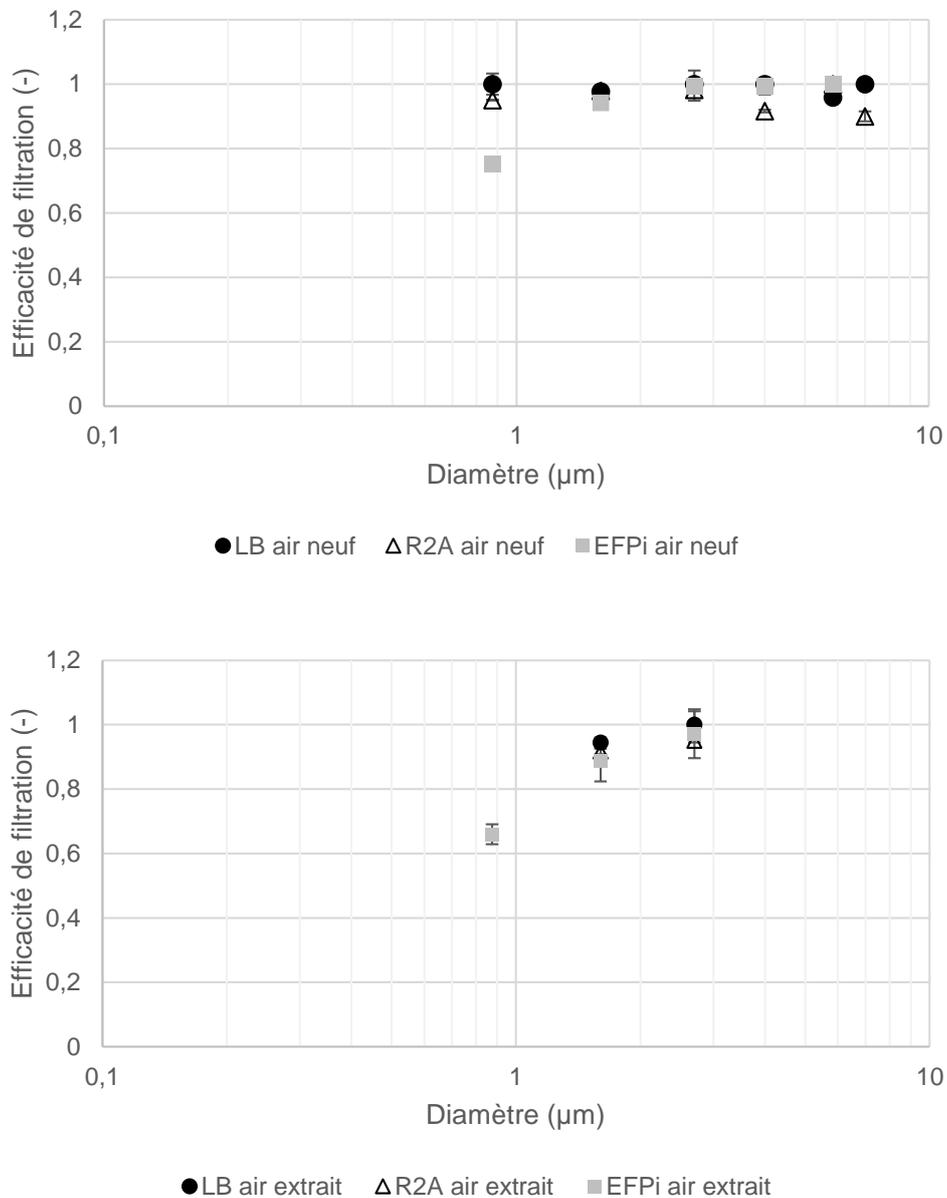
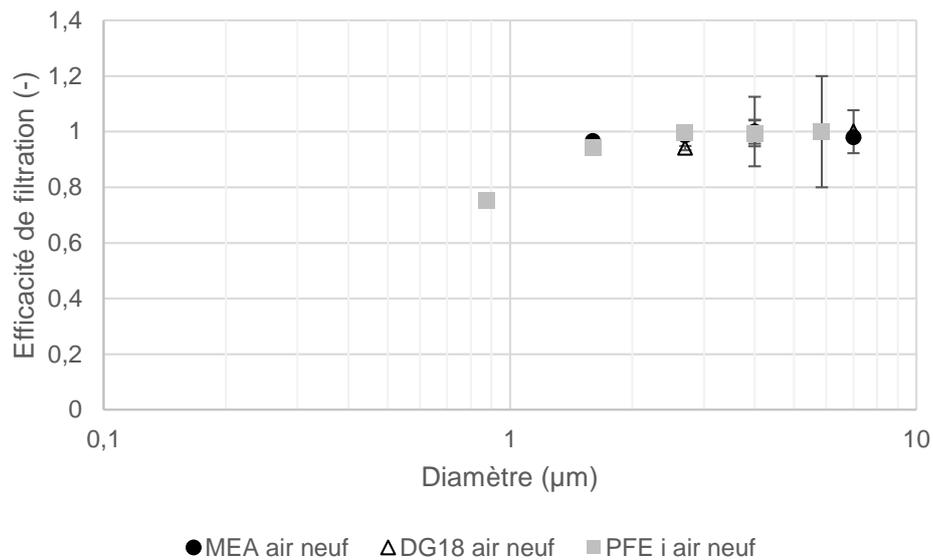


Figure 3-10 : Efficacités de filtration fractionnées pour les particules et les aérosols microbiens cultivables avec des milieux bactériens en février 2022 pour les compartiment air neuf (haut) et extraits (bas).

Les efficacités fractionnées calculées pour les aérosols bactériens cultivables en février 2022 étaient proches de 100 % pour les milieux LB et R2A. Le profil pour les EFP fractionnées était similaire à ceux observés en mai 2021. Il n'y avait pas de données pour l'air extrait relatives à l'EFM fractionné avec des diamètres inférieurs à 1 µm car le nombre de colonies était inférieur à la limite de quantification pour l'air extrait (LQ : limite de quantification inférieure à 10 colonies). En comparaison avec les données de la période mai 2021 à février 2022, l'EFM pour les aérosols inférieurs à 1 µm était d'environ 40 % avec le milieu LB dans l'air neuf en mai 2021, et d'environ 100 % en février 2022. Le colmatage du filtre a donc augmenté l'EFM pour les particules inférieures à 1 µm avec le milieu LB.

La Figure 3-11 montre les résultats de l'EFP fractionnée et de l'EFM avec les milieux fongiques sur le prélèvement de février 2022.



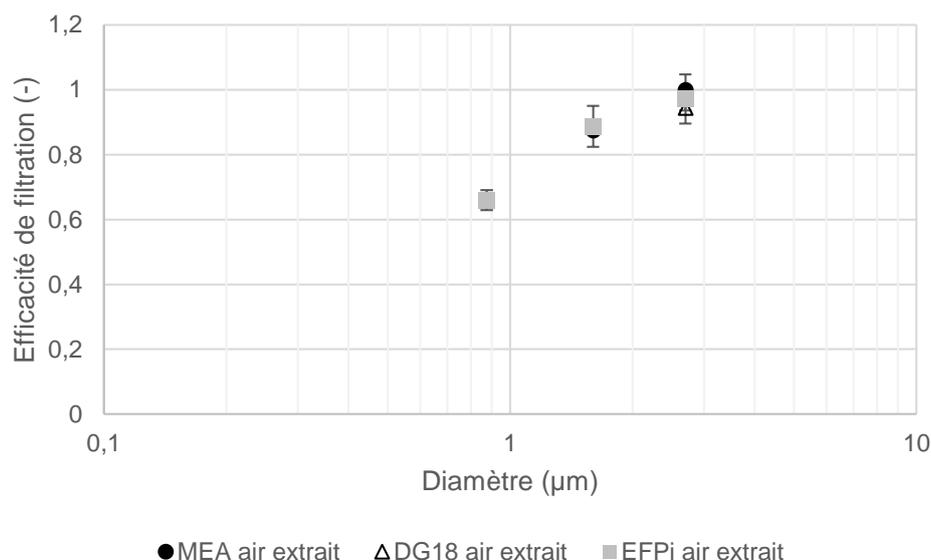


Figure 3-11 : Efficacité de la filtration fractionnée des particules et des aérosols microbiens cultivables avec des milieux fongiques en février 2022 pour les compartiments neuf (haut) et extraits (bas).

Les EFM fractionnées pour les aérosols fongiques cultivables de février 2022 étaient également proches de 100 % pour les milieux MEA et DG18 dans le compartiment d'air neuf. Les mêmes observations ont été faites pour le compartiment d'air extrait. Cependant, il y avait significativement moins d'aérosols microbiens cultivables collectés dans les étages de l'impacteur en amont des filtres. Les données présentées sont similaires à celles mesurées pour les aérosols bactériens cultivables.

Les mesures de l'efficacité de la filtration spectrale des particules et des aérosols microbiens cultivables ont donné des résultats similaires. La comparaison de ces efficacités de filtration pour des diamètres équivalents d'aérosols particulaires et microbiens semble cohérente. Les efficacités mesurées étaient très proches pour tous les diamètres supérieurs à 1 μm. En dessous de 1 μm, les efficacités étaient plus faibles pour les deux types d'aérosols. Il semblerait que les efficacités de filtration des aérosols microbiens puissent être étudiées par la mesure directe des particules dans des conditions réelles de fonctionnement des CTA. Ces résultats obtenus en conditions réelles sont en accord avec ceux obtenus lors d'études précédentes en laboratoire dans des conditions contrôlées (González et al., 2016; Miller-Leiden et al., 1996).

5.3. Identification bactérienne et fongique

Les Tableau 3-4 et Tableau 3-5 présentent les résultats après identification des colonies isolées en utilisant soit la microscopie soit la technique de PCR sur colonie. Ces résultats

doivent être interprétés de façon qualitative et représentent les colonies le plus souvent trouvées sur les boîtes de Pétri après impaction.

Amont filtre air neuf	Aval filtre air neuf	Amont filtre air extrait	Aval filtre air extrait
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	-	-
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	-	-
<i>Sarocladium summerbellii</i>	-	<i>Sarocladium summerbellii</i>	-
<i>Nectria pseudotrichia</i>	-	<i>Nectria pseudotrichia</i>	-

Tableau 3-4 : Identification de colonies fongiques par observations microscopiques ou PCR sur colonies

Amont filtre air neuf	Aval filtre air neuf	Amont filtre air extrait	Aval filtre air extrait
<i>Tsukamurella spumae</i>	-	<i>Micrococcus luteus</i>	-
<i>Kocuria rhizophila</i>	-	<i>Aeromonas sp.</i>	-
<i>Arthrobacter flavus</i>	-	<i>Paracoccus marinus</i>	-

Tableau 3-5 : Identification de colonies bactériennes par PCR sur colonies

En termes de genres fongiques, *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été les plus observés par microscopie optique dans les deux compartiments (Tableau 3-4). Ces moisissures sont couramment identifiées dans les études sur la qualité de l'air intérieur (Dallongeville et al., 2015). D'autres espèces fongiques ont été identifiées dans l'air neuf insufflé vers les bureaux. Ces espèces ont probablement été transportées dans l'air à partir de plantes ou de débris végétaux, car elles sont souvent associées aux interactions plantes-microorganismes.

Micrococcus luteus est une espèce bactérienne présente dans le microbiote de la peau humaine (Kloos & Musselwhite, 1975). Ce résultat concorde avec la littérature car ces bactéries sont probablement liées aux activités humaines dans les bureaux. *Tsukamurella spumae* est un actinomycète isolé de la mousse des stations de boues activées (Nam et al., 2003). *Kocuria rhizophila* est une actinobactérie isolée du rhizoplane d'une quenouille à feuilles étroites (Kovács et al., 1999). Le bâtiment est situé près de la rivière Erdre et de zones humides, où ce type de plante est souvent présent. *Arthrobacter flavus* est une bactérie psychrophile isolée d'un échantillon de tapis de cyanobactéries provenant d'un étang en Antarctique (Reddy et al., 2000). Les bactéries *Aeromonas sp.* et *Paracoccus marinus* sont fréquemment trouvées dans les environnements aquatiques. Leur présence peut également s'expliquer par la proximité de la rivière Erdre (Khan et al., 2008; Parker & Shaw, 2011).

5.4. Analyse des filtres des cassettes de filtration

La méthodologie d'analyse par cassettes de filtration a été réalisée en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 sur les mêmes périodes d'échantillonnages que les prélèvements par impaction. Les filtres analysés par qPCR et RTqPCR n'ont révélé aucun résultat positif.

La filtration sur cassette filtrante en amont et en aval des filtres des deux compartiments n'a pas été une technique fiable pour échantillonner les aérosols bactériens et fongiques. Les limites de la technique proviennent peut-être de la durée d'échantillonnage.

6. Conclusions

Les conditions climatiques mesurées (température et humidité relative) de l'air neuf suivent un schéma saisonnier classique. Celles de l'air extrait des bureaux fluctuent moins car la CTA permet de maintenir des conditions climatiques confortables pour les occupants.

Les pertes de charge des deux filtres à poches installés dans les compartiments d'air neuf et d'air extrait de la centrale de traitement d'air suivent un profil classique sur les 13 mois. Au cours des premiers mois, la perte de charge est stable avec un colmatage profond du média filtrant, puis elle augmente avec le colmatage de la surface du filtre.

Les efficacités totales de filtration particulaire et microbiologique sont restées quasiment stables au cours de l'étude.

Les efficacités de collecte fractionnées des particules et des microorganismes ont également été quantifiées sur 12 mois. Notre étude a démontré que les efficacités de filtration des particules et des aérosols microbiens cultivables d'un diamètre aérodynamique supérieur à 1 μm étaient comparables. La mesure directe de l'efficacité de filtration des particules pourrait être un bon indicateur de l'efficacité de filtration des aérosols microbiens cultivables. Ces résultats obtenus dans des conditions réalistes sont cohérents avec les études précédentes réalisées dans des conditions contrôlées.

Des investigations complémentaires pourront être menées pour établir une relation entre les efficacités de filtration des particules (mesures directes plus faciles à mettre en œuvre) et de filtration microbienne (qui nécessitent un protocole plus complexe).

Chapitre 4 : Campagne de prélèvement sur les filtres de la CTA

1. Introduction

Ce chapitre présente en introduction les mesures de caractérisation d'aérosols microbiens dans l'air ambiant de pièces où l'air est traité par la CTA Bureaux, puis les résultats obtenus avec l'utilisation de la méthodologie d'analyse microbiologique de l'air intérieur via l'échantillonnage de coupon de média filtrant sur les filtres d'extraction d'une CTA. L'objectif est d'identifier et de quantifier les contaminants microbiens présents dans l'air intérieur de bureaux. La méthodologie met en œuvre des coupons de média filtrant prélevés périodiquement sur les filtres et analysés par méthodes culturales et moléculaires. La méthodologie est détaillée dans le Chapitre 2.

2. Caractérisation des aérosols microbiens par échantillonnage dans l'air intérieur et analyses culturales et génomiques

2.1. Description de l'étude

Des analyses dans l'air ambiant ont été effectuées dans deux pièces du bâtiment, situées au rez-de-chaussée haut et au rez-de-jardin bas, dans lesquelles l'air est renouvelé par la CTA Bureaux étudiée. La pièce du rez-de-chaussée haut est une salle destinée à l'utilisation d'un photocopieur, avec un petit espace détente attendant à une bibliothèque (Figure 4-1). On y retrouve également des plantes vertes.

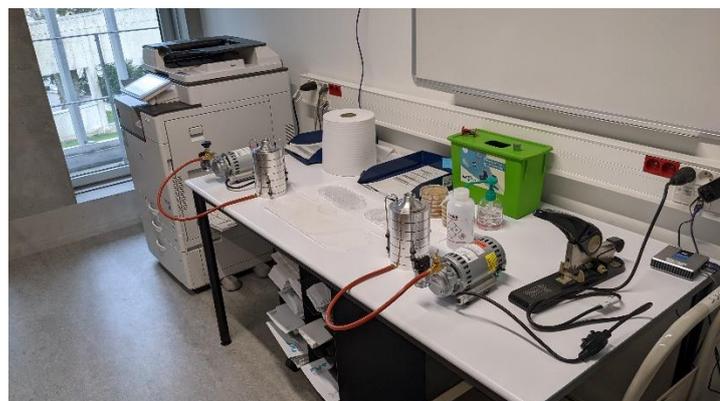


Figure 4-1 : Photographies de la salle du rez-de-chaussée du bâtiment J avec les impacteurs Andersen installés



Figure 4-2 : Photographies de la salle du rez-de-jardin du bâtiment J avec les impacteurs Andersen installés.

La salle du rez-de-jardin bas présenté dans la Figure 4-2 est une salle de convivialité avec un canapé, des sièges, une machine à café. On observe des plantes vertes dans cette salle et les fenêtres sont parfois ouvertes, donnant sur une cour intérieure avec un petit jardin.

Les prélèvements et analyses ont été réalisés deux fois pendant la campagne, une première fois au début en février 2021 et à la fin en février 2022. Des échantillonnages ont été menés (i) avec des impacteurs Andersen (6 étages) et avec 5 milieux de culture différents et (ii) avec des cassettes de filtration, dans le but de caractériser la concentration en aérosols microbiens par le biais d'analyses par culture et génomique respectivement.

2.2. Prélèvement des aérosols microbiens dans l'air par impacteur Andersen et analyse culturale

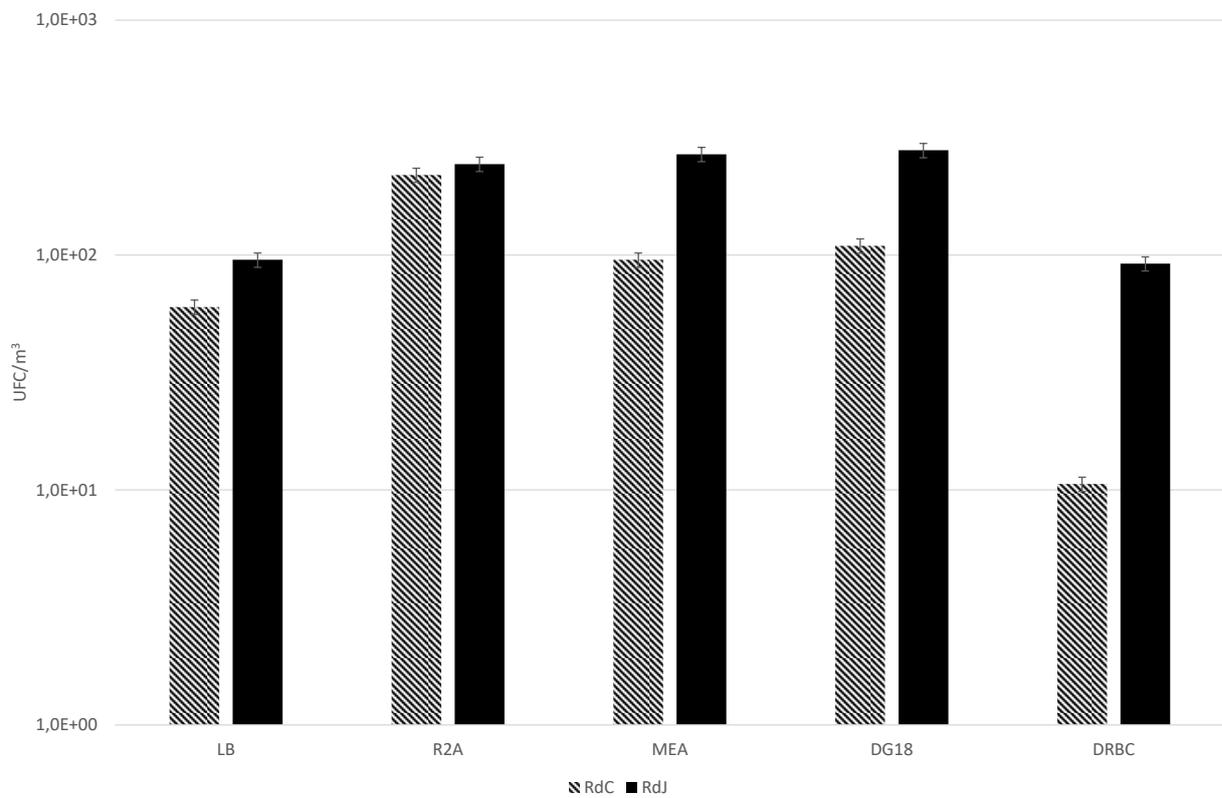


Figure 4-3 : Concentrations en aérosols microbiens cultivables dans les deux salles du bâtiment J prélevés par impaction sur milieux gélosés (impacteurs Andersen). Prélèvements en février 2021. $N=1 \pm 7\%$

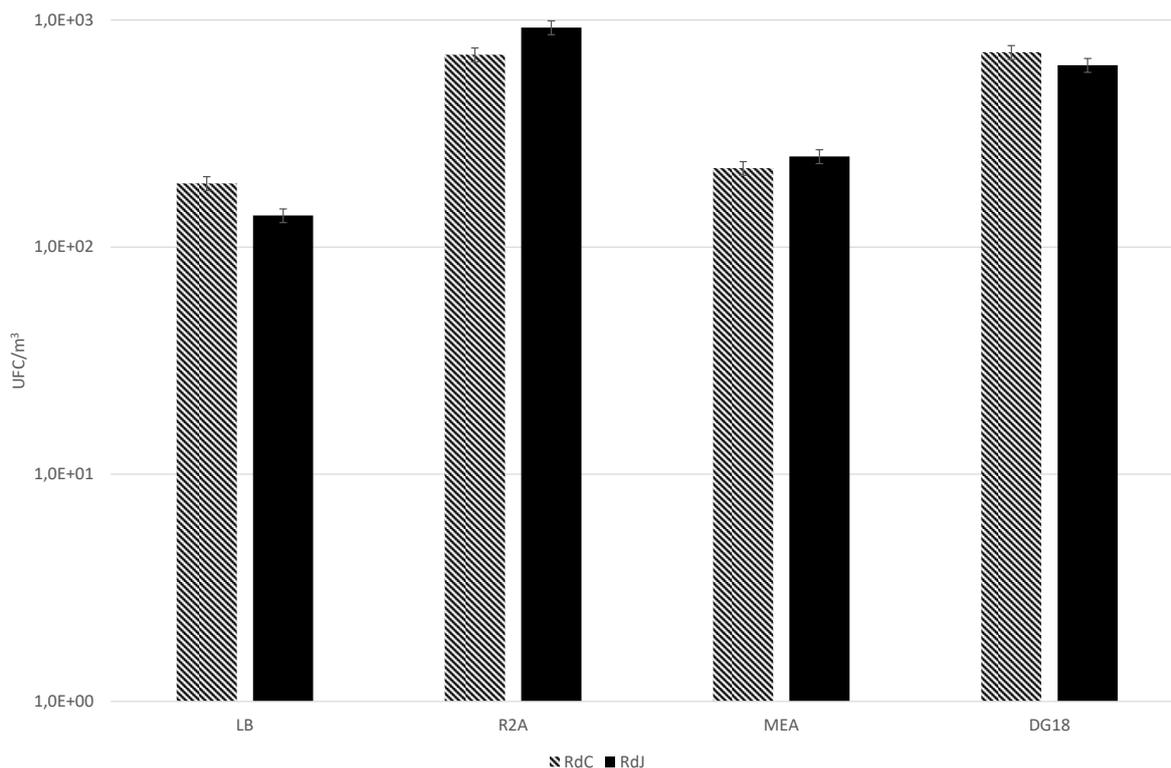


Figure 4-4 : Concentrations en aérosols microbiens cultivables dans les deux salles du bâtiment J prélevés par impaction sur milieux gélosés (impacteurs Andersen). Prélèvements en février 2022. N=1 ± 7%

La Figure 4-3 et la Figure 4-4 présentent les résultats en UFC/m³ mesurés dans l'air ambiant des deux salles du bâtiment J traitée par la CTA 01 sélectionnées pour cette étude. En février 2021, les concentrations en aérosols microbiens cultivables étaient d'environ 10² UFC/m³ pour les milieux bactériens LB et R2A, ainsi que pour les milieux fongiques MEA, DRBC et DG18. Hormis pour le milieu DRBC dans la salle du rez-de-chaussée, une réponse inférieure a été mesurée. Le milieu DRBC n'a pas été utilisé pour le prélèvement du mois de février 2022 car il semble être trop contraignant (pression de sélection) pour la croissance d'une flore fongique diversifiée et donne des réponses plus faibles en termes d'UFC. Les concentrations pour les prélèvements de février 2022 étaient d'environ 10² UFC/m³ pour les milieux favorisant la croissance des moisissures, et inférieures à 10³ UFC/m³ pour les milieux favorisant la croissance des bactéries. Les résultats diffèrent légèrement selon le lieu de prélèvement pour une période donnée, en l'occurrence la pièce du rez-de-chaussée ou celle au niveau inférieur au rez-de-jardin. Il est évident que ces différences de concentration mesurées peuvent être liées à l'activité et aux conditions environnementales au moment du prélèvement. Par exemple une pause réalisée par les occupants juste avant le prélèvement dans la salle de convivialité du rez-de-jardin, ou alors des fenêtres ouvertes pour aérer la pièce de la

photocopieuse au rez-de-chaussée peuvent affecter le résultat. Ces variations correspondent à la vie et une utilisation classique du bâtiment.

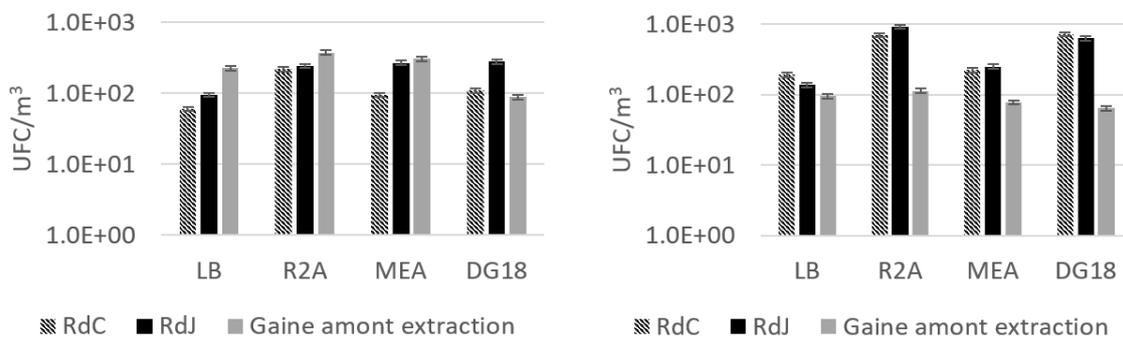


Figure 4-5 : Résultats par impaction Andersen dans le bâtiment et dans les gaines en amont du compartiment d'extraction Février 2021 à gauche et Février 2022 à droite

La Figure 4-5 présente une comparaison des résultats par impaction dans la gaine en amont du compartiment d'extraction de la CTA et des prélèvements dans deux pièces du bâtiment. Les concentrations sont du même ordre de grandeur dans les deux environnements avec au maximum -1 log d'écart pour les prélèvements dans la gaine.

2.3. Prélèvement des aérosols microbiens dans l'air par cassette filtrante et analyse génomique

Des prélèvements sur cassettes filtrantes avec des filtres en fibres de verre et une pompe réglée à un débit de 12,5 L/min pendant 6h, ont été réalisés dans les deux mêmes pièces en début de campagne de prélèvement et à la fin pour des analyses génomiques. Ces filtres ont été conservés à -20°C puis extraits et analysés en suivant le protocole décrit dans le Chapitre 2. Les analyses par qPCR avec des amorces ciblant les bactéries et les moisissures, ainsi que par RTqPCR avec des amorces ciblant des virus respiratoires, n'ont révélé aucun résultat positif. Les quantités d'ADN et d'ARN captées étaient en dessous des limites de quantification des protocoles.

2.4. Conclusions

Les temps de prélèvement avec les impacteurs Andersen ou la sensibilité et le protocole des cassettes de filtration ne sont peut-être pas les mieux adaptés pour appréhender la contamination microbiologique de l'air intérieur par les bactéries, les moisissures et les virus. Ces résultats confirment l'intérêt de disposer d'un nouveau protocole d'échantillonnage de la

contamination microbienne présente dans les bureaux, en particulier lorsque des analyses génomiques de type qPCR ou RTqPCR sont mises en œuvre.

L'équipe de recherche a donc proposé d'utiliser les filtres présents dans la CTA comme échantillonneurs de l'air extrait des bureaux. En effet, ces filtres accumulent sur une grande période de temps, de l'ordre de plusieurs mois, les aérosols microbiens présents dans l'air intérieur des bureaux. Un protocole a été mis au point et est détaillé dans le Chapitre 2 expliquant la stratégie et la méthodologie d'analyse par l'utilisation de coupons de média filtrant disposés en amont de la surface des filtres.

Les résultats obtenus sont présentés dans la suite de ce chapitre avec en (i) les résultats obtenus avec les analyses par cultures microbiennes sur milieux gélosés, (ii) les résultats par analyses de biologie moléculaire en qPCR et RT-PCR, (iii) les résultats par séquençage ADN et (iv) une dernière partie comparative de ces différentes approches.

2.5. Prélèvement des coupons et empoussièrement du filtre

Les coupons de média filtrant installés sur le filtre dans le compartiment d'extraction sont prélevés tous les mois de février 2021 à février 2022 en suivant la méthodologie précisée dans le Chapitre 2. À chaque prélèvement, le filtre d'extraction est photographié afin de suivre visuellement son encrassement avec les particules collectées. La Figure 4-66 et la Figure 4-77 présentent des photographies du filtre au début de la campagne en mars 2021 et à la fin en février 2022.



Figure 4-6 : Photographies du filtre avec les coupons après les prélèvements de mars 2021.



Figure 4-7 : Photographies du filtre à la fin de la campagne en février 2022.

En comparant les deux figures, le colmatage du filtre est observable entre le début et la fin de la campagne. Visuellement, le filtre semble s'être encrassé de façon uniforme, on n'observe pas de zone plus dense.

Sur la Figure 4-7 on observe bien les zones où les derniers coupons ont été prélevés en accord avec la cartographie présentée dans le Chapitre 2. Cette observation corrobore les résultats montrant qu'il y a environ 50% du flux d'air qui est dévié par la double couche de média filtrant à l'endroit du coupon. Il est normal de retrouver un média filtrant moins encrassé lors du prélèvement du coupon. On note également sur la Figure 4-7 que les coupons en place sont plus propres que les zones du filtres les entourant. Ceci est également cohérent avec le fait que la présence du coupon modifie les lignes d'écoulement du fluide avec environ 50 % d'échantillonnage de l'air en moins à travers le coupon. À noter que les emplacements des coupons prélevés lors des premiers mois de la campagne ne sont plus discernables car l'encrassement du filtre a « comblé » la surface protégée du filtre en dessous du coupon.

La pesée des coupons prélevés peut également être utilisée afin de suivre l'avancement du colmatage du filtre en fonction des aérosols captés dans le média filtrant. Les résultats sont présentés dans la Figure 4-8.

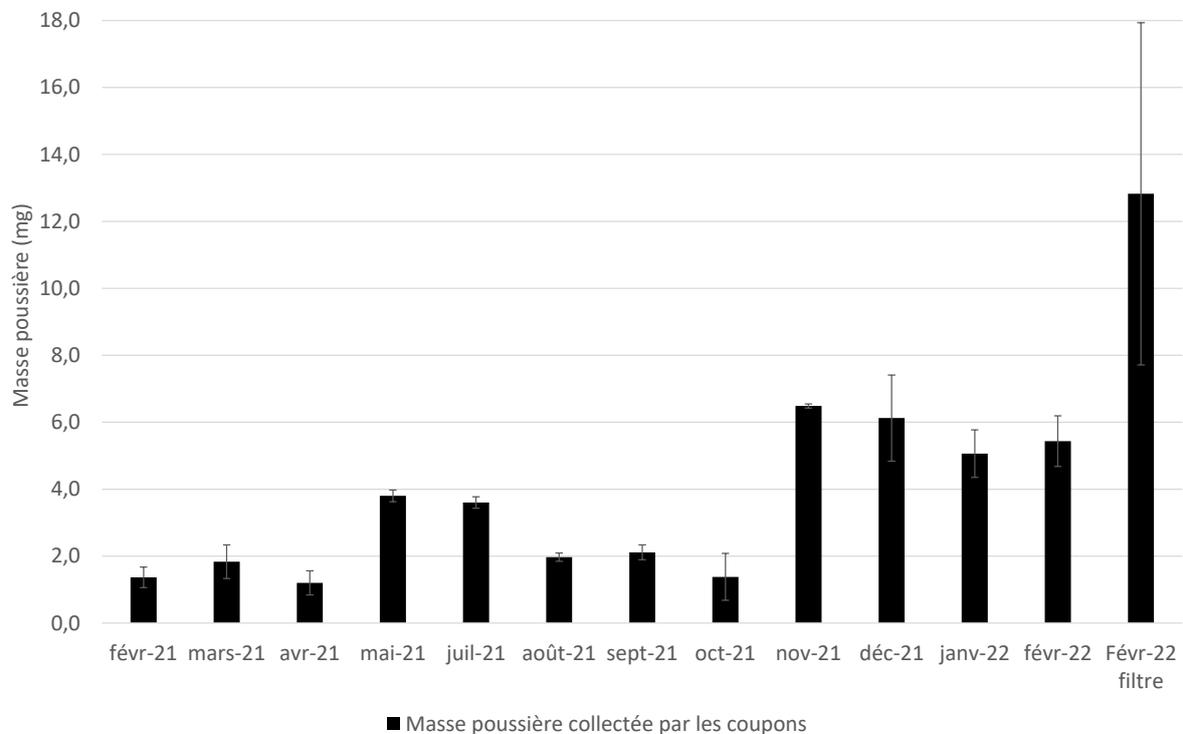


Figure 4-8 : Évolution de la masse moyenne de la poussière collectée par les trois coupons prélevés chaque mois durant la campagne. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type des mesures (N=3 pour Fev21 à Fev22 et N=6 pour Fev22 filtre).

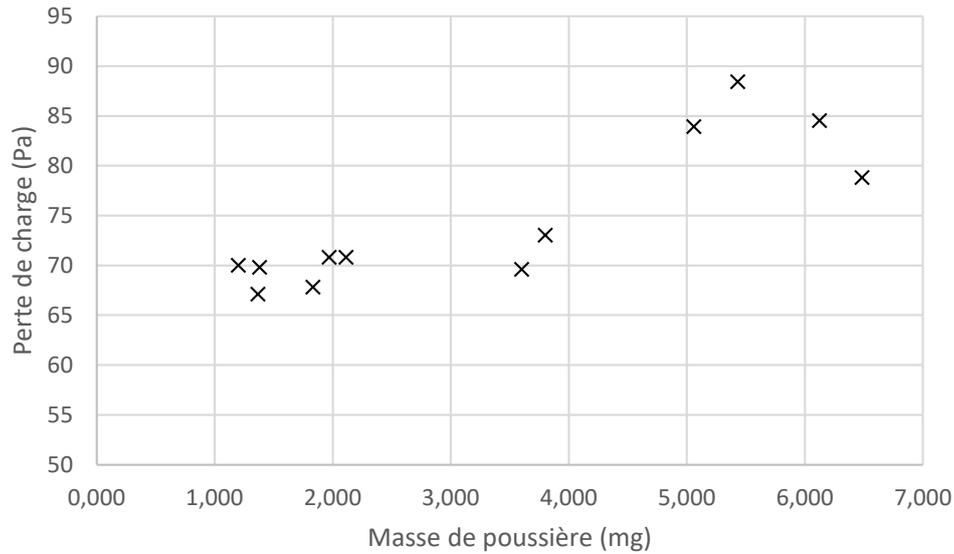


Figure 4-9 : Graphique représentant la perte de charge associée à la masse de poussière collectée sur le coupon (perte de charge de la journée précédant le jour de collecte).

Les coupons prélevés sont pesés avant de mettre en place le protocole d'extraction. Ils sont pesés dans des pots en plastique qui ont préalablement été pesés avec et sans le coupon avant d'être fixés sur le filtre. La masse de poussière captée est déterminée en faisant la moyenne des trois coupons pesés, l'écart-type est calculé sur ces trois mesures. Comme attendu, les coupons témoins prélevés à la mise en place des filtres dans la CTA ne présentent pas de variation de masse. Nous n'observons pas une accumulation constante de la masse de particules collectées au cours des mois de prélèvement. En accord avec l'augmentation linéaire de la perte de charge des filtres (filtration en surface) observable à partir du mois d'octobre 2021 (voir Figure 3-5), les coupons prélevés lors des 4 derniers mois présentent une quantité de poussière supérieure. L'encrassement du filtre est relativement homogène en observant les photographies du filtre (Figure 4-7) mais des variations locales sont possibles, en particulier au début de la campagne en raison des conditions géométriques de la CTA comme indiqué dans le Chapitre 2, conduisant à une répartition non homogène du fluide.

La Figure 4-99 présente un graphique de la relation (12). La perte de charge mesurée la veille du prélèvement des coupons est exprimée en fonction de la masse de poussière collectée par le média filtrant. Il semblerait que lorsque la quantité de poussière collectée est plus importante, la perte de charge mesurée est également supérieure. Cette observation est en accord avec les interprétations énoncées dans le Chapitre 3 : l'augmentation de la perte de charge sur les derniers mois de mesure est liée à un colmatage en surface du filtre avec la formation d'un gâteau de particule. Cette étape de colmatage est normalement associée à une

augmentation de l'efficacité de filtration du filtre et cela peut également expliquer la plus grande quantité de poussière collectée.

$$\Delta P_{\text{filtre extraction}} = f(\text{masse de poussière collectée}) \quad (12)$$

Les masses de poussières mesurées sont naturellement très faibles en accord avec une charge en particules globalement faible dans l'air intérieur des bureaux extrait. Les coupons ne sont pas étuvés avant d'être pesés. Le passage en étuve permettrait de soustraire la masse d'eau du coupon liée à la l'humidité de l'air extrait des bureaux. Mais ce passage pourrait affecter les résultats des analyses microbiologiques, il n'a donc pas été retenu.

3. Résultats des analyses par croissances microbiennes

3.1. Concentration en microorganismes cultivables

Les coupons échantillonnés sont analysés au laboratoire et traités avec le protocole détaillé dans le Chapitre 2.

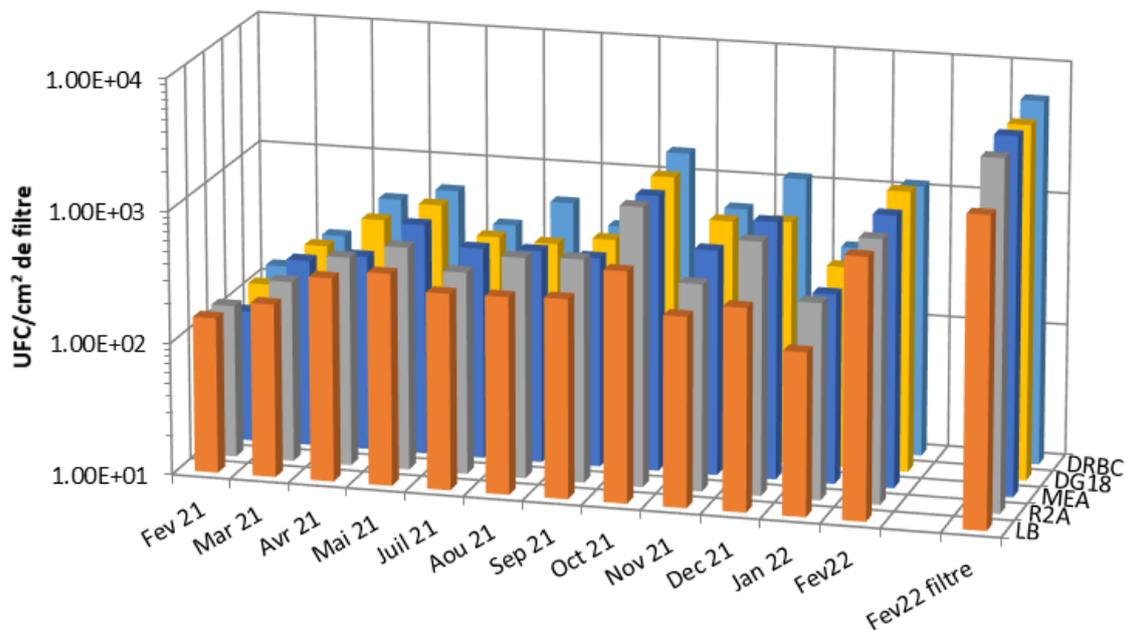


Figure 4-10 : Évolution des concentrations en microorganismes cultivables par surface de coupon en UFC/cm² extraits des coupons au cours de la campagne, extraction avec une solution de $MgSO_4(0,01M)$.

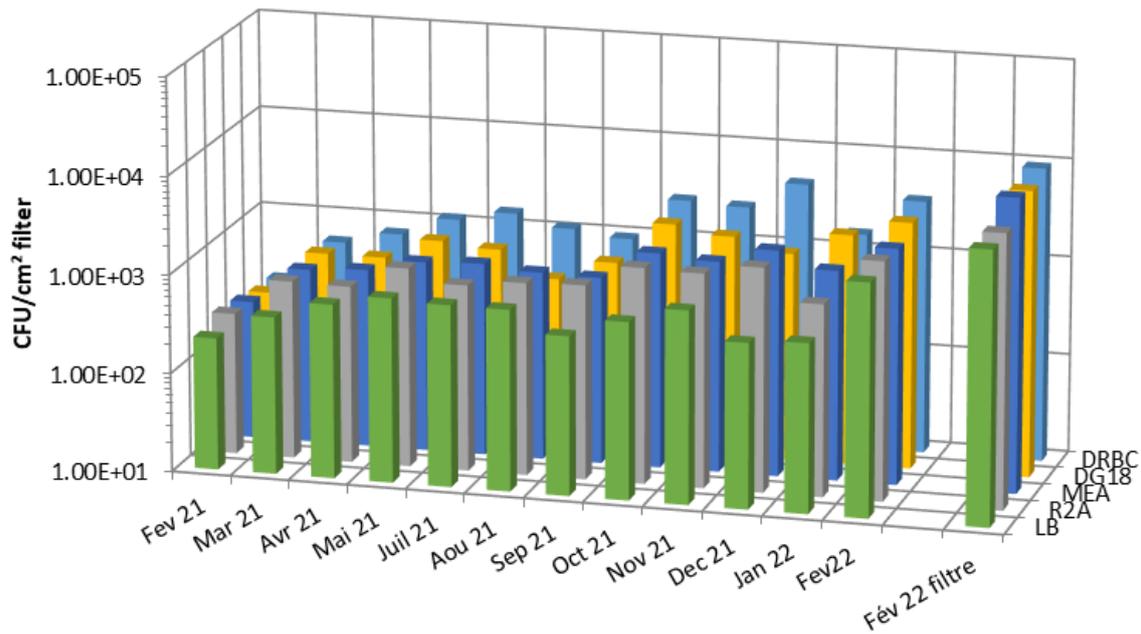


Figure 4-11 : Évolution des concentrations en microorganismes cultivables par surface de coupon en UFC/cm² extraits des coupons au cours de la campagne, extraction avec une solution de MgSO₄ (0,01M) + Tween 20 (0,25%).

En comparant les différents résultats, il n'y a pas de différence significative de croissance sur les différents milieux que ce soit pour les bactéries ou pour les moisissures. Le nombre d'UFC/cm² compté n'évolue que faiblement pour les premiers mois de prélèvement, avec au minimum $9,2 \cdot 10^1$ UFC/cm² pour atteindre un maximum $9,6 \cdot 10^3$ UFC/cm² en fin de campagne. Les résultats sont cohérents avec ceux de Gonzalez H., 2014 qui a mesuré après 6 mois d'étude sur un filtre G4 sur une CTA d'un immeuble de bureaux en région périurbaine nantaise, des valeurs comprises entre $9,3 \cdot 10^2$ et $1,2 \cdot 10^3$ UFC/cm² en utilisant la même méthodologie de coupons. Après ces 13 mois de campagne, il semble que les niveaux d'UFC/cm² sont stables au cours de toute l'étude. Ces résultats n'étaient pas attendus car avec l'accumulation des aérosols par le média filtrant, il était envisageable d'observer une augmentation progressive des UFC/cm² au fur et à mesure des mois de prélèvement. Notamment avec les spores fongiques ou bactériennes qui possèdent des capacités de survie en état de dormance malgré les conditions environnementales difficiles comme la dessiccation par exemple.

Il est important de noter que la flore microbienne cultivable représente une faible fraction de l'ensemble des microorganismes présents dans l'environnement (Nichols et al., 2010). Les coupons ne présentent que seulement une partie de la flore cultivable en condition de laboratoire. Une hypothèse est que les niveaux d'UFC/cm² mesurés peuvent être liés à un

niveau basal de contamination par des espèces cultivables. Et qu'une autre part des microorganismes non-cultivables peut fluctuer à des niveaux supérieurs mais invisibles par méthodes culturales. Une analyse en biologie moléculaire avec des amorces non-spécifiques par qPCR pourrait apporter une réponse à cette hypothèse.

Les résultats obtenus avec les coupons prélevés à la fin de la campagne en février 2022 sont comparés aux résultats obtenus à partir des échantillons de média filtrant découpés sur le filtre à côté de la position des derniers coupons prélevés. Une plus grande quantité d'UFC/cm² a été mesurée sur l'échantillon de filtre (environ $1,5 \cdot 10^3$ et 10^4 UFC/cm²) comparé aux UFC/cm² des coupons. On retrouve encore l'effet double épaisseur de média par le biais du coupon de média filtrant fixé à la surface du filtre, et la déviation des lignes d'écoulement du flux d'air avec une perte d'environ 50% du flux d'air.

Les milieux favorisant la croissance des bactéries ne possèdent pas d'inhibiteur de croissance de moisissure. Par contre les milieux DG18 et DRBC, favorisant la croissance des moisissures, possèdent un antibiotique à spectre large inhibant la croissance des bactéries. Les dynamiques étant semblables en comparant les milieux favorisant la croissance des bactéries et les milieux favorisant la croissance des moisissures, on observe que les comptages des boîtes LB et R2A prennent en compte les colonies de moisissures en plus des colonies bactériennes. Par exemple, il était difficile de dissocier certaines colonies telles que les levures et les colonies bactériennes. De plus la croissance très rapide de certaines espèces fongiques et l'envahissement des géloses par le mycélium pouvait rendre difficile la lecture de certaines boîtes. Des colonies bactériennes ont également pu être masquées par le mycélium débordant. Des mécanismes de compétition entre les différents genres bactériens ou fongiques peuvent également gêner la lecture. Il est envisageable que des moisissures ayant produit des molécules antibiotiques ont pu inhiber la croissance de bactéries pourtant bien présentes dans le média filtrant. De cette façon, les comptages ont peut-être lissé les différences de croissances observables entre les deux types de milieux. Cela peut expliquer les mêmes dynamiques observées, indépendamment des variations de concentrations en aérosols bactériens ou fongiques de l'air extrait des bureaux.

En comparant les résultats des extractions avec et sans Tween 20, on observe une quantité supérieure d'UFC par cm² de filtre avec la solution contenant du Tween 20. Il semble que son rôle de tensioactif permet de mieux extraire les microorganismes du coupon, et ce pour les 5 différents milieux. Cette observation est valable pour les milieux favorisant la croissance

fongique et ceux favorisant la croissance bactérienne. Les molécules tensio-actives permettent d'extraire plus facilement les particules captées dans le média filtrant, sans modifier l'efficacité d'extraction des aérosols bactériens ou fongiques.

3.2. Comparaisons des microorganismes cultivables prélevés sur le filtre et en amont dans la gaine d'extraction

Afin de mieux comprendre l'évolution des concentrations en UFC/cm² mesurées par l'extraction des coupons, il était intéressant de prendre en compte la charge en aérosols microbiens qui est aéroporté par l'air extrait des bureaux. Pour cela les résultats des mesures par impaction dans la gaine d'extraction en amont du compartiment sont comparés.

Cette analyse est menée en comparant les tendances de ces deux variables car il est difficile de faire directement correspondre les données en UFC/cm² de filtre à celles données par les impacteurs en UFC/m³. En utilisant cette l'équation (13), les données en ont été converties. Et le Tableau 4-1 présente les résultats des UFC/m³ mesurés sur les coupons et la comparaison avec ceux mesurés directement dans la gaine par impaction.

$$Concentration_{UFC/m^3} = \frac{Nombre\ UFC.m^{-2} \times Surface\ filtre\ (m^2)}{Débit\ (m^3.h^{-1}) \times Temps\ (h)} \quad (13)$$

	Mai 21		Fév. 22 filtre	
	Coupon	Gaine	Coupon	Gaine
LB	3,11E+00	2,26E+02	7,58E+00	9,54E+01
R2A	4,38E+00	3,75E+02	7,78E+00	1,13E+02
MEA	3,56E+00	3,04E+02	1,24E+01	7,77E+01
DG18	4,14E+00	8,83E+01	1,03E+01	6,36E+01

Tableau 4-1 : Comparaison des données UFC/m³ mesurés dans les gaine et par coupon.

Les données d'UFC/cm² pour les extractions avec Tween 20 pour les mois de Mai 2021 à Octobre 2021 semblent stables et oscillent autour des 5,0.10² et 1,0.10³ UFC/cm² de filtre. L'air extrait des bureaux possède une charge en aérosols microbiens cultivables d'environ 1,0.10² UFC/m³ pour les milieux favorisant la croissance des moisissures et environ 5,0.10²

UFC/m³ pour les milieux favorisant la croissance des bactéries. D'une manière générale, les variations dans les données de ces deux prélèvements sont faibles. Cela pourrait expliquer le fait de mesurer des concentrations stables en UFC/cm² sur le filtre. On peut expliquer cela car les concentrations en aérosols microbiens de l'air extrait sont stables dans les gaines. Cette interprétation est valable seulement s'il n'y a pas du tout d'accumulation de microorganismes sur le filtre.

En comparant les données converties des coupons et les données mesurées dans la gaine en UFC/m³ (Tableau 4-1), on observe des résultats plus faibles d'un ou deux log avec le prélèvement par coupon pour le mois de Mai 2021. Avec le filtre prélevé en fin de campagne (Fev22 filtre) on observe également cette différence, avec plus d'UFC/m³ par prélèvement par impaction. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet abattement. Pour le mois de Mai 2021, l'échantillonnage par coupon est toujours limité par la double épaisseur de média filtrant et la diminution du flux d'air. Globalement le filtre n'est pas efficace à 60 % pour les ePM₁, il est alors probable qu'une partie des aérosols microbiens ne soient pas collectés. La méthodologie d'extraction liquide des coupons n'a pas un rendement de 100 % également. Enfin, tout comme l'impaction directe sur gélose, l'impaction et la survie sur le média filtrant des bactéries et moisissures peut expliquer ces différences.

Afin de comparer ces données il est important de prendre en compte plusieurs biais liés à ces techniques. Pour l'extraction des coupons, il est possible que l'étape d'extraction en solution puisse causer un stress (agitation, changement d'environnement de l'air à l'eau) et que le rendement d'extraction suivant les espèces n'est pas de 100 %. La technique utilisant les collecteurs Andersen peut également être stressante pour les microorganismes car l'impaction directe sur la gélose peut générer un stress et diminuer la quantité de microorganismes cultivables observables après incubation.

3.3. Identification des genres

Les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* ont été observés le plus fréquemment par microscopie optique, et les genres *Engyodontium*, *Sarocladium*, *Nectria* et *Ascochyta*, ont été identifiés par PCR. *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* sont les genres majoritairement retrouvés dans les analyses d'air intérieur (Luhung et al., 2017; Sautour et al., 2009; Shelton et al., 2002). Les analyses par PCR des colonies bactériennes ont permis notamment d'identifier *Micrococcus luteus*, *Parracoccus sp.*, *Rhodococcus sp.* et *Aeromonas*

sp. Le genre *Micrococcus* est également couramment retrouvé dans l'air intérieur, faisant partie du microbiome cutané humain (Kooken et al., 2012; Luhung et al., 2018).

Les genres et espèces qui ont été identifiés sur les boîtes de Pétri à partir des extractions des coupons ont également été retrouvés sur les boîtes de Pétri des prélèvements par impaction dans la gaine d'extraction en amont du compartiment. Les genres fongiques *Aspergillus* et *Penicillium* ont été observés sur les deux types de prélèvement, ainsi que des colonies bactériennes du genre *Micrococcus* ont été identifiées par PCR sur colonie.

4. Analyses par biologie moléculaire

Les résultats présentés dans cette partie sont organisés de la façon suivante. Une première partie est dédiée aux résultats par qPCR et RTqPCR. Puis une seconde partie présente les résultats obtenus à l'issue des séquençages du gène 16S pour les bactéries et de la région ITS pour les moisissures à partir des extraits d'ADN des coupons prélevés. L'ensemble des méthodologies employées pour l'obtention de ces résultats est présenté dans le Chapitre 2.

4.1. Concentration en ADN total sur les coupons et le filtre

Les résultats des extractions d'ADN des coupons sont présentés dans la Figure 4-122.

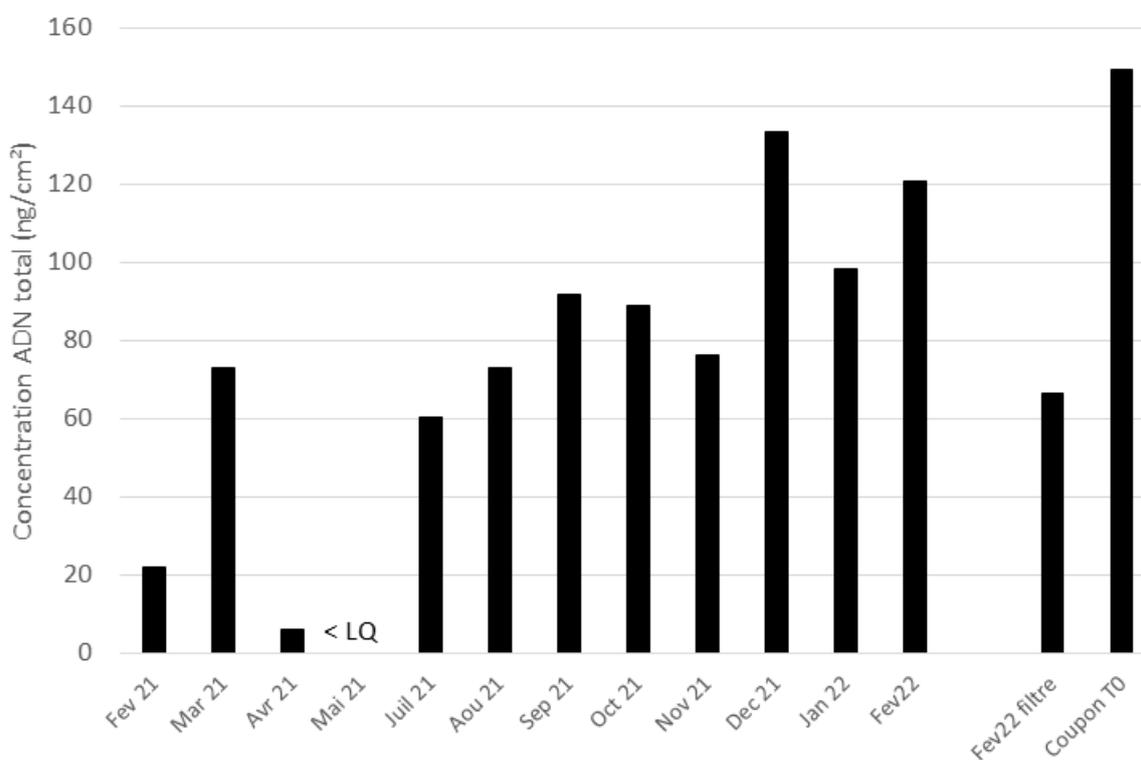


Figure 4-12 : Résultats des extractions d'ADN des coupons. Incertitude non représentée de ± 2 ng/ μ L, données fournisseur, soit 64 ng/cm² après conversion.

Les résultats présentés dans la Figure 4-12 proviennent d'un échantillon de filtre de 3,15 cm² correspondant à ¼ de coupon (protocole détaillé dans le Chapitre 2). Le coupon entier n'a pas été extrait car la première étape du protocole d'extraction ne permet pas d'utiliser l'entièreté du coupon. Le média filtrant étant épais, il absorbe toute la solution de lyse et l'action des billes pour l'étape de *bead beating* est totalement inefficace. Après cette étape de lyse et l'élution, très peu de solution était récupérable. Pour augmenter la surface de contact avec le coupon et la solution de lyse, il a été décidé de ne prendre qu'un quart du coupon et de séparer les

différentes parties de média filtrant pour exposer les fibres à la solution de lyse. Cette étape a mis en exergue une piste d'amélioration importante qui est de trouver et d'optimiser un protocole d'extraction des acides nucléiques à partir de ce type d'échantillon complexe. Car il n'existe pas de kit d'extraction d'ADN/ARN prêt à utiliser pour des médias fibreux.

Après extraction nous observons des concentrations en ADN inférieures à 10 ng/ μ L après lecture au Nanodrop. Il faut noter que lorsque les concentrations mesurées par le Nanodrop sont faibles (<10 ng/ μ L) les valeurs affichées ne sont pas précises et il est nécessaire de les analyser avec précaution. Cependant il semblerait que les concentrations soient supérieures à la fin de la campagne. L'échantillon Filtre Fev22 correspond au média prélevé directement sur le filtre en fin de vie. L'analyse par culture a permis d'observer une plus grande quantité de microorganismes cultivables par rapport au dernier coupon prélevé. En revanche, les résultats révèlent que la quantité d'ADN de l'échantillon de filtre en fin de campagne n'est pas supérieure à celle du dernier coupon. Il est possible que les particules piégées dans le média interfèrent en diminuant l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques. Cette lecture est également appuyée par le fait que le coupon T₀ prélevé avant la mise en place du filtre dans la CTA dont la charge microbiologique est donc uniquement liée à la manipulation et au stockage du média, présente une quantité d'ADN extrait supérieure aux coupons qui ont été dans le flux d'air. Les particules collectées sur les filtres pourraient donc influencer sur l'extraction des acides nucléiques.

Les quantités d'ADN extraits sont comparables aux résultats de la littérature. Les résultats d'une étude à Singapour étaient de 1,1 à 41 ng/cm² de filtres prélevés dans neuf CTA d'une Université (Luhung et al., 2017). Les filtres sont classés MERV-8 et les échantillons extraits font environ 10 cm² dans l'étude de Luhung.

4.1.1 Analyses bactériennes et fongiques en équivalent UFC/cm²

Les extraits d'ADN ont été analysés par qPCR avec des amorces dessinées pour détecter et quantifier des cibles bactériennes et fongiques retrouvées classiquement dans l'air intérieur.

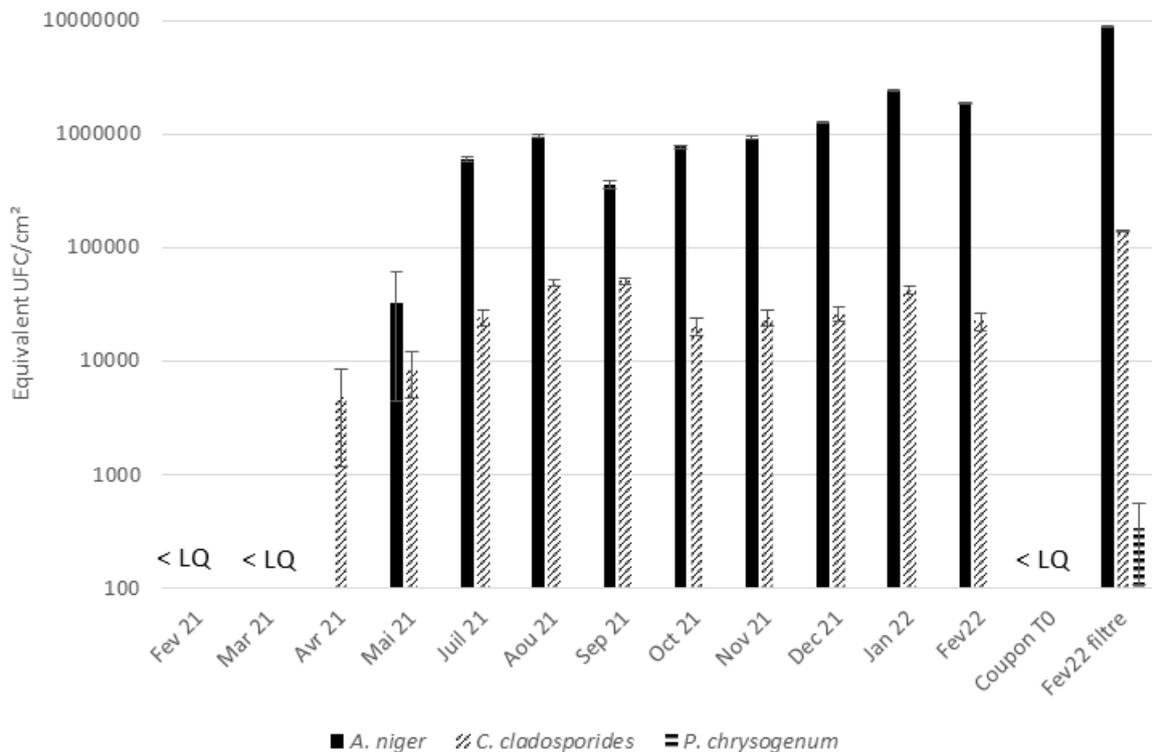


Figure 4-13 : Résultats des qPCR avec les amorces fongiques

La Figure 4-13 présente les résultats obtenus pour les cibles fongiques *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium chrysogenum*. Les cibles bactériennes *P. aeruginosa* et *S. aureus* n'ont pas été détectées en qPCR. Tous les résultats étaient négatifs et inférieurs aux limites de quantification. Les données sont présentées en équivalent UFC/cm² alors qu'il s'agit bien d'une technique de biologie moléculaire sans culture. Pour obtenir cette équivalence, des gammes de concentration connues en microorganismes ont été réalisées (nombre de spores déterminé par comptage au microscope pour les spores et comptage d'UFC pour les cibles bactériennes). Ces gammes ont ensuite été utilisées pour réaliser des extractions d'ADN. Ces extraits d'ADN ont ensuite été quantifiés par qPCR. Le nombre de copies de gène mesuré a ensuite été rapporté au nombre d'UFC quantifié dans les gammes de concentration de chaque cible. Les résultats des échantillons de filtre ont alors été divisés par la surface de filtre des coupons où l'ADN a été extrait.

Les cibles fongiques n'ont pas été détectées sur les premiers mois de la campagne de prélèvement. Puis les concentrations de moisissures en équivalents UFC/cm² de filtre ont augmenté jusqu'à un plateau aux environs des 5.10⁴ UFC/cm² pour *C. cladosporioides* et 10⁶ UFC/cm² pour *A. niger*. Pour ces deux amorces il y a une augmentation d'environ un log quand on compare les résultats des coupons à ceux de l'échantillon de filtre prélevé à la fin de la

campagne. Cela est en accord avec les observations faites sur l'influence de la double épaisseur de média filtrant et les résultats obtenus en culture.

Pour chaque amorce, les extractions réalisées sur le coupon témoin T₀ ont produit des résultats négatifs, les résultats étaient inférieurs aux limites de quantification. Ces résultats sont attendus, malgré le fait qu'une quantité d'ADN extrait semble être supérieure aux coupons de la campagne de prélèvement.

L'échantillon prélevé sur le filtre à la fin de la campagne (Filtre Fev22) est positif à *Penicillium chrysogenum* avec une concentration faible de 3,32.10² équivalent UFC/cm². Cette moisissure n'a pas été retrouvée dans les autres échantillons. La limite de quantification (LQ) est de 2,24.10² équivalent UFC/cm² pour les amorces de *P. chrysogenum*. Il est probable que cette moisissure soit présente sur les autres coupons prélevés mais en quantité inférieure à la LQ.

4.1.2 Analyses qPCR et RTqPCR des virus

Les analyses avec les cibles virales sont présentées dans le tableau de résultat suivant. Les protocoles utilisés sont détaillés dans le Chapitre 2.

Date de prélèvement	Amorces avec résultat positif
Oct-21	<i>Coronavirus OC43</i>
Nov-21	<i>human Adenovirus</i>
Janv-22	<i>human Adenovirus</i>
Filtre Fev22	<i>Coronavirus OC43</i>

Tableau 4-2 : Résultats des qPCR et RTqPCR avec les cibles virales

Deux Coronavirus ont été détectés les mois d'octobre 2021 et de Février 2022. Il est donc possible de détecter ces virus respiratoires sur un filtre de CTA. Ces virus sont responsables d'environ 30% des rhumes communs de l'hiver. La période correspond en effet au moment où les virus respiratoires se propagent.

Deux Adénovirus ont aussi été détectés. Au mois de novembre 2021 et au mois de janvier 2022. Cela correspond également à la circulation virale de ces virus respiratoires.

Les autres cibles qui sont présentées dans la partie méthodologie n'ont pas montré un signal suffisamment haut pour être positif en qPCR. Le peu de réponse est aussi potentiellement lié à la faible quantité d'acides nucléiques qui a été extraite des coupons.

Les prélèvements réalisés sur cassette filtrante dans les gaines de la CTA et dans les pièces du bâtiment du J ont tous été négatifs pour les virus respiratoires.

4.2. Analyses des résultats de séquençage

Pour la suite des résultats présentés dans cette partie, les échantillons ont été référencés en suivant la nomenclature présentée dans le Tableau 4-3.

Coupon T ₀	G13	3
Fev 21	G1	6
Mar 21	G2	9
Avr 21	G3	12
Mai 21	G4	15
Juil 21	G5	18
Aou 21	G6	21
Sep 21	G7	24
Oct 21	G8	27
Nov 21	G9	30
Dec 21	G10	33
Jan 22	G11	36
Fev22	G12	39
Fev22 filtre	G14	Sacrifice du filtre

Tableau 4-3 : Présentation du nom des échantillons donnés pour les résultats de séquençage

4.2.1 Analyses des génomes bactériens

Les extraits d'ADN des coupons sont traités en suivant la méthodologie de séquençage pour les bactéries présentée dans le Chapitre 2. Les génomes bactériens sont séquencés sur le gène 16S en utilisant les amorces V3-V4 (Klindworth et al., 2013).

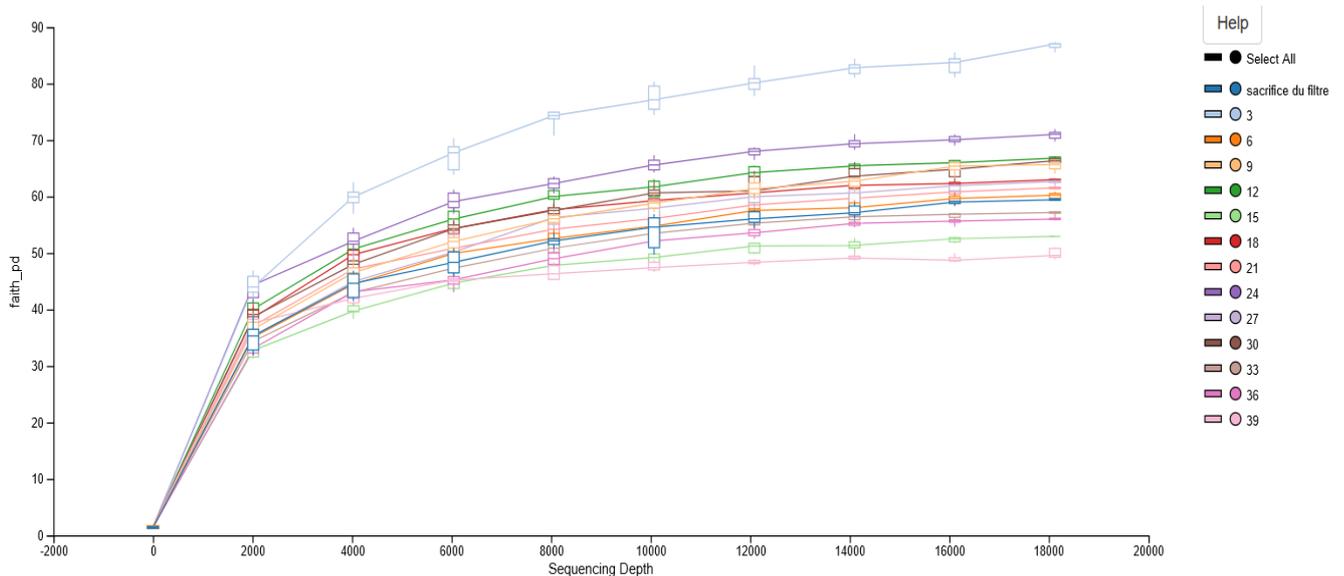


Figure 4-14 : Courbes de raréfaction pour le séquençage 16S

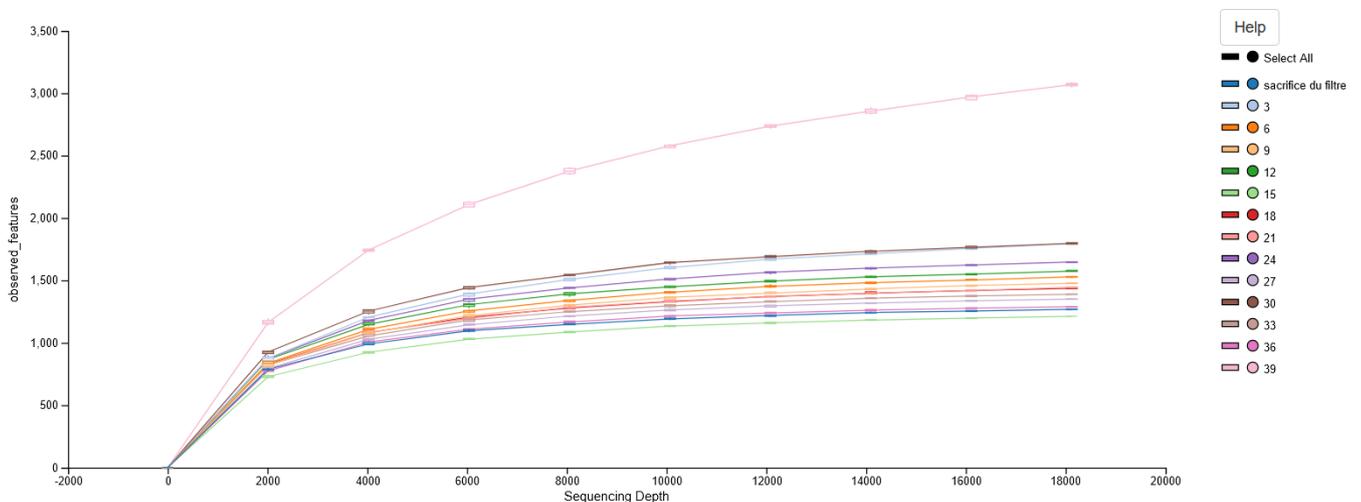


Figure 4-15 : Courbes du nombre de séquences pour le séquençage 16S

La courbe de raréfaction permet d'estimer si la profondeur de séquençage est suffisante. La profondeur est suffisante lorsque l'on atteint le plateau de saturation. Pour chaque échantillon, on observe bien un plateau. La profondeur de séquençage pour les analyses des génomes 16S est suffisante. Le nombre d'*observed features* (ou séquences) met en évidence la diversité de l'échantillon. On observe que tous les échantillons de coupons se comportent de la

même façon. L'échantillon 39 présente une courbe différente avec un nombre de séquences supérieur. Cet échantillon correspond au coupon T₀. La diversité bactérienne semble être plus grande sur le coupon qui n'a pas été soumis à l'air extrait des bureaux.

Échantillon	Shannon_entropy	Simpson
Coupon T ₀	10,719	0,999
Févr-21	9,847	0,998
Mars-21	9,770	0,998
Avr-21	9,703	0,998
Mai-21	9,849	0,998
Juil-21	9,340	0,997
Août-21	9,677	0,998
Sept-21	9,743	0,998
Oct-21	9,828	0,998
Nov-21	9,616	0,998
Déc-21	9,963	0,998
Janv-22	9,696	0,998
Févr-22	9,590	0,998
Filtre Févr-22	9,621	0,998

Tableau 4-4 : Indices de Shannon et Simpson pour le séquençage 16S

La diversité alpha mesure le niveau de diversité à l'intérieur d'un même échantillon. L'objectif est d'estimer la justesse de l'échantillonnage (diversité d'espèce et/ou uniformité). Les indices liés à la diversité alpha sont Shannon et Simpson. L'indice de Shannon permet d'estimer la diversité des espèces au sein d'un échantillon. Il est compris entre 0 et l'infini. Il permet d'avoir une vision globale de l'échantillon car il met en évidence 2 aspects : le nombre de séquences différentes et leur proportion respective. L'indice de Simpson est la probabilité

que 2 individus tirés au hasard dans un échantillon appartiennent au même taxon, il est compris entre 0 et 1. Cet indice aura une valeur de 1 pour indiquer un maximum de diversité.

L'échantillon T₀ présente une plus grande diversité bactérienne que les autres échantillons. Il semble alors que la manipulation et le stockage des coupons favorisent une grande diversité bactérienne. Une autre lecture serait que la mise en place des coupons dans le flux d'air extrait des bureaux chargé en particules conduise à la mesure d'une diversité plus faible. La diversité des bactéries présente sur le coupon à l'origine diminue puis fluctue au cours du temps. Néanmoins ces variations semblent être assez faibles en comparant les valeurs des deux indices.

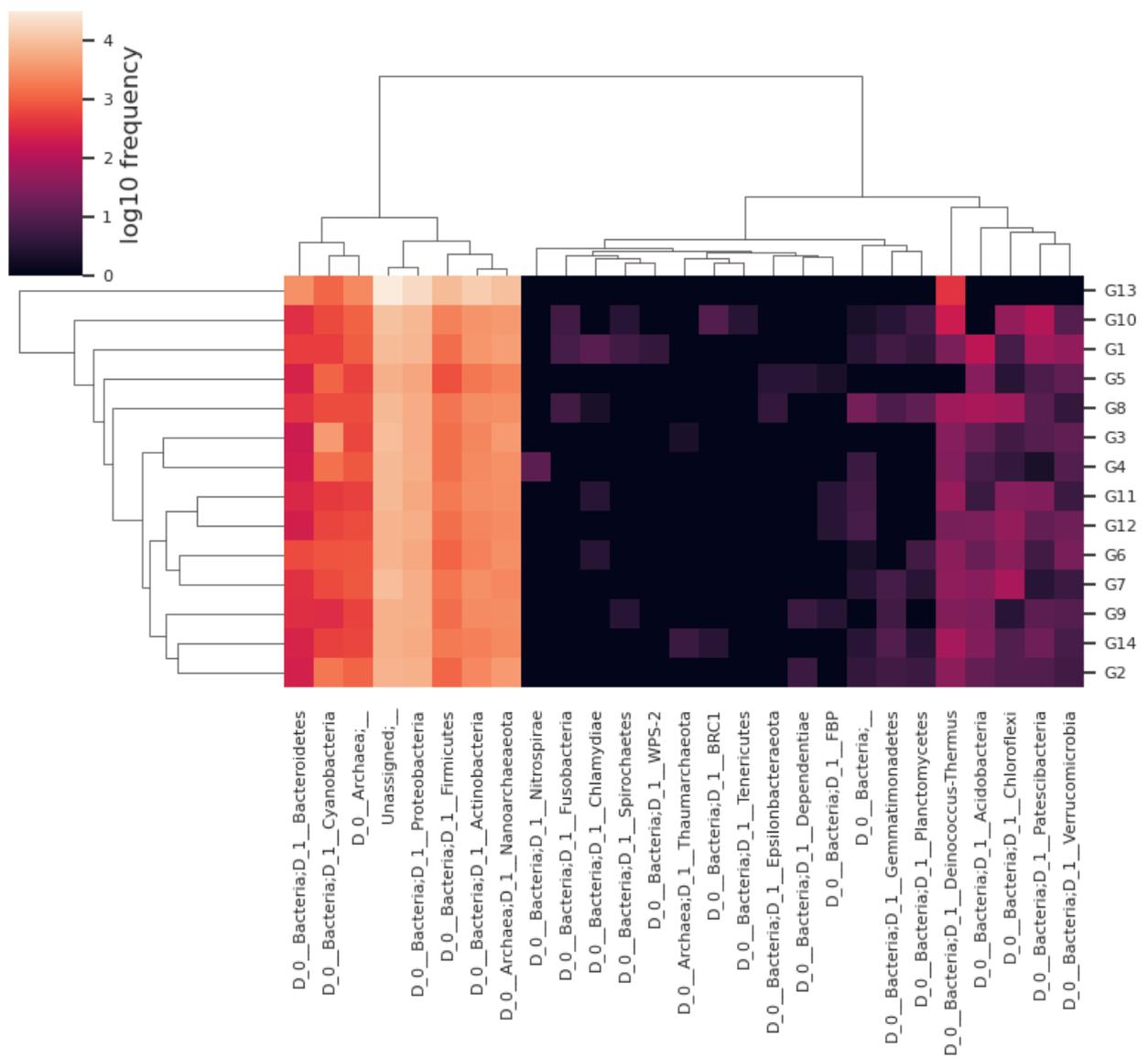


Figure 4-16 : Heatmap (ou carte de chaleur) au niveau du phylum pour le séquençage 16S

La Figure 4-16 présente la *heatmap* (ou carte de chaleur) au niveau de la famille des bactéries. Cette figure met en avant la diversité beta qui permet de comparer les échantillons entre eux. Elle permet de visualiser les familles bactériennes les plus représentées dans les échantillons (couleurs plus chaudes) et de comparer les échantillons entre eux et visualiser ceux dont la composition se rapproche le plus. Les familles en rouge orange : *bacteroidetes*, *cyanobacteria*, *archae*, *proteobacteria*, *firmicutes*, actinobactéries sont celles le plus souvent retrouvées dans l'environnement intérieur. On retrouve également des phyla moins communs tels que les *Cyanobacteria* et *Archaea*.

L'échantillon G13 correspond au coupon T₀ et les échantillons G1 à G12 sont les échantillons des mois de Février 2021 à Février 2022. L'échantillon G14 est l'échantillon prélevé dans le filtre à la fin de la campagne. D'une façon générale, il y a une grande diversité entre les genres homologues entre les différents échantillons.

On observe que les échantillons G13 et G14 sont très éloignés et par conséquent ils présentent une composition très différente. Ce résultat semble cohérent car il s'agit de prélèvements réalisés au début de la campagne et du prélèvement réalisé à la toute fin. Le G12 est proche du G14, car ce sont deux prélèvements réalisés au même moment en Février 2022.

A contrario l'échantillon G10 est comparable à l'échantillon G1 qui sont pourtant deux échantillons prélevés à 10 mois d'intervalle. On pourrait s'attendre à ce qu'ils soient différents. Ce n'est pas le cas et cela peut être lié à la période de l'année de prélèvement. G1 au mois de Février 2021 et G10 au mois de Décembre 2021 ont des similarités. Les conditions environnementales liées à la saison ont potentiellement favorisé la croissance et/ou le dépôt de bactéries semblables.

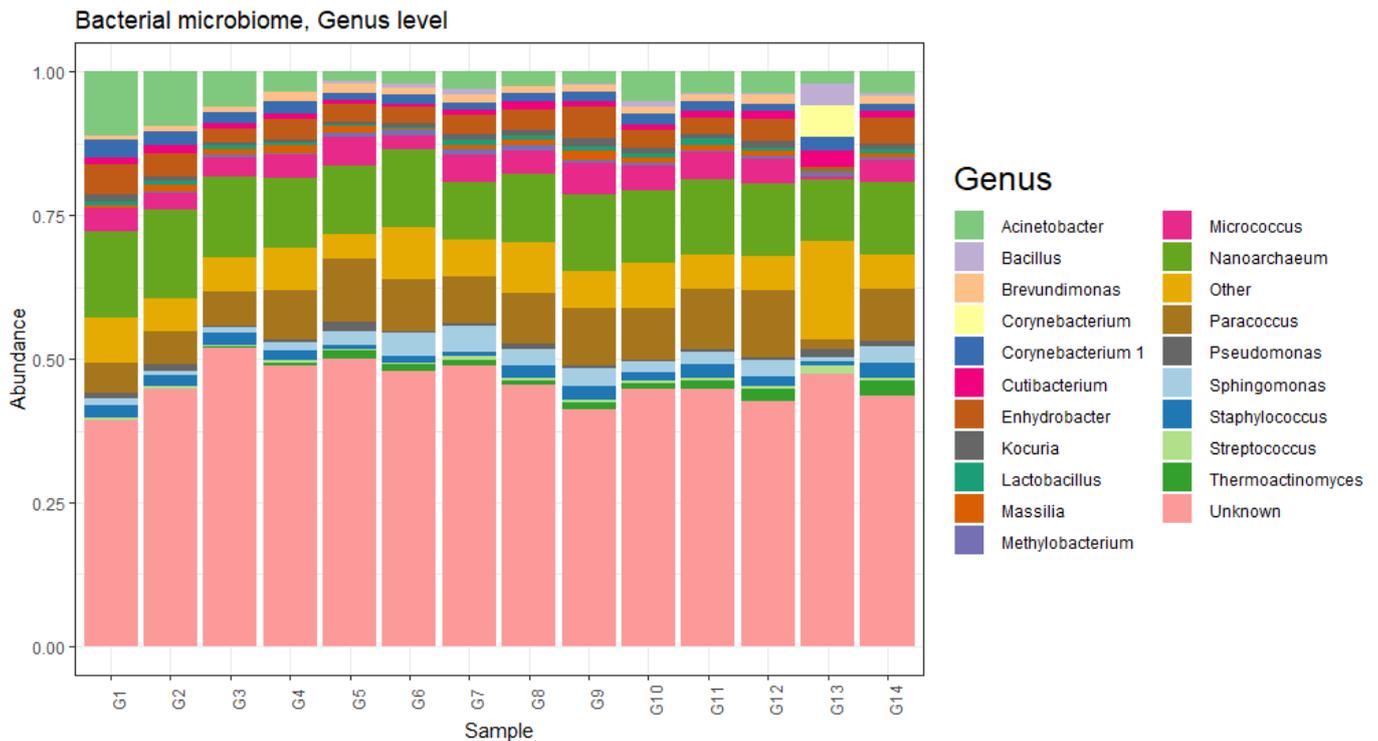


Figure 4-17 : Répartition des taxons par échantillon au niveau du genre bactérien

La Figure 4-177 permet de représenter la proportion des 20 OTUs/taxons les plus fréquents par échantillon. On observe que le coupon prélevé à T₀ (G13) a un profil différent des autres échantillons. Il possède une plus grande proportion de *Corynebacterium* et de *Bacillus*. Les *Corynebacterium* n'apparaissent plus dans cette proportion au cours de la campagne. Ce genre bactérien peut être associé à des bactéries du microbiome cutané humain (de Oliveira Sant'Anna et al., 2023). La manipulation des filtres lors de la fabrication a potentiellement contaminé le média filtrant. La fabrication, le transport et le stockage des filtres permet de retrouver une large diversité bactérienne sur le coupon T₀.

Contrairement au *Bacillus* qui disparaissent quasiment de Février 2021 à Juillet 2021 avec un maintien d'une plus grande proportion jusqu'à Septembre 2021. Les *Bacillus* semble provenir majoritairement de l'air extérieur (Aydogdu et al., 2010). Le fait de retrouver ce genre bactérien durant les mois de l'année les plus chauds (Juillet à Septembre 2021) peut être lié à l'ouverture des fenêtres du bâtiment par le personnel. L'air extérieur entre dans le bâtiment par les fenêtres sans être filtré par le compartiment d'air de la CTA. Les spores des bactéries du genre *Bacillus* se sont alors retrouvées sur les coupons de média filtrant du filtre d'extraction.

En observant les données pour le genre *Staphylococcus*, l'abondance relative est à l'inverse du genre *Bacillus*, plus faible pendant la saison estivale de Juillet 2021 à Septembre 2021. Cela peut s'expliquer avec les congés d'été et la baisse de fréquentation du personnel

dans le bâtiment. Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont notamment connues pour faire partie du microbiome cutané humain également, comme par exemple *S. epidermidis* (Adams & Dancer, 2020; Zhu et al., 2023).

Ces observations sont semblables pour le genre *Acinetobacter* que l'on retrouve également associé à la flore cutanée (Doughari et al., 2011). On observe une baisse de l'abondance relative de ce genre de Février 2021 à Juillet 2021. L'aération par les fenêtres peut également participer à diluer la concentration en aérosols de ce genre.

Pour tous les échantillons, la plus grande proportion des données correspond à des bactéries inconnues dans la base de données. Cette observation montre qu'il est nécessaire d'alimenter et d'étudier l'écologie de ce type d'environnement car presque 50% des bactéries séquencées ne sont pas référencées.

4.2.2 Analyses séquençage des moisissures

Les extraits d'ADN des coupons sont traités en suivant la méthodologie de séquençage des moisissures présentée dans le Chapitre 2. Les génomes de moisissures en utilisant les amorces ITS2 (White et al., 1990).

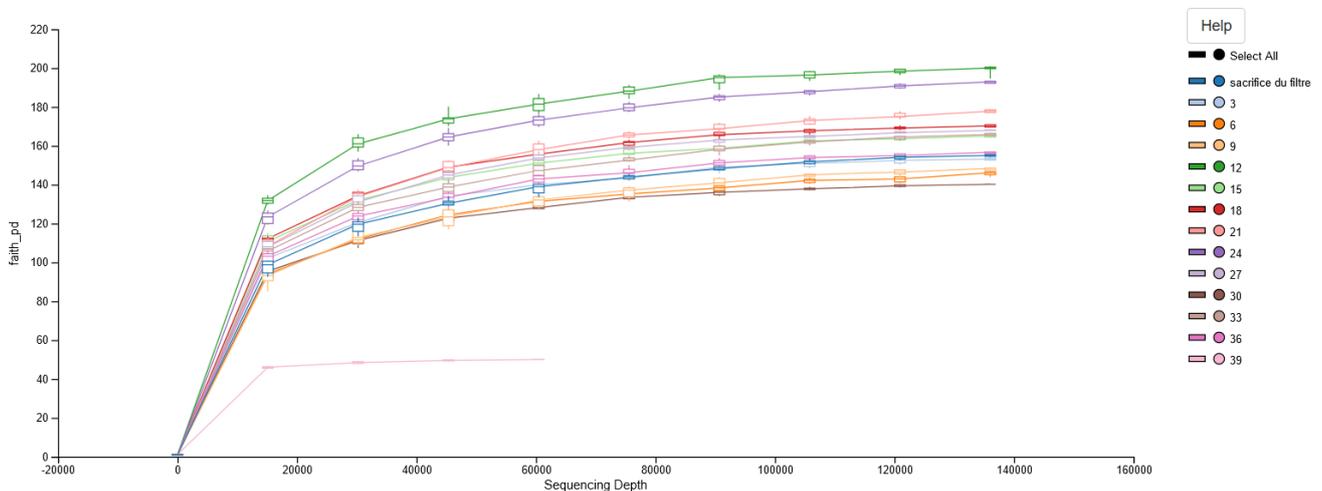


Figure 4-18 : Courbes de raréfaction pour le séquençage ITS

Pour chaque échantillon, on observe bien un plateau. La profondeur de séquençage pour les analyses des génomes ITS est suffisante. L'échantillon 39 correspondant au coupon prélevé à T₀ présente une courbe différente, significative d'une faible charge en moisissure.

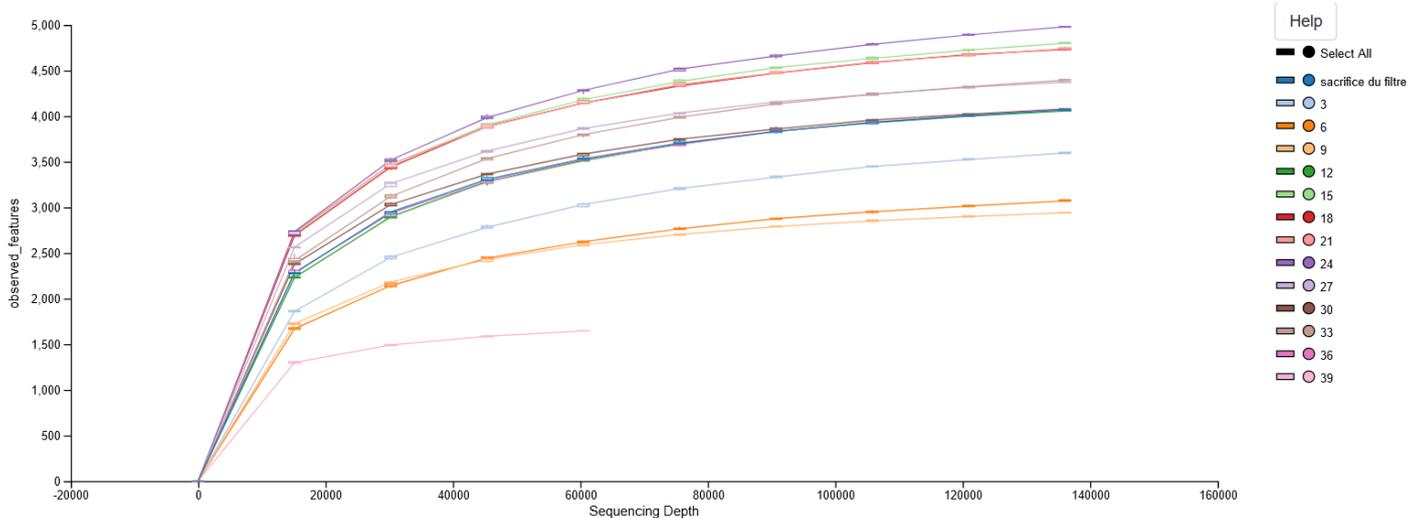


Figure 4-19 : Courbes du nombre de séquences pour le séquençage ITS

Le nombre de séquences met en évidence la diversité de l'échantillon. On observe que tous les échantillons présentent des courbes plus hétérogènes que celles du séquençage 16S. L'échantillon 39 présente une courbe différente avec un nombre de séquences inférieur aux autres courbes. Cet échantillon correspond au coupon T₀.

Échantillon	Shannon_entropy	Simpson
Févr-21	8,922	0,994
Mars-21	8,581	0,992
Avr-21	8,805	0,993
Mai-21	9,403	0,995
Juil-21	10,131	0,997
Août-21	10,128	0,997
Sept-21	10,171	0,998
Oct-21	10,127	0,998
Nov-21	10,090	0,998
Déc-21	9,796	0,997
Janv-22	9,806	0,997
Févr-22	9,643	0,997
Filtre Fev22	9,694	0,997

Figure 4-20 : Indices de Shannon et Simpson pour le séquençage ITS

La diversité alpha mesure le niveau de diversité à l'intérieur d'un même échantillon avec les indices Shannon et Simpson. Pour le séquençage ITS on observe que ces indices sont plus élevés de Juillet 2021 à Novembre 2021.

Les indices pour le coupon prélevé en Février 2022 et l'échantillon du filtre sont similaires. A noter qu'il manque dans l'analyse le coupon T₀ du début de la campagne.

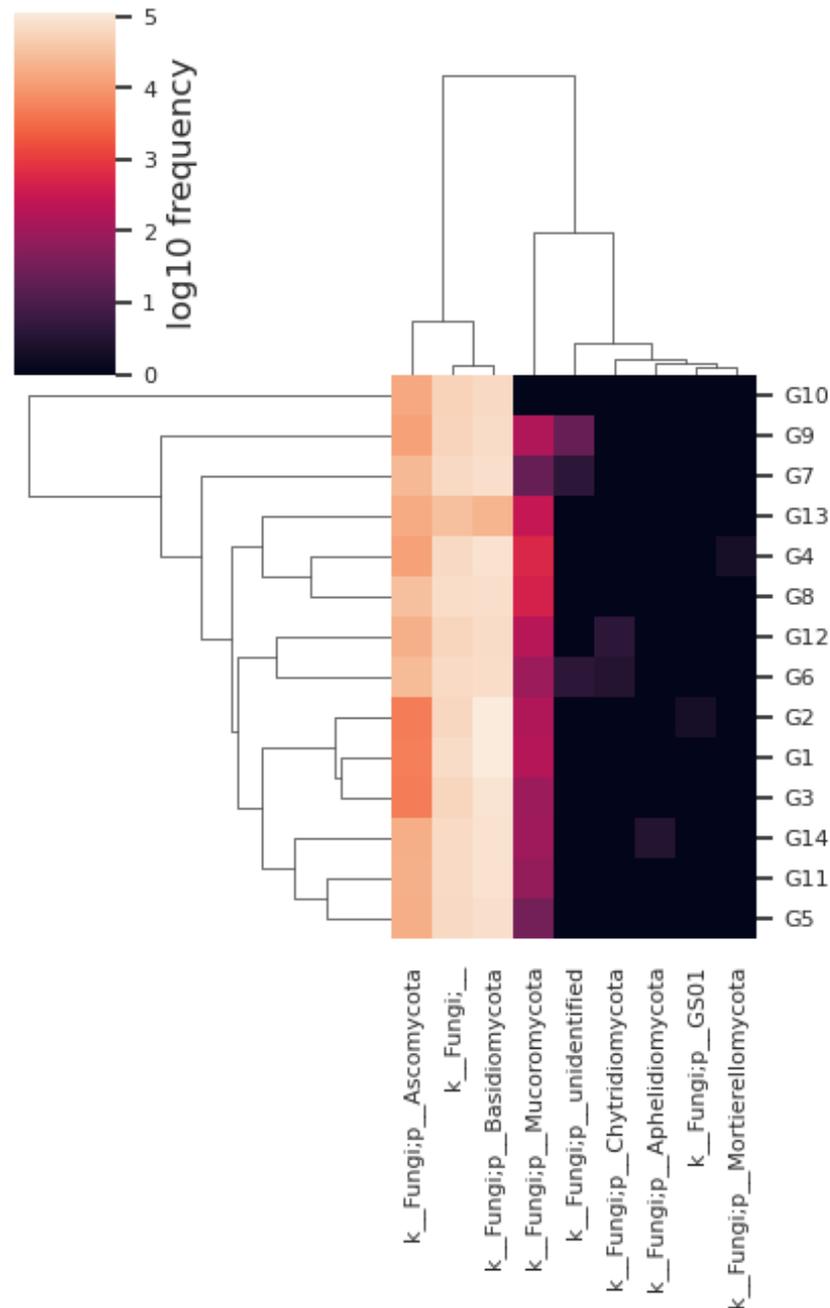


Figure 4-21 : Heat map au niveau du phylum pour le séquençage ITS

La Figure 4-21 présente la *heatmap* au niveau de la famille des moisissures. Cette figure met en avant la diversité beta qui permet de comparer les échantillons entre eux.

On observe que les échantillons sont plutôt regroupés par saison. Le coupon de Février 2021 est proche de celui prélevé en Février 2022 (G1 et G14). On observe environ la même distance entre le coupon final G12 et l'échantillon prélevé dans le filtre G14.

Les phyla *Basidiomycota* et *Ascomycota* très fréquents et sont également retrouvés majoritairement dans le mycobiome de bureaux (Green et al., 2017). La proximité directe avec des forêts aux alentours du bâtiment peut expliquer l'observation de ces phyla dans les résultats. On peut également noter que le phylum des *Basidiomycota* lié à la dispersion des spores des champignons. Et le phylum des *Ascomycota* est également associé aux lichens en lien avec des relations symbiotiques avec des cyanobactéries, cyanobactéries également détectées dans l'analyse 16S.

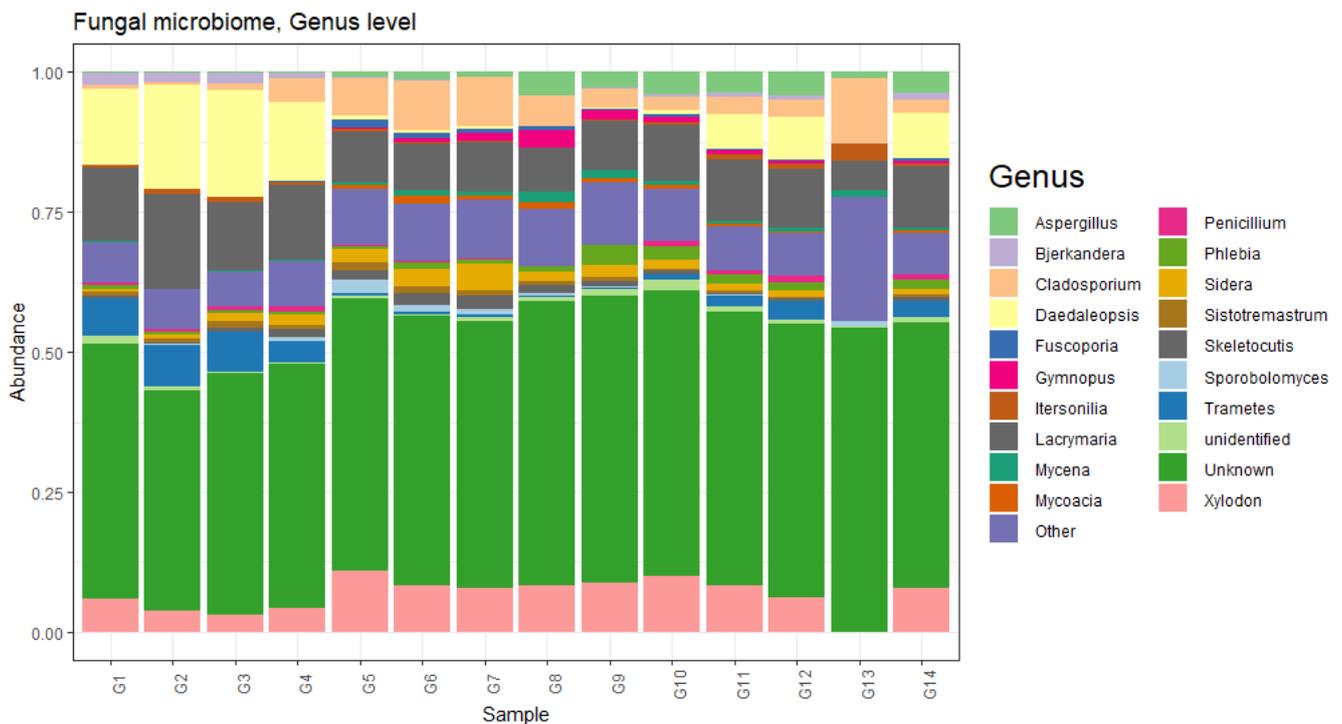


Figure 4-22 : Répartition des taxons par échantillon au niveau du genre de fungi

La Figure 4-22 permet de représenter pour chaque échantillon la proportion des 20 OTUs/taxons les plus fréquents. On observe que le coupon prélevé à T₀ (G13) présente un profil différent des autres échantillons.

Comme pour le séquençage 16S, la plus grande abondance relative représente les moisissures non identifiées dans la base de données. Cela montre également la nécessité

d'approfondir les bases de données en découvrant de nouveaux genres dans ce type d'environnement.

Le genre *Cladosporium* est très représenté dans le coupon T₀, comparativement aux autres échantillons. Son abondance relative est en augmentation de Mai 2021 à Septembre 2021. Cette augmentation peut être liée à une plus grande quantité d'aérosols dans l'air extérieur avec des éléments de végétaux pouvant aéroporter ces moisissures. Les fenêtres du bâtiment étant plus souvent ouvertes permettent également de faire entrer dans le bâtiment ces aérosols fongiques. Il ne faut pas également exclure la survie et la potentielle croissance de moisissures sur les filtres de la CTA en fonction des conditions environnementales.

Le genre *Daedaleopsis* regroupe des champignons basidiomycètes. Il semble que ces champignons apparaissent seulement de décembre à mai. Ils sont associés à la présence d'arbres car on les retrouve sur les plantes à l'extérieur.

Le genre *Penicillium*, fréquent en environnement intérieur est représenté avec une abondance relative équivalente parmi les différents échantillons. Les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* sont observés dans les différents échantillons. Ils ont également été retrouvé avec les analyses par culture sur boîte.

Le genre *Xylodon* est retrouvé dans tous les échantillons sauf le G13. Ce basidiomycète n'est pas présent sur le filtre T₀. Son abondance relative semble être plus élevée avec les échantillons G5 à G10 qui correspondent aux échantillons prélevés pendant la saison estivale et l'automne. Ces champignons sont couramment observés lors de la décomposition de bois et notamment la décomposition de bambou (Riebesehl et al., 2019). Le bâtiment est situé à proximité de bois et on peut également noter la présence d'un bosquet de bambou à 50m des bureaux.

5. Comparaison des différentes méthodes et conclusions

Une méthodologie permettant d'analyser la qualité microbiologique (bactérienne, fongique et virale) de l'air intérieur de bureaux basée sur l'utilisation de coupons de média filtrant fixés sur les filtres d'extraction de CTA a été testée en conditions réelles pendant 13 mois.

L'analyse des coupons prélevés indique que la contamination microbiologique des filtres semble stable au cours de la campagne de prélèvement. L'utilisation d'un tensioactif dans

la solution d'extraction permet d'améliorer la récupération des microorganismes. Les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* sont les plus représentés.

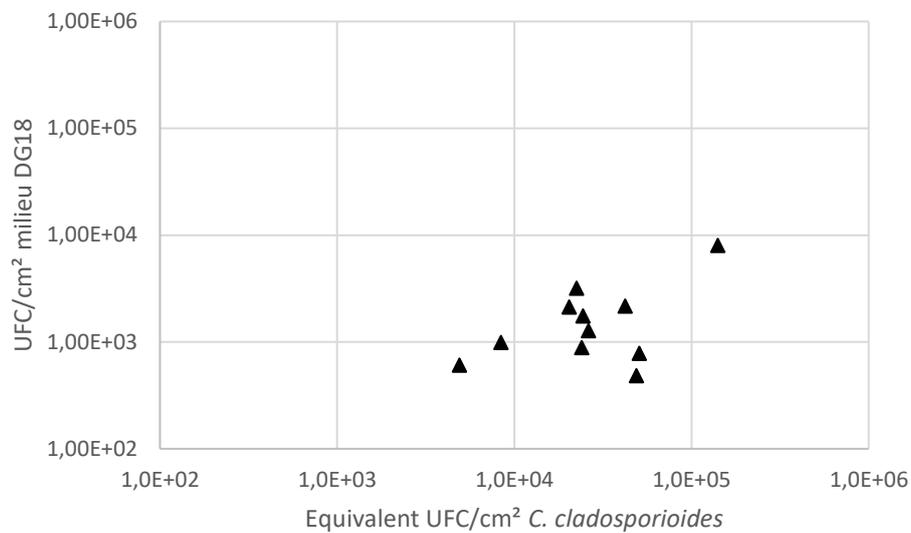


Figure 4-23 : Diagramme de parité avec UFC/cm² mesuré par extraction Tween 20 sur DG18 et en abscisse les équivalents UFC/cm² de *C. cladosporioides*

Pour compléter les analyses par cultures, des manipulations de biologie moléculaire ont été effectuées. Des PCR quantitative ont été réalisées avec des amorces ciblant 3 espèces fongiques : *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium chrysogenum* ; et deux espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats pour les cibles fongiques sont comparables avec les résultats par cultures. Avec ces deux méthodologies, les quantités de microorganismes mesurées sont restées stables au cours de la campagne de prélèvement. En comparant l'évolution des UFC/cm² quantifié par extraction Tween 20 des coupons, aux équivalents UFC/cm² des cibles fongiques comme *C. cladosporioides*, on observe une tendance à atteindre un plateau et une stabilisation dès les premiers mois d'études. La Figure 4-23 montre un diagramme de parité entre les données UFC/cm² des extraction Tween 20 des coupons, aux données équivalents UFC/cm² pour les qPCR avec *C. cladosporioides*. On observe que les différents points sont groupés et comme précédemment indiqué, les concentrations sont plus élevées pour les données qPCR.

Cependant en comparant stricto sensu les données par méthodes culturales et par qPCR, les concentrations relevées par qPCR sont plus élevées malgré la spécificité des amorces. On peut expliquer ces différences avec plusieurs hypothèses. Les données de qPCR sont exprimées en équivalent UFC/cm², il y a donc une approximation liée à la méthode d'étalonnage pour exprimer cette équivalence. En conditions de laboratoire, les microorganismes sont dans des

conditions optimales de croissance. Dans un environnement naturel, les différents stress que subissent ces bactéries ou moisissures, en état végétatif non sporulé, peuvent influencer sur l'organisation et l'expression des génomes (Simonsen, 2022). Il faut alors être prudent lors de la comparaison du comptage d'UFC sur boîte de Petri et les résultats de qPCR basés sur le nombre de copies d'un gène cible dans un échantillon. Dans le premier cas on compte directement le microorganisme en question, et dans le deuxième cas c'est la présence du gène qui permet de quantifier le microorganisme.

Les deux techniques ont montré que les quantités de bactéries et moisissures présentes et collectées sur le filtre sont stables au cours de la campagne de prélèvement. Ce point est intéressant car il permet d'appuyer cette observation pour l'une et l'autre des techniques. Car on pouvait imaginer que cette stabilisation via le comptage UFC était peut-être liée à un biais de la technique par étalement à cause des colonies de moisissures envahissantes.

De plus, les limites de quantification déterminées par les gammes d'étalonnage des amorces qPCR étaient assez hautes en termes d'équivalent UFC/cm². La sensibilité de la technique est moindre par qPCR à titre de comparaison avec la méthode par croissance sur boîte. Mais les amorces étaient spécifiques, il y a donc une grande spécificité avec cette méthode par qPCR. Il est également possible de réaliser des qPCR avec des amorces universelles pour bactéries ou moisissures.

La méthode par séquençage permet d'investiguer en profondeur la diversité microbienne présente sur les coupons. Cependant les bases de données utilisées ne sont pas totalement exhaustives car beaucoup de genres ou d'espèces restent inconnues ou pas assez décrites.

En revanche, il n'est pas possible d'avoir un aspect quantitatif avec cette méthode. On peut seulement discuter autour des abondances relatives entre les différents taxons que l'on compare.

Chapitre 5 : Conclusions – Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis (i) de mieux appréhender les performances de filtration de filtres de CTA concernant les efficacités de filtration particulaire et microbienne sur la durée de vie d'un filtre en conditions réelles d'utilisation, et (ii) de mettre en place une stratégie nouvelle d'échantillonnage de la QAI en utilisant les filtres de la CTA. La nouveauté apportée par ces travaux est d'une part d'avoir pu étudier sur 13 mois l'évolution des conditions d'opération du filtre, les performances de filtration et d'analyser les microorganismes collectés par le média filtrant. L'originalité est aussi d'avoir travaillé avec des échantillons en conditions réelles de la vie d'un bâtiment et au grés des activités des occupants. Les deux principaux objectifs fixés étaient :

- Caractériser la CTA, les filtres et leurs performances de filtration particulaire et microbienne et les conditions climatiques.
- Développer une méthode d'échantillonnage par coupon de média filtrant à la surface des filtres d'extraction de la CTA pour analyser la contamination microbiologique de l'air intérieur.

Afin de mener à bien ces travaux et répondre à ces objectifs, un état de l'art des précédents travaux réalisés dans le domaine de la QAI a été mené. Une attention particulière a été portée sur les différents types de collecteurs disponibles afin de déterminer les avantages et les inconvénients de chaque échantillonneur. Cette revue a été utile pour sélectionner les collecteurs de référence qui ont été utilisés au cours de la campagne de mesure mise en œuvre. Un travail sur les différentes techniques d'extraction de microorganismes collectés sur un filtre a permis d'optimiser un mode opératoire pour répondre aux problématiques liées aux matrices complexes. De plus, l'analyse de différentes publications et des échanges avec des fabricants de kits pour la biologie moléculaire ont également été effectués afin de mettre au point le protocole d'analyse des virus respiratoires par qPCR à l'aide d'un kit utilisé dans la recherche clinique. Les différentes études réalisées sur des CTA pour analyser la QAI ont été prises en considération et ont permis de discuter une partie des résultats obtenus durant ces travaux.

Une attention particulière a été portée sur la partie matériels et la construction des méthodologies durant cette étude. La méthodologie d'échantillonnage par coupon avait auparavant été développée et testée lors de précédentes études du laboratoire GEPEA. Cette approche a néanmoins été modifiée et adaptée pour être utilisée dans les filtres à 4 poches utilisé dans la CTA Bureaux du bâtiment d'IMT Atlantique étudié. Pour cela, le média filtrant a été caractérisé au laboratoire avec des tests de perméabilité et observations par microscopie

électronique à balayage. La technique d'échantillonnage par coupon impliquant une modification physique du filtre en rajoutant une surépaisseur de média filtrant a été étudiée pour mieux connaître le comportement du flux d'air à travers et autour de ce coupon. La perte de charge a été étudiée à l'échelle du laboratoire sur un banc test, mais aussi à l'échelle réelle dans la CTA et elle s'est avérée identique, sans impact de la double épaisseur de média filtrant sur le différentiel de pression en amont et aval du filtre. Des tests avec un traceur particulaire (fluorescéine) pour comprendre le comportement du flux d'air ont été menés au laboratoire dans des conditions contrôlées et dans la CTA réelle. Dans les deux cas la double épaisseur de média filtrant aboutissait à une perte d'environ 50 % de particules captées sur le coupon à prélever, sur des filtres neufs non colmatés. Une fois ces tests préliminaires effectués, la CTA et le compartiment traitant l'air extrait des bureaux a été étudié.

Pour maximiser la collecte des aérosols microbiens par la technique des coupons, la géométrie du compartiment de la CTA dédié à l'air extrait des bureaux et la répartition du flux d'air a été étudiée. L'arrivée de l'air extrait par la gaine d'extraction est désaxée par rapport aux deux filtres présents dans le compartiment, un flux d'air non homogène traversant les filtres a été supposé. Cette hypothèse a été confirmée à l'aide de particules de fluorescéine pour étudier la répartition du flux d'air. Sur des filtres neufs et, dans une moindre mesure sur des filtres colmatés, le flux d'air traversant les filtres est plus important juste en face de la sortie de la gaine d'extraction. Cette expérience a été déterminante pour le positionnement des coupons sur les filtres en face de la gaine. Les coupons ont été disposés en suivant une cartographie basée sur la répartition de la fluorescéine.

Enfin différents tests préliminaires ont été menés pour optimiser les protocoles pour extraire les microorganismes du média filtrant des coupons. Des expériences avec ou absence de tensioactif (Tween 20) ont été réalisées avec des souches bactériennes isolées pour connaître les effets potentiels de cette molécule. Il semblerait qu'un effet négatif est liée à l'utilisation de Tween 20 sur l'efficacité d'extraction de bactéries *S. epidermidis*. Pour la partie biologie moléculaire, de nombreux tests ont été réalisés pour optimiser le protocole d'extraction des acides nucléiques directement à partir du coupon de média filtrant. Finalement l'extraction des acides nucléiques sur un quart du coupon et en réalisant l'étape de *bead beating* directement sur les fibres a été retenue.

Les résultats détaillés dans le troisième chapitre ont permis tout d'abord d'évaluer les conditions climatiques de l'air traité par la CTA pendant 13 mois. La température et l'humidité

relative de l'air neuf suivait un schéma classique saisonnier contrairement à l'air extrait des bureaux aux conditions plus stables et confortables pour les occupants des bureaux. Le colmatage des filtres a suivi un profil classique avec au départ un colmatage en profondeur du média filtrant avec une perte de charge stable puis une augmentation de la perte de charge en lien avec un colmatage en surface du filtre.

Concernant les efficacités de filtration, elles étaient stables au cours de l'étude pour les efficacités totales de filtration particulaire et microbienne. En comparant les efficacités de filtration fractionnelles des particules et des bactéries ou moisissures, elles sont comparables pour des diamètres de particule supérieur à 1 μm .

Les prélèvements réalisés par cassette de filtration suivis d'analyses en biologie moléculaire n'ont révélé aucun résultat positif, contrairement aux analyses par impaction sur milieu gélosé pour des prélèvements identiques dans les gaines.

La méthodologie de prélèvement par coupons de média filtrant fixés sur les filtres d'extraction de la CTA a été mise en place pendant 13 mois. Chaque mois 3 coupons ont été récoltés pour être analysés au laboratoire. Deux coupons ont été utilisés pour les analyses culturales sur boîte de Pétri. Un résultat marquant est l'absence d'augmentation significative de la concentration microbienne sur les coupons au cours de la campagne, mais des valeurs relativement stables pour les 13 mois pour les espèces fongiques et bactériennes ($9,2 \cdot 10^1$ UFC/cm² et $9,6 \cdot 10^3$ UFC/cm² de filtre). Ces valeurs sont en accord avec ceux de (Gonzalez H., 2014) ayant utilisé une méthode par coupons après 6 mois d'analyse sur une CTA d'un immeuble de bureaux. On retrouve également une quantité supérieure de UFC/cm² de filtre sur le prélèvement réalisé directement dans le média filtrant du filtre à la fin de la campagne de prélèvement. Cette observation rejoint les précédentes conclusions concernant un sous-échantillonnage de 50% du flux d'air entre les zones composées d'une simple couche de média filtrant et celles contenant le coupon.

En confrontant les deux approches différentes pour analyser la flore microbienne, on constate que les résultats de qPCR avec les cibles pour les espèces fongiques *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium chrysogenum*, sont semblables à ceux observés en culture pour les premiers mois d'analyse en termes d'équivalent UFC/cm².

Les analyses des données de séquençage ont permis de décrire la diversité des bactéries et moisissures qui ont été collectées au cours des 13 mois de prélèvement. En comparant les

résultats on observe que les échantillons témoins n'ayant pas été en contact avec le flux d'air, présentent des profils différents des échantillons prélevés par la suite en termes de diversité de genre.

En suivant le cours des saisons, on observe des abondances relatives pour des genres fongiques reliées à des moment clefs tels que l'été avec des conditions climatiques propices pour certains mycètes et à l'inverse moins opportuns pour d'autres genres. On peut également faire cette analyse avec les genres bactériens associés à la flore cutanée des occupants et à l'absence ou présence du personnel dans les bureaux.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il semblerait que cette méthodologie d'analyse de la contamination de l'air intérieur de bureaux par des coupons de média filtrant sur les filtres de CTA puisse apporter de nouveaux éléments de réponse concernant le microbiome d'un bâtiment et de l'impact des occupants. Cette nouvelle façon d'échantillonner peut également être ouverte à l'analyse des virus respiratoires. Deux *Coronavirus* et deux *Adenovirus* ont été recensés sur les coupons pendant la campagne de prélèvement grâce au kit qPCR pour virus respiratoires. Cette observation peut ouvrir la voie à une utilisation à une grande échelle des filtres de CTA pour mieux comprendre la transmission virale au sein d'un bâtiment. Ceci permettrait de mettre en place une stratégie de prévention en adaptant le fonctionnement de CTA pour limiter la propagation de virus.

A l'issue de ces travaux de thèse, de nombreuses pistes d'amélioration et de perspectives ont émergé. En voici certaines :

- Etudier plus en détails le sous-échantillonnage de 50 % de flux d'air au niveau du coupon. Peut-être essayer de trouver un média filtrant ou coupon d'une autre nature permettant de limiter cette perte.
- Concernant la répartition du flux au niveau des coupons ou dans le compartiment d'extraction de la CTA, il serait intéressant d'utiliser un autre traceur particulaire avec des diamètres et tailles différentes pour couvrir un plus grand spectre d'aérosols microbiens.
- Approfondir la comparaison entre les efficacités de filtration des particules et des aérosols microbiens, afin de pouvoir valider le fait d'utiliser uniquement la mesure particulaire qui est plus simple à mettre en œuvre.

- Améliorer le rendement d'extraction des acides nucléiques avec une phase de lyse cellulaire et d'extraction du média fibreux plus efficace. Il est fort probable que cette matrice complexe n'a pas favorisé le *bead beating* et les rendements en ADN peuvent être largement augmentés avec un protocole plus adapté.
- Essayer différents types de filtre pour les cassettes filtrantes ou essayer d'adapter un protocole plus enclin à l'analyse des environnements peu chargés en microorganismes.
- Expérimenter un milieu gélosé pour la croissance des bactéries avec un inhibiteur fongique pour accéder uniquement aux colonies bactériennes. Les comptages étant parfois complexes avec les colonies fongiques envahissantes.
- Développer un protocole pour réaliser des analyses qPCR avec des amorces universelles bactériennes et fongiques.
- Tester l'hypothèse de réentraînement d'une partie des microorganismes du filtre en fin de vie en testant un filtre colmaté au laboratoire sur un banc d'essai. Vérifier s'il est possible de détecter du relargage en aval du filtre.
- Investiguer des analyses avec un séquençage 18S pour mieux caractériser la faune eucaryote et notamment découvrir d'éventuels acariens ou autres prédateurs de microorganismes pouvant potentiellement se développer sur le filtre et jouant un rôle dans le colmatage du filtre.

Références

- Abd Ali, S. A. Z. (2018). Filtration performances of antimicrobial and regular HVAC filters regarding PM10 and microbial aerosols in laboratory and realistic conditions [Thèse].
- Abeykoon, A. M. H., Poon, M., Firestone, S. M., Stevenson, M. A., Wiethoelter, A. K., & Vincent, G. A. (2022). Performance Evaluation and Validation of Air Samplers To Detect Aerosolized *Coxiella burnetii*. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e00655-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00655-22>
- Ackelsberg, J., Leykam, F. M., Hazi, Y., Madsen, L. C., West, T. H., Faltsek, A., Henderson, G. D., Henderson, C. L., & Leighton, T. (2011). The NYC Native Air Sampling Pilot Project: Using HVAC Filter Data for Urban Biological Incident Characterization. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*, 9(3), 213-224. <https://doi.org/10.1089/bsp.2010.0064>
- Adams, C. E., & Dancer, S. J. (2020). Dynamic Transmission of *Staphylococcus Aureus* in the Intensive Care Unit. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062109>
- Andersen, A. A. (1958). NEW SAMPLER FOR THE COLLECTION, SIZING, AND ENUMERATION OF VIABLE AIRBORNE PARTICLES,. *Journal of Bacteriology*, 76(5), 471-484. <https://doi.org/10.1128/jb.76.5.471-484.1958>
- ANSES - Concentrations de CO2 dans l'air intérieur et effets sur la santé. 2013.pdf. (s. d.).
- Anua, S. M., Haris, N. F., & Mazlan, N. (2020). Bioaerosol Levels in Indoor Air of Animal House and Hospital Laboratories; A Comparison with Library and Administrative Offices. 7.
- Aydogdu, H., Asan, A., & Tatman Otkun, M. (2010). Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of

- meteorological factors. *Environmental Monitoring and Assessment*, 164(1), 53-66.
<https://doi.org/10.1007/s10661-009-0874-0>
- Bailly, A., Clerc-Renaud, M., Rutman, E., & Ternant, C. (2001). *Traitement de l'air et climatisation—Les composants et leurs fonctions*. Techniques de l'ingénieur.
<https://doi.org/10.51257/a-v1-be9271>
- Berry, G., Beckman, I., & Cho, H. (2023). A comprehensive review of particle loading models of fibrous air filters. *Journal of Aerosol Science*, 167, 106078.
<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2022.106078>
- Betelli, L., Duquenne, P., Grenouillet, F., Simon, X., Scherer, E., Géhin, E., & Hartmann, A. (2013). Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1), 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.009>
- Borges, J. T., Nakada, L. Y. K., Maniero, M. G., & Guimarães, J. R. (2021). SARS-CoV-2 : A systematic review of indoor air sampling for virus detection. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(30), 40460-40473. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13001-w>
- Broderick, Á., Byrne, M., Armstrong, S., Sheahan, J., & Coggins, A. M. (2017). A pre and post evaluation of indoor air quality, ventilation, and thermal comfort in retrofitted cooperative social housing. *Building and Environment*, 122, 126-133.
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2017.05.020>
- Campagnolo, D., Saraga, D. E., Cattaneo, A., Spinazzè, A., Mandin, C., Mabilia, R., Perreca, E., Sakellaris, I., Canha, N., Mihucz, V. G., Szigeti, T., Ventura, G., Madureira, J., de Oliveira Fernandes, E., de Kluzenaar, Y., Cornelissen, E., Hänninen, O., Carrer, P., Wolkoff, P., ... Bartzis, J. G. (2017). VOCs and aldehydes source identification in

- European office buildings—The OFFICAIR study. *Building and Environment*, 115, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2017.01.009>
- Canha, N., Lage, J., Candeias, S., Alves, C., & Almeida, S. M. (2017). Indoor air quality during sleep under different ventilation patterns. *Atmospheric Pollution Research*, 8(6), 1132-1142. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2017.05.004>
- Carazo Fernández, L., Fernández Alvarez, R., González-Barcala, F. J., & Rodríguez Portal, J. A. (2013). Indoor Air Contaminants and Their Impact on Respiratory Pathologies. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 49(1), 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2012.11.004>
- Chang, C.-W., & Chou, F.-C. (2011). Methodologies for quantifying culturable, viable, and total *Legionella pneumophila* in indoor air. *Indoor Air*, 21(4), 291-299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2010.00701.x>
- Chang, C.-W., & Wang, L.-J. (2015). Impact of culture media and sampling methods on *Staphylococcus aureus* aerosols. *Indoor Air*, 25(5), 488-498. <https://doi.org/10.1111/ina.12162>
- Chao, H. J., Schwartz, J., Milton, D. K., & Burge, H. A. (2002). Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environmental Health Perspectives*, 110(8), 777-782. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110777>
- Chenoweth, J. A., Albertson, T. E., & Greer, M. R. (2021). Carbon Monoxide Poisoning. *Critical Care Clinics*, 37(3), 657-672. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.03.010>
- Chowdhury, Z., Campanella, L., Gray, C., Al Masud, A., Marter-Kenyon, J., Pennise, D., Charron, D., & Zuzhang, X. (2013). Measurement and modeling of indoor air pollution in rural households with multiple stove interventions in Yunnan, China. *Atmospheric Environment*, 67, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.10.041>

- Coates, J., Mar, K. A., Ojha, N., & Butler, T. M. (2016). The influence of temperature on ozone production under varying NO_x conditions – a modelling study. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(18), 11601-11615. <https://doi.org/10.5194/acp-16-11601-2016>
- Dallongeville, A., Le Cann, P., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I., & Blanchard, O. (2015). Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air and house dust of French dwellings. *Science of The Total Environment*, 536, 964-972. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.039>
- Davies, C. N. (1973). *Air Filtration* [By] C.N. Davies. Academic Press. <https://books.google.fr/books?id=o0zguAAACAAJ>
- Delikhoon, M., Guzman, M. I., Nabizadeh, R., & Norouzian Baghani, A. (2021). Modes of Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and Factors Influencing on the Airborne Transmission : A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020395>
- de Oliveira Sant'Anna, L., dos Santos, L. S., Araújo, M. R. B., da Rocha, D. J. P. G., Ramos, J. N., Baio, P. V. P., Del Peloso, P. F., da Costa Ferreira Leite, C., Peixoto, R. S., Almuzara, M., Vay, C., Barberis, C., Sangal, V., Burkovski, A., Aguiar, E. R. G. R., Mattos-Guaraldi, A. L., Pacheco, L. G. C., & Vieira, V. V. (2023). *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov.: A new species of *Corynebacterium* from human infections. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00938-y>
- Dodson, R. E., Levy, J. I., Spengler, J. D., Shine, J. P., & Bennett, D. H. (2008). Influence of basements, garages, and common hallways on indoor residential volatile organic compound concentrations. *Atmospheric Environment*, 42(7), 1569-1581. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.088>

- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp. : An Overview. *Microbes and Environments*, 26(2), 101-112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>
- Du, L., Batterman, S., Godwin, C., Rowe, Z., & Chin, J.-Y. (2015). Air exchange rates and migration of VOCs in basements and residences. *Indoor Air*, 25(6), 598-609. <https://doi.org/10.1111/ina.12178>
- Dunn, R. R., Fierer, N., Henley, J. B., Leff, J. W., & Menninger, H. L. (2013). Home Life : Factors Structuring the Bacterial Diversity Found within and between Homes. *PLoS ONE*, 8(5), e64133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064133>
- Engelhart, S., & Exner, M. (2002). Short-term versus long-term filter cassette sampling for viable fungi in indoor air : Comparative performance of the Sartorius MD8 and the GSP sampler. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(6), 443-451. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00183>
- Engelhart, S., Glasmacher, A., Simon, A., & Exner, M. (2007). Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi : Comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable bioaerosol sampler. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(6), 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.10.001>
- Erdmann, C. A., & Apte, M. G. (2004). Mucous membrane and lower respiratory building related symptoms in relation to indoor carbon dioxide concentrations in the 100-building BASE dataset. *Indoor Air*, 14 Suppl 8, 127-134. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2004.00298.x>
- Falzone, L., Marconi, A., Loreto, C., Franco, S., Spandidos, D. A., & Libra, M. (2016). Occupational exposure to carcinogens : Benzene, pesticides and fibers (Review).

<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5791>

- Farnsworth, J. E., Goyal, S. M., Won Kim, S., Kuehn, T. H., Raynor, P. C., Ramakrishnan, M. A., Anantharaman, S., & Tang, W. (2006). Development of a method for bacteria and virus recovery from heating, ventilation, and air conditioning (HVAC) filters. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(10), 1006. <https://doi.org/10.1039/b606132j>
- Fazlzadeh, M., Rostami, R., Hazrati, S., & Rastgu, A. (2015). Concentrations of carbon monoxide in indoor and outdoor air of Ghalyun cafes. *Atmospheric Pollution Research*, 6(4), 550-555. <https://doi.org/10.5094/APR.2015.061>
- Frankel, M., Bekö, G., Timm, M., Gustavsen, S., Hansen, E. W., & Madsen, A. M. (2012). Seasonal Variations of Indoor Microbial Exposures and Their Relation to Temperature, Relative Humidity, and Air Exchange Rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8289-8297. <https://doi.org/10.1128/AEM.02069-12>
- Gale, R. W., Cranor, W. L., Alvarez, D. A., Huckins, J. N., Petty, J. D., & Robertson, G. L. (2009). Semivolatile Organic Compounds in Residential Air along the Arizona–Mexico Border. *Environmental Science & Technology*, 43(9), 3054-3060. <https://doi.org/10.1021/es803482u>
- Gillespie-Bennett, J., Pierse, N., Wickens, K., Crane, J., Howden-Chapman, P., & Team, and the H. H. and H. S. R. (2011). The respiratory health effects of nitrogen dioxide in children with asthma. *European Respiratory Journal*, 38(2), 303-309. <https://doi.org/10.1183/09031936.00115409>
- Gonzalez H., L. F. (2014). Influence de la gestion des centrales de traitement d'air des réseaux de ventilation de bâtiments sur le développement d'aérosols microbiens. Thèse de doctorat en Génie des Procédés. Nantes, IMT Atlantique.

- González, L. F., Joubert, A., Andrès, Y., Liard, M., Renner, C., & Le Coq, L. (2016). Filtration performances of HVAC filters for PM10 and microbial aerosols—Influence of management in a lab-scale air handling unit. *Aerosol Science and Technology*, 50(6), 555-567. <https://doi.org/10.1080/02786826.2016.1167833>
- González-Martín, J., Kraakman, N. J. R., Pérez, C., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2021). A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere*, 262, 128376. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128376>
- Green, B. J., Lemons, A. R., Park, Y., Cox-Ganser, J. M., & Park, J.-H. (2017). Assessment of fungal diversity in a water-damaged office building. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(4), 285-293. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1252044>
- HCSP 2022—Avis relatif à la mesure du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'air intérieur des établissements recevant du public (ERP). (s. d.).
- Hiwar, W., King, M., Kharrufa, H., Tidswell, E., Fletcher, L. A., & Noakes, C. J. (2022). The impact of ventilation rate on reducing the microorganisms load in the air and on surfaces in a room-sized chamber. *Indoor Air*, 32(11). <https://doi.org/10.1111/ina.13161>
- Hong, T., & Gurian, P. L. (2012). Characterizing Bioaerosol Risk from Environmental Sampling. *Environmental Science & Technology*, 46(12), 6714-6722. <https://doi.org/10.1021/es300197n>
- Hou, J., Sun, Y., Dai, X., Liu, J., Shen, X., Tan, H., Yin, H., Huang, K., Gao, Y., Lai, D., Hong, W., Zhai, X., Norbäck, D., & Chen, Q. (2021). Associations of indoor carbon dioxide concentrations, air temperature, and humidity with perceived air quality and sick building syndrome symptoms in Chinese homes. *Indoor Air*, 31(4), 1018-1028. <https://doi.org/10.1111/ina.12810>

- Hwang, S. H., & Park, W. M. (2020). Indoor air concentrations of carbon dioxide (CO₂), nitrogen dioxide (NO₂), and ozone (O₃) in multiple healthcare facilities. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(5), 1487-1496. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00441-0>
- Jeong, S. B., Ko, H. S., Heo, K. J., Shin, J. H., & Jung, J. H. (2022). Size distribution and concentration of indoor culturable bacterial and fungal bioaerosols. *Atmospheric Environment: X*, 15, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2022.100182>
- Jones, R. M., & Brosseau, L. M. (2015). Aerosol Transmission of Infectious Disease: *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 57(5), 501-508. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000448>
- Joubert, A., Abd Ali, S. A. Z., Frossard, M., & Andrès, Y. (2021). Dust and microbial filtration performance of regular and antimicrobial HVAC filters in realistic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(29), 39907-39919. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13330-w>
- Khan, S. T., Takaichi, S., & Harayama, S. (2008). *Paracoccus marinus* sp. Nov., an adonixanthin diglucoside-producing bacterium isolated from coastal seawater in Tokyo Bay. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58(2), 383-386. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65103-0>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kloos, W. E., & Musselwhite, M. S. (1975). Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *APPL. MICROBIOL.*, 30, 15.

- Kooken, J. M., Fox, K. F., & Fox, A. (2012). Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. *Molecular and Cellular Probes*, 26(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.09.003>
- Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., & Máriaiget, K. (1999). *Kocuria palustris* sp. Nov. And *Kocuria rhizophila* sp. Nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 167-173. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-167>
- Kutter, J. S., de Meulder, D., Bestebroer, T. M., Mulders, A., Fouchier, R. A. M., & Herfst, S. (2021). Comparison of three air samplers for the collection of four nebulized respiratory viruses—Collection of respiratory viruses from air –. *Indoor Air*, 31(6), 1874-1885. <https://doi.org/10.1111/ina.12875>
- Le Coq, L. (2006). *Élimination des particules*. Ed. Techniques Ingénieur.
- Li, J., Leavey, A., Wang, Y., O'Neil, C., Wallace, M. A., Burnham, C.-A. D., Boon, A. C., Babcock, H., & Biswas, P. (2018). Comparing the performance of 3 bioaerosol samplers for influenza virus. *Journal of Aerosol Science*, 115, 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.08.007>
- Li, Y., Leung, G. M., Tang, J. W., Yang, X., Chao, C. Y. H., Lin, J. Z., Lu, J. W., Nielsen, P. V., Niu, J., Qian, H., Sleigh, A. C., Su, H.-J. J., Sundell, J., Wong, T. W., & Yuen, P. L. (2007). Role of ventilation in airborne transmission of infectious agents in the built environment? A multidisciplinary systematic review. *Indoor Air*, 17(1), 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2006.00445.x>
- Luengas, A., Barona, A., Hort, C., Gallastegui, G., Platel, V., & Elias, A. (2015). A review of indoor air treatment technologies. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 499-522. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9363-9>

- Luhung, I., Wu, Y., Xu, S., Yamamoto, N., Chang, V. W.-C., & Nazaroff, W. W. (2017). DNA accumulation on ventilation system filters in university buildings in Singapore. *PLOS ONE*, 12(10), e0186295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186295>
- Luhung, I., Wu, Y., Xu, S., Yamamoto, N., Chang, V. W.-C., & Nazaroff, W. W. (2018). Exploring temporal patterns of bacterial and fungal DNA accumulation on a ventilation system filter for a Singapore university library. *PLOS ONE*, 13(7), e0200820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200820>
- Łukaszuk, C., Krajewska-Kułak, E., Guzowski, A., Kułak, W., & Kraszyńska, B. (2017). Comparison of the Results of Studies of Air Pollution Fungi Using the SAS Super 100, MAS 100, and Air IDEAL. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070815>
- Macher, J. M. (1989). Positive-Hole Correction of Multiple-Jet Impactors for Collecting Viable Microorganisms. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 50(11), 561-568. <https://doi.org/10.1080/15298668991375164>
- Mandin, C., Trantallidi, M., Cattaneo, A., Canha, N., Mihucz, V. G., Szigeti, T., Mabilia, R., Perreca, E., Spinazzè, A., Fossati, S., De Kluizenaar, Y., Cornelissen, E., Sakellaris, I., Saraga, D., Hänninen, O., De Oliveira Fernandes, E., Ventura, G., Wolkoff, P., Carrer, P., & Bartzis, J. (2017). Assessment of indoor air quality in office buildings across Europe – The OFFICAIR study. *Science of The Total Environment*, 579, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.238>
- Martins, N. R., & Carrilho da Graça, G. (2020). A simulation study of decreased life expectancy from exposure to ambient particulate air pollution (PM_{2.5}) in naturally ventilated workspaces. *Journal of Building Engineering*, 30, 101268. <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.101268>

- Maynard, R., Krzyzanowski, M., Vilahur, N., & Héroux, M.-E. (2017). Evolution of WHO air quality guidelines past, present and future. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0019/331660/Evolution-air-quality.pdf?ua=1
- Miller-Leiden, S., Lohascio, C., Nazaroff, W. W., & Macher, J. M. (1996). Effectiveness of In-Room Air Filtration and Dilution Ventilation for Tuberculosis Infection Control. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 46(9), 869-882. <https://doi.org/10.1080/10473289.1996.10467523>
- Nam, S.-W., Chun, J., Kim, S., Kim, W., Zakrzewska-Czerwinska, J., & Goodfellow, M. (2003). *Tsukamurella spumae* sp. Nov., A Novel Actinomycete Associated with Foaming in Activated Sludge Plants. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 367-375. <https://doi.org/10.1078/072320203322497392>
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2445-2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.01754-09>
- Novick, V. J., Monson, P. R., & Ellison, P. E. (1992). The effect of solid particle mass loading on the pressure drop of HEPA filters. *Journal of Aerosol Science*, 23(6), 657-665. [https://doi.org/10.1016/0021-8502\(92\)90032-Q](https://doi.org/10.1016/0021-8502(92)90032-Q)
- Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas* spp. Clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.003>
- Pastuszka, J. S., Kyaw Tha Paw, U., Lis, D. O., Wlazło, A., & Ulfig, K. (2000). Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmospheric Environment*, 34(22), 3833-3842. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00527-0](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00527-0)

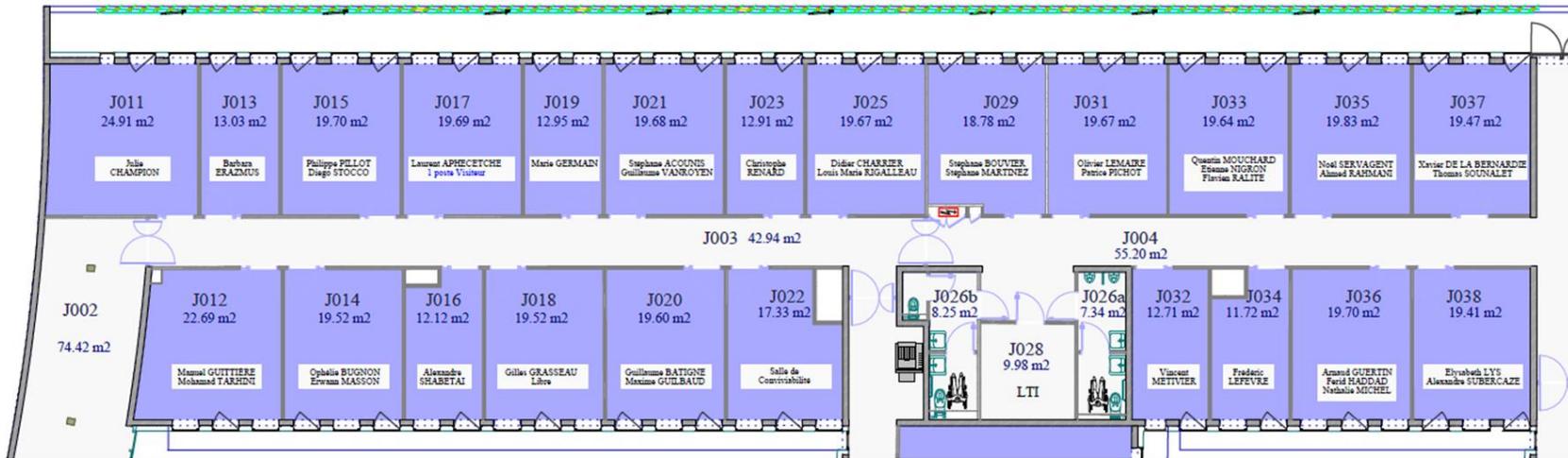
- Prasauskas, T., Martuzevicius, D., Kalamees, T., Kuusk, K., Leivo, V., & Haverinen-Shaughnessy, U. (2016). Effects of Energy Retrofits on Indoor Air Quality in Three Northern European Countries. *Energy Procedia*, 96, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.09.134>
- Principaux résultats de l'enquête nationale de prévalence 2022 des infections nosocomiales.pdf. (s. d.).
- Qian, H., Miao, T., Liu, L., Zheng, X., Luo, D., & Li, Y. (2021). Indoor transmission of SARS-CoV-2. *Indoor Air*, 31(3), 639-645. <https://doi.org/10.1111/ina.12766>
- Rayegan, S., Shu, C., Berquist, J., Jeon, J., Zhou, L. (Grace), Wang, L. (Leon), Mbareche, H., Tardif, P., & Ge, H. (2023). A review on indoor airborne transmission of COVID-19—modelling and mitigation approaches. *Journal of Building Engineering*, 64, 105599. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2022.105599>
- Reddy, G. S., Aggarwal, R. K., Matsumoto, G. I., & Shivaji, S. (2000). *Arthrobacter flavus* sp. Nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1553-1561. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1553>
- Renoux, A., & Boulaud, D. (1998). The aerosols, physics and metrology; *Les Aerosols, physique et metrologie*. <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/681965>
- Riebesehl, J., Yurchenko, E., Nakasone, K. K., & Langer, E. (2019). Phylogenetic and morphological studies in *Xylodon* (Hymenochaetales, Basidiomycota) with the addition of four new species. *MycoKeys*, 47, 97-137. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.47.31130>
- Robert, L., Guichard, R., Klingler, J., Cochet, V., & Mandin, C. (2021). Indoor air quality in shopping and storage areas. *Indoor Air*, 31(4), 1238-1251. <https://doi.org/10.1111/ina.12783>

- Santarpia, J. L., Rivera, D. N., Herrera, V., Morwitzer, M. J., Creager, H., Santarpia, G. W., Crown, K. K., Brett-Major, D., Schnaubelt, E., Broadhurst, M. J., Lawler, J. V., Reid, St. P., & Lowe, J. J. (2020). Transmission Potential of SARS-CoV-2 in Viral Shedding Observed at the University of Nebraska Medical Center [Preprint]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20039446>
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Fourquenot, V., Calinon, C., Paul, K., Valvin, S., Maurel, A., Aho, S., Couillault, G., Cachia, C., Vagner, O., Cuisenier, B., Caillot, D., & Bonnin, A. (2009). Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Science of The Total Environment*, 407(12), 3766-3771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.024>
- Shelton, B. G., Kirkland, K. H., Flanders, W. D., & Morris, G. K. (2002). Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 68, 11. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1743-1753.2002>
- Silva, P. G. da, Gonçalves, J., Lopes, A. I. B., Esteves, N. A., Bamba, G. E. E., Nascimento, M. S. J., Branco, P. T. B. S., Soares, R. R. G., Sousa, S. I. V., & Mesquita, J. R. (2022). Evidence of Air and Surface Contamination with SARS-CoV-2 in a Major Hospital in Portugal. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010525>
- Simonsen, A. K. (2022). Environmental stress leads to genome streamlining in a widely distributed species of soil bacteria. *The ISME Journal*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01082-x>
- Snyder, R., Witz, G., & Goldstein, B. D. (1993). The toxicology of benzene. *Environmental Health Perspectives*, 100, 293-306. <https://doi.org/10.1289/ehp.93100293>

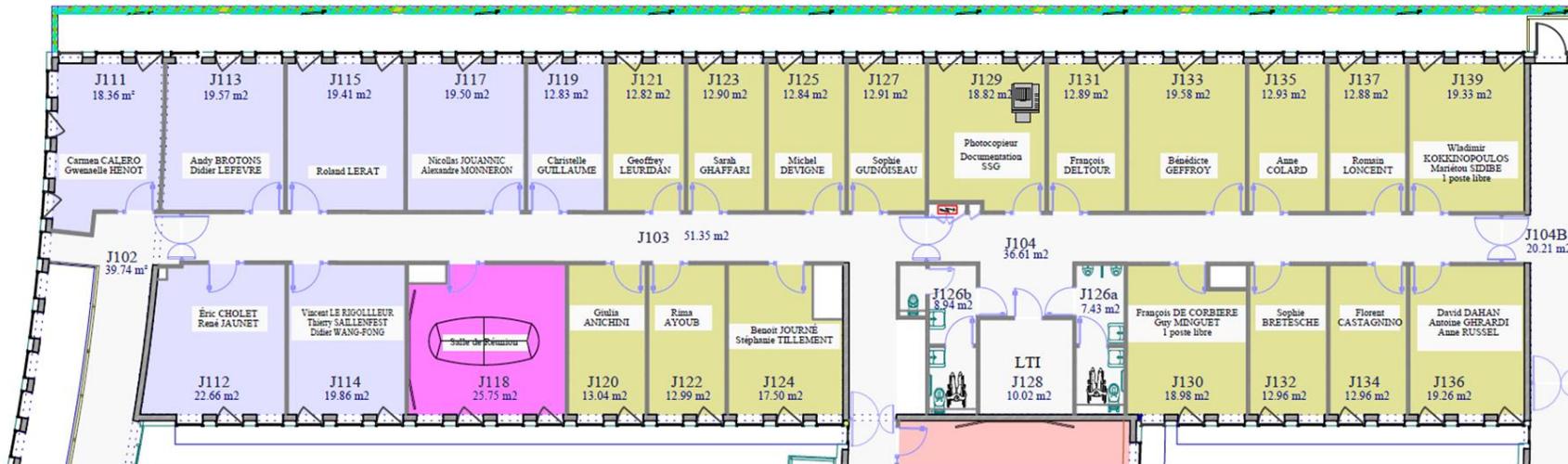
- Szekeres, S., Kostyák, A., Szodrai, F., & Csáky, I. (2022). Investigation of Ventilation Systems to Improve Air Quality in the Occupied Zone in Office Buildings. *Buildings*, 12(4), 493. <https://doi.org/10.3390/buildings12040493>
- Tringe, S. G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W. H., Yap, J., Yao, F., Suan, S. T., Ing, S. K., Haynes, M., Rohwer, F., Wei, C. L., Tan, P., Bristow, J., Rubin, E. M., & Ruan, Y. (2008). The Airborne Metagenome in an Indoor Urban Environment. *PLoS ONE*, 3(4), e1862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001862>
- Truyols Vives, J., Muncunill, J., Toledo Pons, N., Baldoví, H. G., Sala Llinàs, E., & Mercader Barceló, J. (2022). SARS-CoV-2 detection in bioaerosols using a liquid impinger collector and ddPCR. *Indoor Air*, 32(2), e13002. <https://doi.org/10.1111/ina.13002>
- Van Cuyk, S., Deshpande, A., Hollander, A., Franco, D. O., Teclemariam, N. P., Layshock, J. A., Ticknor, L. O., Brown, M. J., & Omberg, K. M. (2012). Transport of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* from an Outdoor Release into Buildings: Pathways of Infiltration and a Rapid Method to Identify Contaminated Buildings. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*, 10(2), 215-227. <https://doi.org/10.1089/bsp.2011.0081>
- Watt, A. E., Browning, G. F., Markham, P. F., & Marends, M. S. (2020). Detection of naturally aerosolized *Actinobacillus pleuropneumoniae* on pig farms by cyclonic air sampling and qPCR. *Veterinary Microbiology*, 250, 108856. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108856>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *Pcr Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (Vol. 31, p. 315-322).

- Zhao, Y., Zhang, J., Wang, S., Yu, L., Yu, H., Wang, Y., & Feng, L. (2021). Efficacy of 75% alcohol in pretreatment of the Andersen sampler in trapping maximum airborne microbes. *Aerobiologia*, 37(1), 171-178. <https://doi.org/10.1007/s10453-020-09668-2>
- Zhu, W., Hamblin, M. R., & Wen, X. (2023). Role of the skin microbiota and intestinal microbiome in rosacea. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1108661>
- Zupin, L., Licen, S., Milani, M., Clemente, L., Martello, L., Semeraro, S., Fontana, F., Ruscio, M., Miani, A., Crovella, S., & Barbieri, P. (2021). Evaluation of Residual Infectivity after SARS-CoV-2 Aerosol Transmission in a Controlled Laboratory Setting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111172>

Annexes



Niveau 0 rez-de-jardin bas

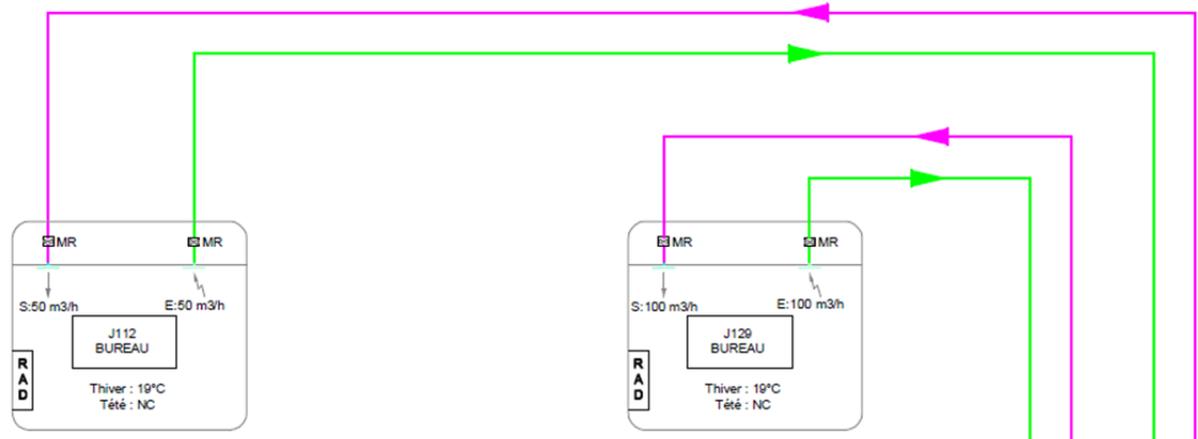


Niveau 1 rez-de-chaussée haut

Annexe 1 : Plan des deux étages du bâtiment J avec les surfaces des bureaux traités par la CTA Bureaux

TOITURE

TOITURE



Locaux avec traitement identique				
Local	Rad	Sou(m³/h)	Ext (m³/h)	
J113 Bureau	1	50	50	
J114 Bureau	2	50	50	
J115 Bureau	1	25	25	
J117 Bureau	1	50	50	
J119 Bureau	1	100	100	
J120 Bureau	2	100	100	

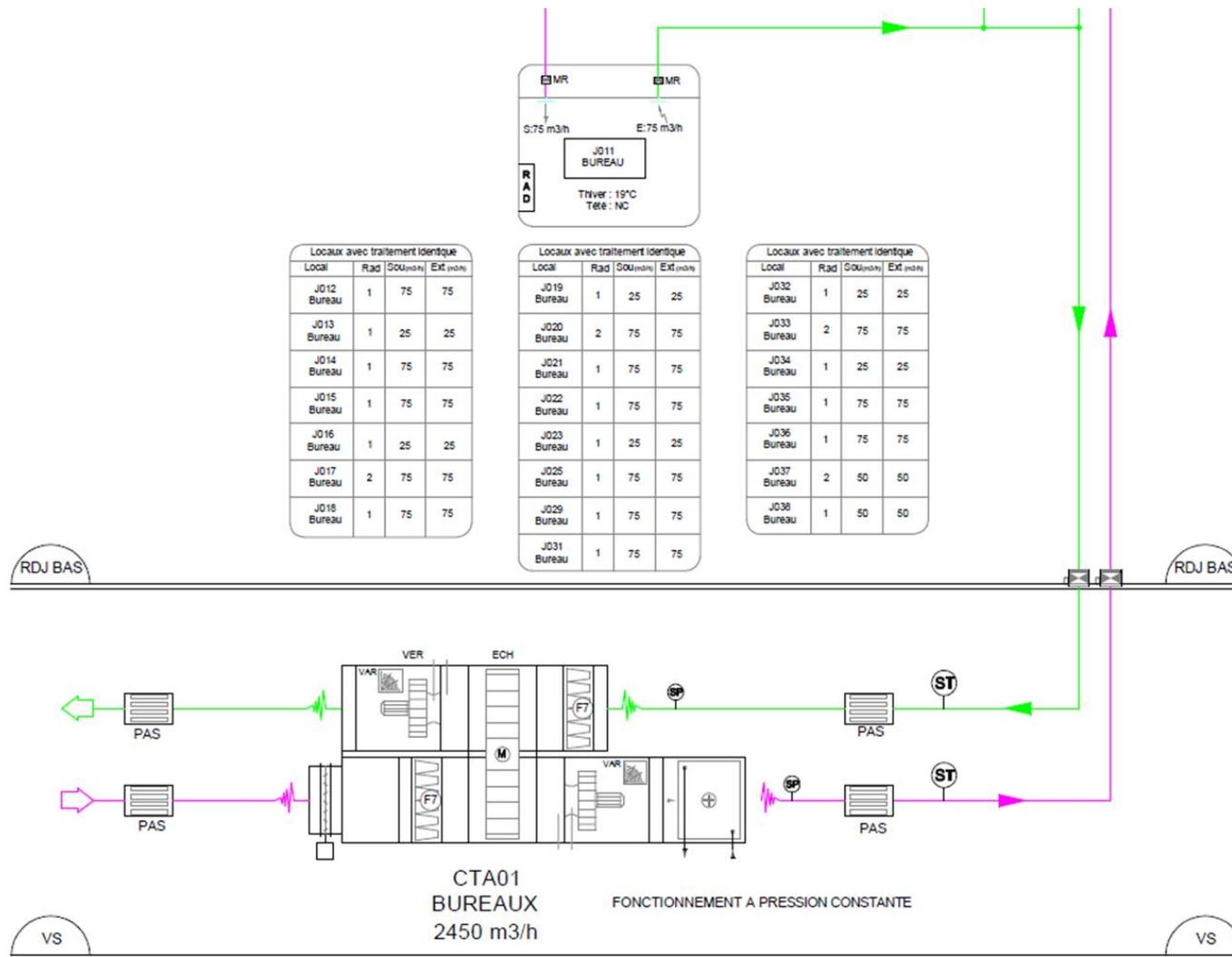
Locaux avec traitement identique				
Local	Rad	Sou(m³/h)	Ext (m³/h)	
J121 Bureau	1	25	25	
J122 Bureau	1	50	50	
J123 Bureau	1	25	25	
J125 Bureau	1	25	25	
J127 Bureau	1	25	25	

Locaux avec traitement identique				
Local	Rad	Sou(m³/h)	Ext (m³/h)	
J130 Bureau	1	25	25	
J131 Bureau	1	100	100	
J132 Bureau	1	25	25	
J133 Bureau	1	25	25	
J134 Bureau	1	25	25	

Locaux avec traitement identique				
Local	Rad	Sou(m³/h)	Ext (m³/h)	
J135 Bureau	1	100	100	
J136 Bureau	1	25	25	
J137 Bureau	1	25	25	
J138 Bureau	1	25	25	
J139 Bureau	1	25	25	

RDJ HAUT

RDJ HAUT



Annexe 2 : Schémas aérauliques de la CTA Bureaux du bâtiment J

Product Information Sheet



Product: HQ85S4-3/440x515

1. General Information

Type of Product	:	Bag filter
Filter Frame	:	Galvanized steel / aluminium
Spacer	:	Synthetic sewing thread
Gasket	:	Optional, continuous poured gasket
Bonding	:	-
Grid	:	No grid
Flange	:	No flange

2. Technical Information Filter Media

Type of Filter Media	:	Glass fiber / synthetic
Media Structure	:	High-loft micro glass fiber filtration media with polyester carded web and a synthetic pre-layer
Base Weight	:	105 ± 5 g/m ²
Thickness	:	3,5-4,5 mm
Flammability (acc. DIN 53438)	:	-

3. Technical Specification Filter

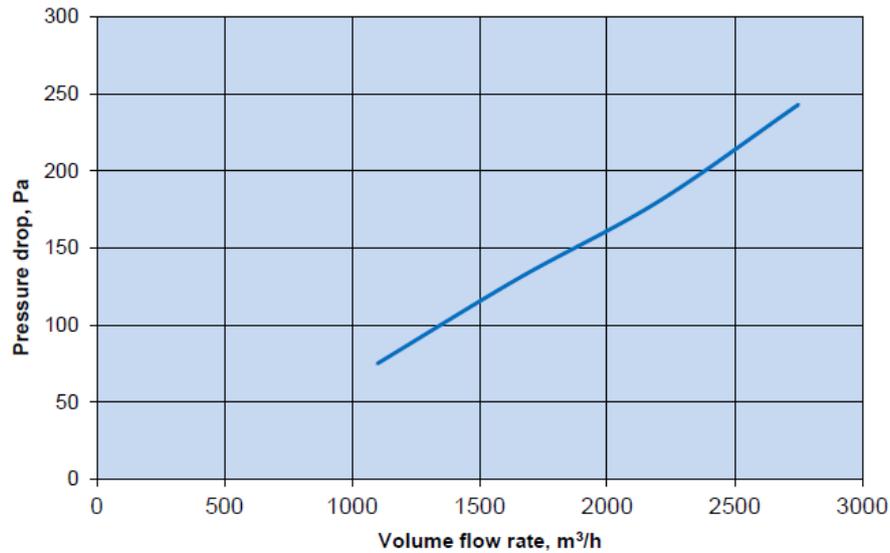
Product	:	HQ85S4-3/440x515
Dimensions (BxHxD)	:	440x515x360 [mm]
Number of pockets or "Vs"	:	4
Surface Area	:	1,5 [m ²]
Volume Air Flow	:	2200 [m ³ /h]
Air Velocity	:	2,7 [m/s]
Media Velocity	:	0,41 [m/s]
Initial Pressure Drop	:	180 [Pa]
Filter Classification acc. ISO16890	:	ePM1 60%
Average Arrestance	:	>99 [%]
Dust Holding Capacity (ISO A2 Fine Dust)	:	98 [g]
Final Test Pressure Drop	:	300 [Pa]
Maximum Temperature	:	70 [°C]
Maximum rel. Humidity	:	90 [%]
Max. Pressure Drop	:	450 [Pa]

Product Information Sheet



Product: HQ85S4-3/440x515

4. Pressure Drop Curve



Annexe 3 : Données techniques des filtres de la CTA Bureaux (<https://www.afprofilters.com>)

Titre : Développement d'une méthodologie d'étude de la contamination microbiologique de l'air intérieur de bureaux par l'analyse des filtres de centrale de traitement d'air

Mots clés : qualité de l'air intérieur, centrale de traitement d'air, média filtrant, aérosols microbiens, microorganismes cultivables, biologie moléculaire

Résumé : Les bioaérosols dégradent la qualité de l'air intérieur (QAI) et peuvent affecter la santé et le bien-être des personnes. L'échantillonnage d'aérosols microbiens dans l'air intérieur est essentiel mais la quantification/identification des microorganismes en faibles concentrations est difficile. Les filtres installés dans les centrales de traitement d'air (CTA) peuvent être considérés comme un échantillonneur à long terme accumulant la contamination microbienne pour évaluer la QAI. Ces travaux de thèse visaient à développer une méthodologie pour analyser l'exposition aux contaminants microbiens de l'air intérieur dans des bureaux en utilisant les filtres de CTA. Une méthodologie de prélèvement par coupon de média filtrant sur filtres de CTA a été appliquée sur 13 mois. Des tests préliminaires ont montré que la présence des coupons à la surface du filtre n'augmentait pas la perte de charge et que l'efficacité de

collecte des particules submicrométriques était de l'ordre de 50% en masse. Les comptages en unités formant colonies (UFC) et analyses par qPCR, RT-qPCR et séquençages 16S/ITS ont été menés. Les concentrations microbiennes sur le filtre sont restées pratiquement stables au cours des 13 mois (entre 10^2 et 10^3 UFC/cm²). Les résultats par qPCR ont révélé des concentrations plus élevées comparé aux méthodes culturales. Les genres fongiques et bactériens identifiés correspondent à l'occupation du bâtiment (*Micrococcus*) mais aussi de l'air extérieur. Deux virus respiratoires ont été identifiés sur le filtre (*Adenovirus* et *Coronavirus*). Les filtres de CTA peuvent permettre d'analyser la contamination microbiologique de l'air intérieur. Cependant, d'autres études devront d'optimiser cette méthodologie, notamment le rendement d'extraction des acides nucléiques.

Title: Development of a methodology to study the microbiological contamination of indoor air in offices through the analysis of air handling unit filters

Keywords: indoor air quality, air handling units, filter media, microbial aerosols, cultivable microorganisms, molecular biology

Abstract: Bioaerosols deteriorate indoor air quality (IAQ) and can affect human health and well-being. Sampling of microbial aerosols in indoor air is critical but quantification/identification of microorganisms at low concentrations is difficult. Filters used in air handling units (AHUs) can be considered as a long-term sampler accumulating microbial contamination to assess IAQ. This PhD work aimed to develop a methodology to analyse exposure to microbial pollutants in indoor air in offices using AHU filters. A sampling methodology using filter media coupons on AHU filters was applied over 13 months. Preliminary tests showed that the presence of the coupons on the filter surface did not increase the pressure drop and that the

collection efficiency of submicrometric particles was about 50% by mass. Colony-forming unit (CFU) counts and analyses by qPCR, RT-qPCR and 16S/ITS sequencing were conducted. Microbial concentrations on the filter remained almost stable over the 13 months (between 10^2 and 10^3 CFU/cm²). The qPCR results revealed higher concentrations compared to the cultural methods. The fungal and bacterial genera identified corresponded to the occupancy of the building (*Micrococcus*) but also to the outdoor air. Two respiratory viruses were identified on the filter (*Adenovirus* and *Coronavirus*). AHU filters can be used to analyse the microbiological contamination of indoor air. However, other studies will have to optimize this methodology, especially the extraction yield of nucleic acids.

