

# Thèse de Doctorat

## Audrey Forthomme

*Mémoire présenté en vue de l'obtention  
du grade de Docteur de l'Ecole des Mines de Nantes  
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

**Discipline :** Génie des Procédés  
**Spécialité :** Environnement  
**Laboratoire :** GEPEA UMR CNRS 6144

**Soutenu le 18 décembre 2012**  
**École doctorale :** SPIGA

Thèse N° 2012EMNA0056

## Caractérisation du comportement des aérosols microbiens dans les réseaux de ventilation d'espaces occupés

### JURY

Rapporteurs :	<b>M. Dominique THOMAS</b> , professeur, Université de Lorraine <b>Mme. Evelyne GEHIN</b> , professeur, Université Paris Est Créteil
Membres du jury :	<b>M. Enric ROBINE</b> , ingénieur, directeur de recherche CSTB <b>M Yves ANDRES</b> , professeur, Ecole des Mines de Nantes <b>M. Philippe DUQUENNE</b> , INRS Lorraine
Directeur de Thèse :	<b>Mme. Laurence LE COQ</b> , professeur, Ecole des Mines de Nantes
Co-encadrants :	<b>M. Denis BEMER</b> , INRS Lorraine <b>Mme. Aurélie JOUBERT</b> , maître-assistante, Ecole des Mines de Nantes
Membres invités :	<b>M. Xavier SIMON</b> , INRS Lorraine <b>Mme. Juliette LARBRE</b> , ingénieur LHVP



# Thèse de Doctorat

## Audrey Forthomme

*Mémoire présenté en vue de l'obtention  
du grade de Docteur de l'École des Mines de Nantes  
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

**Discipline :** Génie des Procédés  
**Spécialité :** Environnement  
**Laboratoire :** GEPEA UMR CNRS 6144

**Soutenue le 18 décembre 2012**  
**École doctorale :** SPIGA

Thèse N° 2012EMNA0056

## Caractérisation du comportement des aérosols microbiens dans les réseaux de ventilation d'espaces occupés

### JURY

Rapporteurs :	<b>M. Dominique THOMAS</b> , professeur, Université de Lorraine <b>Mme. Evelyne GEHIN</b> , professeur, Université Paris Est Créteil
Membres du jury :	<b>M. Enric ROBINE</b> , ingénieur, directeur de recherche CSTB <b>M Yves ANDRES</b> , professeur, Ecole des Mines de Nantes <b>M. Philippe DUQUENNE</b> , INRS Lorraine
Directeur de Thèse :	<b>Mme. Laurence LE COQ</b> , professeur, Ecole des Mines de Nantes
Co-encadrants :	<b>M. Denis BEMER</b> , INRS Lorraine <b>Mme. Aurélie JOUBERT</b> , maître-assistante, Ecole des Mines de Nantes
Membres invités :	<b>M. Xavier SIMON</b> , INRS Lorraine <b>Mme. Juliette LARBRE</b> , ingénieur LHVP



## Remerciements

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse est né d'une collaboration entre le laboratoire GEPEA, l'EMN et l'INRS. Aussi je remercie les membres du personnel de ces organismes qui ont permis de mener à bien ce projet. Je remercie également M<sup>r</sup> DESQUILLES de la société Lydall<sup>®</sup> qui a fournis les médias fibreux utilisés dans cette thèse.

Je remercie Laurence LE COQ, directrice de thèse. J'ai apprécié sa rigueur et ses exigences rédactionnelles qui m'ont aidée à progresser. Je remercie Yves ANDRES, encadrant. J'ai particulièrement aimé nos échanges toujours très intéressants et motivants et la disponibilité qu'il m'a accordée. C'est une chance qu'Aurélie JOUBERT ait directement intégré mon encadrement après son entrée à l'EMN. Je lui dis merci pour ses conseils, ses corrections et ses suggestions. Je remercie également Denis BEMER, Philippe DUQUENNE et Xavier SIMON de l'INRS, pour leurs conseils, leurs regards critiques et les échanges que nous avons eu dans le cadre de réunions.

Je remercie Dominique THOMAS, professeur au LRGP ainsi qu'Evelyne GEHIN, professeur au CERTES, pour avoir accepté le travail de rapporteur de ma thèse. Je remercie Enric ROBINE, responsable du pôle microbiologie et environnement intérieur au CSTB pour avoir participé à ma thèse en tant que membre du comité de suivi de thèse puis en tant que membre du jury de thèse. Je remercie Juliette LARBRE, ingénieur de recherche à la ville de Paris, pour avoir accepté d'être membre invité de mon jury de thèse.

Tout le travail expérimental n'aurait pu se faire sans l'aide précieuse de l'équipe technique du DSEE de l'EMN. Un grand merci à Yvan pour la réalisation des dispositifs expérimentaux décrits dans la thèse et pour ces conseils techniques. Je remercie également Jérôme et François-Xavier pour la réalisation des programmes informatiques et la mise en place des dispositifs électriques. Enfin un grand merci à Thomas et Eric pour leur aide précieuse. Mes remerciements vont désormais à Dominique et Marie-Laure, secrétaires administratives du DSEE, pour leur efficacité et leur aide. Un merci particulier à Dominique avec qui j'ai apprécié échanger.

Ces 3 années de thèse ont été particulièrement agréables grâce aux autres doctorants. Je remercie Cristian, Luisa, Olivier, Sary, Mario, Stéphane, Carolina, Younès, Laura, Espérance, Ernesto,... Un clin d'œil tout particulier à Vanesse et Sèv... Cette fois je remercie Jean-Marc et Maylis, qui m'ont conseillée et soutenue. Des grands mercis à mes amis et en particulier : Vi, Vian, Emilie et Julie. Je remercie aussi Hugues pour son soutien et sa patience... Enfin je remercie ma famille et particulièrement ma mère, mon père et mon frère Guillaume.



# Résumé

La qualité microbienne de l'air intérieur représente un enjeu sanitaire important, notamment dans le secteur professionnel. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier les conditions favorisant le développement des espèces microbiennes collectées sur des médias fibreux utilisés dans des CTA, ainsi que leur réentraînement en aval de la filtration, susceptible de dégrader la qualité de l'air. La première partie de l'étude s'est déroulée en laboratoire à partir de la filtration d'un consortium bactérien – fongique composé de *Staphylococcus epidermidis* et *Penicillium oxalicum*. L'influence de trois paramètres a été étudiée sur la croissance microbienne : le taux d'humidité relative (HR) de l'air, la nature du média fibreux, la présence/absence de flux d'air. Les résultats ont révélé notamment que quelles que soient les conditions, *S. epidermidis* n'arrive pas à croître. En revanche, lorsque l'HR de l'air approche 100%, *P. oxalicum* se développe sur les filtres et des spores sont relarguées en aval des filtres après une reprise de la filtration. Une seconde partie de l'étude a consisté à travailler avec un aérosol atmosphérique semi-urbain. Deux unités de filtration d'air ont fonctionné pendant 5 mois en parallèle. La ventilation d'une des deux unités a été stoppée chaque week-end et redémarrée en début de semaine. Un suivi de la température, de l'humidité de l'air, de la perte de charge des filtres et de la concentration des particules totales dans l'air en amont de la filtration a été assuré tout au long de l'étude. Les concentrations en microorganismes cultivables ont été mesurées chaque semaine en amont et en aval de chaque filtre, notamment au redémarrage de la ventilation. En fonction des variations saisonnières de la concentration des microorganismes, les résultats ont montré en particulier des efficacités de filtration vis-à-vis des particules bactériennes faibles, voire négatives, dans l'unité de filtration fonctionnant en continu.

## Mots clés

CTA, médias fibreux, efficacité de filtration, aérosol microbien, relargage microbien, qualité de l'air intérieur.





# Abstract

Microbial indoor air quality is an important issue in particular in the professional sector. This thesis aims to investigate the conditions leading to microbial development onto fibrous filters and to microbial release downstream of filters that could decrease air quality. The first part of the thesis was realized on laboratory and consisted in the filtration of a microbial consortium composed with *Staphylococcus epidermidis* (bacterium specie) and *Penicillium oxalicum* (fungi specie). The effects of three parameters on the microbial behavior were studied: the relative humidity (RH) of the air, the filter material, the airflow presence/absence. Whatever conditions, *S. epidermidis* did not grow up. However, *P. oxalicum* has demonstrated its ability to develop itself when RH was close to 100% and some *P. oxalicum* spores were released downstream of filter after growth, when ventilation was restarted. The second part of the thesis consisted in working with a semi-urban outdoor air. Two air handling unit (AHU) have operated during 5 months. The ventilation of one AHU was stopped each week-end and restarted each beginning of week. Temperature and RH of the air, filters pressure drop and total concentration of PM in air before filtration were monitored. Concentration of total cultivable microorganisms upstream and downstream of both filters was also measured each week, in particular at the restart of ventilation for one AHU. According to seasonal variations of microbial concentrations, results have revealed for instance that the filtration efficiency of cultivable bacteria was particularly weak, and sometimes negative, for the AHU operating continuously.

## **Key words**

HVAC, fibrous filters, filtration efficiency, microbial aerosol, microbial release, indoor air quality.



# Production scientifique

## **Publication dans une revue internationale avec comité de lecture**

Forthomme A., Andrès Y., Joubert A., Simon X., Duquenne P., Bémer D., Le Coq L. (2012). Evolution of microbial aerosol behaviour in heating, ventilating and air-conditioning systems – quantification of *Staphylococcus epidermidis* and *Penicillium oxalicum* viability. Environmental Technology. iFirst, 1-5.

## **Communications avec actes dans un congrès internationale ou nationale**

Forthomme A., Le Coq L., Andres Y., Joubert A., Bemer D., Duquenne P., Simon X. Suivi du comportement d'un aérosol microbien formé d'un consortium bactérien – fongique au niveau de l'étage de filtration d'une centrale de traitement de l'air – Application au bâtiment tertiaire. Journées RSEIN/OQAI 2010, " Les particules dans l'air intérieur ". Villeneuve d'Ascq (France). 22 - 23 novembre 2010.

Forthomme A., Le Coq L., Andrès Y., Joubert A., Bemer D., Duquenne P., Simon X. Tracking performance of a microbial consortium aerosol in the filter stage of a HVAC. The 12<sup>th</sup> International Conference of Indoor Air Quality and Climate. Austin, Texas (United States). 5 - 10 of June 2011.

Forthomme A., Andrès Y., Joubert A., Simon X., Duquenne P., Bemer D., Le Coq L. Evolution of a microbial aerosol behavior in HVAC systems – Quantification of *Staphylococcus epidermidis* and *Penicillium oxalicum* viability. 13<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP). Lille (France). 29 novembre – 1<sup>er</sup> Décembre 2011.

Forthomme A., Simon X., Bémer D., Duquenne P., Joubert A., Andrès Y., Le Coq L.. Etude de la génération d'un aérosol microbien formé d'un consortium bactérien-fongique dans un dispositif expérimental de filtration. Journées SF<sup>2</sup>P (Société Française des Séparations Fluides – Particules) sur les Séparations Gaz / Particules, " Du laboratoire aux applications industrielles ". Nancy (France). 15 - 16 juin 2011.

Forthomme A., Joubert A., Andrès Y., Simon X., Duquenne P., Bemer D., Le Coq L. Microbial aerosol filtration influence of humidity on HVAC filters colonization and consequences on the filters release. 11<sup>th</sup> World Filtration Congress. Graz (Austria). 16 – 20 of April 2012.

Forthomme A, Joubert A., Andrès Y., Simon X., Bemer D., Duquenne P., Le Coq L. Microbial colonization and release from HVAC filters: comparison between laboratory and real conditions. 10<sup>th</sup> International Conference of Healthy Buildings 2012. Brisbane, Queensland (Australia). 8 – 12 of July 2012.

Forthomme A., Joubert A., Andrès Y., Bemer D., Simon X., Duquenne P., Le Coq L. Influence of HVAC parameters on the microbial behavior onto fibrous media and microbial release. The 10<sup>th</sup> International Conference on Industrial Ventilation. Paris (France). 17 – 19 of September.

Forthomme A., Joubert A., Andrès Y., Simon X., Bemer D., Duquenne P., Le Coq L. Evaluation des performances de filtres plans vis-à-vis des particules d'un air semi-urbain réel. Influence de l'arrêt de la ventilation. CFA 2013. Paris (France). 2013.

# Table des matières

<i>Introduction générale</i> .....	31
<b>CHAPITRE 1</b> .....	39
<i>Etude bibliographique</i> .....	39
<b>I. Introduction</b> .....	41
<b>II. Les aérosols microbiens</b> .....	43
II.1. Présence des aérosols microbiens dans l'air intérieur .....	43
II.1.1. Une catégorie d'aérosols : les bioaérosols.....	43
II.1.1.1. Les bactéries .....	44
II.1.1.2. Les champignons .....	46
II.1.1.3. Composants biologiques issus des microorganismes .....	46
II.1.2. Composition microbienne de l'air intérieur .....	48
II.2. Dangerosité d'une exposition aux bioaérosols sur la santé humaine .....	52
II.2.1. Généralités.....	52
II.2.2. Danger d'une exposition aux fragments microbiens .....	54
II.2.3. Qualité de l'air et bénéfices économiques.....	55
<b>III. La ventilation</b> .....	57
III.1. Généralités sur la ventilation en France.....	57
III.2. Les systèmes de ventilation.....	60
III.3. Centrale de Traitement de l'Air .....	61
III.3.1. Description .....	61
III.3.2. Les inconvénients des CTA .....	62
<b>IV. Filtration particulière sur média fibreux</b> .....	67
IV.1. Filtration des aérosols.....	67
IV.1.1. Caractérisation des performances d'un média fibreux lors de la phase stationnaire.....	67
IV.1.1.1. Ecoulement dans un média fibreux.....	67
IV.1.1.2. Perte de charge d'un filtre vierge.....	69
IV.1.1.3. Efficacité de filtration d'un filtre vierge selon les différents mécanismes de capture des particules .....	70
IV.1.2. Evolution des performances de filtration d'un média lors de la phase dynamique.....	77
IV.2. Médias fibreux filtrants .....	79
IV.3. Filtration des microorganismes .....	81
IV.4. Facteurs influant sur le comportement des microorganismes lors de la filtration .....	85
<b>V. Génération et échantillonnage des aérosols microbiens</b> .....	87
V.1. Génération d'aérosols microbiens .....	87
V.1.1. La génération par voie sèche .....	87
V.1.2. La génération par voie liquide.....	88
V.2. Les différentes techniques d'échantillonnage des particules microbiennes en suspension .....	90
V.3. Choix d'un échantillonneur.....	93
<b>VI. Méthode d'analyses quantitatives et qualitatives</b> .....	95
VI.1. Analyses Quantitatives.....	95
VI.1.1. Méthode de quantification sur milieu de culture .....	95
VI.1.2. Suivi du développement fongique par l'évaluation du taux d'ergostérol .....	96
VI.1.3. Analyse par PCR quantitative.....	97
VI.1.4. Analyse du matériel biologique total par une méthode protéique.....	98
VI.1.5. Analyse du matériel biologique viable total par la détermination de l'ATP .....	98
VI.1.6. Granulométrie et concentration d'un aérosol microbien .....	100
VI.1.6.1. Mesure de la concentration massique .....	100
VI.1.6.2. Mesure de la concentration en nombre .....	100
VI.2. Analyse Qualitative – Identification des espèces.....	102

<b>VII. Conclusion .....</b>	<b>104</b>
<b><i>CHAPITRE 2 Développement d'une méthodologie pour l'étude du comportement microbien sur des filtres .....</i></b>	<b>107</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>109</b>
<b>II. Aérosol microbiens .....</b>	<b>111</b>
II.1. Sélection des espèces microbiennes modèles.....	111
II.2. Méthodes de quantification des microorganismes.....	113
II.2.1. Méthode par culture .....	115
II.2.2. Evaluation du taux d'ergostérol .....	116
II.2.3. Suivi qualitatif du développement microbien par observations MEB .....	116
II.3. Génération et échantillonnage de l'aérosol microbien.....	117
II.3.1. Préparation de la suspension microbienne.....	117
II.3.1.1. Préparation des bactéries <i>S.epidermidis</i> .....	117
II.3.1.2. Préparation des spores de <i>P.oxalicum</i> .....	118
II.3.2. Génération de l'aérosol microbien.....	120
II.3.3. Echantillonnage des aérosols microbiens .....	121
II.3.4. Effet de la génération et de l'échantillonnage sur la cultivabilité des microorganismes.....	122
<b>III. Dispositif expérimental de filtration .....</b>	<b>125</b>
III.1. Principe du dispositif expérimental de filtration.....	125
III.2. Validation du dispositif de filtration : de la génération à l'échantillonnage .....	126
III.2.1. Homogénéité du flux lors de la filtration.....	127
III.2.2. Caractérisation de la génération du bioaérosol à l'aide de compteurs à particules .....	129
III.2.2.1. Caractérisation de la granulométrie de l'aérosol microbien.....	130
III.2.2.2. Stabilité de la génération au cours du temps.....	133
<b>IV. Suivi du comportement microbien sur les filtres .....</b>	<b>135</b>
IV.1. Préparation et contamination des filtres .....	135
IV.2. Analyse des filtres .....	137
IV.2.1. Développement des microorganismes sur les filtres contaminés .....	137
IV.2.2. Relargage microbien en aval des filtres.....	138
IV.2.3. Méthodes d'extraction des microorganismes des filtres .....	139
<b>V. Synthèse de la méthode .....</b>	<b>141</b>
<b>VI. Conclusion .....</b>	<b>142</b>
<b><i>CHAPITRE 3.....</i></b>	<b>143</b>
<b><i>Influence de plusieurs paramètres de CTA sur le développement des microorganismes collectés sur des filtres – Etude du relargage.....</i></b>	<b>143</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>145</b>
<b>II. Matériel, méthode et protocoles.....</b>	<b>146</b>
II.1. Plan expérimental .....	146
II.1.1. Description générale.....	146
II.1.2. Spécifications pour chaque étude .....	147
II.1.2.1. Humidité relative de l'air .....	147
II.1.2.2. Nature des médias fibreux.....	147
II.1.2.3. Présence/absence d'un flux d'air .....	148
II.2. Médias fibreux testés.....	149
II.2.1. Caractéristiques des médias fibreux testés.....	149
II.2.1.1. Caractéristiques générales.....	149
II.2.1.2. Rétention d'eau des médias.....	149
II.2.1.3. Porosité des médias par porosimétrie mercure.....	150
II.2.1.4. Diamètre des fibres .....	153
II.2.1.5. Perméabilité des filtres.....	154

II.2.2.	Efficacité fractionnelle initiale de filtration.....	156
II.2.2.1.	Filtre en fibres de verre .....	156
II.2.2.2.	Filtre en fibres synthétiques .....	157
II.2.3.	Efficacité fractionnelle initiale théorique de filtration.....	159
II.2.3.1.	Filtre en fibres de verre .....	159
II.2.3.2.	Filtre en fibres synthétiques .....	160
II.2.4.	Efficacité initiale de filtration des microorganismes cultivables .....	162
II.2.4.1.	Détermination de l'efficacité initiale de filtration de <i>S. epidermidis</i> et <i>P. oxalicum</i> ....	162
II.2.4.2.	Efficacité de filtration vis-à-vis de <i>S. epidermidis</i> cultivables.....	164
II.2.4.3.	Efficacité de filtration vis-à-vis des spores de <i>P. oxalicum</i> cultivables.....	165
II.2.5.	Récapitulatif des résultats d'efficacité initiale de filtration .....	165
II.2.5.1.	Filtre en fibres de verre .....	166
II.2.5.2.	Filtre en fibres synthétiques .....	166
<b>III.</b>	<b>Etude du comportement microbien en l'absence de flux d'air .....</b>	<b>168</b>
III.1.	Représentation des résultats.....	168
III.2.	Influence de l'humidité de l'air .....	170
III.2.1.	Ajout d'une source de nutriments sur le filtre.....	170
III.2.2.	Croissance microbienne en absence de flux d'air .....	170
III.2.2.1.	Etude du comportement de <i>S. epidermidis</i> .....	171
III.2.2.2.	Etude du comportement de <i>P. oxalicum</i> .....	172
III.2.2.3.	Conservation de la cultivabilité .....	173
III.2.2.4.	Observations par microscopie électronique à balayage .....	174
III.2.2.5.	Evolution du taux d'ergostérol.....	176
III.2.3.	Relargage de microorganismes en aval des filtres .....	178
III.2.3.1.	Etude du relargage de <i>P. oxalicum</i> .....	179
III.2.3.2.	Etude du relargage de <i>S. epidermidis</i> .....	181
III.3.	Influence de la nature du média .....	183
III.3.1.	Ajout d'une source de nutriments sur les filtres.....	183
III.3.2.	Croissance microbienne en absence de flux d'air .....	183
III.3.2.1.	Etude du comportement de <i>P. oxalicum</i> .....	184
III.3.2.2.	Evolution du taux d'ergostérol.....	186
III.3.2.3.	Observations par microscopie électronique à balayage .....	186
III.3.3.	Relargage de microorganismes en aval des filtres .....	188
III.4.	Influence d'un flux d'air.....	190
<b>IV.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>192</b>
	<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>195</b>
	<b><i>Evaluation du comportement d'un filtre plan vis-à-vis des aérosols microbiens issus d'un air semi-urbain</i>.....</b>	<b>195</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>197</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthode .....</b>	<b>198</b>
II.1.	Principe expérimental .....	198
II.2.	Méthodologie .....	199
II.2.1.	Suivi des paramètres en continu .....	199
II.2.1.1.	Température et humidité relative .....	199
II.2.1.2.	Concentration des particules dans l'air .....	199
II.2.1.3.	Pertes de charge des filtres.....	200
II.2.2.	Mesures ponctuelles de la qualité microbiologique de l'air .....	200
<b>III.</b>	<b>Caractérisation de l'air à filtrer .....</b>	<b>202</b>
III.1.	Caractérisation particulière de l'air et évolution de la concentration des particules .....	202
III.1.1.	Caractérisation particulière de l'air.....	202
III.1.2.	Evolution de la concentration massique des particules.....	203
III.1.3.	Evolution journalière de la concentration massique des particules .....	206
III.2.	Composition microbienne de l'air.....	210

III.2.1.	Influence de la température sur l'évolution de la composition microbienne de l'air .....	212
III.2.2.	Influence du taux d'humidité relative sur l'évolution de la composition microbienne de l'air 212	
III.2.3.	Evolution des microorganismes, bactéries et champignons cultivables totaux.....	213
<b>IV.</b>	<b>Performance de filtration des filtres vis-à-vis des particules d'alumine et de fluorescéine ainsi que des particules atmosphériques .....</b>	<b>216</b>
IV.1.	Performance du filtre vis-à-vis de particules d'alumine .....	216
IV.2.	Evolution des pertes de charge au cours du colmatage avec des particules atmosphériques ...	218
IV.3.	Efficacité fractionnelle initiale de filtration vis-à-vis de particules de fluorescéine .....	221
<b>V.</b>	<b>Filtration des particules biologiques et comportement microbien en aval des filtres.....</b>	<b>224</b>
V.1.	Présentation des résultats.....	226
V.2.	Comparaison des résultats d'efficacité de l'UFA <sub>1</sub> et de l'UFA <sub>2</sub> .....	228
V.3.	Comparaison entre le comportement des particules bactériennes atmosphériques collectées par le filtre en fibres de verre et celui de <i>S. epidermidis</i> collectés dans des conditions contrôlées en laboratoire .....	230
V.4.	Influence de la température et du taux d'humidité sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres des deux UFA.....	231
V.5.	Influence du diamètre des particules microbiennes sur l'efficacité de filtration.....	233
V.6.	Influence du transport des particules microbiennes sur l'efficacité de filtration .....	234
V.7.	Espèces bactériennes et fongiques analysées .....	234
<b>VI.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>236</b>
	<b><i>Conclusions générales et perspectives .....</i></b>	<b><i>239</i></b>
	<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b><i>245</i></b>
	<b><i>Annexes .....</i></b>	<b><i>271</i></b>



# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau I- 1. Valeurs guides de la qualité de l'air intérieur publiées par l'ANSES .....	59
Tableau I- 2. Limites des différents régimes d'écoulement .....	68
Tableau I- 3. Expression des efficacités unitaires de collecte par effet électrostatique $\eta_{elec}$ (Mouret, 2008).....	75
Tableau I- 4. Classification des médias filtrants d'après les différentes normes.....	80

## Chapitre 2

Tableau II- 1. Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de quelques méthodes de quantification des microorganismes .....	114
Tableau II- 2. Conditions de croissance de <i>S. epidermidis</i> et <i>P. oxalicum</i> sur milieu gélosé. ....	115
Tableau II- 3. Caractéristiques de croissance des souches microbiennes.....	119
Tableau II- 4. Masses de fluorescéine collectées dans les biosampler suite à 30 et 65 minutes de génération dans le dispositif de filtration disposé sans filtre. ....	127
Tableau II- 5. Masses de fluorescéine retenues sur les filtres et dans les BioSamplers après génération. a) Fibres de verre – b) Fibres synthétiques .....	128
Tableau II- 6. Composition de la solution nutritive .....	135

## Chapitre 3

Tableau III- 1. Caractéristiques physiques des médias fibreux testés.....	149
Tableau III- 2. Rétention d'eau des médias fibreux en fibres de verre et en fibres synthétiques .....	150
Tableau III- 3. Porosités inter-fibres, de rugosité de surface et totale du filtre en fibres de verre et en fibres synthétiques (porosimétrie au mercure).....	152
Tableau III- 4. Diamètres moyens des fibres des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques.....	154
Tableau III- 5. Valeurs des nombres de Reynolds et des perméabilités pour les deux médias étudiés .....	155
Tableau III- 6. Tableau récapitulatif des efficacités mesurées lors de la filtration de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> par les deux médias testés .....	164
Tableau III- 7. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après 168h 25°C et 60%, 80% et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air .....	178
Tableau III- 8. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après 168h à 25°C et 100% HR ainsi que 168h à 25°C et 60% HR suivi de 168h à 25°C et 100% HR ; Etude du relargage microbien lors de la reprise du flux d'air.....	180

Tableau III- 9. Concentrations en microorganismes extraits et relarguées des médias fibreux en fibres de verre et synthétiques après 168h à 100% HR et 25°C en absence de flux d'air .....	188
Tableau III- 10. Taux d'ergostérol extrait de chaque filtre dans le cadre de l'étude sur l'influence du taux d'humidité et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres .....	277
Tableau III- 11. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après contamination, 48h et 168h d'absence de flux d'air à 25°C et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air .....	278
Tableau III- 12. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre et du filtre en fibres synthétiques après contamination, 48h et 168h à 25°C et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air.....	279

## Chapitre 4

Tableau IV- 1. Récapitulatif des conditions de mesure des paramètres de suivi du fonctionnement des UFA .....	201
Tableau IV- 2. Concentrations saisonnières moyennes des PM <sub>10</sub> en µg.m <sup>-3</sup> dans l'air ambiant .....	203
Tableau IV- 3. Moyenne de la température, du taux d'humidité relative et de la concentration sur 24h de PM <sub>totales</sub> pour chaque zone .....	205
Tableau IV- 4. Fréquences des efficacités de filtration des filtres de l'UFA <sub>1</sub> et de l'UFA <sub>2</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables .....	228

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure I- 1. Agrégat bactérien provenant d'un prélèvement atmosphérique proche de l'océan (Lighthart, 1997).....	44
Figure I- 2 : A gauche : Spores d' <i>Aspergillus niger</i> - Microscope électronique à balayage (Ramachandran et al., 2008) – A droite : <i>Penicillium spp.</i> isolé – Microscope à contraste de phase (Liceaga-Gesualdo et al., 2001). ....	46
Figure I- 3. Fréquence de l'occurrence des espèces bactériennes retrouvées dans 63 environnements de travail (Goyer et al., 2001) .....	50
Figure I- 4. Fréquence de l'occurrence des moisissures trouvées dans 126 environnements de travail (Goyer et al., 2001) .....	51
Figure I- 5. Courbes conventionnelles CEN (Comité Européen de Normalisation) définissant les fractions de taille des particules exprimées en pourcentage en fonction du diamètre aérodynamique des particules en $\mu\text{m}$ .....	55
Figure I- 6. Schéma de principe d'un VMC simple flux (source : ANAH). ....	60
Figure I- 7. Schéma d'une installation VMC double flux avec échangeur (source : ADEME) .....	61
Figure I- 8. Composition d'une centrale de traitement de l'air (Bailly et al., 2001b).....	62
Figure I- 9. Mécanismes de capture des particules sur une fibre par effet de diffusion (Bemer et al., 2006).....	72
Figure I- 10. Mécanismes de capture des particules sur une fibre par effet d'interception directe et d'impaction inertielle (Bemer et al., 2006).....	74
Figure I- 11. Efficacité fractionnelle pour chaque mécanisme de capture et efficacité totale d'un filtre vierge – Adaptée de (Bailly et al., 2001).....	77
Figure I- 12. Evolution des performances au cours de la filtration dynamique sur filtre plan de moyenne et haute efficacité.....	78
Figure I- 13. Différences d'efficacité fractionnelles de filtration d'un même filtre présentant des charges électrostatiques. Dans un cas l'efficacité fractionnelle est obtenue en laboratoire avant son utilisation, puis après un mois d'utilisation du filtre dans des conditions réelles de filtration (Gustavsson, 2006) .....	81
Figure I- 14. Comparaison du modèle théorique et expérimental de filtration. (Liu et al., 2009). ....	83
Figure I- 15. Les composants classiques d'un nébuliseur (Adapté de Newman, 1991).....	89
Figure I- 16. Processus d'aérosolisation consécutif au phénomène de bullage. (a) Bulle d'air au contact de la surface d'un liquide ; (b) explosion de la bulle au contact de la surface et génération de gouttelettes. (Blanchard and Syzdek, 1982).....	89
Figure I- 17. Impacteur Andersen à 6 étages (Andersen, 1958). ....	91
Figure I- 18 – (a). Photo du biosampler. (b). Graphique comparant les performances du BioSampler et de l'AGI-30. (BioSampler, SKC).....	92
Figure I- 19. a). Structure de l'ergostérol $C_{28}\Delta^{5,7,22}$ . b). Structure du cholestérol $C_{27}\Delta^5$ (Hull et Woolfson, 1976). ....	96
Figure I- 20. Structure de l'ATP (Weil et al., 1987). ....	99

## Chapitre 2

Figure II- 1. Schéma récapitulatif des différentes étapes méthodologiques .....	110
Figure II- 2. <i>S. epidermidis</i> sur une fibre d'un filtre en fibres de verre – photographie au Microscope Electronique à Balayage .....	118
Figure II- 3. Mycélium et spores de <i>P. oxalicum</i> - photographie au Microscope Electronique à Balayage.....	118
Figure II- 4. Evolution au cours du temps de la cultivabilité de <i>S. epidermidis</i> et <i>P. oxalicum</i> en suspension lors de leur conservation à + 4°C.....	120
Figure II- 5. Nébuliseur médical Omron C29 (CompAir pro).....	121
Figure II- 6. Concentrations en <i>P.oxalicum</i> et <i>S.epidermidis</i> cultivables dans quatre BioSamplers après 65 min de génération.....	123
Figure II- 7. a) Schéma du dispositif – b) Photographie des porte-filtres. ....	125
Figure II- 8. Distributions granulométriques du consortium généré par le nébuliseur médical. a) TSI, APS 3321 – b) Grimm® 1.109 .....	130
Figure II- 9. Photographies obtenue au Microscope Electronique à Balayage (MEB) : a) Spores de <i>P. oxalicum</i> – b) <i>S. epidermidis</i> .....	131
Figure II- 10. Générateur INRS de particules microbiennes par voie liquide (Simon et al., 2011). ....	132
Figure II- 11. Distributions granulométriques de l'aérosol microbien généré par le nébuliseur médical et par le bulleur ; le prélèvement se fait au niveau des portes filtres du dispositif de filtration : a) TSITM APS 3321 – b) Grimm® 1.109 .....	133
Figure II- 12. Suivi de l'évolution des concentrations normalisées de particules ( $0,25 < d_{opt} < 0,50 \mu\text{m}$ ; $d_{opt} > 0,50 \mu\text{m}$ ) pendant 1h de génération (Grimm® 1.109).....	134
Figure II- 13. Evolution au cours du temps des concentrations de <i>S. epidermidis</i> et <i>P. oxalicum</i> dans la solution nutritive maintenue dans une étuve à 25°C.....	136
Figure II- 14. Schéma du système expérimental de maintien des filtres sous atmosphère contrôlée.....	138
Figure II- 15. Colonne de filtration permettant d'étudier le relargage microbien provenant d'un filtre.....	139
Figure II- 16. Etude de l'influence du protocole d'extraction des microorganismes sur leur cultivabilité.....	140

## Chapitre 3

Figure III- 1. Analyses effectuées sur les filtres et dans les BioSampler au cours de chaque étude.....	147
Figure III- 2. Méthodologie employée pour l'étude de l'influence d'un flux d'air sur le comportement des microorganismes collectés sur des filtres .....	148
Figure III- 3. Représentation schématique des différents types de pores d'un matériau poreux .....	150
Figure III- 4. Distribution poreuse du média en fibres de verre (porosimétrie au mercure) ..	151
Figure III- 5. Distribution poreuse du média en fibres synthétiques (porosimétrie au mercure) .....	152
Figure III- 6. Observation des médias vierges par microscopie électronique à balayage : a) filtre en fibres de verre ; b) filtre en fibres synthétiques : à gauche, couche supérieure/inférieure du filtre, à droite, couche du milieu du filtre.....	153

Figure III- 7. Evolution des pertes de charge des filtres vierges en fibres de verre et fibres synthétiques en fonction de la vitesse de filtration.....	154
Figure III- 8. Efficacité fractionnelle initiale du filtre en fibres de verre.....	156
Figure III- 9. Efficacité initiale du filtre en fibres synthétiques selon différentes configurations de charge : $P_c-f_c$ ; $P_0-f_c$ ; $P_0-f_0$ .....	158
Figure III- 10. Efficacité initiale théorique du filtre en fibres de verre.....	160
Figure III- 11. Efficacité initiale théorique du filtre en fibres synthétiques.....	161
Figure III- 12. Efficacité fractionnelle théorique et expérimentale du média en fibres synthétiques déterminées lorsque les fibres et particules sont chargées.....	162
Figure III- 13. Synthèse des efficacités initiales de filtration du filtre en fibres de verre.....	166
Figure III- 14. Synthèse des efficacités initiales de filtration du filtre en fibres synthétiques.....	167
Figure III- 15. Concentrations normées après contamination sur le média en fibres de verre à 25 °C et 60%, 80% et 100 % HR pendant 48h et 168h sans flux d'air : a) <i>S. epidermidis</i> – b) <i>P. oxalicum</i> .....	171
Figure III- 16. Photographies MEB: a) <i>S. epidermidis</i> aérosolisées sur un filtre en fibres de verre – b) <i>S. epidermidis</i> déposées sur le filtre en fibres de verre.....	172
Figure III- 17. Concentrations normées en <i>P. oxalicum</i> et <i>S. epidermidis</i> après disposition des filtres pendant 48h et 168h à 60% HR et 25°C puis 168h à 100% HR et 25°C.....	174
Figure III- 18. Photographies MEB de la face avant à la filtration d'échantillons de filtre en fibres de verre: a) après contamination par le consortium microbien – b) après 48h d'arrêt de ventilation à 25°C et 100% HR – c) après 168h d'arrêt de ventilation à 25°C et 100% HR.....	175
Figure III- 19. Graphique présentant l'évolution du taux d'ergostérol extraits des filtres après 48h et 168h de disposition de ceux-ci à 60%, 80% et 100% HR ainsi que le taux d'ergostérol extrait du filtre après disposition 168h à 60% HR puis 168h à 100% HR.	176
Figure III- 20. Photographies MEB de la face aval de filtre en fibres de verre: a) après 48h à 25°C et 100% HR – b) après 168h à 25°C et 100% HR.....	181
Figure III- 21. Concentrations normées des microorganismes extraits des deux médias fibreux après 48h et 168h à 25°C et 100% HR : a) <i>S. epidermidis</i> – b) <i>P. oxalicum</i> .....	184
Figure III- 22. Taux d'ergostérol extraits des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques après 48h et 168h à 100% HR et 25°C.....	186
Figure III- 23. Photographies MEB d'échantillons de filtres. Après contamination : a) en fibres de verre – b) en fibres synthétiques. Après 48h à 100% HR et 25°C : c) en fibres de verre – d) en fibres synthétiques. Après 168h à 100% HR et 25°C : e) en fibres de verre – f) en fibres synthétiques.....	187
Figure III- 24. Concentrations normées en <i>P. oxalicum</i> et <i>S. epidermidis</i> extraits des filtres en fibres de verre après 168h d'absence de flux d'air à 25°C et 100% HR directement après contamination des filtres et après maintien d'un flux d'air propre pendant 8h.....	190

## Chapitre 4

Figure IV- 1. Schéma du dispositif de filtration d'air comprenant deux sous-unités de filtration d'air.....	198
Figure IV- 2. Fréquence des concentrations journalières en particules totales de l'air en amont des filtres.....	202
Figure IV- 3. Evolution au cours du temps de la concentration en particules totales sur 24h ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et de la température de l'air extérieur en amont des filtres.....	204

Figure IV- 4. Evolution au cours du temps de la concentration en particules totales sur 24h ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et de l'humidité relative de l'air extérieur en amont des filtres.....	204
Figure IV- 5. Evolutions journalières de la concentration massique de particules totales ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) : a) jour de la semaine ; b) samedi ; c) dimanche.....	208
Figure IV- 6. Evolution des concentrations en microorganismes totaux dans l'air en amont de la filtration et de la température au cours du temps.....	210
Figure IV- 7. Evolution des concentrations en microorganismes totaux dans l'air en amont de la filtration et du taux d'humidité relative au cours du temps.....	211
Figure IV- 8. Microorganismes (bactéries et champignons) cultivables dans l'air entrant dans le dispositif de filtration au cours du temps .....	213
Figure IV- 9. Distribution granulométrique de l'aérosol d'alumine. Compteur optique PCS 2010 (Palas).....	216
Figure IV- 10. Suivi des performances du filtre en fibres de verre lors du colmatage par des particules d'alumine.....	217
Figure IV- 11. Distribution granulométrique en nombre de l'aérosol atmosphérique échantillonné dans l'UFA <sub>2</sub> (Compteur optique PCS 2010 - Palas).....	218
Figure IV- 12. Distribution granulométrique en volume de l'aérosol atmosphérique échantillonné dans l'UFA <sub>2</sub> (Compteur optique PCS 2010 - Palas).....	218
Figure IV- 13. Evolution des pertes de charges des filtres au cours du temps .....	219
Figure IV- 14. Evolution des pertes de charges des filtres au cours du temps en fonction de la masse de particules cumulées.....	220
Figure IV- 15. Distribution granulométrique de l'aérosol de fluorescéine (Compteur optique PCS 2010 - Palas). .....	221
Figure IV- 16. Efficacité initiale de filtration des filtres disposés dans chaque UFA ainsi que d'un échantillon de filtre en fibres de verre vis-à-vis de particules d'alumines .....	222
Figure IV- 17. Concentrations en microorganismes cultivables totaux en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps .....	224
Figure IV- 18. Concentrations en bactéries cultivables en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps.....	225
Figure IV- 19. Concentrations en espèces fongiques cultivables en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps.....	225
Figure IV- 20. Efficacité de filtration du filtre de l'UFA <sub>1</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables totaux .....	227
Figure IV- 21. Efficacité de filtration du filtre de l'UFA <sub>2</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables totaux .....	227

# Liste des annexes

Annexe II- 1 : Protocole d'extraction et de mesure de l'ergostérol (à partir d'un protocole provenant du CSTB).....	275
Annexe III- 1 : Valeurs de l'étude sur l'influence du taux d'humidité et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés.....	277
Annexe IV- 1 : Dispositif de filtration.....	281





## Nomenclature

### Lettres Grecques

$\alpha$	Compacité du média	(-)
$\varepsilon$	Porosité du média	(-)
$\varepsilon_i$	Porosité inter-fibre	(-)
$\varepsilon_r$	Porosité de rugosité de surface	(-)
$\varepsilon_f$	Constante diélectrique de la fibre	(-)
$\varepsilon_p$	Constante diélectrique de la particule	(-)
$\varepsilon_0$	Permittivité de l'air	(F.m <sup>-1</sup> )
$\gamma$	Tension superficielle d'un liquide avec l'air	(N.m <sup>-1</sup> )
$\lambda$	Libre parcours moyen des molécules	(m)
$\lambda_f$	Charge linéique des fibres	(C.m <sup>-1</sup> )
$\nu$	Vitesse du fluide	(m.s <sup>-1</sup> )
$\mu$	Viscosité dynamique du fluide	(Pa.s)
$\eta$	Efficacité de filtration d'une fibre	(-)
$\eta_d$	Efficacité unitaire de collecte d'une fibre par le mécanisme de diffusion	(-)
$\eta_{\text{élec}}$	Efficacité unitaire de collecte d'une fibre par effets électrostatiques	(-)
$\eta_I$	Efficacité unitaire de collecte d'une fibre par le mécanisme d'impaction inertielle	(-)
$\eta_r$	Efficacité unitaire de collecte d'une fibre par le mécanisme d'interception directe	(-)
$\rho$	Masse volumique du fluide	(kg.m <sup>-3</sup> )
$\rho_p$	Masse volumique des particules	(kg.m <sup>-3</sup> )
$\theta$	Ange de mouillage d'un liquide avec un matériau	(°)

### Lettres latines

$B_0$	Perméabilité intrinsèque du média filtrant neuf	(m <sup>2</sup> )
$B_v$	Concentration en microorganismes cultivables dans le BioSampler relié à la ligne de prélèvement ne comportant pas de filtre	(UFC/mL)

$B_i$	Concentration en microorganismes cultivables dans le BioSampler relié à la ligne de prélèvement comportant un filtre	(UFC/mL)
$B_j$	Concentration en microorganismes cultivables dans un BioSampler	(UFC.mL <sup>-1</sup> )
$B_{ij}$	BioSampler j de la série i	(-)
$C_{\text{filtre}}$	Concentration en microorganismes cultivables extraits du filtre	(UFC.mL <sup>-1</sup> )
$C_{\text{initiale}}$	Concentration initiale en microorganismes cultivables	(UFC.mL <sup>-1</sup> )
$C_{\text{filtre (t0)}}$	Concentration initiale de microorganismes extrait d'un filtre directement après sa contamination dans le dispositif expérimental	(UFC.mL <sup>-1</sup> )
$C_u$	Coefficient de Cunningham	(-)
$e$	Epaisseur du média	(m)
$\Delta P$	Perte de charge du milieu poreux	(Pa)
$D$	Coefficient de diffusion	(m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
$d_f$	Diamètre de fibres	(m)
$d_p$	Diamètre des particules	(m)
$d_{\text{pores}}$	Diamètre de pores	(m)
$E$	Efficacité globale de filtration d'un média fibreux	(-)
$E_i$	Efficacité fractionnelle de filtration du média fibreux	(-)
$E_{\text{UFC}}$	Efficacité de filtration exprimée en % de la fraction cultivable des microorganismes	(%)
$F_{ij}$	Filtre j de la série i	(-)
$f_c$	Fibres d'un filtre chargées électriquement	(-)
$f_0$	Fibres neutres électriquement	(-)
$k$	Constante de Boltzmann	(J.K <sup>-1</sup> )
$k_m$	Valeur maximale possible de microorganismes présents dans un environnement	(-)
$Kn_p$	Nombre de Knudsen de particules	(-)
$Kn_f$	Nombre de Knudsen de fibres	(-)
$K_u$	Facteur hydrodynamique de Kuwabara	(-)
$P$	Pression	(Pa)
$P_c$	Particules chargées électriquement	(-)
$P_0$	Particules neutres électriquement	(-)
$Pe$	Nombre de Peclet	(-)

$v$	Vitesse frontale de filtration	$(m.s^{-1})$
$s_f$	Surface spécifique des fibres qui représente le rapport entre la surface externe d'une fibre et son volume	$(m^{-1})$
$Re_f$	Nombre de Reynolds de fibres	(-)
$Re_{pores}$	Nombre de Reynolds de pores	(-)
$Stk$	Nombre de Stokes	(-)
$T$	Température	$(^{\circ}C \text{ ou } K)$
$t_{\text{filtre}}$	Taux d'ergostérol extrait du filtre (la surface du filtre est de $12,6 \text{ cm}^2$ ) directement après contamination puis suite à 48h et 168h d'arrêt	$(mg \text{ ergostérol/filtre})$
$t_m$	Moyenne du taux d'ergostérol extrait de plusieurs filtres directement après contamination	$(mg \text{ ergostérol/filtre})$
$U$	Vitesse interstitielle dans le filtre	$(m.s^{-1})$
$x(t)$	Population microbienne au temps $t$	(-)
$x_0$	Population microbienne à l'état initial	(-)

## Acronymes

ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANAH : Agence nationale de l'habitat

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

APS : Aerodynamic particle sizer

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine tri-phosphate

BCA : Bicinchoninic acid assay

COT : Carbone Organique Total

COV : Composés organiques volatiles

CSTB : Centre scientifique et technique du bâtiment

CTA : Centrale de traitement de l'air

DGS : Direction générale de la santé

ELPI : Electrical low pressure impactor

EMN : Ecole des mines de Nantes

ERP : Etablissement recevant du public

GEPEA : Génie des procédés, environnement, agroalimentaire

HEPA : High efficiency particulate air

HPLC : High-performance liquid chromatography

HR : Humidité relative

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale

INVS : Institut de veille sanitaire

IRSST : Institut de recherche robert-sauvé en santé en santé et en sécurité du travail

MEB : Microscopie électronique à balayage

MEP : Microorganismes équivalents protéines

MPPS : Most penetrating particle size

NASA : National Aeronautics and Space Administration

OMS : Organisation mondiale de la santé

OQAI : Observatoire de la qualité de l'air intérieur

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PM : Matière particulaire

PNSE I et II : Plan national santé-environnement I et II

PVA : Polyvinyl-Acétate

QAI : Qualité de l'air intérieur

QMAI : Qualité microbienne de l'air intérieur

Q-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

SBS : Syndrome du bâtiment malsain

TEOM : Tapered element oscillating microbalance

UFC : Unité formant colonie

ULPA : Ultra low penetration air

VBNC : Viable non cultivable

VGAI : Valeur guide de qualité d'air intérieur

VLE : Valeur limite d'exposition

VLEP : Valeur limite d'exposition professionnelle

VMC : Ventilation mécanique contrôlée

WHO : World health organization



# Introduction générale

---





Des récits de l'époque médiévale évoquent des désagréments de personnes causés par de l'air pollué par des fumées de bois et des odeurs provenant d'activités domestiques et d'ordures en décomposition. Des historiens estiment que ce n'est qu'à partir du début du XIV<sup>ème</sup> siècle que la pollution de l'air est devenue un réel problème social. En particulier, l'avènement du charbon comme moyen de chauffage a fortement poussé les populations à s'intéresser aux polluants de l'air. Mais l'historique scientifique et technique ne débute guère avant les années 1850. A partir de cette époque, l'industrialisation fait considérablement évoluer l'urbanisation de la France et le mode de vie de la population. Parallèlement, Louis Pasteur présente ses premières mesures de microorganismes de l'air en 1861. Le chirurgien John Lister se sert alors en 1867 des études de Pasteur pour révolutionner la chirurgie en aseptisant les instruments et en vaporisant du phénol dans les salles d'opération, ce qui a réduit considérablement le nombre d'infections dues à la présence d'aérosols microbiens.

Durant le XX<sup>ème</sup> siècle, le mode de vie des gens a continué d'évoluer avec l'urbanisation du pays ce qui a conduit la population à occuper de plus en plus de temps dans des environnements dits semi-clos. Actuellement, un habitant d'un pays industrialisé passe en moyenne 80 à 90% de son temps dans des lieux semi-clos tels que : logement, bureau, transport, musée, magasin,... (Gustavsson et al., 2010). Aussi, depuis une trentaine d'années environ, l'étude de la qualité de l'air intérieur est devenue une thématique majeure dans de nombreux pays.

Bien que la France ait fait preuve d'avancées remarquables en ce qui concerne l'étude de la qualité de l'air extérieur, le pays a pris du retard sur l'étude de l'air en environnement intérieur jusque dans les années 2000 (Shriver-Mazzuoli, 2009). Néanmoins, les instances politiques et scientifiques ont désormais pris conscience de l'enjeu sanitaire que représente l'air intérieur, et plusieurs moyens ont été mis en place pour développer les connaissances et lutter contre une pollution de l'air. L'Organisation Mondiale de la Santé classe la pollution de l'air à l'intérieur des habitations au 8<sup>ème</sup> rang mondial des facteurs de risques les plus importants ; cette pollution, toujours selon l'OMS, serait responsable de 2,7 % de la charge mondiale de morbidité. Selon l'INSERM, la prévalence des maladies allergiques (asthme, rhinites, conjonctivites,...) augmenterait considérablement depuis 25-30 ans dans les pays industrialisés. L'évolution du mode de vie et du secteur du bâtiment sont des facteurs pouvant favoriser une telle augmentation. En effet, les sources de pollution intérieures sont majoritairement dues aux occupants, à leurs activités, aux systèmes de chauffage, à l'isolation des bâtiments, à la ventilation, aux équipements, aux caractéristiques de construction et aux différents types de matériaux utilisés dans les bâtiments.

La problématique de l'air intérieur s'est tout d'abord inscrite dans le Plan National Santé-Environnement I (PNSE I) et a été renforcée dans le PNSE II (2009 – 2013). L'objectif du PNSE II est de définir et de hiérarchiser les actions à mener sur le plan de la santé-environnement en se situant au cœur des engagements du Grenelle de l'environnement. Le Grenelle de l'environnement étant un projet porté par l'Etat et visant à créer des conditions favorables à l'écologie, au développement et à l'aménagement durable, un de ses objectifs est la diminution de la consommation d'énergie. En particulier, le PNSE II incite à développer des moyens pour concilier économie d'énergie et qualité de l'air intérieur en limitant les sources de pollution. Il incite à optimiser l'aération, la ventilation et la climatisation ainsi qu'à une meilleure gestion et surveillance de la Qualité de l'Air Intérieur (QAI). Des guides (INVS et Ministère de la Santé, 2010) sont aussi parus afin de conseiller des responsables d'Etablissement Recevant du Public (ERP) et des personnes en charge de la QAI, sur la prévention et la gestion de la QAI (mise en place d'outils d'analyse de l'air, maintenance,...). A partir de cela, un décret a été établi en 2011 pour veiller à une surveillance de la qualité de l'air dans certains ERP. L'application de ce décret n°2011-1728 est progressive entre 2015 et 2023 selon les ERP, et impose la surveillance de la QAI dans les ERP tous les 7 ans.

Selon les locaux, des règles de ventilation sont imposées. Un débit d'air neuf par mètre cube d'air et par personne doit être respecté (Tableau 0). Des systèmes complexes de ventilation et de climatisation, les Centrales de Traitement de l'Air (CTA), ont pour objectif d'assurer une ventilation adéquate selon l'établissement mais également de veiller au confort des occupants.

**Tableau 0. Débit minimal d'air neuf par occupant (ventilation mécanique) selon la circulaire du 20/1/83 – D'après Schriver-Mazzuoli (2009).**

Locaux	Débit (m <sup>3</sup> /h/personne)
Locaux d'enseignement	15 - 18
Bureaux - locaux de réunion	18
Locaux de vente	22
Locaux de restauration	22
Locaux à usage sportif	22
Ateliers et locaux avec travail physique	45
Autres ateliers et locaux	60

Des règles de ventilation sont spécifiques au type de lieu à aérer, aux occupants de ces lieux et aux réglementations spécifiques à certains polluants. Dans le milieu du travail, des particularités interviennent selon le secteur : agro-alimentaire, milieu hospitalier, automobile, tertiaire,... Dans le cas du secteur tertiaire et des bureaux, qui représentent le second lieu

d'occupation des travailleurs de ce secteur d'emploi, les polluants de l'air intérieur proviennent (Schrivver-Mazzuoli, 2009) :

- Des matériaux de construction et du mobilier (pouvant émettre des COV)
- Des éléments de décoration (moquettes, papier peint, tissus,...)
- Des équipements de bureau : les imprimantes et photocopieuses émettent de l'ozone. L'imprimante laser émet également des COV, tandis que l'encre des imprimantes à jet d'encre émet des particules de carbone. Enfin le papier fraîchement imprimé émet du styrène
- Des ordinateurs qui émettent des COV
- Des occupants qui peuvent être à l'origine de contaminants biologiques et de COV issus des produits d'hygiène corporelle
- Des systèmes de ventilation et de CTA qui peuvent accroître la pollution de l'air, la concentration d'organismes microbiens, de moisissures,... suivant leur condition de maintenance
- De nombreux éléments dans des bureaux (mobilier, occupants, équipement de bureaux...) émettent des particules dont des particules fines et ultrafines, aussi les particules font partis des polluants d'intérêts prioritaires (De Beaudoin, 2006)

De plus en plus de CTA sont installées dans les bâtiments du secteur tertiaire. Leur utilité et leur capacité à améliorer la qualité de l'air intérieur ont été démontrées (Rim et al., 2010 ; Yu et al., 2009). Néanmoins, ces systèmes présentent des limites notamment en raison des composants de la CTA en termes de dimensionnement, ou des facteurs environnementaux autour des composants (température, humidité relative, polluants chimiques,...) ou d'une maintenance de la CTA insuffisante (Bluyssen et al., 2003). De plus, les politiques actuelles incitent aux économies d'énergie, ce qui entraîne des évolutions des bâtiments alors mieux isolés mais ce qui réduit également les échanges entre l'air intérieur et extérieur. Une ventilation insuffisante ainsi que la présence de meubles et d'objets ou produits de décoration contenant des produits chimiques et synthétiques augmentent les concentrations des particules et des COV (benzène, toluène, formaldéhyde,...) à l'intérieur des bâtiments (Yu et al., 2009). Ainsi, des plaintes émanant d'occupants de bâtiments, dont des bureaux ventilés par des CTA, ont attiré l'attention. Des bâtiments associés à une CTA présentant une maintenance insuffisance ou une ventilation inadaptée entraîneraient une occurrence plus importante du Sick Building Syndrome (SBS). Il est donc essentiel de cibler les paramètres et organes des CTA à surveiller en priorité.

Des observations de filtres de CTA ont démontré que certains microorganismes, et en particulier des bactéries et champignons, peuvent se servir des filtres comme support de croissance lorsque les conditions suffisantes de température, d'hygrométrie et nutritives sont réunies (Bonnevie-Perrier et al., 2008 ; Kelkar et al., 2005 ; Price et al., 1994). Pourtant l'air est un milieu pauvre en nutriments et peu propice au développement microbien. Les arrêts de CTA, souvent déclenchés dans les bureaux lors des week-ends et de périodes de vacances pour permettre des économies d'énergie, pourraient favoriser la croissance microbienne puisque les microorganismes ne sont plus soumis à un flux d'air (Chow et al., 2005 ; Hamada et Fujita, 2002 ; Kumari et al., 1998). Il semblerait également que l'apparition d'un gâteau de particules conséquent lors du colmatage du filtre puisse favoriser le développement des microorganismes qui se servent des particules comme nutriments (Hamada et Fujita, 2002). Ce gâteau de particules peut aussi avoir pour rôle de favoriser la rétention d'eau sur le filtre.

Un développement microbien peut alors dégrader la qualité de l'air en aval des filtres, dans le cas où une concentration importante de microorganismes et de sous-produits de microorganismes (endotoxines, mycotoxines, allergènes, fragments de particules biologiques,...) seraient relargués. Un tel relargage peut être favorisé lors de la remise en marche de la ventilation après une période d'arrêt. De plus, les propriétés de filtration peuvent être dégradées par le développement microbien : colmatage accéléré du filtre, diminution de l'efficacité (Bonnevie-Perrier et al., 2008).

C'est pour répondre à ces problématiques qu'une collaboration entre le laboratoire GEPEA, l'EMN et l'INRS a été engagée au travers d'une thèse de doctorat qui a porté sur l'étude du comportement des aérosols microbiens collectés sur des filtres de CTA.

Le premier chapitre synthétise un état de l'art sur la problématique de la filtration d'air et des aérosols microbiens ainsi que sur les méthodes de caractérisation de la croissance microbienne.

La description et la validation de la méthodologie qui a été mise en place pour l'étude en laboratoire de l'influence de l'humidité, du type de filtre et du débit d'air sur le développement microbien font l'objet du second chapitre. Ce chapitre détaille les protocoles expérimentaux de génération des microorganismes, de prélèvement des microorganismes dans l'air et d'extraction des filtres, ainsi que de contamination des filtres. De plus, le choix du consortium microbien (une bactérie, un champignon) est présenté et justifié vis-à-vis de la Qualité Microbienne de l'Air Intérieur (QMAI). Enfin, la méthodologie de quantification des microorganismes cultivables présents dans les filtres après contamination, ainsi qu'après

croissance sur ces filtres en conditions contrôlées (Température, Humidité Relative) et en aval des filtres, est présentée.

Un troisième chapitre présente les filtres commerciaux testés dans cette thèse qui sont représentatifs de ceux rencontrés dans des CTA. Les résultats de l'étude portant sur l'influence du taux d'humidité, du type de média fibreux et du flux d'air sur le comportement des microorganismes (une espèce bactérienne et une espèce fongique) collectés sur des filtres, ainsi que de l'étude du relargage microbien en aval du filtre après la reprise du flux d'air, sont détaillés et discutés.

Enfin un quatrième chapitre est dédié à la description et l'analyse des résultats d'un cas d'étude qui a consisté à la mise en place d'un dispositif de filtration d'un air semi-urbain provenant des environs de la région Nantaise. Le dispositif expérimental comprend deux unités de filtration similaires conçues pour filtrer le même air. Chaque unité comporte un même média filtrant en configuration plane et perpendiculaire à l'écoulement. La ventilation d'une des deux unités de filtration est arrêtée chaque week-end alors que la 2<sup>ème</sup> unité est en marche continue. L'objectif de ce chapitre est double :

- 1) Valider avec un air semi-urbain « réel » les observations et conclusions obtenues au chapitre 3 pour le consortium microbien modèle et en l'absence de toute autre pollution particulaire
- 2) Evaluer l'influence de l'arrêt de la ventilation le week-end sur le développement des microorganismes collectés sur le filtre et observer la qualité de l'air filtré lors du redémarrage de la ventilation. Cette opération s'est déroulée pendant 5 mois lors des mois de printemps/été.

Ainsi le travail réalisé dans cette thèse doit apporter des éléments concernant le comportement des microorganismes collectés sur des médias fibreux et sur les paramètres pouvant favoriser un développement microbien. Ces éléments pourront apporter des informations aidant à l'établissement de préconisations concernant la gestion de centrale de traitement de l'air.



# CHAPITRE 1

## Etude bibliographique

---





## I. Introduction

Afin de lutter contre la pollution de l'air à l'intérieur des bâtiments, des systèmes ont été développés pour ventiler et extraire ou retenir les polluants des environnements intérieurs. Les biocontaminants, les composés chimiques dont les COV, les aérosols et la radioactivité naturelle font partis de ces polluants. Parmi les techniques de traitement de l'air il est retrouvé : la filtration sur média fibreux, la photocatalyse, l'ozonation, l'irradiation UV, le traitement biologique, des procédés épuratoires d'absorption/adsorption,... La photocatalyse est une technique essentiellement appliquée aux réactions d'oxydation avancée des composés organiques (Debono, 2011). C'est une technique en plein développement mais qui comporte l'inconvénient majeur de parfois générer des sous-produits toxiques. L'ozonation consiste à détruire les composés organiques et en particulier les microorganismes, par l'usage de l'ozone comme oxydant. Cependant l'ozone est un produit très dangereux. L'irradiation UV présente une action germicide sur les microorganismes seulement il est important de veiller à une bonne installation des lampes afin d'éviter des risques pour les yeux ou la peau. Le traitement biologique consiste à oxyder des composés en présence de microorganismes. L'épuration par adsorption consiste à capter des polluants gazeux ou des vapeurs par piégeage sur un milieu solide poreux, tandis que l'épuration par absorption consiste à éliminer les polluants par réaction chimique entre un polluant et la solution absorbante qu'il traverse ou par un transfert gaz-liquide. La filtration sur média fibreux demeure le moyen le plus en usage actuellement pour réduire la pollution particulaire de l'air. La filtration est un mécanisme de séparation en usage depuis des centaines d'années et peut réduire significativement les polluants particuliers, les pollens, les spores fongiques,... (Gustavsson et al., 2010). Aujourd'hui, de nombreux systèmes complexes de traitement d'air utilisent la filtration comme procédé épuratoire de l'air, dont les CTA.

Depuis que des aérosols microbiens sont soupçonnés d'être à l'origine de problèmes de santé, de nombreuses études ont été menées et en particulier dans les secteurs hospitalier, pharmaceutique, agroalimentaire et de l'agriculture. Plusieurs études concernant la présence de microorganismes dans l'air de logements, d'écoles, de bureaux ont également été mises en place ces dernières années (Moularat et al., 2011 ; Noris et al., 2011 ; Tseng et al., 2011., Jo et al., 2005). Il a alors été nécessaire de développer des outils d'échantillonnage de particules microbiennes dans l'air ainsi que de quantification ou de qualification des microorganismes et de leurs sous-produits.

L'étude de l'air intérieur est un vaste domaine contenant un large champ de disciplines. Ce travail de thèse s'attache plus particulièrement à l'étude du comportement des microorganismes collectés sur des filtres de CTA alimentant des bâtiments du secteur tertiaire de type bureaux. Ce chapitre de thèse synthétise une étude bibliographique qui a consisté, dans un premier temps, à caractériser les aérosols microbiens contenus dans l'air intérieur des bâtiments et d'en exposer les dangers pour la santé des personnes. Dans un second temps, sont exposées des informations concernant la ventilation des locaux et en particulier la ventilation mécanique par des CTA et l'étape de filtration particulaire. Les mécanismes de filtration et les principaux résultats qui concernent la filtration des microorganismes et en particulier des bactéries et des champignons ont été recensés. Les principales études réalisées en laboratoire portant sur les aérosols microbiens et qui ont conduit à une maîtrise de la génération et de l'échantillonnage de microorganismes au travers du développement de techniques spécifiques aux particules microbiennes sont décrites. Enfin, ce chapitre présente les méthodes d'analyse des particules microbiennes et de certains de leurs sous-produits.

## II. Les aérosols microbiens

### II.1. Présence des aérosols microbiens dans l'air intérieur

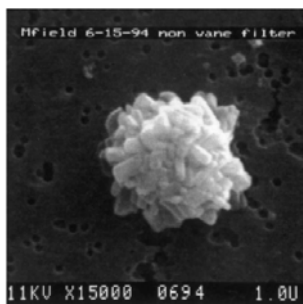
#### II.1.1. Une catégorie d'aérosols : les bioaérosols

Les habitants des pays industrialisés occupent 80% à 90% de leur temps dans des espaces semi-clos (logements, bureaux, transports, écoles,...) (Gustavsson et al., 2010). Certains seuils de pollution doivent être respectés afin d'assurer une qualité de l'air suffisante. Plusieurs éléments de différentes natures (chimique, physique, biologique) présents dans l'air intérieur sont ainsi étudiés et surveillés pour une meilleure compréhension et gestion des environnements dans l'objectif particulier de prévenir les risques susceptibles d'atteindre la santé humaine.

Les aérosols correspondent à une catégorie importante des composants de l'air intérieur. Ce sont des particules solides ou liquides, en suspension dans un milieu gazeux et dont la vitesse de chute est négligeable. Le spectre de leur taille varie de quelques nanomètres jusqu'aux environs de 100  $\mu\text{m}$  (Harrison, 2004). Une sous-classe d'aérosols se distingue : les bioaérosols qui sont des particules aéroportées d'origine microbienne, animale ou végétale (Douwes et al., 2003). Ils sont présents dans l'air sous plusieurs formes physiques. Ils peuvent être individualisés (spores, cellules bactériennes,...), regroupés sous forme d'agrégat composé de plusieurs éléments individualisés ou avec d'autres matériels biologiques. Ils peuvent également être issus de produits (mycotoxines, endotoxines,...) ou de fragments d'éléments individualisés ou bien pour finir, se présenter sous forme de particules d'origine biologique associées à des particules non biologiques (Duquenne et Greff-mirguet, 2005). Les bioaérosols se dispersent de la même façon que les aérosols. Ceux dont la taille est inférieure à 5  $\mu\text{m}$  possèdent des temps de vol importants et peuvent rester longtemps en suspension dans l'air tandis que les particules plus grossières (>10  $\mu\text{m}$ ) sédimentent plus rapidement pour se déposer sur des surfaces. (Mohr et al., 2002)

Les microorganismes de l'air se présentent majoritairement en agrégat, comme l'illustre la photographie de la Figure I- 1, et forment des particules de taille plus importante que les organismes individuels (Lighthart et al., 1994) ce qui les protège contre la dessiccation, l'oxydation et la lumière. Lighthart & Kim (1989) précisent que les bactéries qui sont situées à l'intérieur des grosses particules (> 9,2  $\mu\text{m}$ ) formées par les agrégats survivraient mieux sur

de longues distances ce qui explique que la majorité des bactéries cultivables (donc viables) sont associées avec des particules.



**Figure I- 1. Agrégat bactérien provenant d'un prélèvement atmosphérique proche de l'océan (Lighthart, 1997).**

Les bioaérosols sont issus d'organismes vivants dont font partie les microorganismes, à savoir les bactéries, les champignons, les protozoaires, les algues, les virus. La présence des aérosols microbiens dépend de plusieurs facteurs physiques qui influencent également leur propre développement. En particulier, les courants d'air, l'humidité relative et la température sont des paramètres physiques environnementaux qui peuvent modifier de façon significative la taille, la masse volumique et la forme des particules (Mohr et al., 2002, Pedgley et al., 1991). Parmi les microorganismes de l'air, les bactéries et les champignons sont les plus représentés.

#### *II.1.1.1. Les bactéries*

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires. La plupart d'entre elles détiennent l'information génétique suffisante pour assurer leur propre croissance lorsqu'elles parviennent à produire suffisamment d'énergie. Leur taille est comprise entre 0,2 et 50  $\mu\text{m}$ . Elles peuvent être réparties de façon grossière en deux groupes selon leur coloration au test de Gram : les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif. Les bactéries Gram positif sont plus résistantes, de par leur paroi plus épaisse. De plus, certaines espèces de bactéries à Gram positif ont la capacité de sporuler dans des conditions de stress. Les spores bactériennes (endospore) présentent une incroyable capacité de résistance à la chaleur, la dessiccation et aux composés chimiques et parviennent parfois à survivre pendant des centaines d'années. Dans ce cas, les spores bactériennes sont incapables de se diviser, ont un contenu en eau très faible et disposent de niveaux de charge énergétique potentielle très faible. Lorsque le milieu sera à nouveau favorable la cellule germera et pourra encore se diviser et reprendre une activité normale. Les bactéries Gram négatif ont une paroi cellulaire plus fragile qui supporte mal une déshydratation notamment lors d'un passage prolongé dans l'air (Goyer et al., 2001).

Il existe un état particulier des bactéries, très répandu et que l'on nomme état " Viable non cultivable " (VBNC). Cet état peut être induit par un changement brusque d'un milieu favorable à un environnement appauvri en nutriments, en eau,... imposant des conditions de stress aux bactéries. La viabilité d'une cellule bactérienne correspond, selon Postgate (1969) (Roszak and Colwell, 1987), à la propriété de se multiplier quand les conditions sont adéquates. Ce n'est d'ailleurs qu'au début des années 1980 lorsque l'existence des cellules viables mais non cultivables a été mise en évidence, que l'utilisation de la méthode par culture a montré ses limites. Car ces cellules qui ont la capacité de se diviser et de former des colonies sont temporairement bloquées mais pour le moins vivantes. Seule une faible quantité de cellules bactériennes est cultivable par l'utilisation de milieux de culture adéquate. Une étude suppose qu'environ 0,08% des bactéries totales en air extérieur, sont cultivables (Tringe et al., 2008). Les autres bactéries sont soit dans un état VBNC soit mortes.

Selon Wilson and Lindow (1992), 75% des bactéries viables se développant sur des feuilles de végétaux avec une faible présence de nutriments, ne sont plus détectées après 3 jours passés dans cet environnement. De plus, des études ont montré que des cellules étaient encore capables de se diviser à la suite d'un stress nutritionnel mais sans augmentation de la biomasse et en formant des petites cellules ovoïdes (Novitsky and Morita (1978) dans Roszak and Colwell, 1987). Il s'agit d'une division réductive pour laquelle la taille des cellules est considérablement réduite après quelques divisions. Des rapports de volumes variant de 15 à 300 ont déjà été décrits. Bien que le nombre de cellules puisse augmenter, l'incapacité à former des colonies visibles demeure. Elles pourront néanmoins reprendre une taille dite " normale " (habituellement observée en laboratoire) si elles sont à nouveau disposées sur un milieu nutritif qui leur convient. La cultivabilité définit la capacité d'une bactérie à se diviser sur un milieu de culture, jusqu'à former une colonie de taille visible. Cette définition est vague, les « conditions optimales » et « le milieu de culture » étant des paramètres variables suivant les souches. La comparaison des concentrations en organismes « cultivables » provenant d'études distinctes est alors hasardeuse. De plus, il est difficile de percevoir si ce qui est effectivement cultivé provient du milieu prospecté ou s'il s'agit d'une population transitoire non adaptée au milieu oligotrophe dans lequel elle se trouve puisque, de manière générale, les milieux de culture couramment utilisés pour la mesure des microorganismes cultivables contiennent mille fois plus de carbone par unité de volume que l'on peut généralement en rencontrer dans la plupart des environnements à tendance oligotrophe (1-15 mgC.l<sup>-1</sup>) (Martin and MacLeod, 1984 dans Amato, 2006). Une alternative courante consiste à utiliser une formule diluée des milieux classiques (Andreeva et al., 2001) pour

rechercher les organismes oligotrophes. Les cellules bactériennes sont également rangées en plusieurs catégories selon leur forme et leur type de mobilité : spirochètes qui sont de longues bactéries fines (0,1 à 3  $\mu\text{m}$  sur 5 à 250  $\mu\text{m}$ ) en forme d'hélice souple, les bacilles et les coques, vibroïdes et hélicoïdales, incurvées, pédonculées, filamenteuses, mycéliennes,...

### II.1.1.2. Les champignons

Les champignons ou mycètes dont la taille varie en moyenne de 1 à 100  $\mu\text{m}$ , sont des saprophytes primaires qui utilisent la matière biologique morte comme source nutritive pour assurer leur reproduction. Tout comme les bactéries, les mycètes jouent un rôle primordial comme agent de décomposition. Parmi les champignons, une distinction est faite entre les levures et les moisissures dont la plupart des espèces font parties des ascomycètes (embranchement des champignons). Les levures sont des organismes unicellulaires se divisant soit par bourgeonnement (de façon asexuée) soit par la formation de spores (de façon sexuée). Les moisissures présentent quant à elles des filaments fins, longs et ramifiés que l'on appelle « hyphe », qui s'entrelacent et forment une masse nommée mycélium. Les hyphes portent des conidiophores composés de spores (conidies). Ce sont des organismes pluricellulaires se reproduisant majoritairement par la dissémination dans l'air des spores produites et dans une moindre mesure par des fragments d'hyphes viables. La Figure I- 2 présente des spores de champignons (*Aspergillus niger*) observées au microscope électronique à balayage ainsi qu'une photographie d'un conidiophore de *Penicillium oxalicum* obtenue en microscopie à contraste de phase.

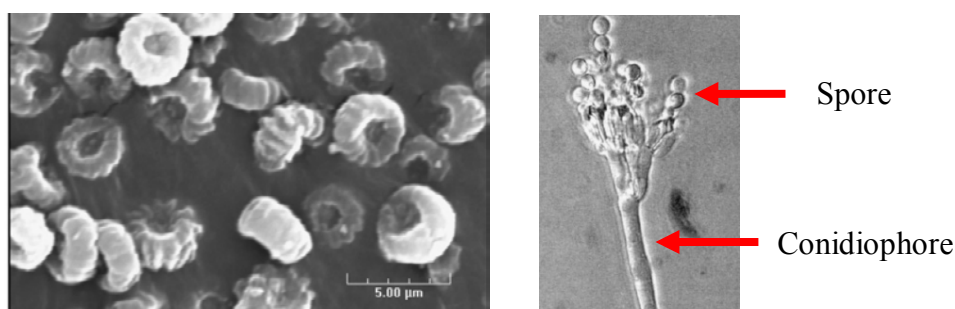


Figure I- 2 : A gauche : Spores d'*Aspergillus niger* - Microscope électronique à balayage (Ramachandran et al., 2008) – A droite : *Penicillium spp.* isolé – Microscope à contraste de phase (Liceaga-Gesualdo et al., 2001).

### II.1.1.3. Composants biologiques issus des microorganismes

Parmi les bioaérosols, il convient également de s'intéresser aux composants biologiques issus des microorganismes et susceptibles d'être nocifs pour la santé humaine.

Les endotoxines sont des constituants de la membrane cellulaire extérieure des bactéries Gram négatif et sont composées de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides (responsable de l'effet toxique). Le terme « endotoxine » fait référence à la toxine présente soit dans la cellule bactérienne, soit dans les fragments des parois cellulaires libérés pendant la lyse bactérienne. Dans l'environnement, les endotoxines de l'air sont souvent associées à des particules de poussières ou à des aérosols liquides. Une exposition trop importante aux endotoxines peut engendrer des problèmes respiratoires, par exemple de l'asthme. A de faibles doses les endotoxines peuvent jouer un rôle positif en assurant une protection à l'égard des allergies et de l'asthme (Douwes et al., 2003). Elles sont également soupçonnées de jouer un rôle dans la maladie du rhumatisme des bâtiments touchés par l'humidité (Lorenz et al., 2006). Leurs effets sur la santé varient beaucoup selon les espèces, les individus, la dose et la voie d'entrée. Les symptômes rapportés suivant une exposition respiratoire aux endotoxines sont la toux, le souffle court, la fièvre, l'obstruction et l'inflammation des poumons ainsi que des problèmes gastro-intestinaux (Goyer et al., 2001).

Les mycotoxines, appelées également toxines des champignons, sont des biomolécules à faible poids moléculaire capables d'être toxiques pour les animaux et l'homme. Ces métabolites secondaires spécifiques des moisissures sont libérés lors du processus de dégradation de la matière nutritive. La mycotoxine sert de défense aux champignons contre les microorganismes incluant les autres moisissures. Ce sont des composés non volatils présents dans l'air uniquement en cas d'agitation du milieu où elles sont produites. Eduard et al. (2006) ont mis en évidence qu'à faible dose, élément essentiel, le trichothecene produit par *Stachybotrys chartarum* était stimulant pour le système immunitaire. Des mycotoxines peuvent être présentes à de fortes concentrations dans des bâtiments affectés par des problèmes d'humidité et de moisissure mais il n'est pas clairement établi qu'un développement exacerbé de moisissures dans un bâtiment affecté par des problèmes d'humidité induise de façon systématique des concentrations de mycotoxines suffisantes pour affecter la santé des occupants (Who, 2009 ; Bloom et al., 2007 ; Brasel et al., 2005). Néanmoins les mycotoxines sont connues pour interférer avec la synthèse de l'ARN et donc causer des dommages pour l'ADN. Beaucoup d'entre elles sont toxiques pour le système immunitaire. Plusieurs mycotoxines comme l'aflatoxine provenant d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont potentiellement cancérogènes.

Le (1-3)- $\beta$ -D-glucan est un polymère de glucose à poids moléculaire variable (Williams, 1997). C'est un composant non allergène insoluble dans l'eau et présent dans la plupart des parois cellulaires des champignons, de quelques bactéries et de la plupart des plantes (Stone et al., 1992). Il représente plus de 60 % du poids sec de la paroi cellulaire des champignons (Klis, 1994). Il peut affecter le système immunitaire et être un agent irritant du système respiratoire (Douwes, 2005).

### II.1.2. Composition microbienne de l'air intérieur

Les principales sources microbiennes à l'intérieur des bâtiments proviennent de l'air extérieur, des occupants et de la croissance des microorganismes présents sur les matériaux à l'intérieur des bâtiments (WHO guidelines, 2009).

L'identification de la composition bactérienne de l'air intérieur a fait l'objet de plusieurs études. Seul 0,08% des cellules sont cultivables (Tringe et al., 2008). Depuis quelques années, grâce au développement de nouvelles technologies, en particulier la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne), la connaissance s'élargit même si seule une faible proportion des espèces présentes à l'extérieur et à l'intérieur des bâtiments ne peut encore être identifiée.

Tringe et al. (2008) ont comparé la composition microbienne de l'air intérieur de deux supermarchés de Singapour : ils ont identifié les espèces présentes par PCR. Plus précisément ils ont étudié la séquence 16S rARN présent dans une sous unité des ribosomes particulière à toutes les bactéries.

Les conclusions de Tringe et al. (2008) sont les suivantes :

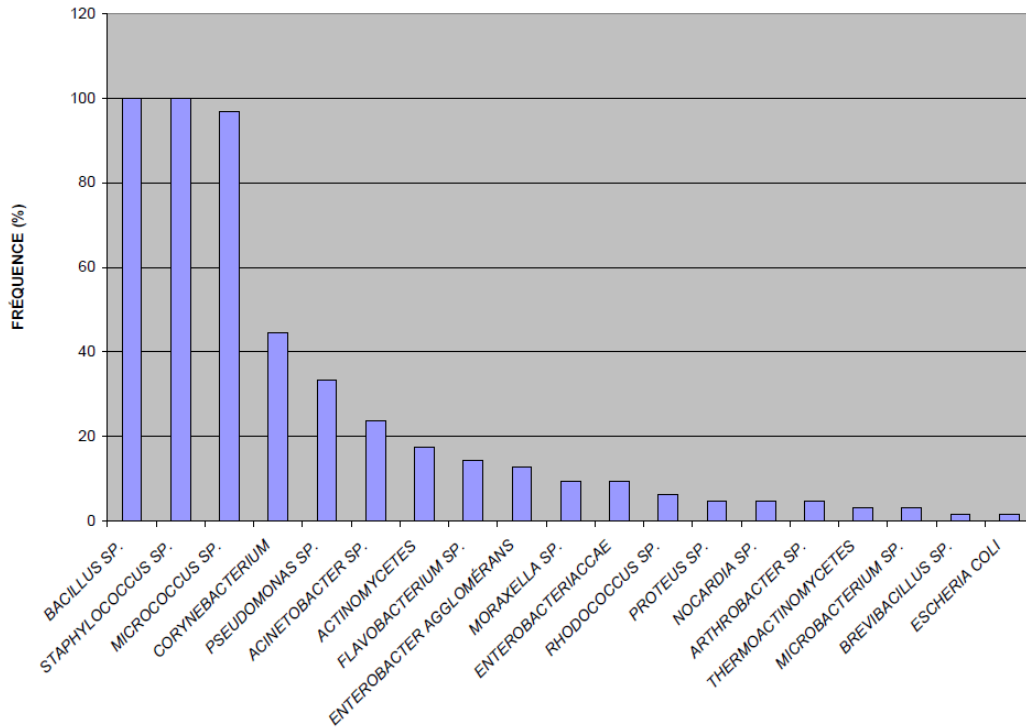
- Les organismes de l'air intérieur se distinguent en partie de ceux trouvés dans l'air extérieur des alentours, dans l'eau et le sol proches des magasins. En revanche, les similarités du matériel génétique sont très fortes entre les deux supermarchés éloignés l'un de l'autre, ce qui laisse supposer une spécificité de l'air des espaces intérieurs.
- La composition microbienne de l'air intérieur est influencée par l'Homme. En effet, des comparaisons de séquences 16S rARN ont mis en évidence de fortes similitudes entre des échantillons d'air intérieur et des échantillons de postillons de narines d'origine humaine.



- Les bactéries de l'air subissent un stress conséquent au manque de fer, à l'oxydation et à la dessiccation.
- L'air étant un milieu hostile pour les microorganismes, Tringe suppose que le développement d'agents résistants et infectieux s'en trouve favorisé.

Plusieurs études démontrent l'importance de l'occupation humaine comme contribution à la masse totale des aérosols (Ferro et al., 2004 a,b; Koistinen et al., 2004; Thatcher and Layton, 1995). Qian et al. (2012) ont comparé des populations bactériennes de l'air extérieur et intérieur d'une salle de cours d'université (dont l'air était renouvelé par une CTA) par des analyses de l'air par PCR (16S rARN ciblant les espèces bactériennes). Les échantillons analysés présentent de nombreuses similitudes entre l'air extérieur et l'air intérieur (*Sphingomonas*, *Rhodobacteria* and *Streptophyta*). Néanmoins, l'air intérieur se démarque fortement de l'air extérieur lors des périodes d'occupation des salles puisque des genres bactériens associés à la peau, aux cheveux, aux narines et à la bouche enrichissent fortement l'air intérieur (*Staphylococcus*, *Corynebacteria*, *Propionibacteria*).

Dans le cadre d'une étude de l'IRSST (Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail), des résultats d'analyses réalisées sur 8 ans et dans 63 sites de travail ont été compilés (36 édifices de bureaux, 12 écoles et 15 hôpitaux) dans le but de comparer la prévalence des espèces bactériennes en air intérieur (Goyer et al., 2001). La Figure I- 3 résume les résultats sous forme de graphique. Les bactéries les plus représentées sont *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* et *Micrococcus sp.* *Bacillus sp.* est une bactérie sporulante Gram positif tandis que *Staphylococcus sp.* et *Micrococcus sp.* sont des bactéries non sporulantes Gram positif. L'air, milieu hostile pour les bactéries et champignons, contient majoritairement des espèces microbiennes résistantes. Ainsi, les spores fongiques et les endospores (du type *Bacillus sp.* *Clostridium sp.*) ont une plus grande capacité de résistance au stress environnemental que les cellules végétatives (Stetzenbach, 2007). Les bactéries Gram-négatif sont souvent plus sensibles aux réactions de Maillard, à la déshydratation et aux chocs osmotiques que les bactéries Gram-positif possédant un taux plus important de phospholipides (Mohr, 2007) ce qui suppose une prévalence des bactéries Gram positif dans l'air. Law et al. (2001) ont analysé la composition microbiologique de deux bureaux alimentés en air par des CTA et ont dénombré plus de 80% de Gram-positif sur la totalité des bactéries quantifiées sur milieu de culture.



**Figure I- 3. Fréquence de l'occurrence des espèces bactériennes retrouvées dans 63 environnements de travail (Goyer et al., 2001)**

L'IRSST a également étudié la fréquence sur 8 ans des différents genres de moisissures présentes sur 126 sites de travail (47 édifices de bureaux, 41 écoles, 23 hôpitaux et 15 usines) (Goyer et al., 2001). La Figure I- 4 illustre ces résultats.

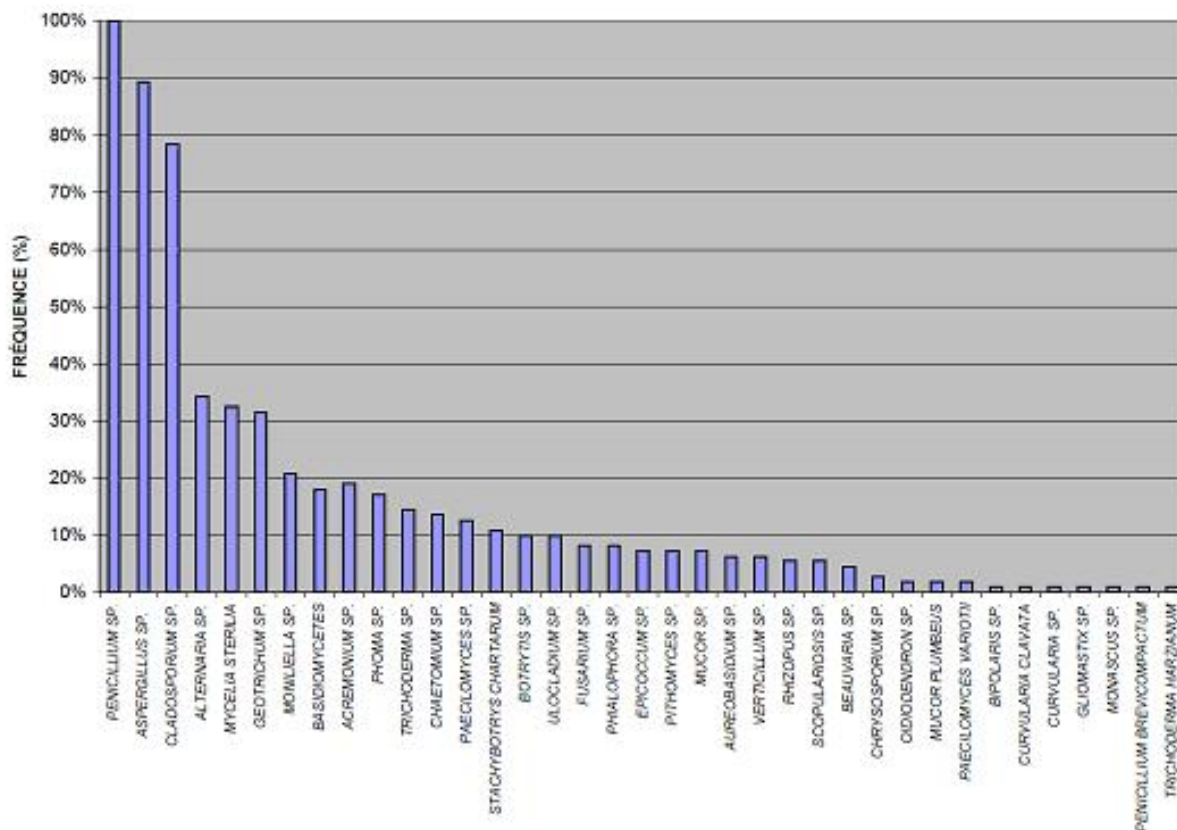


Figure I- 4. Fréquence de l'occurrence des moisissures trouvées dans 126 environnements de travail (Goyer et al., 2001)

Les mycètes les plus répertoriés sont *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.* Mise à part l'espèce *Beauveria*, les résultats de Parat et al. (1996) concordent avec d'autres études qui placent *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus* comme espèces dominantes (Ackermann et al., 1969 ; Miller et al., 1988). Précisément, les genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Aspergillus* sont systématiquement détectés en grande proportion (jusqu'à 90 % du matériel fongique détecté) dans les échantillons atmosphériques rapportés dans la littérature (Cooley et al., 1998 ; Fang et al., 2005 ; El-Morsy, 2006). Crook et Burton (2010) ont relevé plusieurs études démontrant une forte prédominance des genres *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* dans l'air intérieur. Par ailleurs, les spores bactériennes de *Bacillus subtilis* et les conidies de *Aspergillus niger* sont généralement détectées dans beaucoup d'environnements, à tel point que ces espèces sont considérées comme " microorganismes de l'air " (Fannin et al., 1985 ; Maroni et al., 1993 ; Nevalainen et al., 1993 ; Laitinen et al., 1994). Les spores de ces deux espèces sont reconnues pour être résistantes aux facteurs environnementaux suivants : chaleur, dessiccation, radiation (Cox, 1987 ; Creager et al., 1990).

## II.2. Dangers d'une exposition aux bioaérosols sur la santé humaine

### II.2.1. Généralités

Depuis les années 70, de nombreuses personnes travaillant dans des immeubles de bureaux se sont plaintes d'inconfort ou de symptômes particuliers. Une mauvaise qualité de l'air est le plus souvent à l'origine de ces plaintes. Pourtant, beaucoup de cas semblent avoir une origine plurifactorielle. Ainsi, un groupe de travail de l'OMS a décidé en 1983 d'introduire le SBS (Sick Building Syndrome - Syndrome des Bâtiments Malsains) pour qualifier ces pathologies sans cause attribuable. Le SBS est la pathologie la plus étudiée dans les bâtiments de bureaux. De plus, les nouvelles constructions sont aujourd'hui mieux isolées. Or, une meilleure isolation associée à une mauvaise ventilation peuvent entraîner l'apparition de SBS, en raison notamment d'une augmentation des bioaérosols (en particulier des champignons) (Walinder et al, 2001). Et bien que les bioaérosols soient en concentrations relativement faibles dans l'air par rapport aux particules inorganiques, ils peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et animale (Maus et al., 2001). L'intérêt pour les bioaérosols a ainsi considérablement augmenté ces dernières années car il est désormais prouvé que des expositions trop importantes ou trop longues à des agents biologiques dans les espaces intérieurs peuvent être associées à des problèmes de santé d'une grande variabilité (Douwes et al., 2003). Les maladies générées par une mauvaise qualité de l'air sont communément rangées en trois catégories majeures :

Les maladies infectieuses : les infections proviennent de la pénétration dans le corps d'agents infectieux, issus des microorganismes, par contact direct. C'est aujourd'hui la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité en France. Les principales répercussions sur la santé sont très variables selon l'agent biologique incriminé (localisation, gravité, temps d'apparition). De plus, même si l'infection résulte de l'action d'un microorganisme particulièrement virulent, des genres microbiens opportunistes peuvent s'avérer pathogènes pour des individus affaiblis (Arnou et al., 1991). En exemple, de nombreux problèmes sont survenus lors d'infections par la légionellae (particulièrement *Legionella pneumophila*) qui est une bactérie Gram négatif très virulente. La légionelle peut être très nocive (pneumonies), particulièrement pour des personnes fragiles (personnes âgées, immunodéprimées). Beaucoup d'infections sont provoquées par des microorganismes lorsqu'ils atteignent certains organes respiratoires profonds. Par exemple, la tuberculose, la diphtérie ou la légionellose se transmettent ainsi

(Nevalainen et al., 1993 ; Brousseau et al., 1994 ; Lacey and Dutkiewicz, 1994). Depuis les années 1980, la prévalence des infections fongiques a considérablement augmenté en France.

Les maladies respiratoires : les symptômes respiratoires et les problèmes pulmonaires sont les plus étudiés parmi les effets sur la santé entraînés par la présence d'aérosols (Douwes et al., 2003). En effet, selon leur taille, les particules vont atteindre des zones du système respiratoire plus ou moins profondes :

- de 10 à 30  $\mu\text{m}$  elles resteront dans la zone thoracique, c'est-à-dire qu'elles ne dépasseront pas les fosses nasales et le larynx.
- < 10  $\mu\text{m}$  elles atteignent la zone alvéolaire et sont retenues dans les bronches et la trachée et s'insèrent jusqu'aux petites bronches et alvéoles lorsqu'elles atteignent des tailles < 3  $\mu\text{m}$ .

L'exposition particulière à des bioaérosols peut entraîner les principales pathologies suivantes (Persoons et al., 2010) :

- Réactions irritantes (au niveau des voies inférieures et supérieures du système respiratoire, asthme).
- Réactions inflammatoires (bronchites chroniques).
- Réactions allergiques ou réactions immunoallergiques (rhinites, sinusites, asthme allergique).
- Infections telles que des aspergilloses envers des sujets immunodéprimés (Bünger et al., 2000 ; Douwes et al., 2003 ; Millner et al., 1994).

Les problèmes respiratoires varient de légers symptômes influençant une journée de travail jusqu'aux problèmes chroniques qui imposeront l'intervention d'un spécialiste. Jones (1998) constate que parmi les polluants de l'air des logements qu'il a étudiés, les biocontaminants sont les plus souvent mis en cause dans les cas d'asthmes. En particulier, l'asthme affectait aux Etats-Unis, en 2009, 24,6 millions d'adultes et d'enfants, soit 8,2% de la population. Une sensibilité aux moisissures serait un facteur important chez les patients souffrant d'allergies touchant les voies respiratoires. Elles joueraient un rôle majeur dans le développement, la persistance et la sévérité des problèmes des voies respiratoires inférieures, en particulier de l'asthme (Knutsen et al., 2012). Il s'avère également qu'entre 25 et 30% des cas d'asthme causés par des allergies dans le monde industriel sont la conséquence d'une exposition aux champignons trop importante. Cela affecterait approximativement 6% de la population générale (Horner et al., 1995 ; Kurup, 2003).

Des risques toxiques peuvent également être liés à des composants de microorganismes et sont susceptibles d'engendrer des problèmes respiratoires. Deux sortes de toxines se distinguent :

- Les exotoxines qui sont des molécules protéiques sécrétées par des microorganismes (mycotoxines de certaines moisissures, toxines de tétanos,...) (Balty et al., 2006).
- Les endotoxines (lipopolysaccharides) qui sont des facteurs d'asthme et de problèmes pulmonaires (Douwes and Heederick, 1997). Des sujets déjà sensibles aux problèmes bronchiques et d'asthme ont plus de probabilité de développer des symptômes. Plusieurs études ont suggéré une association causale entre les endotoxines et une augmentation de l'asthme chez les enfants et les adultes (Michel et al., 1996 ; Park et al., 2001).

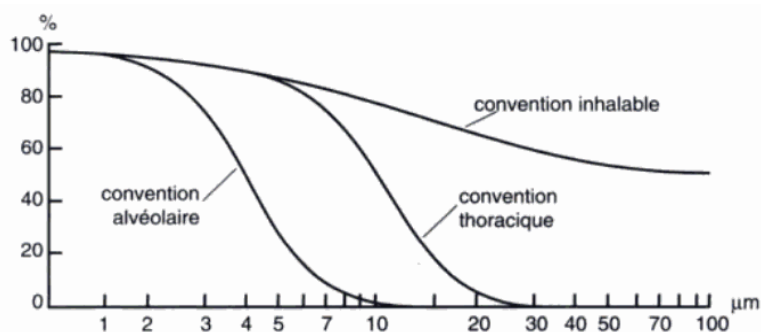
Les cancers : les cancers peuvent être la conséquence d'une variété d'agents biologiques. Les seuls cancérigènes biologiques reconnus sont certaines mycotoxines (Richard et al., 1999 ; Douwes et al., 2003).

#### II.2.2. Danger d'une exposition aux fragments microbiens

En plus des aérosols microbiens et des sous-produits des microorganismes (endotoxines, mycotoxines,...), il ne faut pas négliger les conséquences que provoqueraient l'inhalation de fragments microbiens sur la respiration et la santé. Beaucoup d'études se sont penchées sur l'émission des spores fongiques (Foarde et al., 1999 ; Gorny et al., 2001 ; Pasanen et al., 1991) mais peu se sont intéressées aux fragments de champignons. Or, il s'avère que les particules fines inhalées ( $< 2,5 \mu\text{m}$ ) peuvent avoir des impacts néfastes sur la santé car elles atteignent des parties profondes du système respiratoire (Dockery et al., 1993 ; Levy et al., 2000 ; Schwartz et al., 1996). La fragmentation des champignons peut se déclencher par des procédés biotiques (autolyse fongique, vacuolisation des hyphes,...) ou abiotique (vent, vibration, perturbations mécaniques,...) (Eduard et al., 2012). Une étude de Gorny et al. (2002) met en évidence que des champignons soumis à un flux d'air relarguent une forte proportion de fragments de champignons par rapport aux spores fongiques. La proportion de gros fragments ( $> 2,5\mu\text{m}$ ) peut représenter environ 56% de la totalité des bioaérosols d'origine fongique dans certains environnements (Green et al., 2011).

Par ailleurs, les bioaérosols ont des tailles qui varient entre 0,02 et 100  $\mu\text{m}$  en diamètre. La fraction respirable la plus préoccupante concerne les tailles inférieures à 10  $\mu\text{m}$  (Cox et al.,

1995). Comme l'indique le graphique de la Figure I- 5, ce sont ces particules qui atteignent les zones profondes du système respiratoire. Selon Jones and Cookson (1983), 34 % des bactéries sont associées à la fraction « respirable » des particules ( $D < 8 \mu\text{m}$ ). Tandis que pour les spores fongiques, ce pourcentage varie suivant les espèces, de 56% à 96%.



**Figure I- 5. Courbes conventionnelles CEN (Comité Européen de Normalisation) définissant les fractions de taille des particules exprimées en pourcentage en fonction du diamètre aérodynamique des particules en  $\mu\text{m}$**

### II.2.3. Qualité de l'air et bénéfices économiques

Les dangers potentiels liés à une mauvaise qualité de l'air inhalé sont avérés. Par ailleurs, Wargocki et al. (2003) ont étudié le rapport coût-bénéfice afin d'évaluer l'intérêt financier d'un nouvel investissement pour améliorer la qualité de l'air intérieur des bureaux. Ils en déduisent que les bénéfices issus d'une meilleure productivité des employés lorsque l'air est de meilleure qualité peuvent être 60 fois supérieurs aux coûts engendrés par cette amélioration de la QAI. Le retour sur investissement ne se fait par contre qu'au bout de 2 ans (Wargocki et al., 2003). Encore d'un point de vue économique, Clausen (2004) montre que les filtres colmatés d'un système de ventilation peuvent dégrader la QAI et augmenter la prévalence des symptômes liés à la QAI en diminuant la productivité. Pourtant, aucune norme ou rapport dose-réponse n'a encore été établie en ce qui concerne les bioaérosols. Pour d'autres polluants (chimiques, physiques), des valeurs limites d'exposition (VLE) sont établies. Cet état de fait est principalement dû au manque de méthodes universelles quantitatives des bioaérosols. Il n'y a aucun consensus sur les méthodes à employer pour évaluer les taux d'aérosols microbiens. En effet, l'intérêt pour l'étude des bioaérosols est récent mais en pleine expansion grâce notamment au développement de nouvelles technologies adaptées. De plus, l'air est un milieu très instable pour les microorganismes et sa composition microbienne varie dans une journée ce qui complique les mesures. Et même pour des méthodes bien établies, des variations significatives peuvent être visibles sur les mesures

d'exposition, entre plusieurs laboratoires (Thorne et al., 1997 ; Chunn et al., 2000 ; Reynolds et al., 2002). Les mesures doivent également avoir une très grande sensibilité du fait de la très faible concentration des microorganismes dans l'air.



### III. La ventilation

#### III.1. Généralités sur la ventilation en France

La ventilation a pour objectifs le renouvellement de l'air afin d'introduire de l'air neuf et la réduction des polluants. Des normes et des articles réglementaires définissent des taux de renouvellement d'air suivant différents facteurs : le volume des pièces, le nombre de pièces, le taux d'occupation, l'usage (habitation, local à pollution spécifique, établissement de santé public ou privé,...). La réglementation française impose également la ventilation mécanique contrôlée dans les logements français collectifs ou individuels construits après 1982. De même, le code du travail définit un débit minimal d'air neuf pour des bureaux de 25 m<sup>3</sup>/h/occupant. Cependant, des études ont mis en évidence un manque de connaissances concernant le domaine de la ventilation pour assurer une maîtrise suffisante de la qualité de l'air intérieur. En effet, dans une étude bibliographique portant sur l'association entre la ventilation des bâtiments et la transmission d'infection par voie aérienne, Li et al. (2007) dénombrent 40 études significatives menées entre 1960 et 2005 parmi lesquelles 10 mettent en cause la ventilation des bâtiments comme moyen de transmission d'agents infectieux. Li et al. (2007) mettent également en évidence un manque d'informations quant au minimum de débit de ventilation requis pour enrayer la dispersion d'agent infectieux dans les hôpitaux, les écoles, les bureaux et habitations. En France, des moyens ont été mis en place ces dernières années afin de répondre à de nombreuses questions concernant l'air intérieur. A ce titre, est né l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) qui est un organisme placé sous la tutelle des Ministères en charge de la Construction, de la Santé, de l'Ecologie avec le concours du CSTB (opérateur technique), de l'ADEME, de l'ANSES et de l'ANAHC. L'OQAI réalise actuellement une étude sur l'état de la ventilation dans les bureaux qui complète une précédente étude dont le rapport délivré en 2006 expose les conclusions suivantes (De Beaudoin, 2006) :

- Peu d'études sur les polluants des bureaux ont été réalisées en France
- Certains polluants ont été plus étudiés que d'autres, à savoir les COV et les biocontaminants qui font tout de même partis des paramètres d'intérêt prioritaires à étudier dans les bureaux et qui sont : les COV, les biocontaminants (en lien avec les systèmes de ventilation), les concentrations de particules (en particulier les particules fines), l'ozone qui est un polluant plus spécifique des bureaux car il peut être issu des photocopieuses et/ou imprimantes

- Le dioxyde de carbone est un indicateur intéressant du confinement des pièces
- Les paramètres de confort dont la température et l'humidité relative peuvent être en lien avec des développements de biocontaminants

Des relations ont aussi été proposées entre qualité de l'air et productivité des travailleurs. Seppanen et al. (2004) démontrent dans une étude que l'absentéisme des travailleurs pour raison médicale est moins important lorsque la ventilation est bien entretenue. Zeiler et al. (2009) observent que la qualité thermique de l'air d'une école augmente les performances d'apprentissage des élèves et supposent que la température devrait être au minimum de 24°C.

Des recherches plus précises sur la qualité de l'air, la consommation énergétique, la qualité sanitaire et le confort des occupants sont donc nécessaires. Ainsi, au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, des propositions de valeurs sanitaires sont établies et des réglementations proposées. Le décret n°2011-1728 publié en 2011 impose une surveillance tous les 7 ans de la qualité de l'air à l'intérieur d'établissement recevant du public. Des valeurs de gestion réglementaire établies par le gouvernement français sont proposées pour les substances suivantes : le radon (arrêté du 22 juillet 2004), le CO (arrêté du 15 septembre 2009), l'amiante (article R1334-18 du code de la santé publique).

En plus de ces valeurs de gestion réglementaire, des valeurs de gestion provisoires sont également suggérées pour des substances telles que le formaldéhyde, le benzène, l'ozone,... Ces valeurs sont accessibles dans un guide publié en 2010 par la direction générale de la santé (DGS) et l'institut de veille sanitaire (INVS), portant sur la gestion de la qualité de l'air intérieur dans les établissements recevant du public.

Des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) définissent aussi des concentrations de polluants dans l'air auxquelles le travailleur ne doit pas être exposé. Ces valeurs sont fixées par le ministère chargé du travail. Ces valeurs sont accessibles dans un tableau récapitulatif des VLEP et publié par l'INRS (INRS, 2012). L'INRS a également publié le guide pratique de la ventilation, spécifique aux environnements de travail (INRS, ED 695).

Enfin, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail) a défini entre 2007 et 2011 des valeurs guides pour des substances qui ont été identifiées comme prioritaires. Ces valeurs guides de qualité de l'air intérieur doivent être atteintes pour protéger la santé des personnes et ne sont fondées que sur des critères sanitaires. Elles sont données sous forme de concentrations associées à des durées d'exposition à ne pas dépasser. Lorsque les valeurs sont sans seuil de dose identifié, des valeurs issues d'extrapolations sont exprimées sous forme de concentration associée à une

probabilité de survenue de l'effet. Le Tableau I- 1 regroupe les VGAI des substances jugées prioritaires.

**Tableau I- 1. Valeurs guides de la qualité de l'air intérieur publiées par l'ANSES**

Substances	VGAI proposées
Formaldéhyde	- VGAI court terme : 50 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition de 2h - VGAI long terme : 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition supérieure à un an
Monoxyde de carbone (CO)	VGAI court terme : - 10 $\text{mg.m}^{-3}$ pour une exposition de 8 h - 30 $\text{mg.m}^{-3}$ pour une exposition d'1 h - 60 $\text{mg.m}^{-3}$ pour une exposition de 30 min - 100 $\text{mg.m}^{-3}$ pour une exposition de 15 min
Benzène	- VGAI court terme : 30 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition d'une journée à 14 jours - VGAI intermédiaire : 20 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition de plus de deux semaines à un an - VGAI long terme : * 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition supérieure à un an * 0,2 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition vie entière correspondant à un excès de risque de $10^{-6}$ * 2 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition vie entière correspondant à un excès de risque de $10^{-5}$
Naphtalène	- VGAI long terme : 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition supérieure à un an
Trichloréthylène	- VGAI intermédiaire : 800 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition de plus de deux semaines à un an - VGAI long terme : * 2 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition vie entière correspondant à un excès de risque de $10^{-6}$ * 20 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition vie entière correspondant à un excès de risque de $10^{-5}$
Tétrachloroéthylène	- VGAI court terme : 1380 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition de 1 à 14 jours - VGAI long terme : 250 $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition supérieure à un an
Particules (PM <sub>2,5</sub> et PM <sub>10</sub> )	Pas de VGAI proposées
Acide cyanhydrique	Pas de VGAI proposées

L'Anses ne propose pas de VGAI pour les particules de l'air intérieur mais recommande de suivre les valeurs guides de l'OMS (Afsset, 2009) :

- Sur 24 heures : 25  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour les PM<sub>2,5</sub> et 50  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour les PM<sub>10</sub>
- Sur le long terme : 10  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour les PM<sub>2,5</sub> et 20  $\mu\text{g.m}^{-3}$  pour les PM<sub>10</sub>

La qualité de l'air intérieur et la maîtrise d'une bonne ventilation adaptée aux différents besoins (hôpitaux, écoles, bureaux, logements, véhicules,...) représentent un enjeu primordial pour l'avenir. Augmenter les débits de ventilation dans le but de réduire les polluants à l'intérieur des bâtiments n'est pas la solution idéale aux problèmes d'air intérieur (Rim et al., 2010). En effet, les systèmes de traitement de l'air des bâtiments sont des grands consommateurs d'énergie ce qui représente un coût financier important. Plus précisément, le secteur du bâtiment consomme environ 40% de l'énergie totale en France tandis que la ventilation peut représenter une grande part de cette consommation. Aussi, une bonne

connaissance des sources de pollutions et de l'air intérieur permettra d'établir des solutions de ventilation et de traitement plus adéquates.

### III.2. Les systèmes de ventilation

Différents systèmes de ventilation existent et en particulier :

La ventilation naturelle consiste à renouveler l'air par des ouvertures disposées stratégiquement dans les bâtiments et par l'ouverture régulière des fenêtres. Le taux de renouvellement de l'air dépend de la taille et de la distribution des ouvertures dans le bâtiment, des gradients de température et du vent.

La ventilation mécanique contrôlée (VMC) maintient un débit de ventilation sous toutes les conditions météorologiques et sans faire intervenir les occupants à l'intérieur. La ventilation simple flux et la ventilation double flux se distinguent.

- Le principe de la VMC simple flux consiste à introduire un balayage de l'air des pièces les moins polluées vers celles les plus polluées ou humides ainsi que des entrées d'air neuf dans les pièces principales et des bouches d'extraction dans celles qui sont les plus polluées où l'air vicié est extrait par un ventilateur actionné par un moteur. La Figure I- 6 illustre ce principe de VMC simple flux.

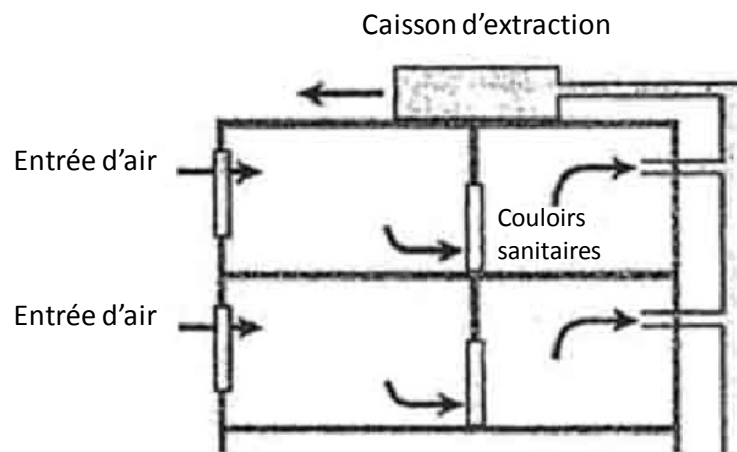


Figure I- 6. Schéma de principe d'un VMC simple flux (source : ANAH).

- La VMC double flux illustrée en Figure I- 7 est généralement réservée aux installations de taille importante avec une occupation variable. A la différence d'une VMC simple flux, l'air entre par des bouches d'insufflation et est distribué dans les pièces par des conduits après avoir été filtré. L'air neuf est également réchauffé par la récupération des calories de l'air extrait. Ainsi, un échangeur air/air est compris

dans les VMC double flux pour économiser de l'énergie de chauffage. Un recyclage partiel de l'air peut aussi être effectué. Des opérations de maintenance régulières sont nécessaires (nettoyage des bouches d'extraction, nettoyage des filtres, ramonage régulier des conduits,...)

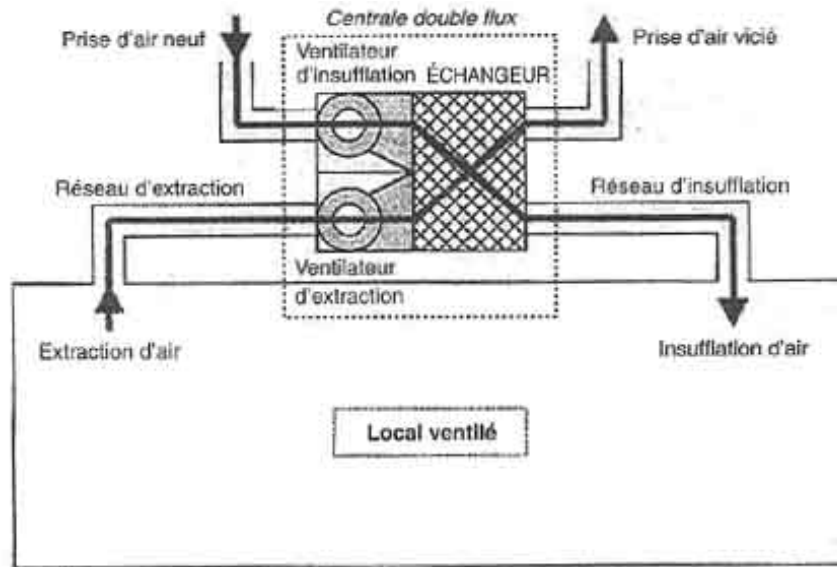


Figure I- 7. Schéma d'une installation VMC double flux avec échangeur (source : ADEME)

La ventilation à partir d'une Centrale de Traitement de l'Air (CTA) offre un renouvellement de l'air dans les pièces des bâtiments, ainsi que son conditionnement selon des critères de température et d'humidité souhaités.

### III.3. Centrale de Traitement de l'Air

#### III.3.1. Description

De nombreux bâtiments du secteur tertiaire de taille conséquente sont équipés d'une Centrale de Traitement de l'Air comprenant une étape de filtration, essentielle pour la capture des aérosols, ainsi que des étapes de climatisation et/ou chauffage et d'humidification. La Figure I- 8 schématise un exemple type de CTA.

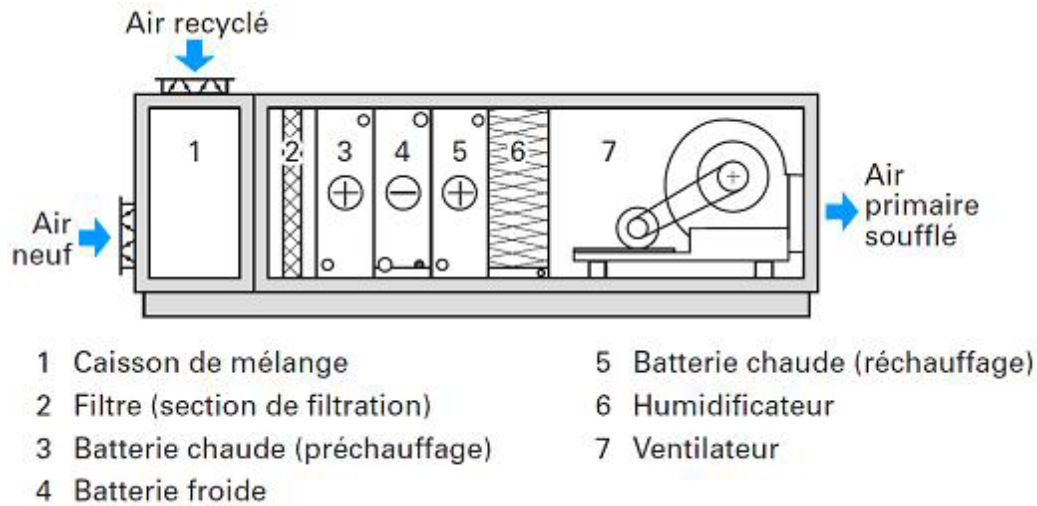


Figure I- 8. Composition d'une centrale de traitement de l'air (Bailly et al., 2001b).

Les CTA ont été conçues pour délivrer de l'air neuf à l'intérieur des bâtiments tout en assurant le confort des occupants (température, humidité) et en réduisant la concentration des particules de l'air extérieur. Ainsi, leurs débits (généralement entre 20 et 30 m<sup>3</sup>/h/personne) sont supérieurs aux débits des autres systèmes de ventilation pour un plus grand confort des occupants. La plupart des CTA comprennent deux étages de filtration qui ont les deux fonctions suivantes :

- Protéger les organes de la CTA de l'encrassement
- Délivrer dans le bâtiment un air dépourvu de particules en suspension

Les CTA se divisent en 2 catégories : les centrales « tout air neuf » fournissant de l'air traité provenant uniquement de l'extérieur des bâtiments. Une partie de l'air vicié en provenance des locaux peut être réutilisée dans une étape de préchauffage de l'air extérieur par un échangeur air/air, ce qui offre des gains en énergie importants. Il existe aussi des centrales « mixtes » traitant de l'air neuf et recyclant une partie de l'air vicié provenant des locaux afin de le traiter pour le souffler à nouveau dans les pièces du bâtiment ventilé.

### III.3.2. Les inconvénients des CTA

Les CTA ont donc un grand intérêt, que ce soit dans le secteur de l'industrie, dans le milieu hospitalier ou encore dans le secteur tertiaire. Néanmoins, les systèmes de ventilation peuvent devenir source de contamination en particulier lorsque ceux-ci sont mal entretenus. Dans un rapport de l'OMS, les informations suivantes ont été délivrées à partir d'une étude bibliographique (WHO, 2009) :

- La ventilation a la capacité de diluer les virus et agents infectieux en suspension dans l'air. Un taux de ventilation plus important peut réduire les maladies causées par des agents infectieux (Fisk et al., 2002; Li et al., 2007)
- Des microorganismes peuvent croître sur des organes d'une CTA : serpentin de refroidissement, pare gouttelette, humidificateur et tour de refroidissement. Cela peut avoir pour conséquences d'engendrer des problèmes respiratoires ou des symptômes de la maladie du légionnaire, ou de la fièvre des humidificateurs (Flannigan and Morey, 1996)
- Des taux de ventilation inférieurs à  $10 \text{ L.s}^{-1}$  ( $36 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ ) par personne dans les bureaux augmenteraient significativement la fréquence des problèmes de santé et de mauvaise perception de la qualité de l'air (Seppanen, Fisk, Mendell, 1999). En revanche, des taux de ventilation compris entre  $10$  et  $20 - 25 \text{ L.s}^{-1}$  ( $36$  et  $72 - 90 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ ) par personne diminueraient la fréquence des SBS et amélioreraient la perception de la qualité de l'air par les employés (Seppanen et al., 1999 ; Sundell and Levin, 2007)
- Une meilleure ventilation a pour effet une meilleure productivité des employés et une meilleure exécution des tâches de leur part (Seppanen et al., 2006)
- En comparaison avec les cas de ventilation naturelle, les systèmes d'air conditionné sont statistiquement plus fréquemment associés à un ou plusieurs SBS dans les bureaux (Seppanen and Fisk, 2002)
- L'humidité de l'air dans un bâtiment est fortement liée au taux de ventilation de ce bâtiment. Or, des taux d'humidité relative élevés entraînent des croissances fongiques et bactériennes plus fréquentes (Institute of Medicine, 2004)
- Des microorganismes pathogènes peuvent être transportés par des systèmes de ventilation. Or, des données manquent pour établir des taux de ventilation minimaux adaptés dans les écoles, hôpitaux et bureaux en lien avec la dispersion des agents infectieux (Li et al., 2007)

Ainsi, différents éléments peuvent engendrer une dégradation de la qualité de l'air traité par une CTA et en particulier en ce qui concerne l'aspect microbien de l'air : les organes d'une CTA dont les filtres, ainsi que la maintenance et la gestion de la CTA.

- Des organes de CTA favorisant une pollution microbienne :

Plusieurs composants des CTA contribuent à baisser le taux de microorganismes ou au contraire favorisent leur développement selon la qualité du matériel utilisé et les conditions de sa maintenance. La filtration et l'humidification sont des éléments très importants et critiquables en raison de leur influence vis à vis des champignons présents dans l'air. Tout d'abord, une mauvaise efficacité des filtres ne permet pas d'arrêter les particules les plus fines comme peuvent l'être les microorganismes et un humidificateur pollué délivrera en continu un air humide pollué (Burge et al., 1985). Notamment, les systèmes d'air conditionné où des microorganismes se sont développés peuvent être responsables d'asthme (Burge et al., 1985), d'hypersensitivité pulmonaire ou de fièvre (Baur et al., 1988 ; Woodward et al., 1988). Selon Li et al. (2007), il y a une forte corrélation entre les systèmes de ventilation dans les bâtiments et la dispersion de maladies infectieuses. Les auteurs affirment que des données font encore défaut pour établir des règles minimales de ventilation dans les hôpitaux, les bureaux, les écoles. Le rapport de Parat et al. (2004) sur l'aérobiocontamination due à la climatisation évoque les sources potentielles de cette contamination. Les microorganismes proviennent de l'air extérieur (notamment pour les moisissures *Cladosporidium* ou *Alternaria*), de l'air intérieur (surtout pour les bactéries apportées par les Hommes, ou certaines moisissures qui prolifèrent sur les matériaux ou les revêtements comme *Aspergillus* ou *Cladosporidium*), ou des systèmes de climatisation eux-mêmes où une prolifération microbienne peut se produire (bactérie Gram négatif et Actinomycètes thermophiles). Ces proliférations de moisissures ou de bactéries dans les systèmes de climatisation peuvent être à l'origine des pics de contamination de l'air intérieur et de l'apparition de troubles chez les occupants (pathologies infectieuses, allergies, troubles directement liés aux toxines...). Enfin, Chow et al. (2005) ont analysé chaque partie d'un système d'air conditionné à ventilation mécanique (MVAC) : la chambre de mélange, les serpentins de refroidissement et la sortie d'air. Il apparaît que les plus fortes contaminations proviennent de la chambre de mélange, où se rencontrent air intérieur et air extérieur. De plus, l'intensité de la contamination au niveau de la sortie d'air est plus importante le lundi matin à la remise en route du système. Mendell et al. (2003) ont montré grâce à des régressions logistiques sur des données prélevées en 1993 par le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), que les infections des voies respiratoires inférieures sont très fortement associées à deux facteurs de risque de contamination microbiologique : un mauvais drainage des réservoirs des climatisations et la



présence de débris dans l'air entrant. L'association est encore plus dangereuse pour des sujets ayant des antécédents asthmatiques.

- Les filtres devenant porteurs d'une pollution microbienne :

L'efficacité des systèmes de ventilation quant à la réduction des particules provenant de l'extérieur a été démontrée dans plusieurs études. Sawant et al. (2004) ont étudié les ratios entre les concentrations massiques des  $PM_{2,5}$  (particules en suspension ayant un diamètre  $< 2,5 \mu m$ ) à l'intérieur et à l'extérieur de résidences et d'écoles. Ils obtiennent un ratio moyen de 0,87 pour les résidences et de 0,38 pour les écoles. Ils concluent que la CTA et l'étape de la filtration est l'élément principal permettant d'obtenir un ratio de 0,38 dans les écoles. Vincent et al. (1997) a mesuré les  $PM_8$ , proches des  $PM_{10}$ , dans 133 bureaux parisiens aux différentes configurations de ventilation. Les concentrations moyennes obtenues dans les bureaux ventilés naturellement sont de  $137 \mu g.m^{-3}$  tandis que dans les bureaux équipés d'une ventilation mécanique contrôlée elle s'élève à  $93,5 \mu g.m^{-3}$ . Jamriska (2000) cité dans un rapport réalisé par l'ANSES (Afsset, 2009) attribue aux systèmes de conditionnement d'air associés à une étape de filtration une réduction d'environ 34% des particules ultrafines (particules dont le diamètre est inférieur à 100 nm) dans un bâtiment dans le cas d'une filtration classique (et 80% avec l'utilisation d'électrofiltre). De plus, la filtration de l'air dans les CTA contribue à assurer une bonne qualité de l'air et permet de réduire les coûts d'exploitation et de maintenance des autres organes de la CTA. La filtration limite la présence de particules dans la CTA et aide à préserver le niveau de performances aérauliques et thermiques des différents organes de cette dernière (Bluyssen et al., 2001). Bekö et al. (2008) ont évalué les bénéfices financiers acquis par une filtration de l'air alimentant un bureau. Ils observent que la réduction des particules dans l'air a plusieurs avantages financiers :

- Cela permet tout d'abord de réduire l'absentéisme des employés et d'en améliorer leur productivité. Bekö et al. (2008) citent à ce propos l'étude de Wyon et al. (2000) dans laquelle ils estiment que le remplacement dans une CTA d'un filtre encrassé par un filtre neuf permet d'améliorer la productivité de 5,7%
- L'action d'un pré- filtre permet de réduire l'encrassement des composants de la CTA et ainsi d'obtenir une réduction de 5% à 60 % des coûts d'entretien de la CTA

Néanmoins, des études ont montré que le SBS est plus souvent présent dans les bâtiments ventilés par air conditionné que dans ceux ventilés naturellement (Mendell and

Smith, 1990 ; Seppänen and Fisk, 2002). En particulier, les filtres utilisés dans les unités de traitement de l'air capturent des microorganismes qui peuvent ensuite les coloniser (Bonnevie-Perrier et al., 2008 ; Kelkar et al., 2005 ; Price et al., 1994). La composition des fibres des filtres peut également favoriser la colonisation de ces mêmes filtres par des microorganismes, comme l'ont montré Simmons et al. (1997) dans le cas des fibres de cellulose. Après filtration, des microorganismes seraient susceptibles d'être réentraînés dans l'air traité par relargage ou encore diminueraient l'efficacité de capture des filtres (Bonnevie Perrier et al., 2008 ; Verdenelli et al., 2003).

- Influence de la maintenance et de la gestion de la CTA

Des problèmes d'infection peuvent apparaître si les systèmes de ventilation sont mal conçus ou mal entretenus (Mendell et al., 2003). Seppanen and Fisk (2004) ont réalisé une étude définissant les liens entre la ventilation et les infections du système respiratoire. Ils ont montré que la ventilation, lorsqu'elle était bien entretenue, pouvait réduire la prévalence des infections respiratoires dues à l'air, et par là même, le nombre de jours d'absentéisme. Cependant, les auteurs soulignent que les systèmes de ventilation peuvent créer une dépression dans le bâtiment en entraînant une séquestration des polluants à l'intérieur de celui-ci. Un projet européen nommé AIRLESS a été mené entre 1998 et 2000 par 12 instituts (universités, industries) de 7 pays européens. L'objectif de ce programme était de développer des stratégies, principes et protocoles permettant d'améliorer le contrôle et les performances des systèmes de CTA. Selon l'étude, les facteurs favorisant un développement microbien et à surveiller au sein de la CTA étaient : l'humidité en priorité, la vitesse du flux, le type et la classe des filtres utilisés, l'emplacement du filtre et la durée d'exposition (Bluyssen et al., 2003).

## IV. Filtration particulière sur média fibreux

Le procédé le plus répandu pour la capture des particules en traitement de l'air est la filtration sur média fibreux, du fait de ses performances, de son faible coût et de sa facilité d'adaptation à des problématiques différentes. (Rault, 1991 ; Bemer et al., 2006).

### IV.1. Filtration des aérosols

Le comportement d'un filtre lors du dépôt de particules comprend généralement deux phases distinctes (Renoux and Boulaud, 1998) :

- Une phase "stationnaire" lors de laquelle l'efficacité et la perte de charge du filtre ne varient pas ou peu au cours de cette étape. En effet la capture des particules est encore suffisamment négligeable pour ne pas modifier la structure du filtre ; les particules sont déposées sur les fibres du média.
- Une phase "dynamique" (ou "non stationnaire") correspondant au colmatage du filtre. La capture des particules modifie la structure du filtre faisant varier son efficacité de collecte et sa perte de charge au cours du temps.

#### IV.1.1. Caractérisation des performances d'un média fibreux lors de la phase stationnaire

Les propriétés de structure du filtre, la taille des particules collectées et l'écoulement de l'air (vitesse, régime,...) influent sur la capacité d'un média fibreux à collecter des particules (Davies, 1973 ; Brown, 1993). Les performances d'un filtre, définies selon sa perte de charge et son efficacité de collecte globale, sont alors déterminées à partir de ces paramètres.

Après avoir défini les différents régimes d'écoulement de l'air au sein d'un filtre, il est possible d'en déduire la perte de charge générée ainsi que l'efficacité de collecte selon les propriétés de structure du média et les caractéristiques de l'écoulement. En effet, la filtration particulière a lieu en régime laminaire visqueux. L'efficacité de collecte peut être établie à partir des différents mécanismes de collecte des particules appliqués dépendant directement de leur diamètre.

##### IV.1.1.1. Ecoulement dans un média fibreux

La nature de l'écoulement d'un fluide au sein d'un média fibreux peut être définie à partir du calcul du nombre adimensionnel de Reynolds qui est décrit comme le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses (principales forces agissant sur un élément de fluide).

Il permet de distinguer le régime laminaire, caractérisé par une résistance du fluide uniquement due à la viscosité, du régime turbulent caractérisé par l'apparition de petits tourbillons dissipant l'énergie cinétique du fluide (effets d'inertie) (Carman, 1961).

En fonction de la porosité  $\varepsilon$  du média fibreux, l'écoulement est décrit (Mauret and Renaud, 1997) :

- soit comme un écoulement au travers de canaux tortueux, pour  $\varepsilon < 0,8$ , auquel cas un nombre de Reynolds de pores se calcule selon la formule suivante :

$$Re_{pores} = \frac{\rho v}{(1 - \varepsilon_i) \mu S_f} \quad (I-1)$$

- soit comme un écoulement autour d'objets isolés (fibres), pour  $\varepsilon > 0,8$ , auquel cas le nombre de Reynolds de fibres se calcule comme suit :

$$Re_f = \frac{\rho d_f v}{\mu \varepsilon_i} \quad (I-2)$$

$\rho$  correspondant à la masse volumique du fluide ( $\text{kg.m}^{-3}$ ),  $d_f$  au diamètre de fibres (m),  $v$  à la vitesse frontale ( $\text{m.s}^{-1}$ ),  $\mu$  à la viscosité dynamique du fluide (Pa.s) et  $\varepsilon_i$  à la porosité inter-fibres (-).  $S_f$  représente la surface spécifique des fibres qui correspond au rapport entre la surface externe d'une fibre et son volume ( $\text{m}^{-1}$ ).

$$S_f = \frac{4}{d_f} = \frac{4\varepsilon_i}{(1 - \varepsilon_i)d_{pores}} \quad (I-3)$$

Les valeurs limites des nombres de Reynolds pour chaque type de régime sont présentées dans le Tableau I- 2.

**Tableau I- 2. Limites des différents régimes d'écoulement**

Régimes d'écoulement distingués			Références
Laminaire	Intermédiaire	Turbulent	
$Re_{pores} < 1-10$ (linéaire)			Seguin <i>et al.</i> (1998) Comiti <i>et al.</i> (2000)
$1-10 < Re_{pores} < 150-180$ (non-linéaire)	$150-180 < Re_{pores} < 900$	$Re_{pores} > 900$	
$Re_f < 0,2 - 1$	$0,2 - 1 < Re_f < 1000$	$Re_f > 1000$	Davies (1973) Dullien (1989) Renoux and Boulaud (1998)

Dans le cas d'un écoulement en régime laminaire dans un milieu poreux, deux cas sont distingués. Lorsque le nombre de Reynolds est faible ( $Re_{pores} < 1 - 10$ ) une relation linéaire entre la vitesse de filtration et le gradient de pression est observée. Tandis que lorsque le

nombre de Reynolds augmente ( $1 - 10 < Re_{\text{pores}} < 150 - 180$ ), un terme non linéaire doit être ajouté (Comiti et al., 2000).

Dans le cas d'un régime laminaire et lorsque le nombre de Reynolds de fibres est inférieur à 0,2, l'écoulement est considéré comme purement visqueux.

Différents modèles sont proposés pour évaluer l'écoulement dans un filtre. Cependant, les diamètres de fibres sont souvent variés et les arrangements de fibres aléatoires. C'est pourquoi ces nombreux modèles s'appliquent sur un réseau de fibres idéalisé. Les modèles sont alors répertoriés en trois catégories selon Thomas (2001) (Joubert, 2009):

- Les modèles théoriques considérant un écoulement parallèle aux fibres
- Les modèles théoriques considérant un écoulement perpendiculaire aux fibres
- Les modèles empiriques considérant un écoulement à travers un arrangement aléatoire de fibres

#### IV.1.1.2. Perte de charge d'un filtre vierge

La perte de charge  $\Delta P$  caractérise la différence entre les pressions statiques en amont et en aval d'un filtre :

$$\Delta P = P_{\text{amont}} - P_{\text{aval}} \quad (\text{I-4})$$

La perte de charge générée par un matériau poreux traduit sa résistance à l'écoulement du fluide qui le traverse. Dans le cas d'un régime d'écoulement laminaire ou intermédiaire, cette perte de charge peut être exprimée en fonction de la vitesse frontale de l'air par une équation très générale du type (Reynolds, 1900) :

$$\Delta P = X \mu v + Y \rho v^2 \quad (\text{I-5})$$

Avec :  $X (\text{m}^{-1})$  et  $Y (-)$  : coefficients de l'équation

Selon cette expression, la perte de charge dans le milieu poreux est la somme d'un terme linéaire lié aux effets de la viscosité et d'un terme quadratique dû à la dissipation d'énergie sous l'action des forces d'inertie (Carman, 1961). Le rapport  $e / X$  (avec  $e$  l'épaisseur de média) représente le coefficient de perméabilité du média. Les coefficients  $X$  et  $Y$  peuvent être exprimés en fonction des propriétés de structure du milieu considéré. Différentes expressions de la perte de charge en fonction des hypothèses faites sur la représentation du matériau et du régime d'écoulement sont proposées. Thomas (2001) cité par Joubert (2009) compare différents modèles à des données expérimentales. Il constate qu'aucun modèle ne permet d'observer l'ensemble des valeurs expérimentales. Ces modèles ne prennent pas en

considération la polydispersion des fibres. Il conclut donc que les fibres ne peuvent pas être uniquement caractérisées par un diamètre moyen.

Seul le modèle empirique de Davies (1973) encore en usage aujourd'hui sera cité (Joubert, 2009):

$$\Delta P = 64\alpha^{\frac{3}{2}}(1 + 56.\alpha^3).\mu.v.\frac{e}{d_f^2} \quad (\text{I-6})$$

$d_f$  correspondant au diamètre des fibres,  $\alpha$  à la compacité ( $\varepsilon = 1 - \alpha$ ),  $v$  à la vitesse de filtration et  $e$  à l'épaisseur du média.

#### *IV.1.1.3. Efficacité de filtration d'un filtre vierge selon les différents mécanismes de capture des particules*

##### a) Mécanismes de capture des particules par filtration sur média fibreux

La capture de particules par un média fibreux est régie par différents mécanismes dont les principaux sont les suivants : la diffusion brownienne, l'interception directe et l'impaction inertielle. Seuls les modèles utilisés dans la suite du travail sont présentés ci-après.

**La diffusion brownienne** est un mécanisme s'appliquant majoritairement aux particules de petite taille ( $d_p < 0,1 \mu\text{m}$ ) qui possède une dimension de l'ordre du libre parcours moyen des molécules du gaz porteur, en l'occurrence de l'air. Elles sont agitées par le mouvement brownien qui les dévie des lignes de courant porteur vers les fibres du filtre. Ces particules possèdent une masse tellement faible que des collisions avec les molécules du gaz porteur peuvent perturber leur trajectoire (Renoux and Boulaud, 1998). La Figure I- 9 illustre ce mécanisme.

Le mouvement des particules par diffusion brownienne est défini à partir d'un coefficient de diffusion brownienne  $D$ .

$$D = \frac{kTCu}{3\pi\mu d_p} \quad (\text{I-7})$$

$k$  correspondant à la constante de Boltzmann ( $k = 1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $T$  à la température du milieu,  $Cu$  au coefficient de correction de Cunnigham,  $\mu$  à la viscosité dynamique du fluide, et  $d_p$  au diamètre des particules.

Le coefficient de Cunningham  $Cu$  est un facteur correctif permettant de prendre en compte l'aspect non continu d'un milieu gazeux vis-à-vis de très fines particules, lorsque leur taille est proche de la valeur du libre parcours moyen du gaz.

Buckley and Loyalka (1989) cité dans Bémer and Muller (1997) propose l'expression (I-7):

$$Cu = 1 + Kn_p [1,155 + 0,471 \cdot \exp\left(-\frac{0,596}{Kn_p}\right)] \quad (I-8)$$

Le coefficient de Cunningham  $Cu$  dépend du nombre de Knudsen de particules calculé par la relation :

$$Kn_p = \frac{2\lambda}{d_p} \quad (I-9)$$

$\lambda$  étant le libre parcours moyen des molécules de gaz ( $\lambda = 6,4 \cdot 10^{-8}$  m à température et pression normales)

A partir de ces expressions, l'efficacité unitaire de collecte des particules par l'effet de la diffusion brownienne est déterminée en fonction d'un paramètre adimensionnel, le nombre de Peclet  $Pe$  :

$$Pe = \frac{d_f U}{D} \quad (I-10)$$

$d_f$  correspond au diamètre d'une fibre du filtre et  $U$  à la vitesse interstitielle dans le filtre.

Plusieurs modèles définissant l'efficacité unitaire de filtration par diffusion brownienne existent dans la littérature. Nous retiendrons le modèle de Liu and Rubow (1990) proposé à partir des travaux de Lee and Liu (1982a, 1982b) et cité dans Renoux and Boulaud (1998) :

$$\eta_d = 1,6 \left(\frac{1 - \alpha}{Ku}\right)^{1/3} Pe^{-2/3} Cd \quad (I-11)$$

$Ku$  étant le facteur hydrodynamique de Kuwabara (1959) cité par Joubert (2009) :

$$Ku = \alpha - 0,5 \ln \alpha - 0,25 \ln \alpha^2 - 0,75 \quad (I-12)$$

Cette expression considère le régime d'écoulement continu autour de fibres représenté en ensemble de cylindres.

$C_d$  est un facteur correctif défini ainsi :

$$C_d = 1 + 0.388Kn_f \left[ \frac{(1 - \alpha)Pe}{Ku} \right]^{1/3} \quad (I-13)$$

$Kn_f$  caractérise le nombre de Knudsen relatif à la fibre et qui prend en compte la possibilité de fibres de diamètre inférieur au libre parcours moyen des molécules du gaz porteur  $\lambda$ . Il est exprimé selon la relation :

$$Kn_f = \frac{2\lambda}{d_f} \quad (I-14)$$

Payet et al. (1992) ont introduit un autre facteur correctif à partir de leurs travaux expérimentaux :

$$Cd' = \frac{1}{1 + \eta_d} \quad (I-15)$$

L'expression de l'efficacité unitaire de filtration par le mécanisme de diffusion brownienne retenu pour la suite de ces travaux est le suivant :

$$\eta'_d = 1,6 \left( \frac{1 - \alpha}{Ku} \right)^{1/3} Pe^{-2/3} CdCd' \quad (I-16)$$

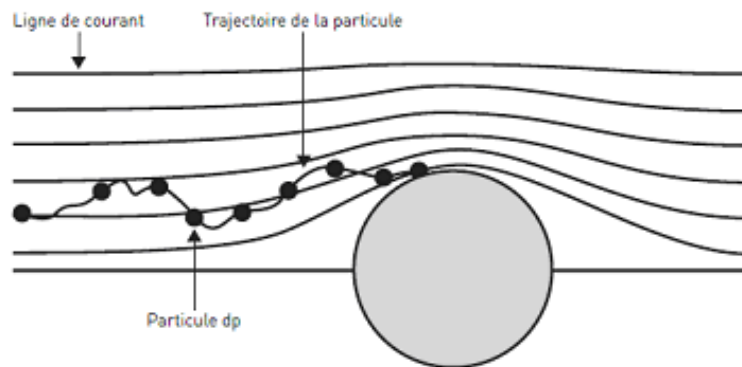


Figure I- 9. Mécanismes de capture des particules sur une fibre par effet de diffusion (Bemer et al., 2006).

**L'interception directe** concerne les particules de taille supérieure à  $0,1 \mu\text{m}$ . En raison de sa faible inertie, une particule suit les lignes de courant qui contournent les fibres. Elle sera alors interceptée lorsque la distance de la particule par rapport à la surface de la fibre est inférieure à son rayon. Le nombre adimensionnel associé à ce mécanisme est le rapport  $R = d_p/d_f$ .



Plusieurs modèles définissant l'efficacité unitaire de filtration par interception directe existent dans la littérature. En exemple, Liu and Rubow (1990) proposent un modèle de calcul de l'efficacité unitaire de collecte des particules par interception directe à partir des travaux de Lee and Liu (1982a, 1982b) et est cité dans Renoux and Boulaud (1998):

$$\eta_r = 0,6 \left( \frac{1 - \alpha}{Ku} \right) \frac{R^2}{1 + R} C_r \quad (\text{I-17})$$

$C_r$  est un facteur correctif défini ainsi :

$$C_r = 1 + \frac{1,996Kn_f}{R} \quad (\text{I-18})$$

**L'impaction inertielle** ne concerne que les particules de diamètre supérieur à 1  $\mu\text{m}$  et ayant suffisamment d'inertie pour quitter les lignes de courant qui contournent la fibre et pour s'y impacter. Le nombre adimensionnel associé à ce mécanisme est le nombre de Stokes ( $Stk$ ) qui définit le rapport entre la distance d'arrêt d'une particule et une longueur caractéristique de l'obstacle (Renoux and Boulaud, 1998).

Le nombre de Stokes est évalué selon l'équation suivante :

$$Stk = \frac{Cu \cdot \rho_p \cdot U \cdot d_p^2}{18\mu \cdot d_f} \quad (\text{I-19})$$

$\rho_p$  correspondant à la masse volumique des particules.

Parmi plusieurs expressions de l'efficacité unitaire de collecte par impaction inertielle proposées dans la littérature, Gougeon et al. (1996), cité dans Renoux and Boulaud (1998), proposent suite à une étude critique des différents modèles :

$$\eta_I = \frac{0,0334Stk^{3/2}}{1 + 0,0334Stk^{3/2}} \quad (\text{I-20})$$

La Figure I- 10 schématise la collecte de particules par les mécanismes d'interception directe et d'impaction inertielle.

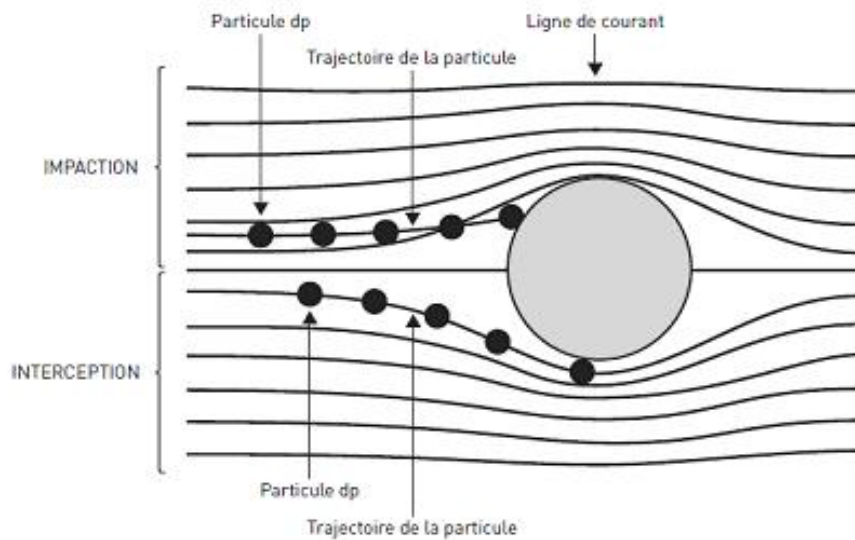


Figure I- 10. Mécanismes de capture des particules sur une fibre par effet d'interception directe et d'impaction inertielle (Bemer et al., 2006).

En plus de ces principaux mécanismes de capture, des forces électrostatiques peuvent intervenir et modifier l'efficacité globale de filtration d'un média. **Les forces électrostatiques** s'appliquent lorsque les fibres du filtre et/ou les particules sont porteuses de charges. Les forces électrostatiques peuvent alors dévier les particules de leurs trajectoires vers les fibres collectrices.

Dans le cas où des effets électrostatiques interviennent, il faut aussi tenir compte de l'efficacité unitaire  $\eta_{\text{elec}}$  de capture résultant de l'application des forces suivantes :

- ✓ La force de polarisation dans le cas où les fibres sont chargées et les particules neutres ( $f_c/P_0$ )
- ✓ La force image lorsque les particules sont chargées et les fibres neutres ( $P_c/f_0$ )
- ✓ La force coulombienne dans le cas où les particules et les fibres sont chargées ( $P_c/f_c$ )

Plusieurs modèles théoriques caractérisant l'efficacité unitaire de collecte des particules par des effets électrostatiques sont également proposés dans la littérature. Ils font intervenir des nombres adimensionnels pour chacune des trois forces. Mouret (2008) résume quelques modèles dans sa thèse :

Tableau I- 3. Expression des efficacités unitaires de collecte par effet électrostatique  $\eta_{\text{élec}}$  (Mouret, 2008)

Auteurs	$\eta_{\text{élec}}$	Nombre adimensionnel
Forces image		
Lundgren et Whitby (1965)	$\eta_{0q} = 1,5N_{0q}^{1/2}$	$N_{0q} = \left( \frac{\varepsilon_f - 1}{\varepsilon_f + 1} \frac{q^2 Cu}{12\pi^2 \mu U \cdot \varepsilon_0 \cdot d_p \cdot d_f^2} \right)$
Yoshioka et al. (1968)	$\eta_{0q} = 2,3N_{0q}^{1/2}$	
Forces de polarisation		
Stenhouse (1974)	$\eta_{q0} = 0,84N_{q0}^{0,75}$	$N_{q0} = \left( \frac{\varepsilon_p - 1}{\varepsilon_p + 2} \right) \frac{\lambda_f^2 d_p^2 Cu}{3\pi^2 \mu U \cdot \varepsilon_0 \cdot d_f^3}$
Kraemer et Johnstone (1955)	$\eta_{q0} = \left( \frac{3\pi}{2} \right)^{1/3} N_{q0}^{0,75}$	
Forces coulombiennes		
Kraemer et Johnstone (1955)	$\eta_{qq} = \pi \cdot N_{qq}$	$N_{qq} = \frac{\lambda_f q Cu}{3\pi^2 \mu U \cdot \varepsilon_0 \cdot d_p \cdot d_f}$

b) Efficacité globale de filtration d'un filtre vierge

L'efficacité fractionnelle de filtration d'un média fibreux correspond à l'efficacité de capture définie pour un diamètre de particules donné. Elle résulte généralement des efficacités fractionnelles unitaires des fibres uniques, elles-mêmes déterminées à partir des efficacités unitaires fractionnelles propres à chaque mécanisme de capture (diffusion, interception, impaction,...).

L'efficacité unitaire totale de fibre  $\eta$  peut être déterminée à partir des différentes efficacités unitaires propres à chaque mécanisme de capture :  $\eta_d$  pour la diffusion,  $\eta_r$  pour l'interception,  $\eta_I$  pour l'impaction inertielle,  $\eta_{\text{élec}}$  lors de la présence de charges électrostatiques. En considérant que les différents mécanismes de capture agissent indépendamment les uns des autres, l'efficacité unitaire totale ( $\eta$ ) ou la pénétration unitaire totale ( $1 - \eta$ ) peut être exprimée par la relation suivante (Kasper, 1978) :

$$(1 - \eta) = \prod_i (1 - \eta_i) \tag{I-21}$$

L'efficacité fractionnelle de filtration  $E_i$  pour des particules de diamètres  $d_{pi}$  d'un média fibreux est calculée à partir de l'efficacité unitaire totale d'une fibre suivant la relation (Brown, 1993) :

$$E_i = 1 - \exp\left(\frac{-4(1-\varepsilon)e\eta}{\pi\varepsilon d_f}\right) \quad (I-22)$$

Avec :  $\varepsilon$  : porosité du média (-)

$e$  : épaisseur du média ( $\mu\text{m}$ )

$d_f$  : diamètre des fibres ( $\mu\text{m}$ )

L'efficacité initiale de filtration est ainsi fonction de l'épaisseur et de la porosité du filtre ainsi que du diamètre moyen des fibres constituant le média. La plupart des expressions d'efficacité totale à partir des efficacités unitaires des fibres n'expriment pas correctement l'ensemble des efficacités déterminées expérimentalement (Bemer et al., 2006). Cela s'explique par les limites de ces modèles fondés sur des principes d'écoulement autour d'un arrangement idéal de fibres qui conduit à une structure fibreuse modèle parfaitement homogène et très simplifiée par rapport à la structure réelle présentant des hétérogénéité. Néanmoins ces modèles permettent de dégager des tendances sur l'influence relative de certains paramètres des média fibreux (diamètre des fibres, compacité du filtre, épaisseur du filtre) ou des aérosols (diamètre des particules, masse volumique).

Les efficacités fractionnelles de chacun des mécanismes de capture des particules et l'efficacité fractionnelle globale sont représentées sur la courbe de la Figure I- 11. Le minimum d'efficacité globale, quelque soit le niveau d'efficacité d'un filtre (entre 0% et > 99%), est généralement situé entre 0,1 et 0,2  $\mu\text{m}$  et correspond au diamètre de la particule la plus passante aussi appelée MPPS (Most Penetrating Particle Size) (Gustavsson et al., 2010). Pour des particules de petite taille ( $d_p < 0,1 \mu\text{m}$ ), le mécanisme de diffusion est prédominant. Dans cette zone, l'efficacité de filtration augmente lorsque le diamètre des particules diminue. Pour des particules de taille supérieure à 0,3  $\mu\text{m}$ , les mécanismes prépondérants sont l'interception et l'impaction inertielle dont l'importance croît avec la taille des particules. Dans la zone 0,1 - 0,3  $\mu\text{m}$ , il y a compétition entre les différents mécanismes de capture et aucun ne prédomine.

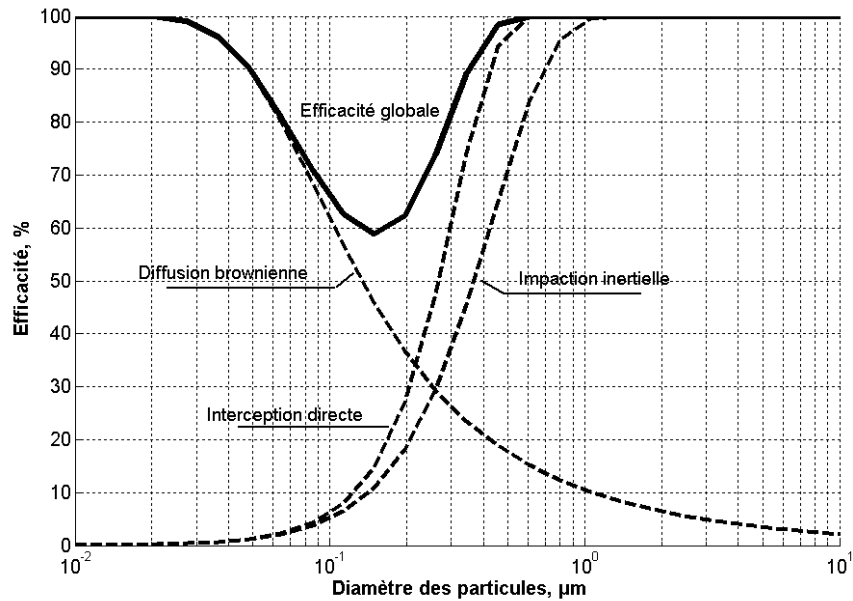


Figure I- 11. Efficacité fractionnelle pour chaque mécanisme de capture et efficacité totale d'un filtre vierge – Adaptée de (Bailly et al., 2001)

#### IV.1.2. Evolution des performances de filtration d'un média lors de la phase dynamique

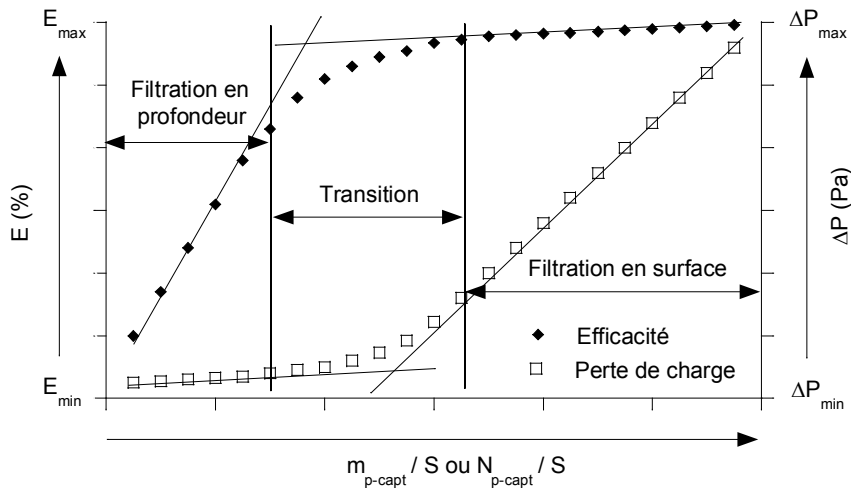
Au cours de la phase dynamique, la capacité du média fibreux à capter des particules dépend non seulement de ses propriétés de structure initiale, de la taille des particules et de l'écoulement d'air qui le traverse, mais également de l'évolution des propriétés de structure du fait de la capture des particules et de l'influence de ces particules collectées lors de la filtration (Davies, 1973).

Le colmatage d'un filtre plan peut être approché par 3 phases:

- Filtration en profondeur : les particules sont capturées en profondeur du média fibreux, à la surface des fibres mais également à la surface des particules déjà retenues (qui contribuent à leur tour à la capture de nouvelles particules).
- Phase de transition : phase correspondant au colmatage. Durant cette étape, les particules déjà collectées par les fibres du média peuvent contribuer à leur tour à la capture des particules. Les particules sont capturées conjointement en profondeur et en surface du média.
- Filtration en surface : les particules sont collectées à la surface du média offerte à l'écoulement et des particules qui la recouvrent (Thomas et al., 2001).

D'une manière générale, les particules capturées par le média fibreux entraînent une augmentation de l'efficacité de filtration et de la perte de charge au cours du colmatage

(Davies, 1973 ; Brown, 1993). L'évolution des performances de filtration au cours du colmatage est schématisée sur la Figure I- 12. Dans le cas particulier d'une filtration sur filtre plissé, il apparaît une phase supplémentaire de réduction de la surface de filtration qui entraîne l'augmentation exponentielle de la perte de charge (Joubert, 2009).



**Figure I- 12. Evolution des performances au cours de la filtration dynamique sur filtre plan de moyenne et haute efficacité.**

Au cours de la phase de filtration en profondeur, la perte de charge et l'efficacité varient de façon linéaire (Japuntich et al., 1994). L'augmentation de  $\Delta P$  est lente (Walsh, 1996 ; Song et al., 2006), tandis que l'efficacité de filtration croît rapidement jusqu'à l'apparition du gâteau de filtration (Thomas et al., 1999). La formation de dendrites (agglomération de particules submicroniques) à la surface des fibres du média conduit à une meilleure capture des particules mais ne modifie pas significativement l'écoulement et donc la perte de charge générée par le média (Pénicot-Bauge, 1998). La phase de transition est caractérisée par une augmentation non linéaire de la perte de charge et de l'efficacité. L'augmentation de  $\Delta P$  devient plus rapide alors que celle de  $E$  paraît plus lente (Le Coq, 1996 ; Walsh, 1996 ; Thomas et al., 2001). Le média fortement chargé en particules en profondeur et partiellement recouvert de particules en surface, offre une résistance à l'écoulement plus importante (Brown, 1993 ; Pénicot-Bauge, 1998).

Au cours de la phase de filtration en surface, la formation du gâteau de particules à la surface du média conduit à une forte perturbation de l'écoulement. Les croissances de  $E$  et  $\Delta P$  sont alors linéaires. L'évolution de  $\Delta P$  est beaucoup plus rapide que dans la phase de filtration en profondeur, la résistance à l'écoulement du gâteau de particules s'ajoutant à celle du média chargé de particules en profondeur (Brown, 1993 ; Le Coq, 1996 ; Thomas et al., 2001). L'efficacité de filtration tend elle à se stabiliser durant le colmatage.

## IV.2. Médias fibreux filtrants

Les filtres sont conçus avec des fibres qui peuvent être de nature différente (Hagège 1993) :

- des fibres organiques d'origine naturelle (fibres végétales, animales, protéiniques).
- des fibres de cellulose régénérée
- des fibres synthétiques (fibres composées de polymères)
- des fibres inorganiques (fibres minérales, fibres de verre, fibres métalliques, fibres de carbone).

Des essais de filtration réalisés dans des conditions standard normalisées permettent de classer des filtres selon leurs performances. En France, la norme AFNOR NF EN 779 (2012) définit les méthodes d'essais de filtres à air destinés à l'élimination de particules en ventilation générale. Elle propose une classification des filtres suivant leur efficacité obtenue pour une perte de charge finale fixée. Les essais sont réalisés pour une poussière d'essai synthétique constituée de DEHS (DiEthyHexylSebacate). La norme AFNOR NF EN 1822-1 (1998) définit les méthodes d'essais de filtres à air de très haute efficacité (HEPA – High Efficiency Particulate Air) et de très faible pénétration (ULPA – Ultra Low Penetration Air). Aux Etats-Unis, la norme ANSI/ASHRAE 52.1 (1992) définit les méthodes de tests des filtres à air de faible et moyenne efficacité. C'est l'équivalent de la norme française NF EN 779, mais elle ne permet pas d'établir de classification. La norme plus récente ANSI/ASHRAE 52.2 (1999) présente une méthode d'évaluation de l'efficacité de filtres à air par taille de particule. L'efficacité est définie pour trois gammes de taille de particule : 0,3-1, 1-3 et 3-10  $\mu\text{m}$ . La norme propose alors une classification des filtres en 16 niveaux de MERV. Le Tableau I- 4 rassemble diverses gammes de filtres classés à partir des normes précédemment citées et de leur application potentielle.

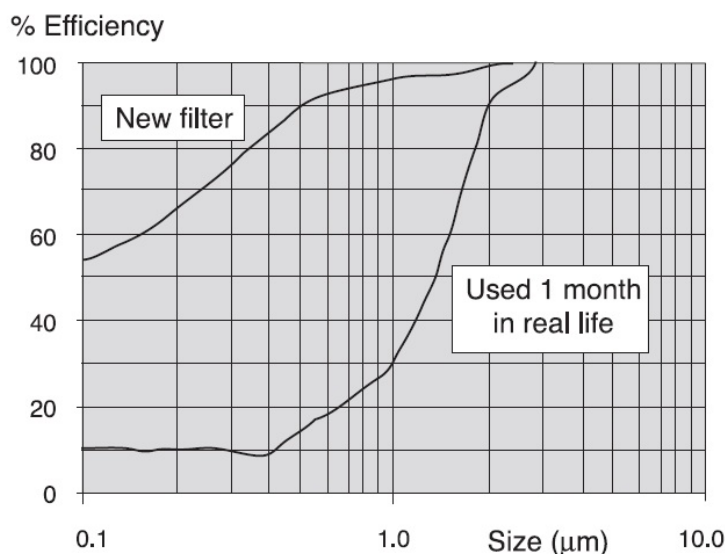
**Tableau I- 4. Classification des médias filtrants d'après les différentes normes**

Gamme de filtre	Types d'applications	Norme	Niveau d'efficacité	Classement
Faible et moyenne efficacité (préfiltre)	Logements, bureaux, ateliers classiques, préfiltration en amont de filtres de haute efficacité, etc.	AFNOR NF EN 779 (2012)	< 40 %	G1 à G4
		ANSI/ASHRAE 52.2 (1999)	< 20 %	MERV1 à MERV4
			20 - 70 %	MERV4 à MERV8
Haute efficacité (filtre fin)	Bureaux, espaces fumeurs, salles d'ordinateurs, milieu hospitalier, industries pharmaceutique et de la microélectronique, préfiltration en amont de filtres absolus, etc.	AFNOR NF EN 779 (2012)	40 - 95 %	M5 à F9
		ANSI/ASHRAE 52.2 (1999)	≥ 85 à 90 % KCl : 3 - 10 µm	MERV9 à MERV12
			50 - 80 % KCl : 1 - 3 µm	
			≥ 90 à 95 % KCl : 3-10 µm ≥ 90 % KCl : 1-3 µm 75 - 95 % KCl : 0,3-1 µm	MERV13 à MERV16
Très haute efficacité (filtre absolu, HEPA, ULPA)	Milieu hospitalier (bloc opératoire, soins intensifs) Environnements stériles de l'industrie pharmaceutique et du milieu médical, salles blanches d'industries de la microélectronique et des semi-conducteurs, etc.	AFNOR NF EN 1822-1 (1998)	85 - 95 %	H10 à H11
			99,5 - 99,995 %	H12 à H14
			99,9995 - 99,999995 %	U15 à U17

Néanmoins, ces classifications ne délivrent qu'une information limitée sur les performances des filtres obtenues dans des conditions idéales de laboratoire, avec une poussière d'essai synthétique (Gustavsson, 2000 ; Gustavsson, 2006). Dans le cas d'un filtre présentant des charges électrostatiques en particulier, les efficacités peuvent diminuer au cours du temps. En effet une partie des charges électrostatiques des fibres peut être neutralisée ou minimisée par l'accumulation des particules atmosphériques. La Figure I- 13 présente la différence entre l'efficacité fractionnelle de filtration d'un filtre dont les fibres contiennent des charges électrostatiques lorsqu'elle est obtenue au laboratoire avant utilisation du filtre, puis après un mois d'utilisation dans des conditions réelles de filtration. Selon ces résultats le filtre appartient à la classe F7, selon la norme EN 779, lorsque l'efficacité est déterminée en laboratoire, alors que le filtre présente des performances beaucoup moins bonnes dans la réalité, après un mois de filtration. De plus le colmatage d'un filtre par des particules modèles



en laboratoire sera différent d'un colmatage avec des particules atmosphériques de nature, de taille, de forme et de densité variable.



**Figure I- 13. Différences d'efficacité fractionnelles de filtration d'un même filtre présentant des charges électrostatiques. Dans un cas l'efficacité fractionnelle est obtenue en laboratoire avant son utilisation, puis après un mois d'utilisation du filtre dans des conditions réelles de filtration (Gustavsson, 2006)**

### IV.3. Filtration des microorganismes

L'usage des filtres dans des unités de traitement de l'air est reconnu pour être la méthode la plus efficace contre la pollution particulaire (Liu et al., 2009). Se pose la question de savoir si la filtration de particules microbiologiques présente les mêmes performances que les particules inertes. En effet, les aérosols microbiens ont des propriétés de surface particulières. Ginestet et al. (1996) ont testé l'efficacité de filtration de plusieurs filtres couramment employés dans des CTA alimentant en air des bâtiments du secteur tertiaire (EU4 – EU7 soit des filtres classés G4 – F7). Ils ont comparé l'efficacité de filtration de particules inertes dont les diamètres optiques varient entre 0,3 µm et 10 µm, à l'efficacité de filtration de *S. epidermidis* et *Penicillium spp* (1 µm et 3 µm respectivement) à 20°C et 80% d'HR. Ils n'observent pas de différences significatives entre la filtration de particules inertes et microbiologiques mis à part pour des filtres G4 pour lesquels l'efficacité de capture de *S. epidermidis* est 2,5 fois supérieure à l'efficacité des particules en latex. Maus et al. (1997) ont également comparé la filtration de particules biologiques à des particules inertes. Ils ont testés des filtres vierges de classes G4 à F5 pour des vitesses comprises entre 0,25 m.s<sup>-1</sup> et 2 m.s<sup>-1</sup>. La filtration de *Micrococcus luteus* (0,9 µm – 1,8 µm) et d'*Aspergillus niger* ainsi que de *Penicillium brevicompactum* (2 µm – 5µm) est comparée à la filtration de particules inertes

dont les tailles sont comprises entre 0,8  $\mu\text{m}$  et 8  $\mu\text{m}$ . Les mesures réalisées avec des particules inertes sont proches des mesures d'efficacité des particules biologiques lorsque le mécanisme de capture par inertie est prépondérant, ce qui est en accord avec d'autres études précédentes (Brousseau et al., 1994 ; Willeke et al., 1996). En effet, lorsque le mécanisme de capture par inertie est le mécanisme majoritaire lors de la collecte des particules microbiologiques de tailles supérieures à 1  $\mu\text{m}$ , les auteurs stipulent qu'elles peuvent être comparées à des particules de diamètres aérodynamiques similaires. Dans le cas de particules plus grosses (> 5  $\mu\text{m}$ ), des phénomènes de rebonds sont plus importants en raison de leurs plus fortes énergies cinétiques directement proportionnelles à la masse des particules. Dans ce cas, les efficacités de filtration des particules inertes et microbiologiques ne sont pas comparables puisque les densités des microorganismes sont variables.

Bien que la filtration puisse être un moyen efficace pour réduire la concentration en microorganismes provenant de l'air extérieur, une mauvaise gestion de la ventilation peut entraîner une pollution microbienne supplémentaire de l'air intérieur. En effet, les microorganismes sont des organismes vivants et aptes à croître sur des filtres en présence suffisante de nutriments et d'humidité (Simmons and Crow, 1995 ; Ahearn et al., 1996).

Verhulst (1838) a proposé un modèle théorique pour suivre la croissance des microorganismes :

$$\frac{dx}{dt} = rx\left(1 - \frac{x}{k_m}\right) \tag{I-23}$$

$r$  est la constante de croissance (la proportion du nombre total de nouveaux microorganismes par unité de temps),  $x(t)$  représente la population microbienne au temps  $t$ .

$k_m$  est la valeur maximale possible de microorganismes présents dans un environnement.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = k_m \tag{I-24}$$

La solution de l'équation est alors :

$$x(t) = \frac{k_m x_0}{(k_m - x_0)e^{-rt} + x_0} \tag{I-25}$$

$x_0$  correspond à la population microbienne à l'état initial.

Pour chaque couche  $j$  du filtre :

$$x_j(t) = \frac{k_j x_{0j}}{(k_j - x_{0j})e^{-rt} + x_{0j}} \quad (\text{I-26})$$

Ainsi le nombre total de microorganismes sur le média filtrant est calculé ainsi :

$$x(t) = \sum_{j=1}^m x_j(t) = \sum_{j=1}^m \frac{k_j x_{0j}}{(k_j - x_{0j})e^{-rt} + x_{0j}} \quad (\text{I-27})$$

Une étude de Liu et al. (2009) a consisté à valider ce modèle. Pour cela, ils ont contaminé un filtre avec l'espèce *E.coli* et ont suivi expérimentalement sa croissance sur différents filtres entre 0 et 12h puis après 24h, 48h et 72h. Sachant qu'après 72h, ces microorganismes ont déjà atteint leur limite de croissance puisque les quantités de nutriments ne sont pas renouvelées (Panikov, 1995). Les résultats expérimentaux s'approchent globalement des valeurs théoriques, comme indiqué par la Figure I- 14. Deux filtres ont été testés et pour chacun d'eux une solution composée de bouillon nutritif a été nébulisée pendant 5 - 10 min dans le but de simuler l'apport nutritif des particules inertes dans le cas réel de filtration, potentiellement assimilées comme nutriments par les microorganismes.

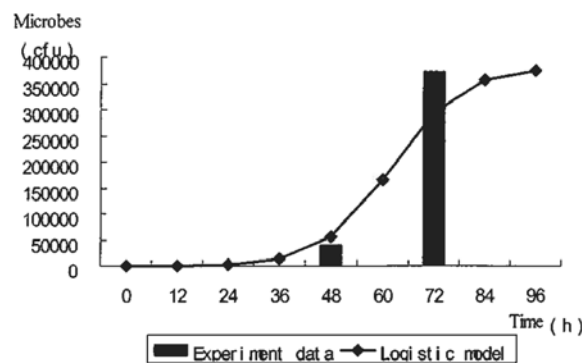


Figure I- 14. Comparaison du modèle théorique et expérimental de filtration. (Liu et al., 2009).

Maus et al. (2001) montrent que les bactéries et les spores de champignons collectés sur les médias fibreux peuvent survivre après des périodes de temps prolongées (> 5 jours) et sont susceptibles de croître lorsque l'humidité relative est élevée ( $RH > 70\%$ ) et lorsque les filtres ne sont pas exposés à des flux d'air. Pourtant, l'impaction sur un filtre peut provoquer un choc violent voire létal pour le microorganisme (Wang et al., 2001). Wang et al. (2001) démontrent dans une étude que les spores bactériennes et les spores fongiques sont plus résistantes à la filtration que les bactéries végétatives. Selon les auteurs, les spores bactériennes sont également plus sensibles que les spores fongiques au temps d'échantillonnage et au taux d'humidité relative lors de l'échantillonnage par un procédé de filtration. De plus, l'air a une

action dessicative et oxydative qui accélère la mort des microorganismes. Möritz et al. (1998) ont étudié le comportement des microorganismes collectés sur un filtre en fibres de verre de type F7 soumis à un écoulement d'air provenant de l'air extérieur à une vitesse de  $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ . Ils constatent que les microorganismes conservent leur cultivabilité sur le filtre pendant 1 à 3 jours. D'autres études ont relevé des multiplications microbiennes sur médias fibreux soumis à un flux d'air. Elixmann et al. (1987) ont par exemple étudié un système d'air conditionné dans un hôpital et ont conclu qu'il y avait un développement fongique possible sur les filtres au cours de la filtration, ainsi que des relargages de spores fongiques et éventuellement d'allergènes dans l'air traité. Simmons and Crow (1995) ont démontré que les champignons sont capables de croître sur les fibres de médias filtrants (fibres de cellulose) dans le cas où l'air présente une humidité supérieure à 70-80% et où les particules de poussières sont présentes sur les médias fibreux. Dans le cadre de leur étude, les filtres n'étaient pas soumis à un flux d'air. Kemp et al. (1995) ont constaté que lorsqu'un média fibreux (fibres de verre et fibres de polymère) filtre pendant un mois de l'air continuellement en provenance de l'extérieur et que le taux d'humidité relative au niveau du filtre est supérieur à 90%, une croissance microbienne est observable. Dans le cas de filtres soumis à un flux d'air ou non et testés avec un taux d'humidité relative  $< 70 - 80 \%$ , aucun développement microbien n'est détecté et la population microbienne viable décroît (Kemp et al., 1995 ; Simmons and Crow, 1995 ; Maus et al., 1997). En Inde, des filtres terminaux de réseaux de ventilation ont été inspectés dans 25 salles d'opération et 26% présentaient une contamination fongique (Kelkar et al., 2005). Bonnevie-Perrier et al. (2008) ont observé en laboratoire la colonisation d'un filtre en fibres de carbone activé par 2 espèces fongiques (*E. album* et *P. oxalicum*) après 25 jours dans des conditions d'humidités et températures contrôlées (100%, 25°C) sans flux d'air et sans apport de nutriments. Ils ont également mis en évidence l'influence de l'espèce microbienne sur le vieillissement du filtre. En effet, la colonisation de *E. album* a entraîné une diminution de la perméabilité des filtres mais sans contribuer (testé à  $0,3 \text{ m.s}^{-1}$ ) à un relargage de particules en aval tandis que *P. oxalicum* n'a pas entraîné de diminution de perméabilité des filtres mais a été réentraîné en aval du filtre. Bonnevie-Perrier et al. (2008) concluent que la croissance filamenteuse est responsable de la diminution de la perméabilité du filtre tandis que la dégradation de la qualité de l'air est principalement due à la production de spores par les moisissures.

#### IV.4. Facteurs influant sur le comportement des microorganismes lors de la filtration

En conclusion, compte tenu des diverses études réalisées, trois groupes de facteurs ont un impact important sur le comportement des microorganismes collectés lors de la filtration :

- Les paramètres de filtration (vitesse de filtration, matériau du filtre, colmatage...). Un filtre est soumis à un flux d'air qui diminue fortement la viabilité des espèces microbiennes présentes (dessiccation, oxydation). Il est d'ailleurs plus probable que les microorganismes profitent des phases d'arrêt de la ventilation lorsqu'il y en a, pour se développer. Pour assurer leur croissance ils ont également besoin de nutriments. Le gâteau de particules accumulées au cours de la vie du filtre peut jouer ce rôle et de plus favoriser l'accumulation d'humidité dans le filtre (Hamada and Fujita, 2002). De plus, les microorganismes nichés dans le gâteau sont protégés de l'action biostatique du flux d'air de filtration. Des filtres peuvent également, de par leur structure, être de bons substrats. C'est le cas notamment des fibres à base de coton (Simmons and Crow, 1995 ; Simmons et al., 1997a ; Simmons et al., 1997b). Des croissances microbiennes ont également été observées sur des médias non biodégradables en fibres de verre après quelques jours de filtration puis après les avoir placés à 80% d'humidité relative pendant plus de 14 jours (Cecchini et al., 2004). Cecchini et al. (2004) démontrent également que des agents intégrés dans la fabrication des filtres (phosphate d'ammonium quaternaire, polyhexaméthylène biguanide,...) peuvent avoir des actions biostatiques intéressantes et conduire à une diminution importante de la colonisation microbienne d'un filtre. Le matériau constitutif du filtre influence grandement la quantité et la diversité des espèces microbiennes qui sont retrouvées sur les médias usagés (Kemp et al., 2001).
- Les paramètres de qualité de l'air filtré. La température et l'humidité sont des facteurs influençant grandement le développement des microorganismes. Hamada and Fujita (2002) ont quantifié 5 fois plus de champignons xérophiles sur des filtres de climatisation individuelle pour des appartements du rez-de-chaussée que pour des appartements du 2<sup>ème</sup> étage. Cette différence est principalement due au taux d'humidité plus important dans les parties basses du bâtiment. Möritz et al. (2001) constatent quant à eux un développement microbien sur les filtres de CTA lorsque l'humidité relative de l'air dépasse 80%. D'autres auteurs affirment que les risques

et l'importance du développement microbien sont augmentés par une forte humidité (Chang et al., 1996 ; Foarde et al., 1996).

- La maintenance et les paramètres de dimensionnement de la centrale de traitement de l'air ou du bâtiment. Une mauvaise maintenance des différents composants des CTA est un risque important de pollution (Mendell et al., 2003 ; 2006). Sepänen (2006) indique que la nécessité d'une bonne maintenance (nettoyage régulier des serpentins de refroidissement et des égouttoirs, changement régulier des filtres,...) a été préconisée dans plusieurs guides nationaux de différents pays (Verein Deutscher Ingenieure, 1997; Finnish Society of Indoor Air Quality and Climate, 2001; REHVA, 2007a,b). Des études se sont intéressées à l'influence de la configuration des CTA face au risque d'un développement des microorganismes. Möriz et al. (2001) constatent une diminution de la croissance microbienne sur le filtre et de la pollution microbiologique de l'air lorsque le système de chauffage est placé avant le filtre terminal. De même, dans le but de diminuer l'humidité sur les filtres, l'humidificateur ne doit pas être placé en amont des filtres. Les CTA sont couramment arrêtées pendant le week-end dans un souci de gain d'énergie. Or des études ont montré que lors de ces arrêts la croissance microbienne est la plus importante (Chow et al., 2005 ; Hamada and Fujita, 2002 ; Kumari et al., 1998). Ahearn et al. (1996) ont constaté qu'il serait possible de diminuer la pollution microbiologique induite par la croissance fongique dans le réseau de ventilation en laissant la ventilation en marche durant les week-ends.

## V. Génération et échantillonnage des aérosols microbiens

### V.1. Génération d'aérosols microbiens

La maîtrise de la génération de microorganismes dans l'air est nécessaire pour la réalisation de diverses études comme par exemples :

- Sur le comportement des aérosols microbiens dans des systèmes de ventilation
- La propagation des aérosols microbiens dans l'air
- Pour tester des échantillonneurs d'aérosols microbiens
- Pour mener des études toxicologiques

La génération de microorganismes est complexe puisque cela nécessite d'aérosoliser des particules viables susceptibles de perdre leur viabilité si le choc induit est trop brutal et/ou inadapté aux microorganismes. Ainsi, des générateurs ont spécialement été conçus pour générer des particules microbiennes tandis que d'autres, habituellement utilisés pour des applications avec des particules inertes, ont été adaptés pour des microorganismes. La génération doit assurer une production efficace, stable et reproductible de l'aérosol. Il existe deux grands principes de génération des particules: La génération par voie sèche et la génération par voie liquide.

#### V.1.1. La génération par voie sèche

La génération par voie sèche est principalement utilisée avec des particules non microbiologiques mais permet également la génération de moisissures, de bactéries sporulées ou de cellules déshydratées. Elle consiste à mettre en suspension les particules situées sur la couche supérieure d'un matériau puis à les entraîner par un courant d'air. Particulièrement, la génération par voie sèche de spores fongiques, hydrophobes, peut s'avérer intéressante. Dans l'environnement, l'aérosolisation des particules fongiques dans l'air est conduite par deux sortes d'énergie (Deacon, 2006) :

- L'énergie produite par les champignons eux-mêmes
- L'énergie provenant de sources extérieures telles que les courants d'air, la pluie, la gravité, les changements de température et de sources nutritionnelles.

L'aérosolisation des particules fongiques en air intérieur se fait principalement par les courants d'air (Gregory, 1973 ; Madelin, 1994) ce que certains générateurs de bioaérosols

essayent de reproduire. Une technique de génération par voie sèche consiste à aérosoliser des colonies de champignons présentes sur de l'agar (Pasanen et al., 1991) ou sur du matériel de gaine en fibre de verre (Foarde et al., 1999) en y appliquant un flux d'air. Dans ce cas, l'aérosolisation ne se fait que sur des périodes de courte durée avec des concentrations élevées en particules fongiques. Pasanen et al. (1991) ont généré des spores fongiques d'*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.* et *Cladosporium sp* présents sur de l'agar. Les concentrations de spores aérosolisées dépendent alors de la vitesse de l'air appliquée sur le milieu de culture, du taux d'humidité relative ainsi que de l'espèce fongique. Une telle génération par voie sèche présente l'inconvénient de ne pas pouvoir générer de façon stable dans le temps une concentration de spores fongiques (Reponen et al., 1996 ; Gorny et al., 2001).

#### V.1.2. La génération par voie liquide

La génération par voie liquide consiste à convertir une suspension microbienne liquide en gouttelettes comprenant des tailles inhalables jusque dans les voies respiratoires inférieures (Hess, 2000). Cette technique est plus adaptée pour la génération de bactéries, particulièrement sensibles au stress hydrique. La nébulisation pneumatique est d'ailleurs la technique la plus utilisée pour l'aérosolisation de microorganismes (Chen et al., 1994 ; Jensen et al., 1992). La nébulisation pneumatique offre également la possibilité d'atteindre des concentrations importantes de particules aérosolisées. Néanmoins, ces générateurs ont l'inconvénient d'introduire des forces de cisaillement importantes qui peuvent perturber les structures bactériennes et fongiques (Mainelis et al., 2005 ; Griffiths et al., 1994). La génération par voie liquide est aussi moins adaptée à la génération de spores fongiques, hydrophobes. Un avantage du nébuliseur pneumatique est qu'il permet de répartir les spores fongiques dans le liquide par le mélange continu de la suspension microbienne induit par le barbotage (Reponen et al., 1997). La Figure I- 15 schématise un nébuliseur.



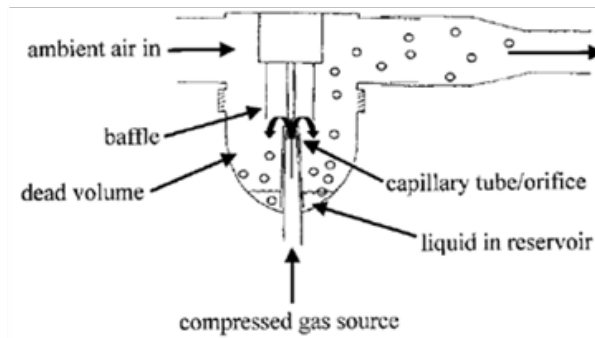


Figure I- 15. Les composants classiques d'un nébuliseur (Adapté de Newman, 1991).

La taille des gouttes générées dépend de plusieurs caractéristiques de la solution (densité, viscosité, tension de surface) et de la vitesse du gaz. Une augmentation de la vitesse du gaz introduit diminuera la taille des gouttes et inversement.

Des générateurs fondés sur le principe d'aérosolisation par bullage, lequel repose sur un phénomène naturel présent par exemple en mer, ont également été proposés (Saint-Louis and Pelletier., 2004). Lorsque les bulles d'air atteignent la surface de l'eau, elles éclatent sous l'action des vagues ou des précipitations. Deux types de gouttelettes sont formés par le phénomène du bullage : les « jet drops » et les « film drops » comme le montre la Figure I- 16. Les gouttelettes sont générées à l'interface air-eau où les microorganismes (bactéries) sont souvent concentrés. La génération par bullage est une technique qui permet de réduire les forces de cisaillements induites par des générateurs de type nébuliseur en simulant le phénomène naturel. D'ailleurs, Mainelis et al. (2005) constatent que les fragments microbiens générés lors de l'aérosolisation d'une solution de *Pseudomonas fluorescens* sont 3 à 3,5 fois moins importants lors de l'utilisation d'un générateur de type bullage qu'avec un nébuliseur pneumatique (Collison).

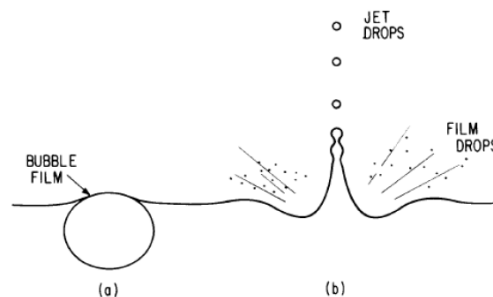


Figure I- 16. Processus d'aérosolisation consécutif au phénomène de bullage. (a) Bulle d'air au contact de la surface d'un liquide ; (b) explosion de la bulle au contact de la surface et génération de gouttelettes. (Blanchard and Syzdek, 1982).

En conclusion, un certain nombre de générateurs existent sur le marché et d'autres sont en cours d'élaboration et d'évolution. Le choix final du générateur dépend beaucoup de l'application envisagée et des microorganismes à aérosoliser. Avant toute opération, il est important de bien définir les conditions de départ et les gammes de concentrations dans l'air souhaitées. La caractérisation granulométrique, la stabilité de l'aérosol obtenu ainsi que l'analyse des pertes de cultivabilité des particules microbiennes générées doivent également être validées pour s'assurer de l'adéquation de la génération selon chaque cas d'étude.

## V.2. Les différentes techniques d'échantillonnage des particules microbiennes en suspension

L'échantillonnage des microorganismes de l'air s'effectue de la même façon que pour des particules inertes, soit principalement par aspiration. L'efficacité des échantillonneurs dépend pour l'essentiel de l'aspiration, du mécanisme de collecte ainsi que de la conservation de la cultivabilité des microorganismes afin de permettre une quantification par méthodes de culture (Nevalainen et al., 1994 ; Griffiths et al., 1994 ; Grinshpun et al., 1994). Après aspiration, les microorganismes peuvent être capturés selon les trois techniques suivantes (Duquenne and Greff-Mirguet, 2005) :

Le prélèvement par **impaction** consiste à faire passer l'air aspiré à travers une série d'orifices (grille) et les particules viennent s'impacter sur une surface cible (support de collecte) placée sur le trajet du flux d'air. Souvent, la surface en question est un milieu gélosé dans le cas de la collecte des aérosols microbiens. Plus une particule portée par un écoulement est grosse et plus les forces d'inertie agissant sur elles sont importantes. Les impacteurs se basent sur ce principe pour collecter des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. Ils sont souvent à plusieurs étages pour séparer les différentes tailles. Plusieurs géométries sont mises en jeu pour collecter les particules : impacteurs à orifices circulaires, à fentes, centrifuges... Les temps d'échantillonnage par impaction doivent être courts car les colonies sont ensuite directement comptées sur les plateaux de collecte. Parmi les différents impacteurs commerciaux, l'impacteur Andersen (Andersen Instruments Inc., Atlanta, Ga) est souvent considéré comme élément de référence. L'échantillonneur Andersen illustré sur la Figure I- 17, est un impacteur en cascade à 6 étages permettant de séparer les gammes de taille variant de 0,6  $\mu\text{m}$  à 7  $\mu\text{m}$  et dont le débit d'air est de 28,3  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (Eduard et al., 1998). Il permet de trier les particules biologiques par taille et notamment d'évaluer la fraction des particules respirables par rapport à celles non respirables par l'intermédiaire de 2

plateaux qui comportent chacun 200 orifices (Gillepsie et al., 1981). Bien que les caractéristiques de capture des différents étages ne soient pas délivrées, le fabricant affirme que la capture des microorganismes cultivables ayant un diamètre supérieur à 0,8  $\mu\text{m}$  a une efficacité de 95% environ. L'impacteur Andersen est encore très utilisé pour l'échantillonnage des bactéries cultivables (Bovallius et al., 1978 ; Jones and Cookson, 1983 ; Shaffer and Lighthart, 1997). Très simple d'utilisation, facilement transportable, il est possible de choisir le milieu de culture constituant les plaques d'impaction selon les besoins. Néanmoins, plusieurs critiques ont été soulevées. Tout d'abord, l'impaction induit un choc mécanique qui peut altérer de manière importante la cultivabilité des microorganismes, d'autant plus que le débit d'air (et donc la vitesse d'impact) est élevé (Stewart et al., 1995). De plus, une variation de l'épaisseur de milieu gélosé dans les boîtes de Pétri peut influencer la gamme de taille collectée car le diamètre de coupure des différents étages dépend de la distance entre la plaque d'impaction (le milieu gélosé) et l'entrée d'air.



Figure I- 17. Impacteur Andersen à 6 étages (Andersen, 1958).

Le prélèvement par **impingement** consiste à créer un contact entre le flux d'air et un liquide de collecte. Ce dernier est généralement soit de l'eau soit une solution physiologique à laquelle peuvent être ajoutés des agents de protection contre les chocs osmotiques et des tensioactifs contre la dessiccation. La méthode par impingement permet de rallonger considérablement les temps d'échantillonnage (Eduard et al., 2006). L'échantillon peut ensuite être dilué et est compatible avec un grand nombre de méthodes d'analyse (culture sur milieu gélosé, microscopie, biologie moléculaire...), ce que l'échantillonnage par impaction sur milieu solide ne permet pas (Duquenne and Greff-Mirguet ; 2005). Concernant l'échantillonnage des microorganismes par cette technique, les impingers sont principalement utilisés pour échantillonner des bactéries. Les spores fongiques sont souvent hydrophobes et peuvent présenter des efficacités de capture moins bonnes (Eduard and Heederik, 1998) en étant plus facilement réentraînées par le flux d'air de sortie car elles restent à la surface du liquide (ACGIH, 1989 ; Muilenberg et al., 1989). L'AGI-30 (Ace Glass INC., Vineland, N.J) et le BioSampler (SKC) (Figure I- 18 a)) sont des échantillonneurs spécialement conçus pour

la collecte des microorganismes dans un liquide. Leur débit d'échantillonnage optimal est de 12,5 L.min<sup>-1</sup>. L'air aspiré bulle dans un liquide (eau, liquide physiologique, tampon phosphate...), ce qui permet une collecte « douce » des aérosols microbiens. Les microorganismes sont alors moins stressés par le choc mécanique que peuvent induire les systèmes de filtration ou d'impaction, et par conséquent conservent mieux leur cultivabilité (Tyler et al. 1959). Ils sont simples d'utilisation et peu coûteux. Le biosampler s'affiche comme le modèle récent de l'AGI-30 et de nombreuses améliorations permettent de dépasser certains problèmes rencontrés avec des impingers plus anciens. L'efficacité de capture des particules inférieures à 1 µm est meilleure pour le BioSampler que celle de l'AGI-30 (voir Figure I- 18 b)). Il limite également le ré-entraînement des particules en imposant une rotation centrifuge du liquide de collecte (Willeke et al., 2008). Le BioSampler (SKC) a aussi l'avantage de permettre des temps d'échantillonnage allongés lorsqu'un liquide de collecte adapté est utilisé (huile minérale). Néanmoins, il faut aussi retenir que les concentrations en microorganismes cultivables peuvent être diminuées suite à un échantillonnage par un impinger de type BioSampler. En effet, selon Lin et al. (2000), le BioSampler induirait une sélection des microorganismes plus résistants au stress de collecte. Ainsi, le BioSampler présenterait une efficacité biologique de collecte de *Bacillus subtilis* sous sa forme sporulée supérieure à 95% tandis qu'elle chuterait à 25 - 30 % pour *Pseudomonas fluorescens* sous sa forme végétative.

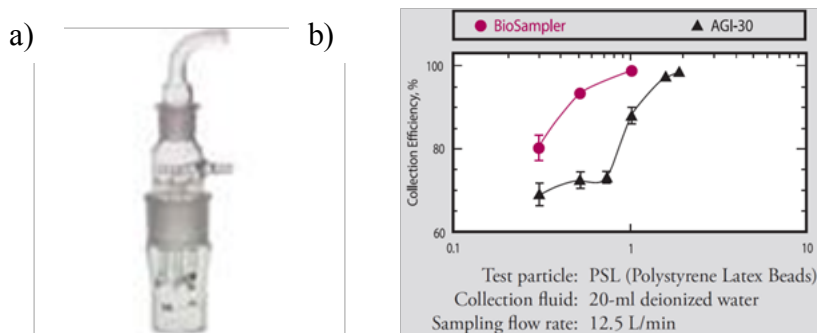


Figure I- 18 – (a). Photo du biosampler. (b). Graphique comparant les performances du BioSampler et de l'AGI-30. (BioSampler, SKC)

Le prélèvement par **filtration** est couramment utilisé pour la collecte d'aérosols microbiens en raison de sa facilité et de sa rapidité de mise en œuvre. Cette méthode consiste à séparer les particules de l'air en les faisant passer à travers un média filtrant. Une pompe en aval contrôle le débit d'air tandis qu'un filtre adapté aux analyses souhaitées est placé au travers du flux d'air. Une tête de prélèvement peut également être ajoutée pour sélectionner une gamme de tailles de particules à prélever (comme une tête PM<sub>10</sub> qui sélectionne les tailles

de particules inférieures à 10 µm). La collecte des particules sur le filtre se fait par impaction ou par interception à la surface ou dans le réseau poreux du milieu filtrant. Les filtres sont soit de types capillaires (type membrane en polycarbonate) ou de types médias fibreux (type filtres en fibres de verre) (Duquenne and Greff-Mirguet ; 2005). Il est alors possible de travailler directement sur le filtre grâce aux techniques d'analyses moléculaires, comme l'utilisation de sondes marquées (FISH par exemple) ou l'extraction de matériel génétique (pour DGGE par exemple). Les filtres peuvent également être employés pour la mise en culture ou encore des observations par microscopie optique ou électronique. Un des principaux inconvénients de l'échantillonnage par filtration est la dessiccation des cellules bactériennes, aussi cette technique est généralement utilisée pour échantillonner la poussière dans l'air, les spores fongiques et le pollen. (Crook et al ; 1995). La perte de viabilité dépend principalement des espèces microbiennes échantillonnées, du temps d'échantillonnage et du taux d'humidité relative (Wang et al., 2001). Les spores bactériennes et fongiques présentent un taux de survie plus important que les bactéries végétatives (Wang et al., 2001 ; Jensen et al., 1992 ; Palmgren et al., 1986).

### V.3. Choix d'un échantillonneur

L'atmosphère, l'air, est un environnement extrême et oligotrophe ; échantillonner les microorganismes de l'air relève du défi technologique. Les échantillonneurs de bioaérosols ont des efficacités de capture inférieures à 100% et de nombreux préleveurs induisent un stress très important ce qui peut réduire de beaucoup la viabilité et/ou cultivabilité des microorganismes de l'air (Buttner et al., 1997 ; Stewart et al., 1995). Plusieurs études ont comparé les impacteurs Andersen, les Impingers AGI-30, les filtres en gélatine et les filtres-membrane pour la collecte des aérosols microbiens. Dans des conditions de laboratoire (Lundholm, 1982) et avec des souches connues (*Staphylococcus epidermidis* et *Serratia marcescens*), l'impacteur Andersen semble être le système le plus efficace tandis que l'Impinger AGI-30 obtient des résultats peu satisfaisants, en particulier pour des microorganismes de petites tailles (< 2 µm). A l'opposé, Thorne et al. (1992) concluent à partir d'échantillons réels que l'AGI-30 et les filtres s'imposent par leur plus grande efficacité. Il est ainsi difficile de conclure sur les systèmes d'échantillonnage. En revanche, l'impacteur Andersen est limité à l'échantillonnage des microorganismes cultivables, tandis que les Impingers permettent l'étude de la communauté dans son ensemble par des méthodes de marquage / microscopie ou des techniques de biologie moléculaire. En conclusion, le choix d'un échantillonneur dépend de plusieurs paramètres tels que les tailles des particules à

échantillonner, le temps d'échantillonnage, les analyses de l'échantillon, les concentrations des particules envisagées,... et est spécifique à chaque étude. Il est donc important de bien cibler dès le départ les particules microbiologiques recherchées selon l'environnement dans lequel est réalisé l'échantillonnage et de considérer que la réponse ne peut être universelle tant les particules microbiennes sont diverses.

## **VI. Méthode d'analyses quantitatives et qualitatives**

Il est difficile d'établir des normes ou valeurs guides en ce qui concerne les bioaérosols dans l'air intérieur tant le nombre d'espèces microbiennes est important. De plus, les microorganismes morts ou vivants ainsi que leurs composants (endotoxines, mycotoxines, glucans, allergènes,...) peuvent avoir un impact sur la santé des occupants. Aucun protocole normé n'est imposé que ce soit pour l'échantillonnage des composants microbiens dans l'air ou pour l'analyse des échantillons. Les résultats entre laboratoires divergent donc et des relations doses-réponses sont complexes à établir selon les paramètres d'études. Ainsi, parmi les possibilités d'analyses des composants microbiens, de même que pour le choix de la technique d'échantillonnage, il est important de bien cibler les éléments recherchés et d'appliquer la méthode d'analyse la plus adaptée.

Ce paragraphe a pour but de présenter plusieurs méthodes d'analyse. Une sélection des méthodes les plus pertinentes pour l'évaluation quantitative et qualitative des microorganismes dans le cadre de la réalisation de cette présente étude a été faite. Elle tient compte du souhait d'étudier prioritairement le développement microbien sur un matériau filtrant. L'analyse d'autres éléments et notamment des sous-produits tels que des toxines (endotoxines, mycotoxines) des allergènes, du  $\beta$  (1 – 3) glucane,... serait également très intéressante et pourrait être envisagée dans une prochaine étude.

### **VI.1. Analyses Quantitatives**

#### **VI.1.1. Méthode de quantification sur milieu de culture**

La méthode de quantification sur milieu de culture présente l'avantage de pouvoir sélectionner des espèces bactériennes et fongiques selon le milieu de culture sur lequel l'échantillon est analysé. C'est également un moyen d'analyse peu coûteux. La quantification bactérienne et/ou fongique sur milieu de culture consiste à étaler un volume d'échantillon à analyser sur un milieu solide favorisant la croissance des espèces ciblées. Après un certain temps d'incubation à une température fixée, les cellules vivantes et ayant la capacité de se développer forment des colonies qui sont ensuite dénombrées. Le résultat est finalement exprimé en Unité Formant Colonie (UFC) par unité de volume ou de masse. La quantification des microorganismes sur un milieu de culture sur boîte de pétri est aujourd'hui encore la méthode la plus largement utilisée pour l'étude des microorganismes (ACGIH, 1999). Traditionnellement, elle est utilisée pour l'étude des champignons de l'air intérieur (Pitkäranta

et al., 2008). Il s'avère néanmoins que seules les espèces microbiennes cultivables peuvent se développer, ce qui limite fortement les mesures (Hawksworth, 1991). Il est estimé que le pourcentage de mycètes cultivables peut varier d'un nombre inférieur à 1 % jusqu'à 100 % selon les organismes et le matériel étudié (Chao et al., 2002 ; Niemeier et al., 2006 ; Toivola et al., 2002). De même, moins de 1% des bactéries provenant d'environnements aquatique ou terrestre se développent sur milieu de culture (Amann et al., 1995 ; Pace, 1997).

#### VI.1.2. Suivi du développement fongique par l'évaluation du taux d'ergostérol

L'ergostérol est le principal stérol des champignons. Andreassen and Stier (1953) ont découvert en 1953, que l'ergostérol, qui remplit les mêmes fonctions que le cholestérol chez l'Homme, est un composant des membranes cellulaires des champignons essentiel à leur croissance. Il y a une corrélation très forte entre les stérols, leurs fonctions et certains aspects du métabolisme, de la croissance et de la viabilité des cellules eucaryotes (Weete and Gandhi, 1996). La structure chimique de l'ergostérol est schématisée sur la Figure I- 19. Il est supposé se dégrader vite après la mort des cellules fongiques de par son instabilité chimique bien que sa cinétique de destruction ne soit pas clairement établie. Le taux total d'ergostérol est habituellement considéré comme étant le marqueur le plus sensible de la biomasse fongique (Seitz et al ; 1977) et est supposé évaluer la globalité des champignons microscopiques. En effet, les conidies et les fragments mycéliens contiennent un ester d'ergostérol commun et spécifique à la majorité des champignons microscopiques (Robine et al., 2006). Les champignons contiennent de l'ergosterol libre dans leurs membranes et des esters d'ergostérol dans leur cytoplasme (Tardieu et al., 2007).

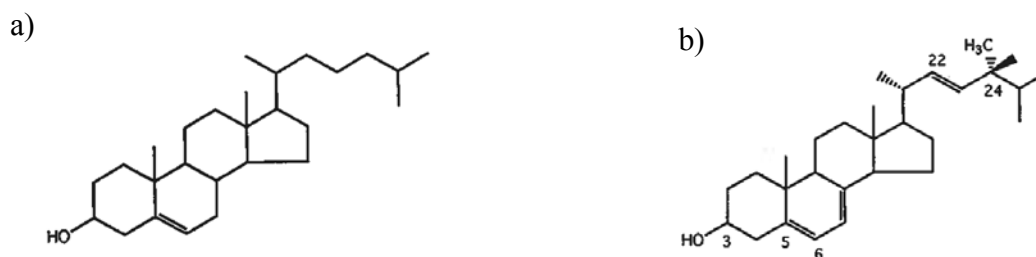


Figure I- 19. a). Structure de l'ergostérol C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sup>5,7,22</sup> . b). Structure du cholestérol C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sup>5</sup> (Hull et Woolfson, 1976).

Cependant, les taux d'ergostérol contenus dans les cellules fongiques ne sont pas constants et différent selon les espèces, l'âge de la culture, l'étape du développement (phase de croissance, formation de l'hyphe, sporulation) et les conditions de croissance (pH, température,...) (Pasanen et al., 1999). Par exemple, pour les espèces *Aspergillus*,



*Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Candida* et *Alternaria*, il varie entre 0,4 et 14,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Axelsson et al., 1995 ; Seitz et al., 1979). Pour quantifier le cholestérol et l'ergostérol, une méthode colorimétrique a été utilisée dans la 1<sup>ère</sup> moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Elle consiste à faire réagir l'ergostérol ou le cholestérol avec le réactif de Liebermann-Burchard (Liebermann, 1885 ; Burchard, 1889) pour provoquer une coloration proportionnelle à la concentration du stérol présent. Aujourd'hui, l'ergostérol est majoritairement déterminé par chromatographie gazeuse ou liquide. L'HPLC est une technique plus rapide. Dans un 1<sup>er</sup> temps, les esters d'ergostérol contenus dans la membrane cellulaire sont libérés et transformés en alcool par saponification (Robine et al., 2006). Les composés isolés sont ensuite quantifiés et déterminés par HPLC à la longueur d'onde de 282 nm.

### VI.1.3. Analyse par PCR quantitative

Kary B. Mullis a reçu le prix Nobel de chimie en 1993 pour l'invention de la PCR qu'il a conceptualisé en 1983 (Saiki et al., 1986). La découverte de la réaction de polymérisation en chaîne est l'une des avancées scientifiques les plus importantes du XX<sup>ème</sup> siècle en biologie moléculaire. C'est une réaction enzymatique dans laquelle une séquence d'ADN (habituellement un gène spécifique ou une portion de gène) est sélectionnée puis amplifiée. La RT-PCR (Real Time Polymerisation Chain reaction) est une technologie basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est liée au nombre de cycles de réplication effectués pendant la réaction de PCR. Ainsi, grâce à cette méthode, une séquence d'acides nucléiques d'ADN ou d'ARN peut être détectée après amplification. Plusieurs instruments de PCR quantitative en temps réel sont aujourd'hui sur le marché. Leur processus est totalement automatisé du début à la fin des cycles de réplication ce qui en facilite l'application pour des analyses à grande échelle (Martell et al., 1999). Il est particulièrement important de choisir correctement un primer spécifique à l'initiation du gène à quantifier par PCR pour éviter une compétition entre le gène ciblé et d'autres éléments présents dans l'échantillon (Qiagen, 2009). En effet, en raison de la sensibilité de la mesure par PCR, des problèmes relatifs à la contamination sont courants. Il est également important de s'assurer que les réactifs et les équipements sont exempts de contaminant cellulaire ou d'acide nucléique. Pour quantifier les bactéries présentes dans un échantillon, il faut amplifier un gène dit « universel », c'est-à-dire présent chez toutes les bactéries. C'est le cas du gène qui code pour l'ARN 16S présent dans une sous-unité du ribosome des procaryotes. De même, la quantification des espèces fongiques passe par l'utilisation d'un gène dit « universel ». Or, la quantification des mycètes (eucaryotes) est plus complexe que celle

des bactéries. Un gène particulier des champignons code pour l'ARN 18S, présent dans une sous unité du ribosome des champignons. La corrélation quantitative entre un champignon et le gène en question n'est pas clairement établie. Les techniques de quantification dans le domaine de la mycologie sont encore à l'étude et insuffisamment validées (Bougnoux and Espinasse, 2003).

#### VI.1.4. Analyse du matériel biologique total par une méthode protéique

Bonnevie-Perrier (Bonnevie-Perrier, 2008) a mis au point une méthode de quantification de la biomasse microbienne à travers le dosage des protéines, la protéine étant une macromolécule biologique présente chez tous les organismes vivants et notamment dans le cytoplasme des parois cellulaires des microorganismes. Pour ce faire, la quantité moyenne de protéines présentes dans un microorganisme a été déterminée. Ainsi, pour évaluer le nombre de microorganismes dans un échantillon il faut dans un 1<sup>er</sup> temps déterminer le taux de protéines présent dans cet échantillon puis utiliser la corrélation établie pour exprimer le nombre de " microorganismes équivalents protéines " (MEP). La méthode PIERCE est utilisée pour la mesure des protéines en phase liquide. C'est une méthode colorimétrique qui consiste à faire réagir un réactif à base d'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Pierce® BCA protein Assay Kit 23225). Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont réduits en ions  $\text{Cu}^+$  par réaction avec les liaisons peptidiques des protéines (réaction de biuret). Alors le BCA forme avec les ions  $\text{Cu}^+$  un intense complexe pourpre qui présente un maximum d'absorption de lumière de la longueur d'onde de 562 nm (Smith et al., 1985). L'absorbance à 562 nm est corrélée à la concentration en protéines à l'aide d'étalons d'albumine de sérum bovin fournis dans le kit de mesure des protéines. La méthode PIERCE a ses limites. En cas réels et non de laboratoire, toutes les protéines sont quantifiées et pas seulement celles des champignons et des bactéries. Il n'est donc pas possible d'évaluer la croissance précise des bactéries et des champignons dans le temps. En revanche c'est une méthode rapide, efficace en laboratoire et peu coûteuse.

#### VI.1.5. Analyse du matériel biologique viable total par la détermination de l'ATP

L'ATP ou Adénosine Tri-Phosphate dont la structure est représentée sur la Figure I- 20 est présente universellement dans les cellules vivantes (Ranalli et al., 2001). Le taux d'ATP intracellulaire présent dans les microorganismes varie selon le taux de croissance spécifique des espèces (Ball and Atkinson, 1975). De ce fait, l'ATP est un indicateur qualitatif qui reflète

l'activité total microbienne. En effet tous les organismes vivants transforment de l'énergie en énergie chimique par synthèse de l'ATP.

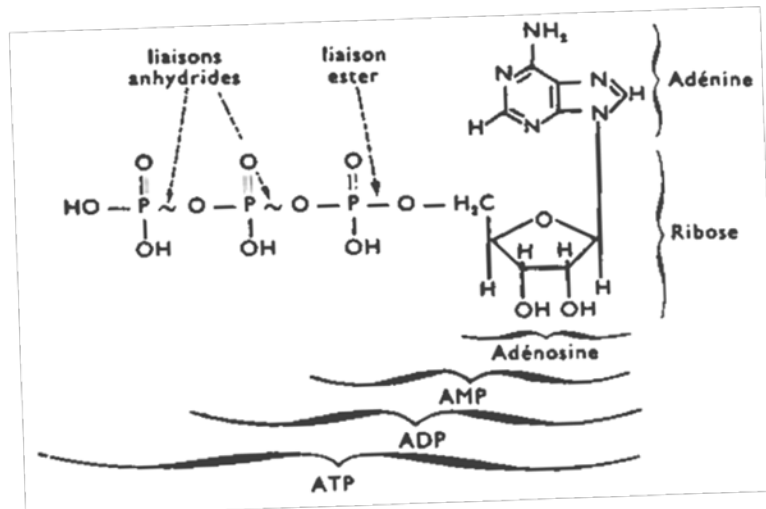


Figure I- 20. Structure de l'ATP (Weil et al., 1987).

L'ATP est libéré des cellules lorsqu'elles sont tuées par la chaleur, les désinfectants ou d'autres traitements qui cassent l'intégrité de l'enveloppe de la cellule (Venkateswaran et al., 2003). Des mesures d'ATP dans les lieux à faible présence biologique tels que les sols de l'antarctique, ont démontré que ce marqueur pouvait être utilisé pour détecter une présence de population microbienne très faible (Cowan et al., 2002 ; Cowan et al., 2007). L'ATP est donc un marqueur extrêmement sensible de la viabilité microbienne d'où l'intérêt, pour la NASA, de rechercher, par cette molécule, la présence d'une vie sur la planète mars (Fajardo-Cavazos et al., 2008). L'ATP a été découvert en 1929. Depuis, il existe plusieurs méthodes pour le doser dont celle, très largement utilisée depuis plus de 30 ans, mettant en jeu des réactions de luminescence (Fajardo-Cavazos et al., 2008). Le complexe luciférin-luciférase est utilisé pour déterminer le taux d'ATP présent dans un échantillon grâce à la réaction de bioluminescence dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente. La luciférase est une enzyme provenant des lucioles. Cette enzyme catalyse la réaction de la luciférine avec de l'ATP pour former un intermédiaire, luciféryl adénylate, qui suite à une oxydation émet un rayon lumineux (Seliger, 1989 ; Wilson and Hastings, 1998). Cette technique a principalement été utilisée pour évaluer la contamination d'échantillons alimentaires ou pharmaceutiques par des microorganismes (Stanley, 1989; Selan et al., 1992; Siragusa et al., 1996).

#### VI.1.6. Granulométrie et concentration d'un aérosol microbien

La surveillance de la qualité de l'air pour ce qui concerne les particules comporte l'analyse de la concentration massique des poussières ou des études en nombre de particules en fonction de leur taille. Des compteurs de particules sont alors d'usage dans de nombreux domaines (contrôle des salles blanches, analyse de la qualité de l'air urbain et de divers environnements de travail,...). De même, la surveillance de la concentration d'aérosol dans l'air est un moyen proposé pour l'étude de la contamination microbienne. Dharan et al. (2002) observent une corrélation entre le taux de particules dont la taille est comprise entre 5 et 7  $\mu\text{m}$  et une contamination microbienne. De même Wan et al. (2011) remarquent une corrélation entre la concentration bactérienne relevée dans diverses salles blanches d'hôpital et la concentration massique des  $\text{PM}_{2-10}$ . Les granulomètres et les compteurs de particules peuvent offrir la possibilité d'analyser la granulométrie de l'aérosol généré ainsi que le nombre et la concentration en particules au cours du temps.

##### *VI.1.6.1. Mesure de la concentration massique*

La masse des aérosols est déterminée soit à partir de la méthode par la jauge  $\beta$  ou lors d'une mesure sur une microbalance oscillante (TEOM soit Tapered Element Oscillating Microbalance). La méthode par la jauge  $\beta$  est basée sur l'absorption du rayonnement  $\beta$  par la matière, proportionnelle à la quantité de matière traversée. Le TEOM comprend une microbalance constitué d'un élément conique oscillant à sa fréquence naturelle (élément en quartz). Lorsqu'une contrainte physique y est appliquée, un potentiel électrique apparaît. Ainsi les particules échantillonnées et déposées sur la microbalance induisent une augmentation de la masse sur l'élément conique ce qui entraîne une diminution de la fréquence d'oscillation. Cette variation de fréquence est enregistrée en continu et convertie en variation de masse. Des têtes de prélèvement peuvent s'ajouter au TEOM afin de sélectionner des tailles de particules ( $< 10 \mu\text{m}$  ;  $< 2,5 \mu\text{m}$ ,  $< 1 \mu\text{m}$ ).

##### *VI.1.6.2. Mesure de la concentration en nombre*

Il existe deux techniques principales permettant de mesurer la concentration d'un aérosol particulaire par classe de taille : une méthode optique et une méthode reposant sur les propriétés aérodynamiques des particules.

Un compteur optique repose sur le principe qu'un rayon lumineux est focalisé sur un volume d'échantillon à travers lequel les particules en suspension passent une à une. Un détecteur optoélectronique mesure alors la quantité de lumière absorbée ou diffusée.

L'amplitude du signal est enregistrée dans différents canaux d'un analyseur qui en déduit la distribution dimensionnelle (Renoux and Boulaud, 1998). Un comptage optique à l'aide d'un laser est également utilisé pour affiner la mesure des plus petites particules (de l'ordre de 0,1  $\mu\text{m}$ ).

Un compteur utilisant les propriétés aérodynamiques des particules se sert de l'inertie, de la sédimentation et de la centrifugation des particules pour obtenir les résultats souhaités. Les impacteurs fondés sur le principe d'inertie sont les plus largement utilisés et étudiés.

Les compteurs de particules offrant la possibilité d'évaluer la distribution granulométrique d'un aérosol sont nombreux. L'Impacteur Electrique Basse Pression (ELPI) et l'Aerodynamic Particle Sizer (APS) sont, par exemple, fréquemment utilisés.

L'ELPI permet de définir la répartition granulométrique des particules sur 12 canaux (entre 0,028 et 10  $\mu\text{m}$ ). Il est composé d'un impacteur en cascade à l'entrée duquel est installé un chargeur corona dont l'objectif est de charger les particules qui sont alors séparées dans l'impacteur selon leur diamètre aérodynamique. Chaque plateau de l'impacteur est relié à un électromètre qui enregistre les charges appliquées lors du dépôt des particules. Enfin, l'analyse du signal permet d'estimer le nombre de particules déposées.

L'APS a été développé à partir des travaux de Wilson and Liu (1980). L'air échantillonné est fortement accéléré au travers d'un petit orifice disposé à l'entrée de l'APS. Les particules mettent alors un certain temps avant de pouvoir ajuster leur vitesse à celle du fluide porteur. Ce temps est proportionnel à leur diamètre aérodynamique. Une mesure de la vitesse d'une particule réalisée juste après l'orifice d'accélération permet donc de déterminer le diamètre aérodynamique de la particule en question. Chaque particule passe au travers d'un faisceau laser dédoublé et forme deux impulsions de lumière converties en impulsions électriques ce qui permet de déterminer le temps entre les deux impulsions et donc la vitesse de la particule.

Les méthodes quantitatives présentées comportent deux inconvénients majeurs :

- Les temps d'analyse sont longs (de la journée à quelques semaines).
- L'identification des espèces est une étape délicate nécessitant de l'expertise. Il est néanmoins possible de compléter les analyses par un séquençage génotypique.

## VI.2. Analyse Qualitative – Identification des espèces

Ces 15 dernières années, l'étude des microorganismes de l'environnement s'est fortement renforcée grâce à la détection et à l'identification par comparaison des séquences d'ADN ou d'ARN (Pace, 1997). La PCR a pour principe d'amplifier une séquence d'ADN spécifique (un gène spécifique ou une partie de gène) choisie puis d'en obtenir de multiples copies détectables à partir d'un certain seuil. Ensuite, les séquences obtenues peuvent être directement analysées et comparées avec des bases de données enregistrées pour l'identification. L'ARN peut également être utilisé après une 1<sup>ère</sup> étape préalable qui consiste à transformer l'ARN en ADN par une enzyme : la transcriptase inverse. Le large domaine d'étude couvert (bactéries, virus, champignons,...), sa très grande sensibilité et des temps courts d'analyse font de la PCR un instrument technologique très prometteur. La PCR a conduit à des avancées dans les sciences environnementales et de la santé en identifiant par exemple des pathogènes dans les aérosols, ce que la méthode de culture ne permettait pas. (Angenent et al., 2005 ; Schafer et al., 2003 ; Wakefield, 1996) Ainsi, la connaissance des populations bactériennes, fongiques et de la biomasse allergène dans l'air urbain s'est développée (Boreson et al., 2004 ; Wilson et al., 2002). Pour l'identification des espèces bactériennes et/ou fongiques, le principe de la méthode par PCR repose sur l'amplification des régions ADN présentes chez toutes les bactéries ou champignons et dont les séquences sont suffisamment différentes entre espèces pour permettre une identification précise. Les gènes de l'ADN ribosomique constituent une cible de choix : présents chez tous les microorganismes, ils sont connus pour accumuler des mutations à un taux constant (Bougnoux and Espinasse, 2003). Les séquences d'ARN sont bien décrites (Amann et al., 1995 ; Lane et al., 1985 ; Pace, 1997 ; Woese, 1987). Wu et al (2002) ont bâti une liste de primers de PCR utiles pour l'étude des champignons des aérosols. L'analyse par PCR la plus courante est l'identification d'une espèce bactérienne ou fongique (PCR qualitative) (Calderon et al., 2002 ; Maher et al., 2001 ; Mastorides et al., 1997 ; Myatt et al., 2004 ; Pascual et al., 2001 ; Sawyer et al., 1994 ; Stark et al., 1998 ; Wakefield, 1996 ; Wan et al., 2004). Les souches sont identifiées par comparaison des séquences (complètes ou partielles) avec celles contenues dans une banque de données. Néanmoins, les caractéristiques taxonomiques peuvent parfois être inexactes puisque fournies par les dépositaires des séquences.

Les avantages d'utiliser l'ADN comme cible pour l'identification des espèces sont :

- La rapidité des analyses
- La reproductibilité

- La sensibilité de détection
- La détection des organismes viables et morts ce qui est particulièrement important pour l'étude des microorganismes de l'air dont la dangerosité n'est pas liée uniquement à la viabilité des organismes (Brasel et al., 2005, Hirvonen et al., 1997).

## VII. Conclusion

L'air intérieur représente un enjeu sanitaire important. L'analyse de ses composants (particules, composés chimiques, radioactivité, composés biologiques) fait l'objet de nombreuses études. Les instances politiques et scientifiques françaises ont en effet pris conscience ces dernières années de la nécessité de développer des moyens afin d'accroître la connaissance et la maîtrise de la composition de l'air à l'intérieur d'espaces semi-clos.

La composition de l'air intérieur dépend de chaque lieu de vie qui peut être répertorié par catégorie. Ainsi, des études sont conduites dans des habitations, écoles, voitures, industries agroalimentaires, hôpitaux, secteur tertiaire,... En particulier, l'OQAI lance en 2012 une campagne nationale de mesure dans les bureaux. Dans le secteur tertiaire, le bureau est l'espace dans lequel un travailleur occupe le plus de temps après sa résidence. Or, des plaintes de salariés sont fréquemment recensées en lien avec une possible mauvaise qualité de l'air qu'ils respirent.

Les bureaux sont des lieux semi-clos qui présentent certaines spécificités. Des systèmes de ventilation et de CTA sont installés dans des immeubles de bureaux. Ces systèmes sont de grand intérêt à la fois pour fournir de l'air à une température et un taux d'humidité de confort pour les occupants mais aussi pour réduire les concentrations particulières. Néanmoins, ils peuvent accroître la pollution de l'air lorsque la conception de la CTA est inadéquate, que la ventilation est inadaptée ou que la maintenance ou les conditions opératoires des CTA sont insuffisantes. Un rapport de l'OMS (WHO, 2009) rappelle qu'un taux de ventilation suffisant permet globalement de diluer les virus et agents infectieux mais lorsque le minimum de ventilation n'est pas atteint, la ventilation peut au contraire être vecteur de microorganismes pathogènes. Or, selon Li et al. (2007) les données sont encore insuffisantes pour établir des taux de ventilation minimum dans plusieurs espaces de vie tels que les bureaux. De même, alors que l'étape de filtration prévoit de réduire la concentration particulière de l'air filtré, les filtres retiennent des microorganismes qui parfois se développent sur les filtres. Les propriétés de filtration peuvent alors se dégrader lorsque le colmatage du filtre est accéléré ou l'efficacité de filtration du média fibreux diminuée (Bonnevie-Perrier et al., 2008). Enfin, le relargage de microorganismes développés sur le filtre peut s'avérer particulièrement néfaste. Un tel relargage peut être favorisé lors de la remise en marche de la ventilation après une période d'arrêt. Les filtres ne sont en effet pas soumis à un flux d'air lors de l'arrêt de la ventilation. Or, un flux d'air peut provoquer une perte de viabilité des espèces microbiennes



(dessiccation, oxydation). Les conditions seraient donc plus favorables au développement microbien lors d'arrêt de ventilation.

Aucune valeur limite d'exposition aux aérosols microbiens n'est établie en France bien qu'ils soient souvent mis en cause dans des cas de SBS. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer les concentrations d'aérosols microbiens dans l'air intérieur et d'en limiter les sources. Les recherches bibliographiques mettent en évidence la complexité de l'étude des aérosols microbiens tant les microorganismes sont diversifiés : groupes, espèces, états (viables/non viables – morts). Les sous-produits et les fragments microbiens ne doivent également pas être négligés car ils sont liés à de nombreuses pathologies (allergies, problèmes respiratoires,...). Il est donc important de cibler les éléments recherchés en fonction des réponses attendues.



# CHAPITRE 2

Développement d'une méthodologie pour l'étude du comportement microbien sur des filtres

---



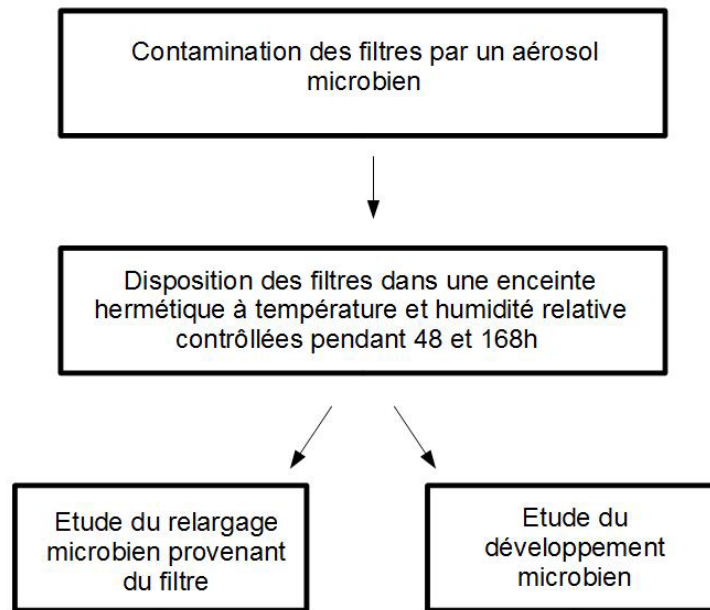
## **I. Introduction**

Afin d'étudier l'influence de certains paramètres de gestion de CTA sur le comportement des microorganismes sur un filtre, il a tout d'abord été nécessaire de développer une méthodologie. Pour analyser séparément les facteurs d'influence et déclencheurs d'un développement microbien les opérations se sont déroulées dans des conditions contrôlées en laboratoire. Quelques études ont mis en évidence des comportements divers de microorganismes collectés sur médias fibreux, seulement plusieurs paramètres sont considérés et il est alors difficile d'établir clairement les impacts de chacun sur la croissance microbienne. Par exemple, Simmons and Crow (1995) précisent que sous des conditions de nutrition et d'humidité favorables, les microorganismes arrivent à croître. Maus et al. (2001) admettent que les bactéries et les spores fongiques peuvent survivre sur des filtres lors de périodes prolongées (> 5 j) tout en conservant leur aptitude à croître lorsque le taux d'humidité devient suffisant (> 70% HR), préférentiellement en absence de flux d'air. Finalement, ces études démontrent l'existence d'un développement bactérien et fongique sur des médias fibreux. Des hypothèses sont proposées sur les facteurs influençant la croissance mais manquent de corrélations précises à défaut de travailler sous conditions maîtrisées. Il s'avère néanmoins que des éléments soient récurrents : le taux d'humidité, le gâteau de particules collectées sur le filtre outre la nature du filtre lui-même pouvant faire office de source nutritive. L'absence de flux d'air serait aussi un élément favorisant la croissance microbienne.

Trois facteurs ont été sélectionnés pour être analysés plus en détail dans cette étude:

- L'humidité relative
- La nature du média fibreux
- Le passage d'un flux d'air sur un temps donné

La ventilation est fréquemment arrêtée lors des week-ends et des vacances dans l'objectif de limiter la consommation d'énergie. Pour simuler un arrêt de ventilation sur un week-end et une semaine de vacances les filtres sont disposés sans flux d'air pendant 48h et 168h après avoir collectés des microorganismes. Afin de suivre différents aspects du développement microbien (quantitativement, qualitativement, relargage en aval des filtres) une approche méthodologique a été élaborée et est présentée dans ce chapitre ainsi que le matériel et les méthodes utilisés. Le schéma de la Figure II- 1 résume les grandes étapes méthodologiques.



**Figure II- 1. Schéma récapitulatif des différentes étapes méthodologiques**

Dans un premier temps, des filtres sont contaminés par un aérosol microbien. Après leur contamination, ceux-ci sont suspendus dans une enceinte fermée afin de maintenir un taux d'humidité relative et une température constants en l'absence de flux d'air. Le développement microbien sur le média fibreux contaminé et le relargage en aval du filtre sous flux d'air sont ensuite quantifiés.

Pour ce faire, ce chapitre décrit :

- Le choix des espèces microbiennes modèles
- La génération et l'échantillonnage de l'aérosol microbien
- Le dispositif expérimental de contamination des filtres et sa validation
- Le principe appliqué pour la simulation d'arrêt et de redémarrage de CTA
- Les méthodes de quantification des microorganismes

## II. Aérosol microbiens

### II.1. Sélection des espèces microbiennes modèles

Les bactéries, les mycètes et les virus correspondent aux microorganismes les plus fréquents et les plus étudiés dans l'air (Agranovski, 2010). Une espèce bactérienne et une espèce fongique sont sélectionnées pour cette étude car parmi les microorganismes, les bactéries et les champignons détiennent le matériel génétique suffisant pour assurer leur propre développement. De plus, ils sont théoriquement capturés par des filtres fins tels que ceux testés dans le cadre de ce travail (Gustavsson et al., 2010). Selon la norme EN 779 (2012) les filtres fins présentent une efficacité moyenne supérieure à 80% vis-à-vis des particules de 0,4  $\mu\text{m}$ . Or les tailles des bactéries présentent des diamètres compris entre 0,2 et 50  $\mu\text{m}$  tandis que les champignons ou mycètes entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (cf. § II.1.1 du chapitre 1). Ainsi, les filtres sont contaminés par un aérosol microbien modèle composé d'une espèce bactérienne et d'une espèce fongique ce qui permet de maîtriser la génération de l'aérosol microbien et le suivi des espèces microbiennes sur les filtres testés.

L'air, milieu hostile pour les bactéries et champignons, comporte des espèces microbiennes spécifiques résistantes. La vulnérabilité des microorganismes aéroportés dépend essentiellement du type de microorganisme et de l'état dans lequel il est présent dans l'air (Gilbert et al., 2009). Ainsi, les spores fongiques et les endospores (du type *Bacillus sp.* *Clostridium sp.*) présentent une plus grande résistance au stress environnemental que les cellules végétatives (Stetzenbach, 2007). Les bactéries Gram-négatif sont également plus sensibles aux réactions de Maillard, à la déshydratation et aux chocs osmotiques que les bactéries Gram-positif possédant un taux plus important de phospholipides (Mohr, 2007). Après avoir analysé la composition microbiologique de deux bureaux alimentés en air par des CTA, Law et al. (2001) recensent plus de 80% de Gram-positif sur la totalité des bactéries quantifiées sur milieu de culture. La présence humaine aurait aussi une incidence sur la prévalence de bactéries Gram-positif alors plus spécifiques de l'air intérieur (Horak et al., 1996 ; Pakarinen et al., 2008 ; Rintala et al., 2008 ; Täubel et al., 2009).

Comme indiqué dans l'étude bibliographique au chapitre 1, Goyer et al. (2001) décrivent les espèces bactériennes les plus fréquemment qualifiées lors de l'analyse de l'air de 63 lieux de travail : *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* et *Micrococcus sp.* dont l'occurrence est comprise entre 95 et 100%. Plusieurs études menées dans des immeubles de bureaux concluent sur une présence marquée de *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.* et *Bacillus sp.* (Mosqueron and Nedellec, 2001). L'analyse des espèces fongiques de 126 lieux de travail

réalisée par Goyer et al. (2001) met en évidence une prévalence des espèces : *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.* avec une occurrence respectives de ~ 100%, plus de 85% et plus de 75%. Vincent et al. (1998) précisent que les espèces les plus retrouvées dans les systèmes de climatisation sont les suivantes : *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* et *Trichoderma sp.* De même, Crook and Burton (2010) relèvent plusieurs études démontrant une forte prédominance des genres *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*.

Par conséquent, l'espèce bactérienne retenue pour cette étude est *Staphylococcus epidermidis*, qui est retrouvée en air intérieur puisque présente sur l'épiderme humain (Prescott et al., 1993). Le choix du champignon s'est porté sur le genre *Penicillium* puisque c'est l'un des genres majoritaires en air intérieur. De plus, de nombreux peptidases allergènes provenant de différentes espèces de *Penicillium*, dont *Penicillium oxalicum*, sont soupçonnés d'engendrer des symptômes chez des personnes occupant des bâtiments contaminés (Bush et al., 2001 ; Kurup, 2003 ; Kurup et al., 2000 ; Shen et al., 1999). Dans une étude, Nielsen et al., (1999) mettent en évidence que des champignons du genre *Penicillium* produisent des mycotoxines associées au SBS. De plus, des allergènes dont beaucoup de protéases, provenant de différentes espèces de *Penicillium*, dont *Penicillium oxalicum*, contribueraient à l'apparition de certains symptômes retrouvés chez des personnes présentes dans des bâtiments contaminés (Bush and Portnoy, 2001; Kurup, 2003; Kurup et al., 2000; Shen et al., 1999). En effet, la plupart des champignons (et bactéries) possèdent de multiples et divers allergènes provenant (Knutsen et al., 2012) :

- Des produits du métabolisme sécrétés hors de l'organisme cellulaire
- Des composants cytoplasmiques et de la structure cellulaire libérés lors de la lyse ou de l'autolyse cellulaire

L'inhalation de spores d'espèces de *Penicillium* à des quantités comparables à celles présentes naturellement dans l'air intérieur et extérieur peut induire un asthme immédiat ou latent sur des personnes sensibles (Knutsen et al., 2012). En particulier, *P. oxalicum* libère un allergène connu, caractérisé et validé par l'union internationale des sociétés d'immunologie (IUIS). Cet allergène, une sérine protéase vacuolaire, est nommé Pen o 18. Une étude menée par O'Connor et al. (2004), démontre également que sur 936 enfants, la moitié réagit au test allergique sur peau à au moins un extrait d'*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* avec une fréquence respective de 36%, 28%, 19% et 13%.

Pour résumer, *Staphylococcus epidermidis* et *Penicillium oxalicum* ont été sélectionnés en raison de leur occurrence dans l'air intérieur, mais également pour leur faible innocuité



envers les expérimentateurs. L'ensemble des manipulations s'est déroulé sous hotte à flux laminaire afin d'assurer la protection des expérimentateurs travaillant à des concentrations supérieures à celles retrouvées en atmosphère non contaminée et afin de travailler en milieu stérile.

## II.2. Méthodes de quantification des microorganismes

Il existe plusieurs méthodes de dénombrement des microorganismes. Certaines ont été précisées dans le chapitre 1. Le Tableau II- 1 les résume. Chacune présente sa spécificité, ses avantages et ses inconvénients. L'absence d'une méthode universelle imposée quant à l'évaluation des aérosols microbiens dans l'air contraint à procéder à la sélection de méthodes de quantification parmi les existantes. Les deux méthodes suivantes ont été choisies pour cette étude :

- La méthode de dénombrement des microorganismes sur milieux de culture, particulièrement intéressante puisqu'elle offre la possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons à faible coût. Des milieux de culture spécifiques permettent de sélectionner des espèces bactériennes et fongiques. Cette méthode est donc adaptée au suivi de la croissance de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum*. Le principal inconvénient du dénombrement sur milieu de culture provient du résultat partiel obtenu qui ne délivre une information que sur la quantité de microorganismes cultivables, sans tenir compte des microorganismes viables/non cultivables et des microorganismes non viables.
- Des mesures du taux d'ergostérol qui concerne uniquement les espèces fongiques puisque l'ergostérol est le principal stérol des champignons. Cette analyse a l'avantage de quantifier tous les champignons présents sur le filtre (viables/non viables). Cette approche a été choisie afin d'obtenir des précisions quant à la croissance fongique, lorsque le taux d'ergostérol varie fortement.

Ces deux méthodes d'analyses et de quantification ont été sélectionnées pour cette étude. Il serait néanmoins intéressant de compléter ces analyses par la quantification des microorganismes totaux ainsi que par l'étude de sous-produits bactériens et fongiques tels que les endotoxines, mycotoxines, allergènes,... En effet un certain nombre d'agents biologiques sont potentiellement mis en cause dans des SBS (Eduard et al., 2012) : des bactéries et des espèces fongiques non pathogènes, des composants microbiens tels que les mycotoxines, le  $\beta(1\rightarrow3)$  - glucans, des allergènes, des enzymes (protéases, amylases,

protéines) ainsi que des endotoxines pour lesquelles des valeurs limites d'exposition ont été proposées dans certains pays.

**Tableau II- 1. Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de quelques méthodes de quantification des microorganismes**

	Réponse	Avantages	Inconvénients
<b>Méthode sur milieux de culture</b>	Bactéries et champignons cultivables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode peu coûteuse</li> <li>• Méthode simple à mettre en place: possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons</li> <li>• Sélection des espèces selon le milieu de culture</li> <li>• Possibilité de diluer les échantillons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temps de réponse relativement longs (quelques jours)</li> <li>• Quantification des microorganismes cultivables uniquement</li> </ul>
<b>Ergostérol</b>	Biomasse fongique totale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantification de la totalité de la biomasse: viable/non viable</li> <li>• Sensibilité de la réponse en cas de croissance fongique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grandes variations du taux d'ergostérol selon les espèces fongiques et le stade des cellules (spores, formation de mycélium, etc.)</li> <li>• Temps d'extraction de l'ergostérol des cellules et temps d'analyse longs</li> </ul>
<b>ATP</b>	Activité totale microbienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marqueur très sensible de la viabilité microbienne</li> <li>• Rapidité des mesures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessité d'un matériel adapté : luminomètre</li> <li>• Délivre une information globale de l'activité cellulaire sans préciser les groupes microbiens mis en cause</li> </ul>
<b>Protéique</b>	Biomasse totale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyses rapides et peu coûteuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Risques importants de contamination par des produits composés de protéines qui ne sont pas forcément issus des microorganismes</li> </ul>
<b>PCR quantitative</b>	Selon primer (espèce / groupe etc.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantification des cellules viables/non viables ciblées</li> <li>• Précision de l'analyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode coûteuse</li> <li>• Difficulté de trouver un primer universel</li> <li>• Risques de contaminations importants</li> <li>• Temps d'extraction et d'analyse longs</li> </ul>

Les adaptations des méthodes de quantification sélectionnées pour le suivi de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum* sont décrites ci-après.

### II.2.1. Méthode par culture

La méthode conventionnelle de culture sur boîte de pétri demeure la méthode la plus largement utilisée lors de suivis quantitatifs de microorganismes (ACGIH, 1999). Dans le cas de cette étude, le nombre d'espèces microbiennes à quantifier est limité à deux, ce qui facilite grandement le suivi des concentrations de ces espèces.

Les conditions de croissance et le choix des milieux nutritifs des deux espèces sont résumés dans le Tableau II- 2.

Tableau II- 2. Conditions de croissance de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* sur milieu gélosé

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<b>Milieu de culture</b>	Mannitol salt agar (Biokar diagnostics)	Rose bengal chloramphenicol agar - soy based (Biokar diagnostics)
<b>Temps de croissance (h)</b>	24	72
<b>Temperature (°C)</b>	37	25

La gélose de Chapman est un milieu nutritif sélectif des bactéries halophiles et particulièrement des *Staphylococcus* : sa teneur élevée en NaCl permet la sélection des bactéries halophiles en inhibant la croissance des autres bactéries.

La gélose dichloran rose bengale chloramphénicol (DRBC) sélectionne les levures et les moisissures en inhibant la croissance bactérienne par la présence d'un agent antibactérien, le chloramphénicol. L'utilisation d'un milieu spécifique pour le dénombrement de *P.oxalicum* permet de diminuer les problèmes liés à la contamination et de limiter le phénomène de compétition entre l'espèce bactérienne et fongique.

Dans les deux cas d'étude, un volume précis (entre 100 µL et 1 mL selon la concentration souhaitée) de l'échantillon liquide à analyser est étalé à différentes dilutions sur les milieux nutritifs gélosés respectifs. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à la température souhaitée, le temps nécessaire à la croissance des microorganismes. La division cellulaire des bactéries et des espèces fongiques présentes sur le milieu nutritif donne naissance à une colonie comprenant un certain nombre de cellules bactériennes et de cellules fongiques. Seule la colonie est visible et dénombrable. Il est enfin déterminé un nombre de colonies cultivables par volume de solution analysée. L'unité utilisée est l'Unité Formant Colonies.mL<sup>-1</sup> (UFC.mL<sup>-1</sup>).

### II.2.2. Evaluation du taux d'ergostérol

En plus de l'information sur la quantité de *P. oxalicum* cultivables, des mesures du taux d'ergostérol présent sur les filtres testés complètent l'analyse.

L'ergostérol est le principal stérol des champignons. L'ergostérol est considéré comme le marqueur le plus sensible de la biomasse fongique (Seitz et al ; 1977). Cependant, les taux d'ergostérol contenus dans les cellules fongiques ne sont pas constants et diffèrent selon les espèces, l'âge de la culture, l'étape du développement (phase de croissance, formation de l'hyphe, sporulation) et les conditions de croissance (pH, température,...) (Pasanen et al., 1999). C'est un élément important à considérer car selon l'état des moisissures, le taux d'ergostérol peut s'avérer bien différent.

Une courbe d'étalonnage de l'ergostérol a été obtenue à partir d'une solution mère à 664 mg/L d'ergostérol synthétique (Sigma – Aldrich  $\geq 95\%$ ) dans du méthanol. La mesure de l'ergostérol est réalisée par chromatographie liquide à l'HPLC (Modèle 600E, Waters). La colonne utilisée est une Nova-Pack C18 (150 mm  $\times$  3.9 mm, I.D. 4  $\mu$ m, Waters). La phase mobile, constituée uniquement de méthanol (Méthanol HPLC grade, Fisher), se déplace en mode isocratique à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La détection du composé est assurée par un détecteur UV (Modèle 486, Waters) pour une longueur d'onde fixée à 282 nm.

Le protocole détaillé de l'extraction des esters d'ergostérol contenus dans le cytoplasme des cellules fongiques, ainsi que leur transformation en alcool par saponification, est développé en Annexe II- 1. Le coefficient d'extraction, évalué à partir d'une solution d'ergostérol synthétique dans du méthanol (Sigma – Aldrich  $\geq 95\%$ ), atteint 63,7%  $\pm$  4.9%. La limite de quantification du taux d'ergostérol est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage à 0,26 mg.L<sup>-1</sup> de méthanol.

### II.2.3. Suivi qualitatif du développement microbien par observations MEB

Le suivi quantitatif des microorganismes a été complété par une analyse qualitative du comportement microbien sur les filtres grâce à des observations réalisées au Microscope Electronique à Balayage (MEB). La microscopie électronique à balayage consiste à observer sous haute résolution la topographie des surfaces. Elle offre la possibilité de révéler des objets submicroniques avec une bonne qualité d'image. Les spores fongiques du genre *Penicillium* ainsi que les bactéries du genre *Staphylococcus* présentent des tailles de l'ordre du micromètre à quelques micromètres. Il est ainsi possible de les observer au MEB. Avant observation, les échantillons de filtres subissent un dégazage puis une métallisation de surface sous vide par

une couche d'or-palladium. Le MEB utilisé est un JSM 5800LV de marque JEOL. Le comportement des microorganismes est suivi sur les filtres à différentes étapes de l'étude : consécutivement à la contamination des filtres mais aussi suite à leur positionnement à température et HR contrôlées pendant 48h et 168h.

### II.3. Génération et échantillonnage de l'aérosol microbien

#### II.3.1. Préparation de la suspension microbienne

##### II.3.1.1. Préparation des bactéries *S.epidermidis*

*S. epidermidis* est une bactérie Gram positif halophile non sporulante apte à résister et à se diviser dans un milieu riche en sels. Les *Staphylococcus* sont souvent associés à la peau, aux glandes cutanées et aux membranes muqueuses des animaux à sang chaud. Les *Staphylococcus* sont des bactéries aérobies, facultativement anaérobies, non mobiles et qui forment des amas irréguliers. La photographie en Figure II- 2 présente des *S. epidermidis*. Elles sont souvent isolées ou groupées en diplocoques ou en amas présentant la forme de grappes de raisins.

Le protocole de préparation des bactéries est le suivant :

- ✓ Culture de *Staphylococcus epidermidis* (référence de la souche : CIP 53124) dans un erlenmeyer contenant 100 mL de bouillon nutritif liquide (tryptone à 10 g.L<sup>-1</sup>, extrait de viande à 5 g.L<sup>-1</sup>, chlorure de sodium à 5 g.L<sup>-1</sup>) pendant 8h à 37 °C.
- ✓ Récupération des bactéries dans 25 mL de NaCl (9 ‰) après centrifugation (7012× g ; 10 min) et élimination du surnageant contenant le bouillon de culture (substrats et nutriments). Cette étape de lavage est renouvelée 3 fois.
- ✓ Conservation des bactéries dans une solution physiologique de NaCl (9 ‰) à + 4 °C. La concentration moyenne en *S. epidermidis* se situe autour de 1.10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

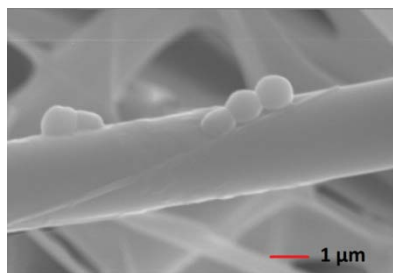


Figure II- 2. *S. epidermidis* sur une fibre d'un filtre en fibres de verre – photographie au Microscope Electronique à Balayage

### II.3.1.2. Préparation des spores de *P.oxalicum*

*Penicillium* appartient au groupe des champignons qui sont des saprophytes primaires ayant la particularité d'utiliser la matière organique morte comme source nutritive pour leur reproduction. Plus précisément, il dépend de la classe des Deutéromycètes qui se reproduisent de manière non sexuée (Kurup et al., 2000). *Penicillium* est l'un des champignons le plus fréquemment isolé dans les bâtiments contaminés par des moisissures (Ahearn et al., 1997; Burge, 1990; Cooley et al., 1998 ; Garrett et al., 1998; Li et al., 1995; McGrath et al., 1999). La Figure II- 3 présente une photographie des spores et du mycélium de *P. oxalicum* prise au MEB.

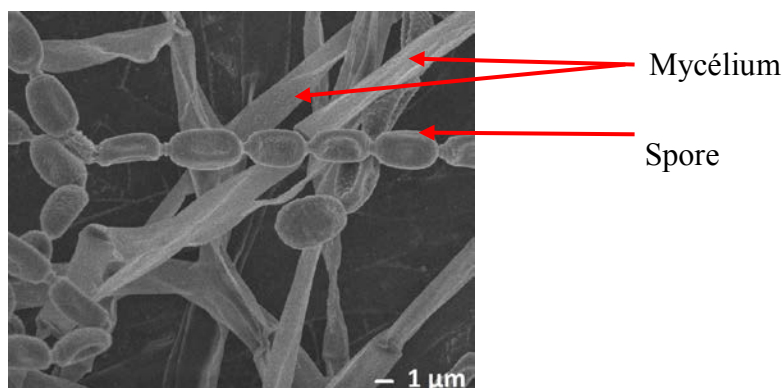


Figure II- 3. Mycélium et spores de *P. oxalicum* - photographie au Microscope Electronique à Balayage

Les champignons sont disséminés naturellement dans l'air sous forme de spores correspondant aux cellules reproductrices non sexuées des mycètes. La spore correspond à la forme résistante des moisissures et elle est adaptée à la dissémination aérienne. Le mycélium des mycètes est constitué d'un réseau de filaments, hyphes ou conidiophores, sur lesquels se forment des conidies productrices de spores (cf. § II.1.1 du chapitre 1). Dans la suite de l'étude, lors de la préparation de la suspension de *Penicillium oxalicum*, seules les spores de *Penicillium oxalicum* seront sélectionnées avant leur aérosolisation.

Le protocole de préparation des spores fongiques est le suivant :

- ✓ Culture de *P. oxalicum* (référence de la souche : DSM 898) à 25 °C pendant 3 jours sur des boîtes de pétri (six boîtes pour obtenir une concentration de l'ordre de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> souhaitée pour l'étude) comprenant de la gélose au Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC).
- ✓ Récupération des spores fongiques après dispersion de 20 mL de MgSO<sub>4</sub> (0,01 M) sur chaque boîte de pétri puis récupération de cette solution.
- ✓ Centrifugation de la solution obtenue (2000 × g ; 10 mn). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est récupéré dans 25 mL d'eau ultra pure. Cette étape de lavage est répétée trois fois afin d'éliminer la solution de MgSO<sub>4</sub> et autres éléments indésirables.
- ✓ Conservation de la suspension de spores fongiques dans de l'eau ultra pure à + 4°C à une concentration moyenne de  $1.10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Le Tableau II- 3 résume les caractéristiques de croissance des deux espèces microbiennes.

**Tableau II- 3. Caractéristiques de croissance des souches microbiennes**

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<b>Milieu de culture</b>	Bouillon nutritif liquide : tryptone (10 g/L); extrait de viande (5 g/L); chlorure de sodium (5 g/L)	Rose bengale chloramphénicol gélose - base soja (Biokar diagnostics)
<b>Temps de croissance (h)</b>	8	72
<b>Température (°C)</b>	37	25

Chaque suspension contenant séparément *S. epidermidis* dans une solution physiologique et *P. oxalicum* dans de l'eau ultra-pure est conservée 10 jours à + 4°C. La Figure II- 4 présente l'évolution des concentrations de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum* cultivables au cours du temps lors de la conservation à + 4°C. A l'état initial chaque solution contient respectivement  $1.10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $1.10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. epidermidis* et de spores de *P. oxalicum* cultivables. A partir de 12 jours de conservation, la concentration des bactéries cultivables commence à chuter et perd un log après quatorze jours. Les spores de *P. oxalicum* conservent leur concentration de  $1.10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> jusqu'au quatorzième jour.

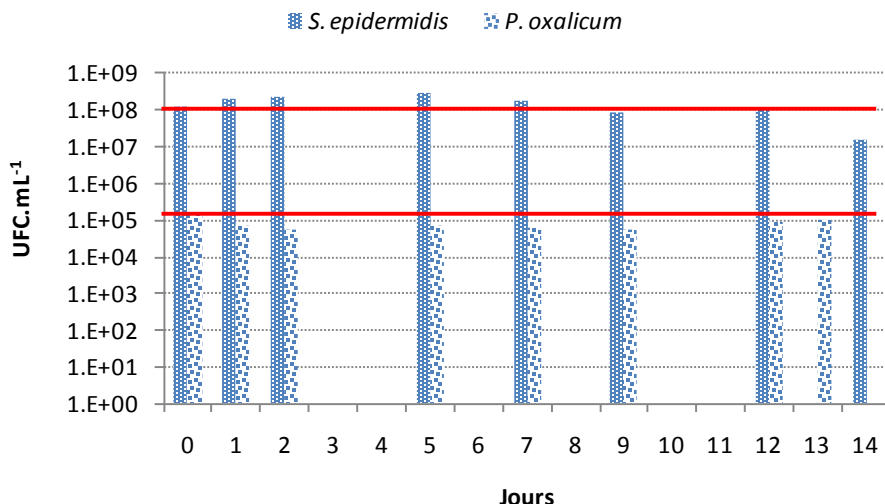


Figure II- 4. Evolution au cours du temps de la cultivabilité de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* en suspension lors de leur conservation à + 4°C.

Le consortium microbien est finalement obtenu par mélange des deux suspensions. Ce mélange est effectué uniquement avant chaque utilisation.

### II.3.2. Génération de l'aérosol microbien

Dans cette étude on souhaite :

- Générer des microorganismes cultivables à de fortes concentrations. En effet, au cours de la durée de vie d'un filtre, des microorganismes s'y accumulent et atteignent parfois des concentrations importantes. Kemp et al. (2001) ont extrait des microorganismes de filtres en fibres de verre (type F7 – F8) testés sur une période de 8 semaines de filtration d'air extérieur (cas de filtration initiale). Après 2 semaines de filtration ils comptabilisent un total de  $7,8 \cdot 10^6$  UFC.m<sup>-2</sup> de filtre (dont  $8,8 \cdot 10^5$  UFC.m<sup>-2</sup> en bactéries et  $4,8 \cdot 10^6$  UFC.m<sup>-2</sup> en champignons) après extraction des microorganismes des filtres. Dans le cadre d'un travail de thèse, Bonnevie-Perrier et al. (2008) obtiennent des concentrations en bactéries et champignons cultivables totaux avoisinant  $10^6$  UFC.m<sup>-2</sup> de filtres (G4 en coton et fibres synthétiques) usagés et provenant d'une CTA desservant des bureaux en tout air neuf. Ces valeurs sont comparables à celles de Kemp et al. (2001).
- Générer pour contaminer des filtres, à la fois des bactéries et des champignons.

La génération par voie liquide est la plus adaptée compte tenu de ces deux exigences. Le nébuliseur pneumatique médical Omron C29 (CompAir pro) présenté en Figure II- 5 a été retenu pour l'étude.



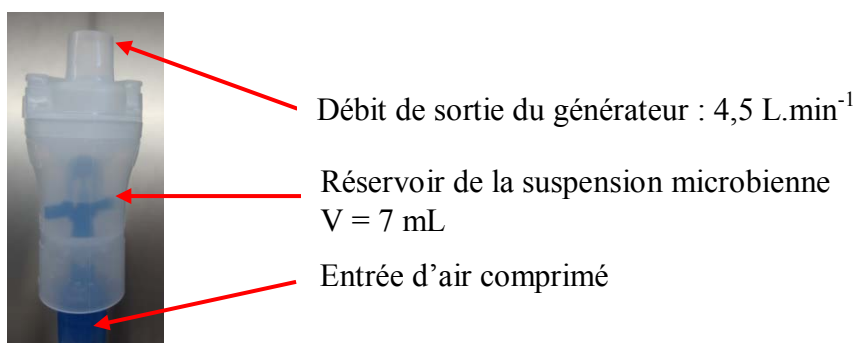


Figure II- 5. Nébuleur médical Omron C29 (CompAir pro)

La nébulisation pneumatique permet de générer des concentrations importantes d'aérosols. C'est aussi la technique la plus employée pour l'aérosolisation de microorganismes (Chen et al., 1994 ; Jensen et al., 1992). Et bien que la génération par voie liquide soit moins préconisée pour des spores fongiques, hydrophobes, les nébuleurs pneumatiques tel que l'Omron C29 répartissent les spores fongiques dans le liquide par le mélange continu de la suspension microbienne (Reponen et al., 1997).

### II.3.3. Echantillonnage des aérosols microbiens

L'échantillonnage des aérosols microbiens est complexe puisqu'il s'agit de collecter des microorganismes potentiellement viables sans altérer leur viabilité. Précisément, le choix de l'échantillonneur dépend des spécificités de l'étude (temps d'échantillonnage, débit d'air souhaité, méthodes d'analyse après échantillonnage). Le type de résultats escomptés entre aussi en compte dans le choix de l'échantillonneur. En effet il n'existe actuellement pas de méthode standardisée pour l'échantillonnage des aérosols microbiens.

Les contraintes appliquées à cette étude sont les suivantes :

- L'échantillonneur doit pouvoir supporter des temps relativement longs d'échantillonnage, à savoir 1h. C'est le temps de génération nécessaire à l'obtention des concentrations souhaitées en microorganismes collectés par les filtres.
- L'échantillonneur doit être apte à collecter des bactéries et des champignons en limitant le ré-entraînement des particules et dans le cas particulier de l'échantillonneur liquide, des spores fongiques, hydrophobes. Il doit alors être adapté à la capture des particules dans la gamme des tailles des spores fongiques et des cellules bactériennes générées.

- Il est nécessaire que l'échantillon collecté soit analysé par étalement sur milieu gélosé pour quantifier les microorganismes cultivables collectés. Il est donc indispensable de pouvoir diluer l'échantillon. Un milieu de collecte liquide est donc adapté à l'étude.

Trois techniques de collecte des microorganismes présents dans l'air ont été répertoriées dans l'étude bibliographique : l'impaction, la filtration et l'impingement (§ V.2 du chapitre 1). L'échantillonnage par impingement s'avère le plus adapté puisqu'il offre la possibilité de collecter des particules de l'air dans un milieu liquide pendant plus d'1h (Eduard, 2006). En particulier, l'impinger retenu pour l'étude, le BioSampler (SKC), limite le ré-entraînement des particules en imposant une rotation centrifuge du liquide de collecte (Willeke et al., 2008). La détermination de l'efficacité de capture du BioSampler dépend de plusieurs paramètres : la taille des particules testées, la méthode d'évaluation de l'efficacité de capture, la vitesse d'échantillonnage,... Seshadri et al. (2009) déterminent des efficacités respectives de collecte de *Pseudomonas. fluorescens* et de *Bacillus. subtilis* ( $d_{ae}$  de 0,62  $\mu\text{m}$  et  $d_{ae}$  de 0,86  $\mu\text{m}$  (Yao and Mainelis, 2007) de  $66\% \pm 10\%$  et entre  $53\% \pm 9\%$  et  $58\% \pm 10\%$  pour un débit de 12,5 L/min. Pour cela ils ont évalué l'ATP à l'entrée du BioSampler, dans le liquide de collecte et à la sortie du BioSampler. En parallèle Lin et al. (2000) ont obtenu une efficacité proche de 100% pour la capture des mêmes particules au même débit de prélèvement. Ils ont calculé l'efficacité du BioSampler à partir de la concentration en microorganismes de l'air sortant et de celui entrant mais sans prendre en considération les pertes éventuelles sur les parois du BioSampler. Dans la suite de l'étude l'efficacité spécifique du BioSampler est intégrée selon les conditions particulières de l'étude.

#### II.3.4. Effet de la génération et de l'échantillonnage sur la cultivabilité des microorganismes

La génération de microorganismes par un nébuliseur pneumatique est susceptible d'engendrer des dommages aux cellules microbiennes : forces de cisaillement, impaction brutale des cellules sur les parois du nébuliseur, agitation continue de la suspension (Simon et al., 2011).

Afin de valider la capacité du générateur à contaminer des filtres par des concentrations importantes en microorganismes cultivables, le consortium a été généré par nébulisation et échantillonné par des BioSamplers (SKC). La suspension initiale de *S.epidermidis* et de spores de *P.oxalicum* présentent des concentrations respectives de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $3,5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. La Figure II- 6 présente les concentrations moyennes de *S. epidermidis*

et des spores de *P. oxalicum* collectées dans quatre BioSampler après 65 minutes de génération.

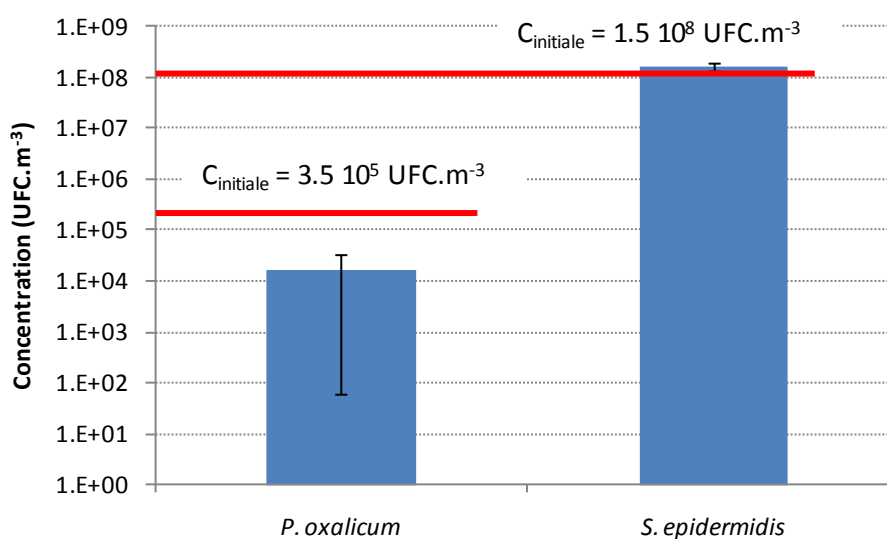


Figure II- 6. Concentrations en *P.oxalicum* et *S.epidermidis* cultivables dans quatre BioSamplers après 65 min de génération

Il est observé une perte de spores cultivables de *P. oxalicum* plus importante que de cellules de *S. epidermidis* lors de la génération. Cela peut s'expliquer par trois hypothèses :

- ✓ La différence de taille entre la bactérie et la spore fongique. La spore étant de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , le dépôt (impaction) sur les parois du dispositif et dans les tubes de prélèvement peut être plus important
- ✓ Les propriétés de surface des spores fongiques et des cellules bactériennes sont différentes en termes d'hydrophobicité ou de charges électrostatiques. Les interactions entre les particules et le matériau utilisé dans le dispositif expérimental peuvent mener à une perte de spores fongiques par sorption sur les tubes
- ✓ Un rebond plus important des spores fongiques lors de l'échantillonnage dans le liquide du BioSampler

Les concentrations en microorganismes cultivables collectés sur des filtres placés dans des conditions réelles de filtration varient selon l'âge du filtre, la qualité de l'air filtré, la nature du média fibreux. Kemp et al. (2001) comptabilisent un total de  $7,8 \cdot 10^6 \text{ UFC.m}^{-2}$  de filtre (dont  $8,8 \cdot 10^5 \text{ UFC.m}^{-2}$  en bactéries et  $4,8 \cdot 10^6 \text{ UFC.m}^{-2}$  en champignons) après deux semaines de filtration sur un filtre en fibres de verre. Heinman et al. (1994) ont quantifié une concentration moyenne en champignons de  $73 \text{ UFC.m}^{-2}$  ainsi qu'une concentration moyenne en bactéries de  $93 \text{ UFC.m}^{-2}$  après extraction des microorganismes de

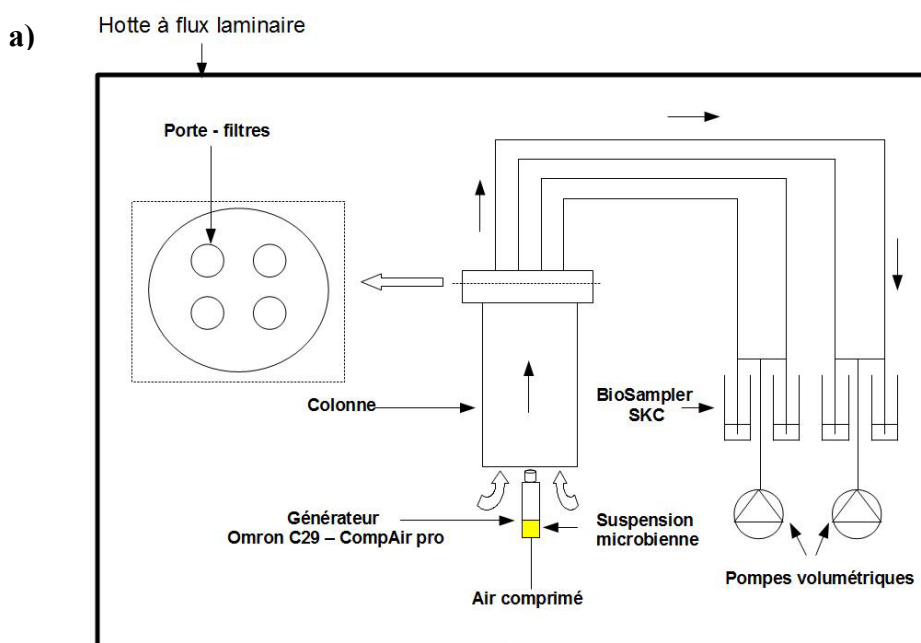
plusieurs filtres provenant de 35 CTA. Dans cette étude, si la totalité des bactéries et des champignons générés sont arrêtés par les filtres (surface de 12,6 cm<sup>2</sup>) lors de la génération pendant 1h, la concentration en bactéries cultivables se situe approximativement autour de 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> UFC.m<sup>-2</sup> de filtre tandis que la concentration en champignons cultivables se situe autour de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC.m<sup>-2</sup>. Les concentrations en bactéries cultivables sont alors manifestement plus importantes que dans les études précédemment citées. Seulement il faut prendre en compte que l'efficacité des filtres est inférieure à 100% pour la taille des bactéries générées et que l'impaction des bactéries lors de la filtration peut entraîner de la perte de cultivabilité des bactéries.

### III. Dispositif expérimental de filtration

#### III.1. Principe du dispositif expérimental de filtration

La filtration sur média fibreux est actuellement la technique épuratoire la plus répandue pour réduire la pollution particulaire en air intérieur, en raison de ses performances, de son faible coût ainsi que de sa facilité d'adaptation à des problématiques différentes (Rault, 1991 ; Bemmer et al., 2006).

Un dispositif expérimental de filtration a été conçu pour contaminer simultanément trois filtres par la filtration d'un même aérosol microbien disposés en configuration plane. La Figure II- 7 illustre ce dispositif.



b)



Figure II- 7. a) Schéma du dispositif – b) Photographie des porte-filtres.

Les microorganismes sont générés dans une colonne verticale en polyméthacrylate de méthyle permettant leur homogénéisation dans le flux d'air ascendant. Le nébuliseur médical (Omron C29 – CompAir pro) assure une génération à un débit de  $4,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  engendré par

une alimentation en air comprimé. Quatre emplacements circulaires de diamètre 4 cm prévus pour recevoir les filtres de l'étude sont disposés perpendiculairement à l'écoulement au sommet de la colonne. Trois des emplacements sont effectivement équipés par un filtre, tandis que le quatrième reste vide pour permettre la collecte d'une partie des microorganismes générés et pouvoir ainsi évaluer les pertes en microorganismes cultivables occasionnées par les différentes étapes de la génération jusqu'à l'échantillonnage. Les particules qui ne sont pas capturées par les filtres sont échantillonnées en aval des filtres par impaction dans un échantillonneur liquide, BioSampler (SKC), conçu pour collecter des microorganismes en limitant au maximum la perte de viabilité (Lin et al., 1999). Le débit d'échantillonnage correspond à 13 L.min<sup>-1</sup> à l'entrée de chaque BioSampler (SKC). Deux pompes volumétriques sont placées en aval du dispositif expérimental afin d'assurer le débit d'air à traiter au travers des filtres. La vitesse frontale de filtration au niveau de chaque filtre est de 0,16 m.s<sup>-1</sup> et est représentative des vitesses observables dans les CTA sur un pli de filtre F7 plissé. L'ensemble du dispositif est positionné sous une hotte à flux laminaire pour travailler sous un air propre et stérile lors des campagnes d'essais. La validation de ce dispositif est définie en termes :

- D'homogénéité de l'aérosolisation au niveau des quatre lignes de prélèvement comprenant le porte-filtre et le BioSampler en aval
- De granulométrie de l'aérosol généré et échantillonné au niveau du porte-filtre
- De stabilité de la génération de l'aérosol microbien dans le dispositif au cours du temps

### **III.2. Validation du dispositif de filtration : de la génération à l'échantillonnage**

Afin de maîtriser l'homogénéité et la reproductibilité de la contamination des filtres, il a été nécessaire de valider le dispositif de filtration décrit au § III.1.

Tout d'abord l'homogénéité de la concentration en microorganismes générés dans la colonne du dispositif expérimental de contamination et du flux d'air traversant les quatre portes-filtres sont étudiés (Figure II- 7).

Ensuite l'aérosolisation de la suspension microbienne par le nébuliseur médical est caractérisée et comparée à celle réalisée avec un autre générateur récemment breveté. Précisément, il est usuellement considéré que la génération doit vérifier les critères suivants (Simon et al., 2011) :

- Une stabilité de la génération de l'aérosol microbien au cours du temps

- Une reproductibilité de la génération (concentrations et caractéristiques granulométriques)

L'étude de ces deux critères fait l'objet de la suite de cette partie.

### III.2.1. Homogénéité du flux lors de la filtration

Afin de suivre la quantité de particules générées au niveau de chacun des quatre portes filtres, une solution de fluorescéine a été générée par le nébuliseur médical à travers le dispositif de filtration, avec ou sans filtre à un débit de 4,5 L.min<sup>-1</sup>.

Le Tableau II- 4 récapitule les résultats en masses de fluorescéine collectées dans les quatre BioSamplers disposés en aval des quatre portes filtres demeurés vides pour cette opération. Ont été générés via le nébuliseur médical, respectivement 1,8 mg et 3,4 mg de fluorescéine à une concentration de 407 mg.L<sup>-1</sup> pendant 30 et 65 minutes. Les BioSamplers contenaient chacun 20 mL d'eau déionisée. Le diamètre aérodynamique médian en nombre de l'aérosol de fluorescéine, prélevé au niveau des portes filtres, a été évalué à 0,35 µm à l'aide d'un compteur à particules, l'ELPI (Electrical Low Pressure Impactor – Impacteur électrique basse pression), présenté dans le chapitre 1 au § VI.2.1.2.

Pour déterminer la masse de fluorescéine collectée dans chaque BioSampler, des mesures de l'absorbance des liquides de collecte contenus dans les BioSamplers ont été réalisées. L'absorbance de la fluorescéine est mesurée à la longueur d'onde  $\lambda = 470$  nm. Il est ainsi possible d'en déduire la masse de fluorescéine retenue dans chaque BioSampler à partir d'une courbe d'étalonnage (Absorbance de la fluorescéine en fonction de la concentration en fluorescéine dans de l'eau déionisée).

**Tableau II- 4. Masses de fluorescéine collectées dans les biosampler suite à 30 et 65 minutes de génération dans le dispositif de filtration disposé sans filtre.**

	30 min	65 min
Ligne de prélèvement 1	0,20	0,37
Ligne de prélèvement 2	0,18	0,33
Ligne de prélèvement 3	0,24	0,37
Ligne de prélèvement 4	0,22	0,40
<b>Moyenne (mg)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,37</b>
<b>Ecart type (mg)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>

Il est constaté une faible variation des masses de fluorescéine entre chaque BioSampler puisque l'écart type obtenu, que ce soit après 30 ou 65 minutes de génération, est de 0,03 mg

de fluorescéine pour une moyenne respective de 0,21 et 0,37 mg de fluorescéine collectée. L'écart type correspond à une variation de 12% et 8% entre les différentes lignes de prélèvement ce qui représente un écart acceptable.

En complément de ces résultats, 3,4 mg de fluorescéine a été générée, pendant 1h, dans le dispositif de filtration contenant quatre filtres. Deux séries de quatre filtres de type F7 (EN 779) en fibres de verre et en fibres synthétiques ont été testés. Ainsi chaque ligne de prélèvement comprend un filtre et le BioSampler positionné en aval de ce filtre. Le Tableau II- 5 résume les résultats obtenus, à savoir les quantités de fluorescéine collectées sur chaque ligne de prélèvement. L'extraction de la fluorescéine des filtre consiste à :

- Placer le filtre dans 20 mL d'eau déionisée
- Agiter la solution contenant le filtre pendant 1h à 300 tr.min<sup>-1</sup>
- Passer cette même solution aux ultrasons pendant 1 minute (100 W, 20 kHz)
- Maintenir le filtre dans la solution pendant 10h ; la solution est placé à + 4°C et est préservée de la lumière afin d'éviter la photodégradation de la fluorescéine

**Tableau II- 5. Masses de fluorescéine retenues sur les filtres et dans les BioSamplers après génération. a) Fibres de verre – b) Fibres synthétiques**

a)

	Masse de fluorescéine collectée - BioSampler (mg) -	Masse de fluorescéine collectée - Filtre F7 (mg) -	Masse totale (mg)
Ligne de prélèvement 1	0,12	0,24	0,35
Ligne de prélèvement 2	0,13	0,25	0,38
Ligne de prélèvement 3	0,15	0,28	0,43
Ligne de prélèvement 4	0,12	0,24	0,36
<b>Moyenne (mg)</b>	0,13	0,25	0,38
<b>Ecart type (mg)</b>	0,02	0,02	0,03
<b>Erreur (%)</b>	13,5	7,0	9,1

b)

	Masse de fluorescéine collectée - BioSampler (mg) -	Masse de fluorescéine collectée - Filtre F7 (mg) -	Masse totale (mg)
Ligne de prélèvement 1	0,09	0,33	0,41
Ligne de prélèvement 2	0,09	0,26	0,35
Ligne de prélèvement 3	0,11	0,28	0,39
Ligne de prélèvement 4	0,08	0,32	0,40
<b>Moyenne (mg)</b>	0,09	0,30	0,39
<b>Ecart type (mg)</b>	0,01	0,03	0,03
<b>Erreur (%)</b>	13,8	10,7	7,0



Compte tenu de la masse de fluorescéine générée dans le système en totalité (3,4 mg), il est estimé des pertes de fluorescéine respectivement de 55,4% et 54,5% pour le filtre en fibres de verre et celui en fibres synthétiques. Ces pertes peuvent s'expliquer par 2 voies principales:

- Une part importante des pertes est probablement consécutive au dépôt des particules de fluorescéine sur la colonne et les tuyaux reliant les filtres aux BioSamplers.
- Certaines particules sont perdues lors de l'échantillonnage de l'aérosol de fluorescéine par les BioSamplers qui présentent une efficacité de collecte comprise entre 80% et 100% pour des particules inertes dont le diamètre aérodynamique médian varie entre 0,3 et 1  $\mu\text{m}$  selon le constructeur (SKC).

Après 1h de génération, la masse totale retenue en moyenne sur les lignes de prélèvement s'élève à 0,38 mg lorsque l'expérience est menée sur le filtre en fibres de verre et 0,39 mg pour le filtre en fibres synthétiques. L'écart type, de 0,03 mg pour chaque cas d'étude, correspond à une variation de 9% et 7% entre les différentes lignes de prélèvement respectivement pour le cas où les filtres testés sont les filtres en fibre de verre et en fibres synthétiques. Ces variations, inférieures à 10%, sont satisfaisantes et confirment la capacité du système à contaminer de manière homogène et simultanée quatre filtres dans les mêmes conditions.

Le volume moyen de fluorescéine collecté dans un BioSampler après 65 minutes de génération (Tableau II- 4) est le même que le volume total accumulé sur le filtre et dans le BioSampler (Tableau II- 5) suite à un temps identique de génération. Il est donc possible de conclure que toute la quantité de fluorescéine contenue sur les filtres est bien extraite lors de la phase d'extraction.

Ainsi il est constaté qu'avec ou sans filtre, après 30 et 65 minutes de génération, les variations du volume de fluorescéine entre les quatre lignes de prélèvement sont inférieures à 12% ce qui valide le dispositif en termes de capacité à contaminer plusieurs filtres en parallèle avec homogénéité.

### III.2.2. Caractérisation de la génération du bioaérosol à l'aide de compteurs à particules

Des mesures de l'aérosol généré par le nébuliseur médical ont été réalisées à l'aide de deux compteurs de particules afin d'obtenir des résultats sur :

- La distribution granulométrique de l'aérosol
- La stabilité de la génération particulaire au cours du temps

Afin de valider le système de génération mis en place pour cette étude, celui-ci a été comparé au générateur d'aérosol microbien développé par l'INRS et récemment breveté (Simon et al., 2011). Pour les deux générateurs, la distribution granulométrique de l'aérosol microbien généré a été comparée.

### III.2.2.1. Caractérisation de la granulométrie de l'aérosol microbien

Le prélèvement de l'aérosol microbien a été réalisé au niveau des portes-filtres dans le dispositif de filtration décrit au paragraphe III.1. La suspension microbienne nébulisée a préalablement été préparée selon le protocole décrit dans le paragraphe II.3.1 à la différence que les bactéries sont récupérées dans de l'eau ultra-pure après lavage afin d'épurer la solution des sels et affiner l'observation de l'aérosol microbien. Les distributions granulométriques présentées en Figure II- 8 ont été caractérisées à l'aide d'un compteur à particules TSI, l'APS 3321 définissant un diamètre aérodynamique ainsi que d'un compteur optique Grimm® 1.109. Ces deux compteurs sont décrits dans le chapitre 1.

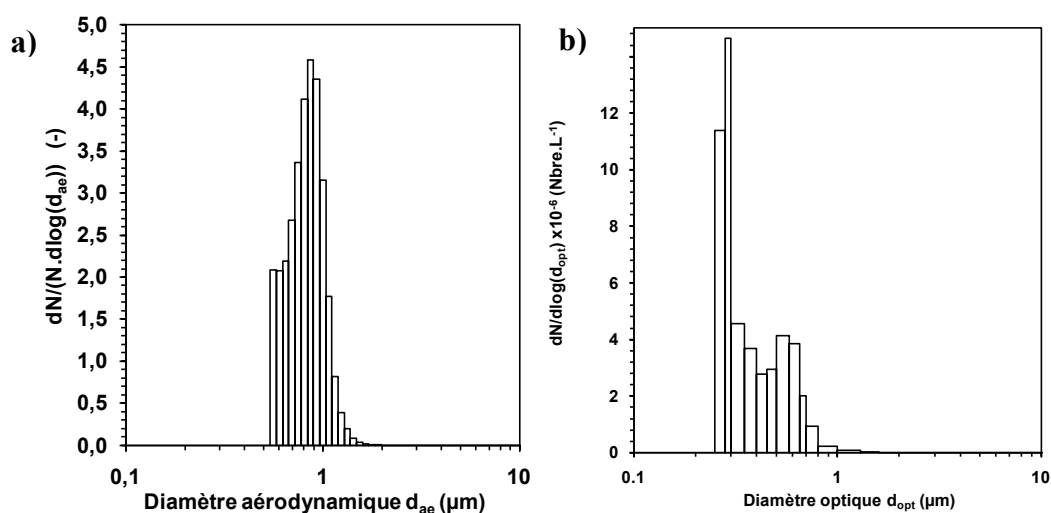


Figure II- 8. Distributions granulométriques du consortium généré par le nébuliseur médical. a) TSI, APS 3321 – b) Grimm® 1.109

La distribution granulométrique obtenue avec l'APS 3321 sur la Figure II- 8 a), présentant le nombre de particules normalisé par rapport aux diamètres des particules, met clairement en évidence un pic de particules pour les classes des diamètres aérodynamiques situés entre 0,78 et 0,96  $\mu\text{m}$ . Ce pic correspond à *Staphylococcus epidermidis* dont le diamètre aérodynamique avoisine 0,8  $\mu\text{m}$  selon la littérature (Park et al., 2011). Enfin, des photographies prises au MEB situent le diamètre des bactéries entre 0,8  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$  (Figure II- 9 b)). En revanche, aucun des deux résultats ne permet d'identifier la population de spores fongiques (Figure II- 8). Des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont

néanmoins permis d'évaluer le diamètre des spores de *P. oxalicum*, entre 2 et 4  $\mu\text{m}$ . Des spores de *P. oxalicum* sont visibles sur la Figure II- 9 a).

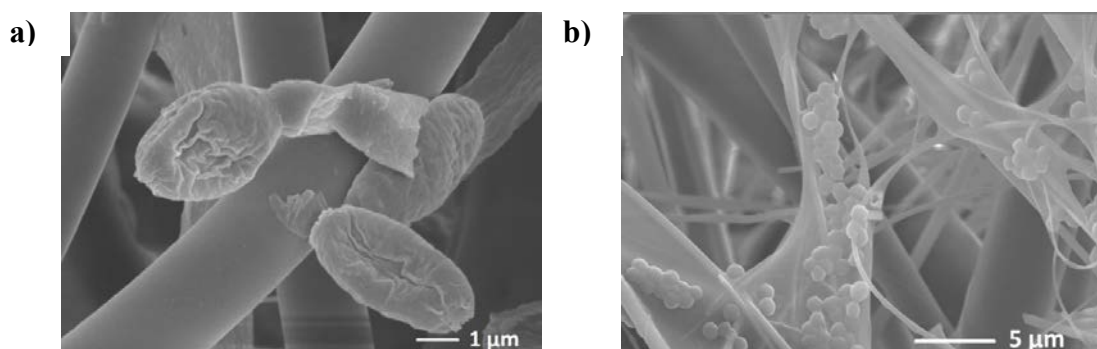


Figure II- 9. Photographies obtenues au Microscopie Electronique à Balayage (MEB) : a) Spores de *P. oxalicum* – b) *S. epidermidis*

Les spores de *P. oxalicum* pourraient être masquées lors de la génération par la population de cellules de *S. epidermidis* de concentration 1000 fois supérieure à celle de *P. oxalicum* dans la solution préparée. De nombreuses particules résiduelles, tels des débris cellulaires, de diamètre optique  $d_{\text{opt}} < 0,4 \mu\text{m}$  coexistent également avec la population de *S. epidermidis* et contribuent à masquer la population de spores comme clairement indiqué sur la figure II.8 b. Si elle n'est pas démontrée par l'examen de la distribution granulométrique, la présence des spores de *P. oxalicum* dans le consortium généré est néanmoins avérée car des concentrations importantes de champignons cultivables ( $\sim 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) ont été collectées dans les échantillonneurs BioSampler et quantifiées par leur mise en culture lors de l'étude de la conservation de la cultivabilité des microorganismes à la génération et à l'échantillonnage décrite au § II.3.4 (Figure II- 6).

La distribution granulométrique de l'aérosol obtenu après génération par le nébuliseur médical a été comparée avec celle de l'aérosol obtenu par l'aérosolisation du même consortium microbien grâce au générateur développé et breveté par l'INRS. Celui-ci est présenté en Figure II- 10.

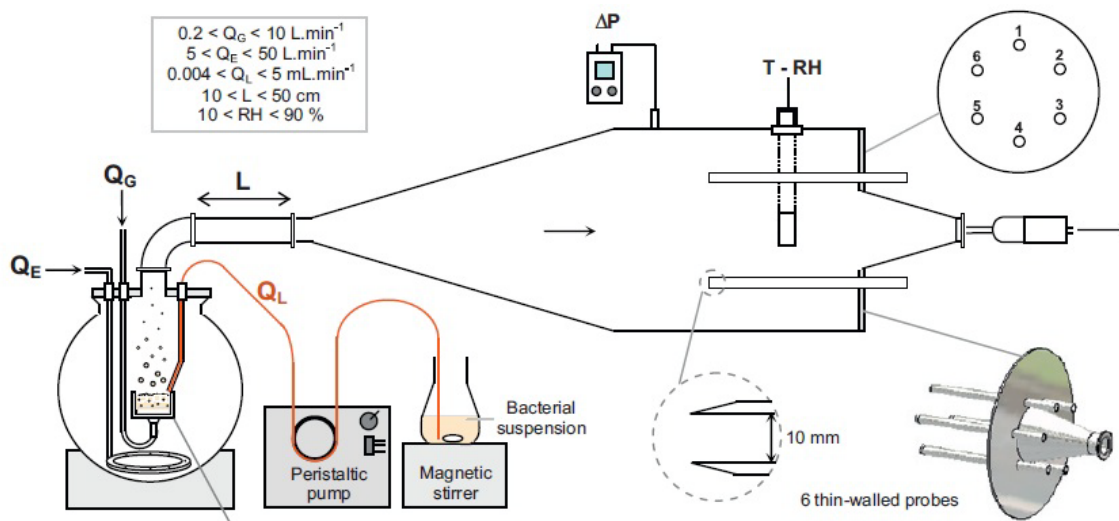


Figure II- 10. Générateur INRS de particules microbiennes par voie liquide (Simon et al., 2011).

Simon et al. (2011) se sont fortement inspirés du Liquid Sparging Aerosolizer (LSA) de Mainelis et al. (2005) pour développer leur propre générateur. Celui-ci consiste à générer un aérosol microbien par un bullage d'air comprimé à travers un film de suspension microbienne. En éclatant, les bulles forment des gouttelettes et des particules entraînées dans un flux d'air vers la sortie du générateur.

Pour obtenir leur générateur, ils ont apporté trois principales modifications au LSA :

- La sortie du générateur est agrandie et est disposée au-dessus de la zone de bullage
- Un air complémentaire d'entraînement des particules est ajouté en partie basse de l'enceinte de génération
- Une cellule de génération a été conçue afin d'assurer une hauteur de film liquide déposé sur le fritté, constante au cours de la génération

Le schéma de la Figure II- 10 présente le générateur et une enceinte de prélèvement disposée à la sortie du générateur et adaptée pour lui par Simon et al. (2009).

Les graphiques de la Figure II- 11 comparent les distributions granulométriques des aérosols microbiens obtenus à la sortie des deux générateurs testés : le nébuliseur médical à un débit de génération de 4,4 L.min<sup>-1</sup> et le bulleur à un débit de génération de 5 L.min<sup>-1</sup>.

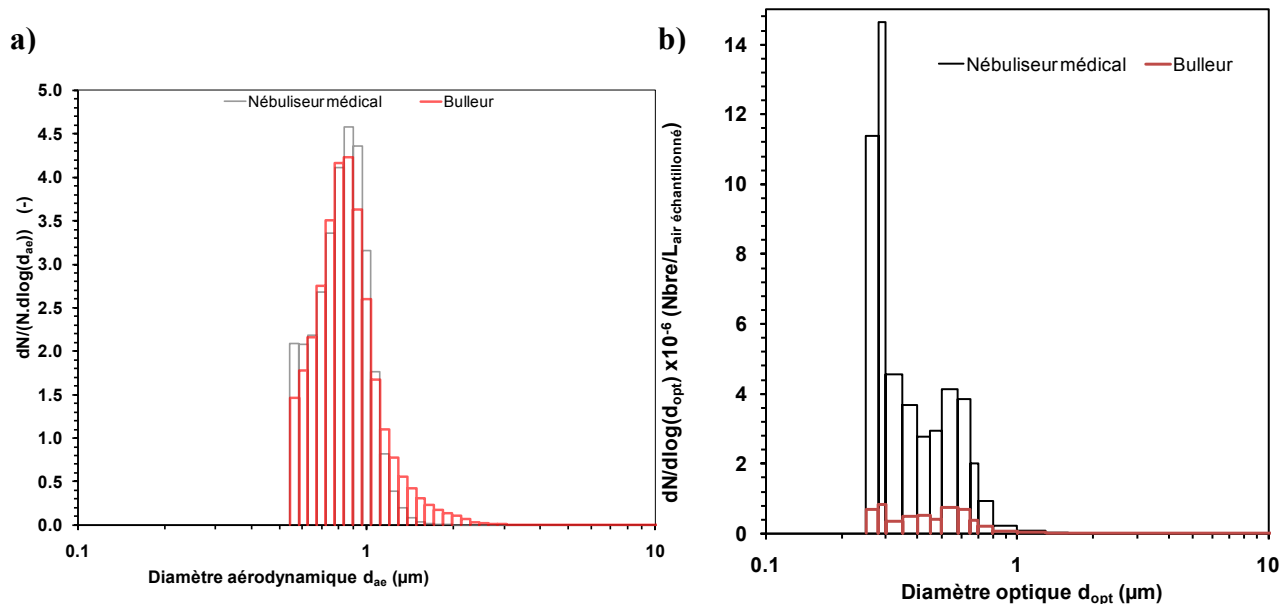


Figure II- 11. Distributions granulométriques de l'aérosol microbien généré par le nébuliseur médical et par le bulleur ; le prélèvement se fait au niveau des portes filtres du dispositif de filtration : a) TSITM APS 3321 – b) Grimm® 1.109

Les deux distributions granulométriques sont sensiblement les mêmes par contre le nébuliseur médical génère un nombre de particules fines ( $d_{ae} < 0,4 \mu\text{m}$ ) beaucoup plus important que le bulleur. Ce résultat est clairement observable sur le graphique présentant les deux distributions granulométriques non normées et obtenues par des prélèvements au compteur optique Grimm® 1.109. Les nébuliseurs pneumatiques ont la particularité de produire une augmentation du nombre de particules fines au cours du temps (Terzieva et al., 1996). Cela principalement en raison de l'évaporation des gouttelettes d'eau et du non renouvellement de la suspension microbienne, ce qui explique cette différence d'autant plus que le bulleur présente quant à lui un renouvellement continu de la solution au cours du temps.

### III.2.2.2. Stabilité de la génération au cours du temps

La stabilité de la génération par le nébuliseur médical dans le temps a été suivie à l'aide d'un compteur à particules Grimm® 1.109 pendant 1h, durée moyenne des essais. La Figure II- 12 présente l'évolution au cours du temps des concentrations en nombre de particules générées cumulées et normalisées par rapport au nombre total de particules au début de l'échantillonnage, pour des diamètres optiques  $d_{opt}$  compris entre  $0,25$  et  $0,50 \mu\text{m}$  et  $d_{opt} > 0,50 \mu\text{m}$ .

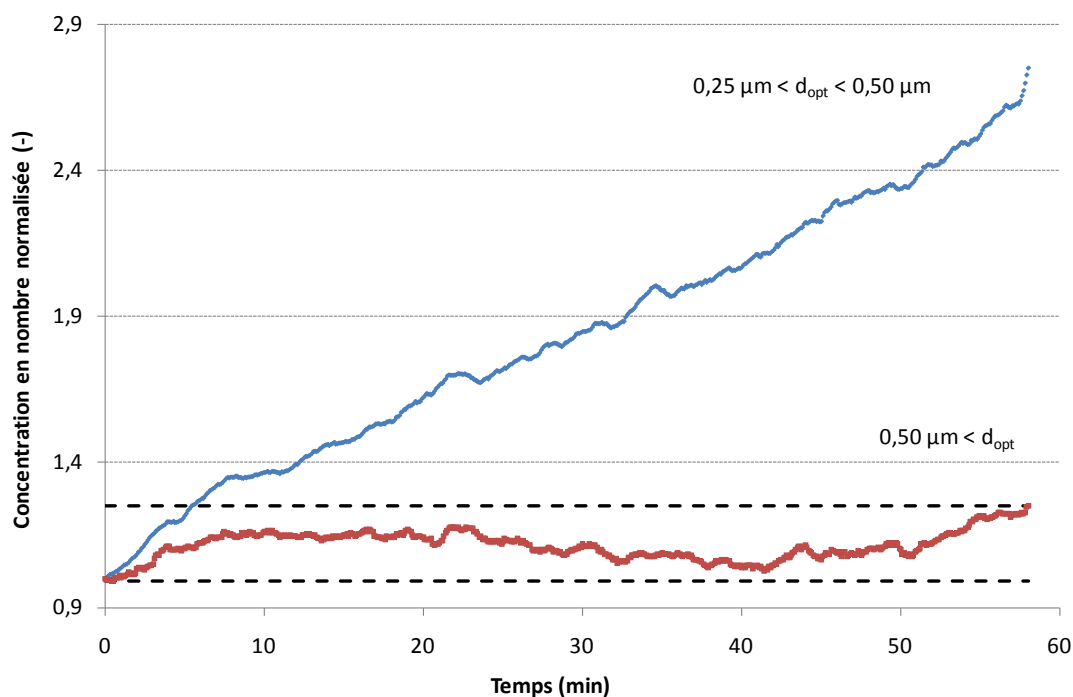


Figure II- 12. Suivi de l'évolution des concentrations normalisées de particules ( $0,25 < d_{opt} < 0,50 \mu\text{m}$ ;  $d_{opt} > 0,50 \mu\text{m}$ ) pendant 1h de génération (Grimm® 1.109)

Les concentrations de particules dont le diamètre est compris entre  $0,25$  et  $0,50 \mu\text{m}$  augmentent de façon linéaire et significativement au cours du temps de génération, la concentration étant multipliée par un facteur supérieur à  $2,5$  après 1h de génération. Dans le cas d'une génération d'aérosols par nébulisation pneumatique, la concentration en nombre de particules dans la suspension à générer augmente au cours du temps de fonctionnement en raison de l'évaporation des gouttelettes sur les parois (Stone et al., 2002). L'augmentation de la concentration en particules les plus fines est également la conséquence des préjudices subis par les microorganismes au cours de la nébulisation. Pour les particules de diamètre  $d_{opt} > 0,50 \mu\text{m}$ , comprenant *S.epidermidis* et *P. oxalicum*, les concentrations restent relativement stables au cours du temps ce qui confirme la capacité du nébuliseur à générer l'aérosol comprenant *S. epidermidis* et *P. oxalicum* avec stabilité au cours du temps.

## IV. Suivi du comportement microbien sur les filtres

### IV.1. Préparation et contamination des filtres

Préalablement à la contamination des filtres par un aérosol microbien, ceux-ci sont conditionnés selon deux étapes :

- Premièrement, les filtres sont entièrement immergés dans une solution d'éthanol (96%) afin de les désinfecter. Ils sont ensuite placés dans une étuve à 60°C pendant 2h pour évaporer l'éthanol.
- Deuxièmement, une solution nutritive est nébulisée sur les filtres. Sa composition est décrite dans le Tableau II- 6. La solution est nébulisée pendant 15 minutes dans le dispositif expérimental décrit dans le paragraphe III.1.

En effet, lors du fonctionnement d'une CTA en conditions réelles, les filtres collectent des particules susceptibles de représenter des sources de substrats et de nutriments qui peuvent être consommés par les microorganismes collectés par ces mêmes filtres (Hamada et al., 2002). C'est pourquoi des nutriments sont injectés sur les filtres testés.

Tableau II- 6. Composition de la solution nutritive

	- Saccharose - 30 g/L
	- Nitrate de sodium - 3 g/L
Bouillon de Czapek-dox (Difco™) :	- Phosphate dipotassique - 1 g/L
	- Sulfate de magnésium - 0,5 g/L
	- Chlorure de potassium - 0,5 g/L
	- Sulfate ferreux - 0,01 g/L
Tryptone	10 g/L

Afin de s'assurer de la bonne croissance de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* dans la solution nutritive, 200 µL d'une suspension de *P. oxalicum* et de *S. epidermidis* ont été injectés simultanément pourensemencer 20 mL de solution nutritive placée dans un erlenmeyer de 100 mL sans agitation. La Figure II- 13 décrit l'évolution, en fonction du temps, des concentrations de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* cultivables dans la solution nutritive à 25°C.

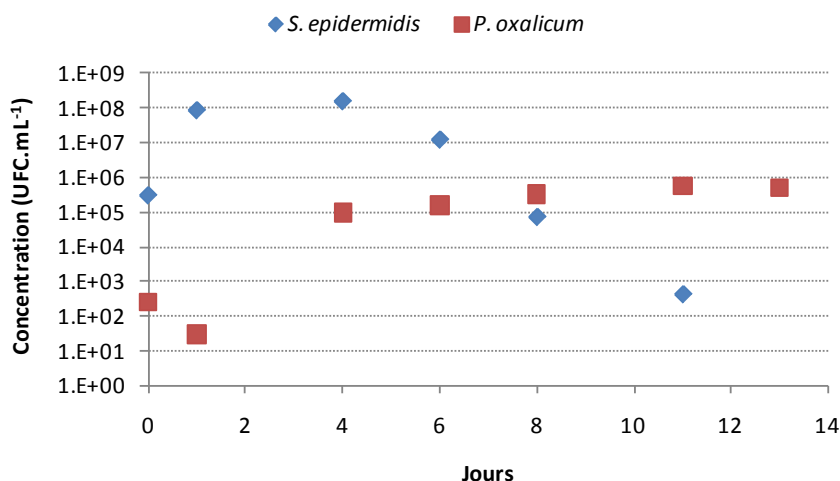


Figure II- 13. Evolution au cours du temps des concentrations de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* dans la solution nutritive maintenue dans une étuve à 25°C

Les résultats démontrent une augmentation de la concentration de *S. epidermidis* cultivables les quatre premiers jours de l'opération (+ 3 log) puis une décroissance régulière pour atteindre une concentration avoisinant  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> le douzième jour. La concentration initiale est proche de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. La concentration des bactéries dans la solution nutritive continue de chuter jusqu'à la limite de détection. Parallèlement à l'évolution de la concentration de *S. epidermidis*, la concentration en spores de *P. oxalicum* cultivables, proche de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> après une journée, croît jusqu'au quatrième jour jusqu'à  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Après le quatrième jour une stabilisation est observée autour d'une concentration avoisinant  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Ces résultats démontrent que les bactéries *S. epidermidis* ont trouvé les ressources nécessaires pour croître dans la solution nutritive à la température de 25°C. Néanmoins une perte de cultivabilité est observée à partir du quatrième jour. Il est possible d'expliquer ce phénomène selon deux hypothèses. Une première hypothèse consiste à supposer l'entrée en compétition des bactéries et des champignons pour l'accès aux nutriments. Lorsque les conditions sont favorables, les spores fongiques se développent pour former un réseau d'hyphes nommé mycélium. Les hyphes composent l'appareil végétatif des champignons. Ils leur permettent de fabriquer des spores et de se répandre pour accéder plus facilement aux sources nutritives. Les champignons ont le potentiel pour croître très rapidement en neutralisant la croissance bactérienne en réduisant puis limitant la source nutritive. Les bactéries atteignent ainsi leur maximum de croissance plus rapidement que si elles étaient seules. Selon l'autre hypothèse les champignons limiteraient le développement des bactéries en synthétisant des molécules antibactériennes, comme les antibiotiques, lors de la phase de



ralentissement de croissance et de la phase stationnaire (Deacon, 2006). En effet l'étude de la croissance d'une espèce fongique dans une solution nutritive liquide en batch test, sans renouvellement de nutriments, indique plusieurs phases de croissance. Après une phase de démarrage, le nombre de cellules fongiques cultivables augmente de façon exponentielle. Puis débute une phase de ralentissement de croissance avant d'atteindre une phase stationnaire lors de laquelle approximativement autant de nouvelles cellules que de cellules mortes apparaissent. Enfin la dernière phase correspond à la phase de l'autolyse lors de laquelle le nombre de cellules fongique cultivables décroît.

## **IV.2. Analyse des filtres**

### IV.2.1. Développement des microorganismes sur les filtres contaminés

Suite à la contamination des filtres par le consortium microbien, ceux-ci sont suspendus immobiles dans une atmosphère sous des conditions de température et d'humidité relative contrôlées. Les filtres ne sont plus soumis à un flux d'air afin de simuler le cas d'un arrêt de ventilation de CTA. Le schéma de la Figure II- 14 présente le dispositif expérimental permettant le contrôle de la température et de l'humidité relative :

- Le contrôle de l'humidité est réalisé par recirculation de l'air dans la boîte à un faible débit et à travers un système d'humidification (circuit d'eau) ou de séchage (grains de silice).
- Le système complet est placé dans une étuve à température contrôlée pour assurer une température constante au sein de la boîte hermétique.
- La température et le taux d'humidité relative sont mesurés régulièrement par un thermo-hygromètre dans l'enceinte.

Dans la suite de l'étude, deux temps d'arrêt de ventilation sont appliqués : 48h, soit un arrêt week-end et 168h, soit un arrêt représentatif d'une semaine de vacances.

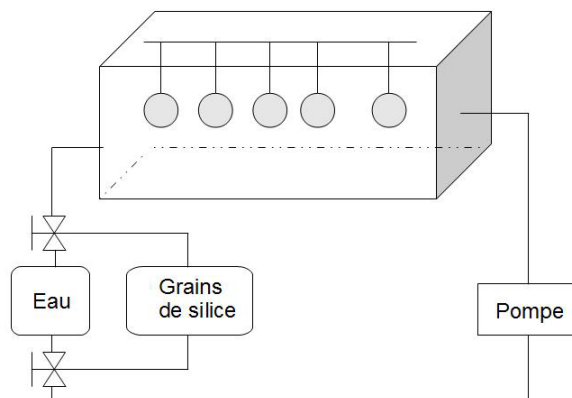


Figure II- 14. Schéma du système expérimental de maintien des filtres sous atmosphère contrôlée

#### IV.2.2. Relargage microbien en aval des filtres

Une croissance bactérienne et/ou fongique sur un filtre peut entraîner des concentrations microbiennes anormalement élevées en aval de la filtration d'une CTA. En effet, lors d'un développement microbien, un filtre peut (Bonnevie-Perrier, 2008) :

- Se colmater plus rapidement, ce qui risque de favoriser un réentraînement de particules en aval des filtres.
- Subir une diminution de son efficacité lors de la consommation des particules collectées sur le filtre, voire le filtre lui-même, par les microorganismes alors à la recherche de sources nutritives nécessaires à leur croissance. De plus, des passages préférentiels sont également susceptibles de favoriser le relargage de microorganismes et de particules en aval des filtres.

Lorsqu'un développement microbien se manifeste, les filtres représentent donc une source potentielle de pollution de l'air. Dans le cas particulier où la ventilation est arrêtée sur une période, le redémarrage de la ventilation peut engendrer un à-coup de débit d'air qui peut occasionner le relargage des microorganismes.

Pour étudier le relargage microbien en laboratoire, Bonnevie-Perrier et al. (2008) ont développé un pilote de filtration schématisé en Figure II- 15. Le montage expérimental se compose d'une canalisation cylindrique droite en acier inoxydable de 45 mm de diamètre pour environ 1,5 m de longueur. L'échantillon de média filtrant contaminé se positionne à mi-longueur de la canalisation en configuration plane et perpendiculaire au flux d'air. La canalisation est positionnée verticalement, ce qui permet de limiter le dépôt de particules sur les parois. Un filtre est placé en aval du média filtrant testé. Il permet la collecte des

microorganismes relargués par le filtre testé. Les particules microbiennes relarguées et collectées par le filtre d'échantillonnage sont extraites via un protocole d'extraction spécifique présenté au paragraphe IV.2.3.

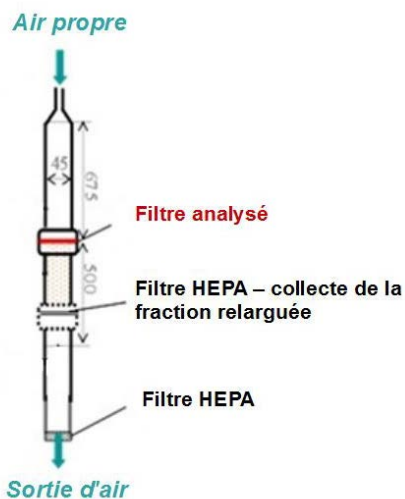


Figure II- 15. Colonne de filtration permettant d'étudier le relargage microbien provenant d'un filtre

La collecte des microorganismes relargués s'effectue sur une durée de 20 minutes par injection d'air comprimé à un débit de 12 L/min qui induit une vitesse de filtration de  $0,16 \text{ m.s}^{-1}$  au niveau du filtre testé, soit à la même vitesse de filtration que dans le dispositif servant à la contamination des filtres.

#### IV.2.3. Méthodes d'extraction des microorganismes des filtres

Préalablement à la quantification des microorganismes collectés sur les filtres, ceux-ci en sont extraits en suivant le protocole d'extraction optimisé dans une thèse précédente (Bonnevie-Perrier, 2008). La base de ce protocole provient d'une étude de Möritz and Martiny (1997) qui ont élaboré une méthodologie d'extraction spécifique à l'étude de la contamination des médias fibreux filtrants. Les travaux de Kemp et al. (2001) ainsi que des expériences complémentaires ont ensuite permis d'optimiser le procédé de base.

Les différentes étapes opératoires sont les suivantes (Bonnevie-Perrier, 2008) :

- ✓ Introduction de l'échantillon du média à analyser dans un récipient de 200 mL contenant une solution stérile (autoclave 20 min,  $121^\circ\text{C}$ ) composée de :
  - 35 mL de  $\text{MgSO}_4$  (0,01 M)
  - 15 mL de tween 20 (0,25% en volume) dans de l'eau déminéralisée
- ✓ Agitation (1 h, table d'agitation à 300 rotations par minute)

- ✓ Passage aux ultrasons (100 W ; 20 kHz) pendant 1 min

L'efficacité de récupération des spores de *P.oxalicum* cultivables provenant du filtre est évaluée entre 80 et 85% pour le média filtrant testé (Bonnevie-Perrier, 2008). L'extraction est suivie d'une quantification des microorganismes.

L'application du protocole implique une longue agitation puis un passage aux ultrasons. Ces deux étapes peuvent induire des chocs et une détérioration des cellules microbiennes puis enfin une perte de la cultivabilité des microorganismes. C'est pourquoi l'application de la méthodologie d'extraction a été validée en termes d'effet sur la cultivabilité pour *P. oxalicum* et *S. epidermidis*. Les résultats sont présentés en Figure II- 16.

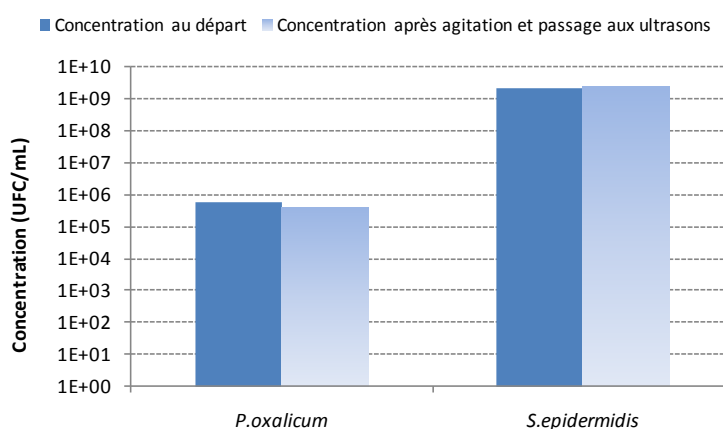


Figure II- 16. Etude de l'influence du protocole d'extraction des microorganismes sur leur cultivabilité

La Figure II- 16 présente les concentrations de *P.oxalicum* et *S.epidermidis* cultivables d'une suspension liquide avant les deux étapes du protocole d'extraction à savoir agitation et passage aux ultrasons. Les concentrations de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* ne subissent aucune variation significative avant et après l'application du protocole. *P. oxalicum* maintient sa concentration autour de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> tandis que *S. epidermidis* avoisine  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> tout au long de l'opération.

## V. Synthèse de la méthode

Voici le rappel des trois principales étapes de la méthodologie décrite dans ce chapitre :

- Contamination des filtres plans en simulant la filtration d'un aérosol composé de deux espèces microbiennes, l'une bactérienne, *Staphylococcus epidermidis* et l'autre fongique, *Penicillium oxalicum*.
- Evaluation quantitative et qualitative du développement bactérien et fongique sur les filtres lors d'un arrêt de ventilation (température et humidité relative contrôlées) pendant 48h et 168h.
- Evaluation quantitative du relargage microbien provenant des filtres directement après la contamination des filtres puis la remise en marche immédiate de la ventilation, ainsi qu'après les deux arrêts de ventilation pendant 48h et 168h.

## VI. Conclusion

L'étude du comportement microbien sur des filtres est réalisée sous conditions de laboratoire afin de maîtriser certains paramètres. En réalité, la quantité de microorganismes présents dans l'air intérieur est importante et ne peut être reconstituée. Deux espèces microbiennes modèles typiquement présentes en air intérieur ont été sélectionnées, l'une bactérienne et l'autre fongique (*Staphylococcus epidermidis* et *Penicillium oxalicum*) afin de pouvoir suivre leur comportement sur des filtres commerciaux de CTA. Pour cela, la méthodologie décrite dans ce chapitre a été établie et consiste à contaminer plusieurs filtres en parallèle de façon homogène puis à simuler un arrêt de ventilation de CTA en fixant un taux d'humidité et une température auxquels sont exposés les filtres. L'homogénéité de la contamination des filtres a été validée et l'aérosol généré a été caractérisé. Ensuite la croissance des microorganismes sur des filtres lors d'arrêts de ventilation est étudiée en quantifiant les microorganismes cultivables ainsi que le taux d'ergostérol. Le comportement des microorganismes et du matériau filtrant sont également observés au Microscope Electronique à Balayage (MEB). Ces résultats délivrent des informations sur le comportement des microorganismes collectés sur des filtres en termes de croissance et de leur entraînement dans l'air traité.

En plus du suivi du comportement de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum* sur les filtres de CTA, un dispositif adapté pour l'étude du relargage des microorganismes en aval des filtres lors de la remise en fonctionnement de la ventilation suite à l'arrêt de CTA est utilisé.

L'objet du chapitre suivant est d'étudier l'influence de certains paramètres sur des microorganismes collectés sur des filtres à partir de la méthodologie décrite dans ce chapitre 2 et en particulier :

- ✓ L'humidité relative variable lors de l'arrêt de la ventilation
- ✓ Les filtres de natures différentes
- ✓ L'impact du maintien d'un flux d'air propre après contamination des filtres et avant la simulation de l'arrêt de la ventilation

# CHAPITRE 3

Influence de plusieurs paramètres de CTA sur le développement des microorganismes collectés sur des filtres – Etude du relargage

---





## **I. Introduction**

L'étude bibliographique a permis de constater qu'un développement microbien sur des filtres et des concentrations en microorganismes plus importantes en aval qu'en amont de la filtration peuvent être observés.

L'apparition d'une croissance microbienne est multifactorielle. Plusieurs éléments doivent être réunis pour que des bactéries et/ou des champignons puissent se développer. Ces microorganismes nécessitent tout d'abord d'avoir accès à des nutriments. L'humidité relative est aussi un facteur important, tout comme la température. L'étude de la filtration de particules microbiennes contenues dans l'air en cas réel est intéressante puisqu'elle permet d'établir des corrélations entre plusieurs paramètres environnementaux (HR, température), de gestion de CTA (vitesse de flux d'air,...) et un développement d'espèces microbiennes. Néanmoins, peu d'études sont accessibles. De plus, les paramètres sont variables et les espèces microbiennes nombreuses ce qui rend difficile la corrélation entre comportement microbien et paramètre spécifique. C'est pourquoi une partie des travaux réalisés durant cette étude, dont les résultats sont présentés dans ce chapitre 3, a été menée sous conditions contrôlées en laboratoire. En effet, plus les conditions favorisant le développement microbien sont analysées en détail et comprises, et plus la pollution microbienne en aval de la filtration peut être maîtrisée.

Aussi dans le cadre de cette étude, le dispositif de filtration et la méthodologie de qualification du développement microbien développés et présentés au chapitre 2 ont permis d'étudier l'influence de trois paramètres sur le comportement des microorganismes collectés sur des filtres lors d'arrêt de ventilation :

- Le taux d'humidité relative pour une température constante de 25°C
- La composition du média fibreux
- La présence ou non d'un flux d'air traversant les filtres après leur contamination par des microorganismes

Tout d'abord, la méthodologie générale employée pour l'étude de chacun des paramètres est décrite. Les médias fibreux utilisés dans le cadre de cette étude sont ensuite présentés. Enfin, les résultats sont illustrés et argumentés.

## II. Matériel, méthode et protocoles

### II.1. Plan expérimental

#### II.1.1. Description générale

Le principe d'étude de l'influence de la nature du média fibreux et du taux d'humidité relative sur le comportement des microorganismes collectés sur des filtres est le même : trois séries de trois filtres sont contaminées dans le dispositif expérimental (Figure II.7, chapitre 2). Les trois filtres de la première série sont directement analysés après contamination tandis que les six filtres des deux autres séries sont introduits dans une boîte hermétique (Figure II.14, chapitre 2) pendant 48h et 168h à un taux d'humidité relative fixe pour une température constante de 25°C, avant d'être analysés à leur tour. Les analyses effectuées directement après la contamination des filtres, puis après 48h et 168h en atmosphère conditionnée sont les suivantes :

- Les microorganismes cultivables collectés sur le premier filtre sont extraits du filtre puis quantifiés par la méthode par culture (§ II.2, chapitre 2).
- Le deuxième filtre est dédié à l'analyse du relargage lors de la simulation d'un redémarrage de CTA.
- Un quart du troisième filtre est placé à l'étuve à 65 °C pendant 24h puis conservé dans un endroit sec avant son analyse au Microscope Electronique à Balayage (MEB). Le taux d'ergostérol contenu sur l'autre partie du filtre (3/4 de filtre) est évalué.

Des analyses du liquide de collecte contenu dans les BioSampler en aval des filtres sont effectuées directement après la contamination de chaque série de trois filtres. La quantité de microorganismes cultivables collectés en aval des filtres ainsi que dans le BioSampler témoin (permettant d'accéder à la concentration en microorganismes cultivables générés et échantillonnés) est évaluée par la méthode par culture (UFC).

La Figure III- 1 schématise la série d'analyses effectuées pour chaque cas d'étude, sur chaque filtre  $j$  de chaque série  $i$  ( $F_{ij}$ ) ainsi que celles effectuées sur le liquide de collecte contenu dans chaque BioSampler  $j$  ( $B_{ij}$ ).

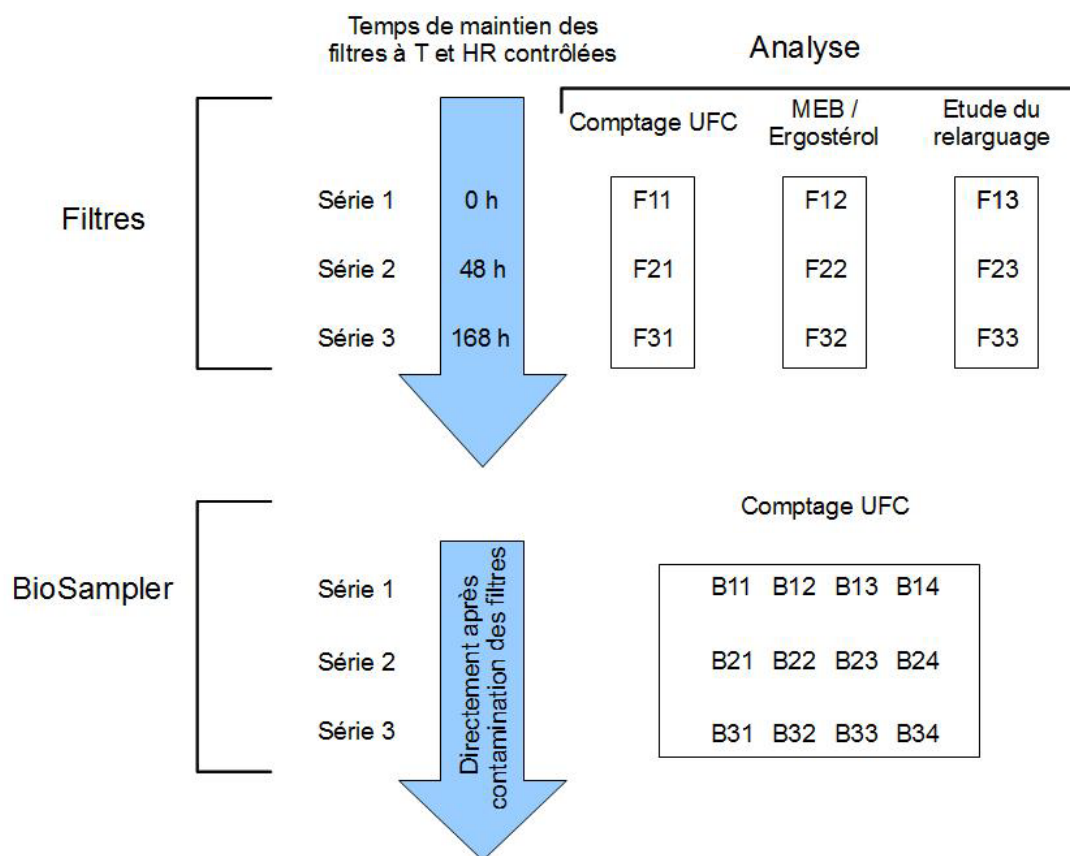


Figure III- 1. Analyses effectuées sur les filtres et dans les BioSampler au cours de chaque étude

Des adaptations du protocole ont été mises en place selon le cas d'étude.

## II.1.2. Spécifications pour chaque étude

### II.1.2.1. Humidité relative de l'air

Après contamination des filtres, trois taux d'humidité relative ont été fixés à 60%, 80% et 100% pour les séries 2 et 3 des filtres maintenus à T°C et HR contrôlées pendant 48h et 168h. L'influence du paramètre HR n'a été étudiée que sur le média en fibres de verre.

### II.1.2.2. Nature des médias fibreux

Deux médias fibreux de composition différente ont été testés. Le descriptif et les caractéristiques de ces deux médias sont présentés ci-après, au § II.2. L'un est en fibres de verre et l'autre en fibres synthétiques. L'influence de ce paramètre a été étudiée pour une seule condition d'humidité relative de 100%.

Pour chaque taux d'humidité (60%, 80% et 100%) ou média fibreux étudié (fibres de verre, fibres synthétiques), 3 séries de 3 filtres sont contaminés puis analysés selon les

opérations présentées sur la Figure III- 1. Cette opération est menée 2 fois afin d’obtenir un répliquât pour chaque taux d’humidité ou média testé.

### II.1.2.3. Présence/absence d’un flux d’air

L’objectif de ce cas d’étude est d’observer l’effet du maintien d’un flux d’air propre dans le système de filtration sur le comportement des microorganismes collectés sur le média fibreux en fibres de verre. Le schéma présenté en Figure III- 2 indique les opérations effectuées pour ce cas d’étude.

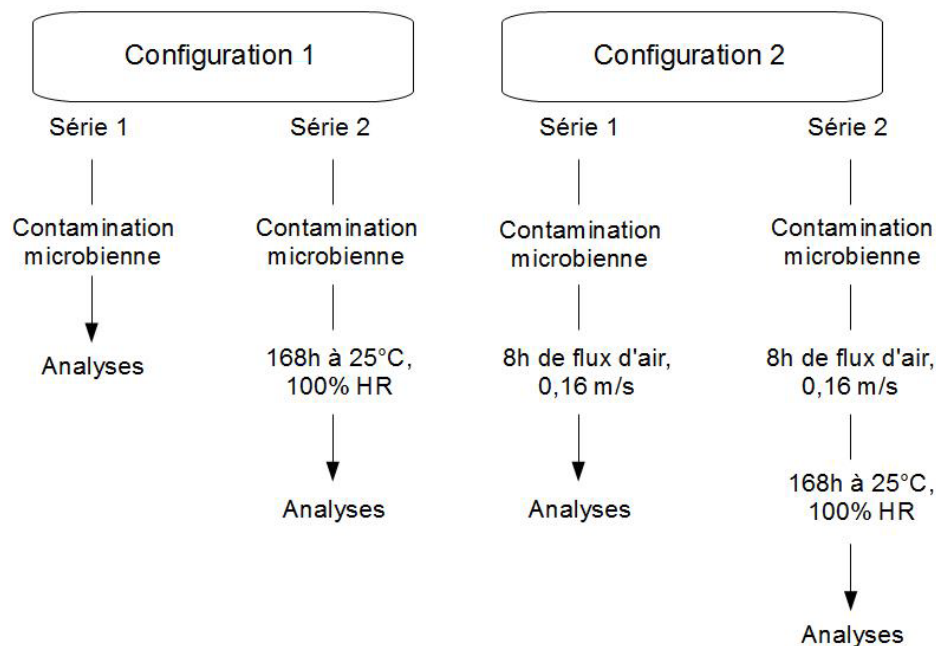


Figure III- 2. Méthodologie employée pour l’étude de l’influence d’un flux d’air sur le comportement des microorganismes collectés sur des filtres

Dans une première configuration, les trois filtres d’une première série sont analysés directement après contamination selon le même procédé indiqué en Figure III- 1. Les trois filtres de la deuxième série sont positionnés dans une boîte hermétique à 100% HR et 25°C pendant 168h, puis analysés.

Dans l’autre configuration, deux séries de trois filtres sont contaminées puis continuent d’être soumis à un flux d’air propre pendant 8h à une vitesse de filtration de 0,16 m.s<sup>-1</sup>, consécutivement à leur contamination par l’aérosol microbien. La première série est analysée après 8h de filtration de l’air propre tandis que la deuxième série est positionnée dans l’enceinte hermétique 168h (100% HR, 25°C) avant analyse.

Les configurations 1 et 2 (Figure III- 2) ont été testées 2 fois afin d’obtenir un répliquât.

## II.2. Médias fibreux testés

### II.2.1. Caractéristiques des médias fibreux testés

#### II.2.1.1. Caractéristiques générales

Les CTA du secteur tertiaire sont équipées d'un ou deux étages de filtration comprenant souvent sur l'un des deux étages voire les deux, un filtre de haute efficacité. Les filtres implémentés dans les CTA, dits de hautes efficacités et classés entre F5 à F9 selon la norme EN 779 sont généralement des filtres à poches ou à plis profonds. Dans le cadre de cette étude, deux filtres F7 de géométrie plane sont utilisés. Les filtres choisis sont composés de matériaux classiquement utilisés dans des CTA. L'un est composé de fibres de verre, l'autre de fibres synthétiques avec notamment des fibres en polypropylène. Les médias ont été fournis par la société Lydall<sup>®</sup>. Le Tableau III- 1 présente des caractéristiques de ces médias délivrées par le constructeur excepté l'épaisseur du filtre en fibres synthétiques obtenue au laboratoire.

Tableau III- 1. Caractéristiques physiques des médias fibreux testés

	Média en fibres de verre	Média en fibres synthétiques
Grammage (g/m <sup>2</sup> )	68	143
Epaisseur (mm)	0,4	1,2

Le filtre en fibres synthétiques est composé de trois couches filtrantes. Le grammage et l'épaisseur de ce filtre sont respectivement deux et trois fois plus importants que celui du filtre en fibres de verre monocouche.

#### II.2.1.2. Rétention d'eau des médias

L'affinité des médias testés avec l'eau a été analysée. En effet, l'humidité est un paramètre supposé avoir une influence notable sur la croissance microbienne. Aussi, l'hydrophobicité des filtres devrait avoir un impact sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres. L'affinité des médias avec l'eau est mesurée selon le protocole suivant (Bonnevie-Perrier, 2008) :

- Une surface connue d'échantillon de média est séchée pendant 24h à 45°C puis pesée
- L'échantillon sec est plongé dans un volume d'eau déminéralisée pendant 10 s
- L'échantillon est égoutté pendant 10 s puis pesé à nouveau

L'affinité des médias avec l'eau est définie par l'augmentation du poids de l'échantillon de filtre. L'affinité est évaluée pour 4 échantillons de chaque média et la valeur moyenne représente la capacité de rétention d'eau du média. Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau III- 2.

Tableau III- 2. Rétention d'eau des médias fibreux en fibres de verre et en fibres synthétiques

	Filtre en fibres de verre	Filtre en fibres synthétiques
Rétention d'eau ( $g_{H_2O}/g_f$ )	$1,4 \pm 0,1$	$0,05 \pm 0,01$

Le filtre en fibres synthétiques est beaucoup plus hydrophobe puisqu'il retient environ 30 fois moins d'eau que le filtre en fibres de verre.

### II.2.1.3. Porosité des médias par porosimétrie mercure

Les propriétés des matériaux poreux dépendent de la taille, de la géométrie des pores ainsi que de leur distribution. Un filtre peut être constitué de différents types de pores tels qu'indiqués sur le schéma de la Figure III- 3.

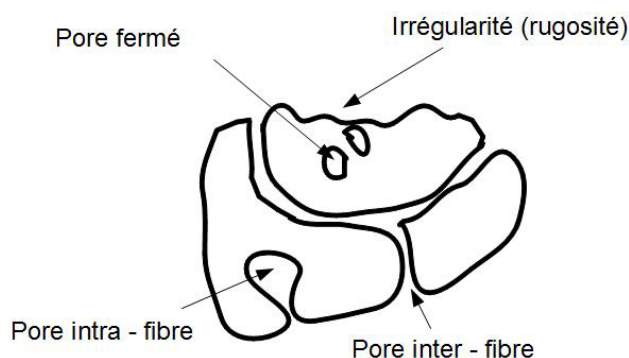


Figure III- 3. Représentation schématique des différents types de pores d'un matériau poreux

Afin de déterminer la porosité des deux médias fibreux, des mesures par porosimétrie au mercure (Porosimètre mercure Autopore IV 9500) ont été réalisées. La porosimétrie mercure consiste à déterminer les caractéristiques de méso et de macroporosité d'un matériau poreux pour différents niveaux de pression du média (Le Coq, 2008). La porosité totale ou cumulée du média est déterminée à l'échelle inter-fibres du matériau. Les diamètres des mésopores sont estimés entre 2 nm et 50 nm, tandis que les macropores présentent des diamètres supérieurs à 50 nm. L'évaluation de la porosité du matériau consiste à introduire dans un échantillon de filtre une quantité de mercure (Hg) ayant la particularité d'être un liquide non mouillant. Il ne pénètre donc pas dans les pores d'un solide poreux par capillarité mais nécessite l'application d'une pression, inversement proportionnelle à la taille des pores. La

tension de surface du mercure est élevée :  $\gamma = 485 \text{ mN.cm}^{-1}$ . Si l'hypothèse qu'un pore est circulaire est émise, la force de résistance du mercure à son intrusion dans ce pore est proportionnelle à  $-\pi d_{\text{pores}} \gamma \cos\theta$ ,  $\theta$  correspondant à l'angle de mouillage du liquide avec le matériau étudié ( $140^\circ$  pour le mercure avec la plupart des solides à l'intrusion) et  $\gamma$  à la tension superficielle du liquide avec l'air. Cette force résistante est directement proportionnelle à la pression appliquée sur le liquide, ce qui a conduit Washburn (Van Brakel et al., 1981) à élaborer l'équation III.1 définissant la courbe de distribution du volume poreux du média.

$$d_{\text{pores}} = \frac{-4\gamma \cos\theta}{P} \quad (\text{III.1})$$

$\gamma$  est exprimée en  $\text{N.m}^{-1}$

Respectivement pour le média en fibres de verre et celui en fibres synthétiques, trois et deux essais ont été effectués sur des échantillons de matériaux de 0,03 à 0,06 g. Les courbes situées en Figure III- 4 et Figure III- 5 représentent respectivement les distributions poreuses du filtre en fibres de verre et de celui en fibres synthétiques. La porosité cumulée en fonction des diamètres de pores est représentée sur ces graphiques. Il est alors possible d'isoler les diamètres de pores prédominants qui correspondent aux points d'inflexion.

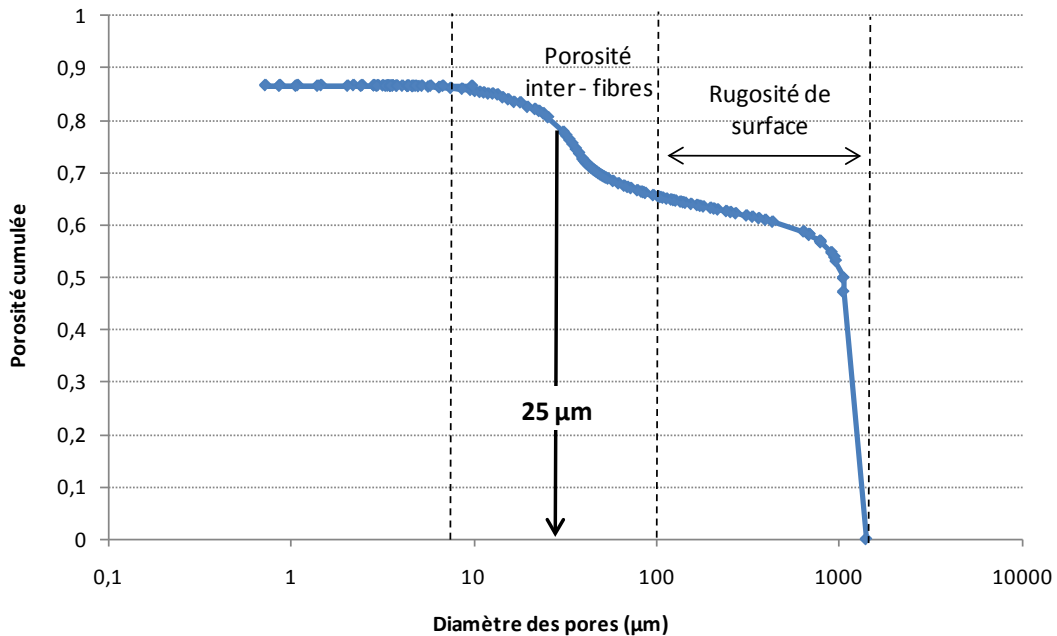


Figure III- 4. Distribution poreuse du média en fibres de verre (porosimétrie au mercure)

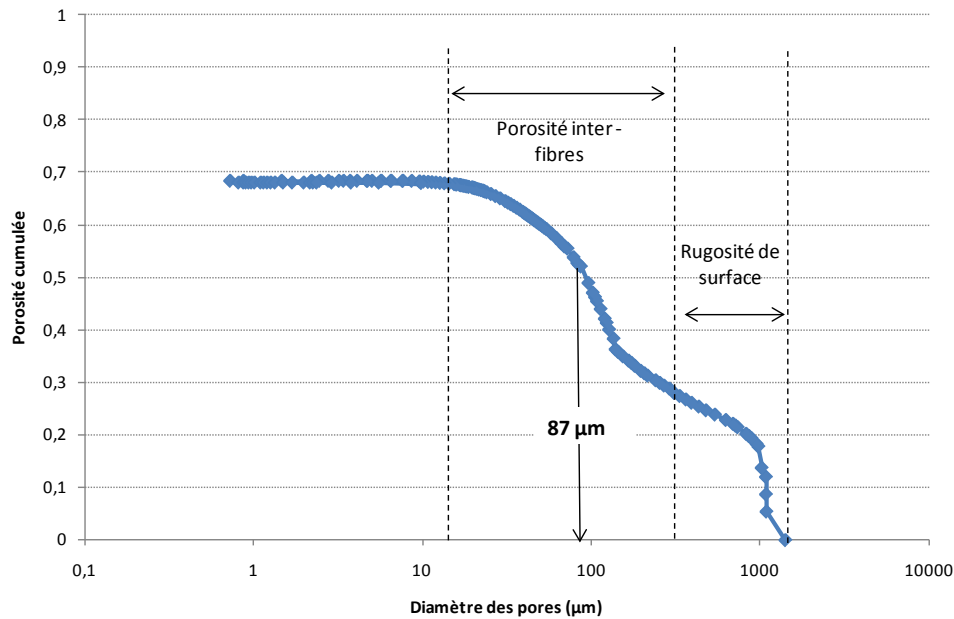


Figure III- 5. Distribution poreuse du média en fibres synthétiques (porosimétrie au mercure)

L'analyse de la distribution poreuse du filtre permet de différencier deux modalités. Le premier mode est centré sur les faibles diamètres de pores et correspond à la porosité inter-fibres et l'autre est centré sur des diamètres de pores plus larges correspondant à la rugosité de surface du média. Le diamètre moyen modal des pores inter-fibres est de 25  $\mu\text{m}$  pour le filtre en fibres de verre, soit bien inférieur à celui du filtre en fibres synthétiques qui est évalué à 87  $\mu\text{m}$ . Il s'avère également que la rugosité de surface est bien plus importante sur le filtre en fibres de verre que sur le filtre en fibres synthétiques. En effet, la porosité correspondant à la rugosité de surface représente environ 65% de la porosité totale du filtre en fibres de verre, tandis qu'elle représente environ 36% de la porosité totale du filtre en fibres synthétiques. Il faut néanmoins préciser que la porosité du filtre en fibres synthétiques a été déterminée à partir d'un échantillon de média comprenant les 3 couches filtrantes. Une analyse par couche permettrait d'affiner encore les résultats. Le Tableau III- 3 regroupe les valeurs de porosité des deux médias.

Tableau III- 3. Porosités inter-fibres, de rugosité de surface et totale du filtre en fibres de verre et en fibres synthétiques (porosimétrie au mercure)

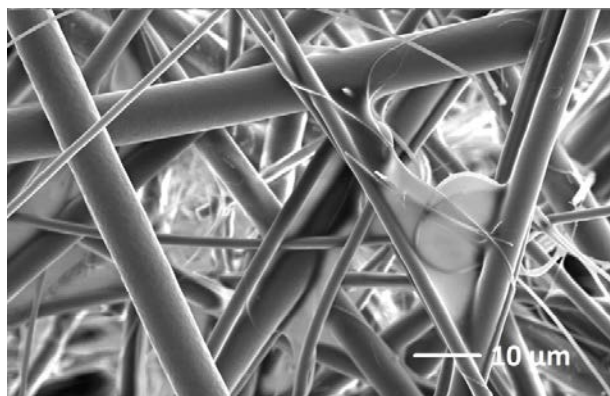
	Filtre en fibres de verre	Filtre en fibres synthétiques
$\epsilon_{\text{inter-fibres}}$ (%)	25 $\pm$ 4	46 $\pm$ 5
$\epsilon_{\text{rugosité de surface}}$ (%)	59 $\pm$ 6	26 $\pm$ 1
$\epsilon_{\text{totale}}$ (%)	91 $\pm$ 4	72 $\pm$ 4



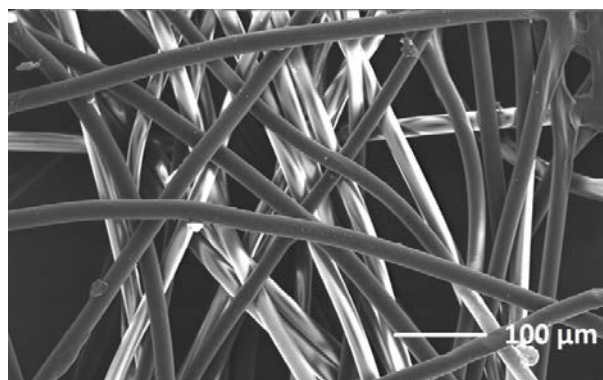
#### II.2.1.4. Diamètre des fibres

Les diamètres des fibres ont été déterminés à partir de l'analyse des photographies d'échantillons de filtres obtenues au Microscopie Electronique à Balayage. Ces photographies sont présentées en Figure III- 6.

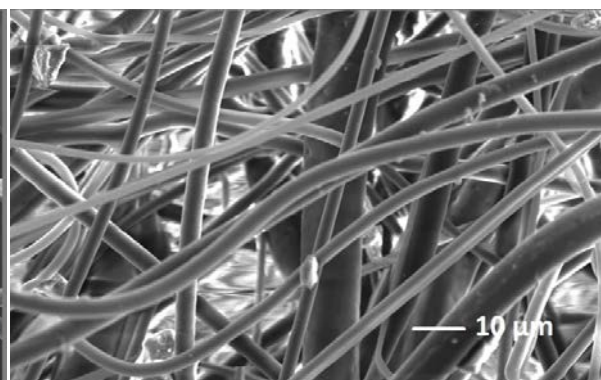
a)



b)



c)



**Figure III- 6. Observation des médias vierges par microscopie électronique à balayage : a) filtre en fibres de verre ; b) filtre en fibres synthétiques : à gauche, couche supérieure/inférieure du filtre, à droite, couche du milieu du filtre**

Un diamètre moyen des fibres a été déterminé pour chaque filtre à partir de la mesure numérique par le logiciel Semafore du diamètre de 30 fibres provenant de 3 photographies différentes (10 diamètres de fibres pour chaque photographie). Les résultats sont regroupés dans le Tableau III- 4.

Tableau III- 4. Diamètres moyens des fibres des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques

		Diamètre moyen (μm)	Ecart type (μm)
<b>Filtre en fibres de verre</b>		3,9	2,4
<b>Filtre en fibres synthétiques</b>	Couche inférieure/supérieure	20,9	1,8
	Couche centrale	4,4	3,1
	Filtre global	14,8	8,4

II.2.1.5. Perméabilité des filtres

La perméabilité de chaque média fibreux a été évaluée par la mesure de l'évolution des pertes de charge générées lors de l'écoulement de l'air au travers du média en fonction de la vitesse frontale de l'air le traversant. La Figure III- 7 présente ces résultats.

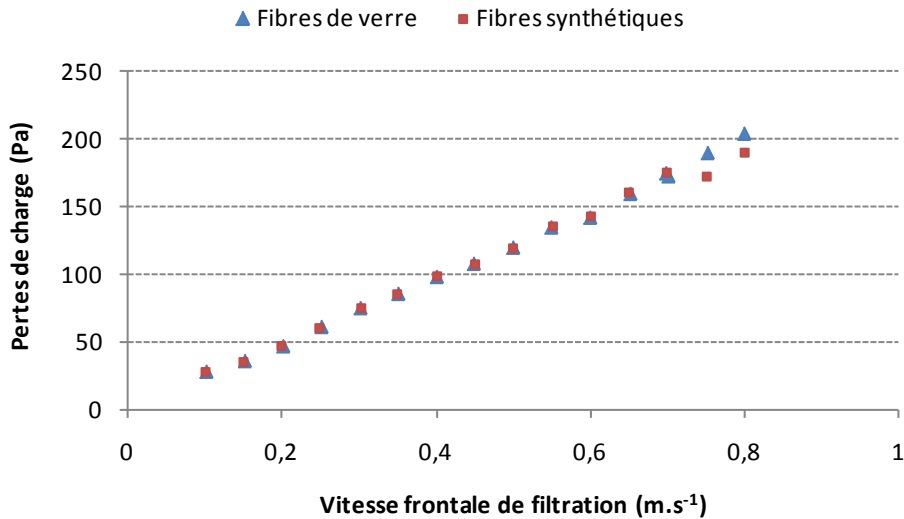


Figure III- 7. Evolution des pertes de charge des filtres vierges en fibres de verre et fibres synthétiques en fonction de la vitesse de filtration

La perméabilité des filtres est ensuite calculée à partir de la pente de la courbe des pertes de charge en fonction de la vitesse frontale de filtration, correspondant à  $(\frac{\mu e}{B_0})$  selon la loi de Darcy (équation III.2) dans le cas d'un régime laminaire linéaire :

$$\Delta P = \frac{\mu e}{B_0} v \tag{III.2}$$

Le calcul des nombres de Reynolds attribués à chaque vitesse a permis de s'assurer que le régime est bien laminaire dans la gamme de vitesses appliquées aux médias fibreux. Lorsque la porosité inter-fibres est inférieure à 80%, ce qui est le cas pour les deux médias

fibres étudiés, le nombre de Reynolds de pores se calcule selon l'équation I-1, § IV.1.1.1, chapitre 1 :

$$Re_{pores} = \frac{\rho v}{(1 - \varepsilon_i) \mu s_f}$$

Les nombres de Reynolds ainsi que les perméabilités sont présentés dans le Tableau III- 5.

**Tableau III- 5. Valeurs des nombres de Reynolds et des perméabilités pour les deux médias étudiés**

	<b>Filtre en fibres de verre</b>	<b>Filtre en fibres synthétiques</b>	
$d_f$	$3,9.10^{-6}$	$14,8.10^{-6}$	<i>m</i>
$\varepsilon$	0,91	0,72	-
$S_f$	$1,0.10^6$	$2,7.10^5$	<i>m</i> <sup>-1</sup>
$v$	entre 0,15 et 0,8	entre 0,15 et 0,8	<i>m.s</i> <sup>-1</sup>
$e$	$0,4.10^{-3}$	$1,2.10^{-3}$	<i>m</i>
<b>Re<sub>pores</sub></b>	<b>de 0,11 à 0,56</b>	<b>de 0,13 à 0,69</b>	-
<b>B<sub>0</sub></b>	<b><math>3.10^{-11}</math></b>	<b><math>9.10^{-11}</math></b>	<i>m</i> <sup>2</sup>

L'écoulement de l'air au sein des deux médias dans la gamme de vitesses appliquées (entre 0,15 et 0,8 m.s<sup>-1</sup>) est en régime laminaire. Le média en fibres synthétiques est 3 fois plus perméable que le filtre en fibres de verre.

## II.2.2. Efficacité fractionnelle initiale de filtration

Les efficacités fractionnelles initiales de filtration du filtre en fibres de verre et du filtre en fibres synthétiques ont été déterminées suite à la génération par voie liquide (nébuliseur Devilbiss 40 et AGK 2000, Palas) de particules de Polyvinyl-Acétate (PVA) dont le diamètre médian est évalué à  $0,2 \mu\text{m}$ . La vitesse de filtration a été fixée à  $0,16 \text{ m.s}^{-1}$ , puisque c'est la vitesse de filtration qui est appliquée dans la suite de l'étude. Les concentrations en particules ont été mesurées en amont et en aval grâce à un compteur optique (PMS Lasair 1001, 8 canaux de  $0,1$  à  $2 \mu\text{m}$ ).

### II.2.2.1. Filtre en fibres de verre

La Figure III- 8 présente l'efficacité de filtration du filtre en fibres de verre selon le diamètre des particules de PVA naturellement chargées générées.

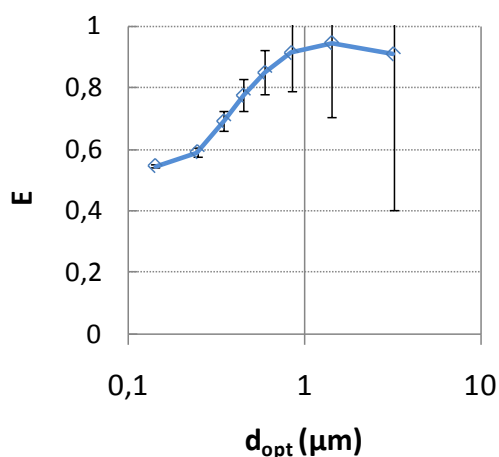


Figure III- 8. Efficacité fractionnelle initiale du filtre en fibres de verre

La norme EN 779 stipule que des filtres F7 doivent détenir une efficacité initiale de filtration comptée en nombre comprise entre 80 et 90% pour des particules de diamètre  $0,4 \mu\text{m}$  (Aérosol de DEHS-Di-éthyl-héxyl sébaçate) au débit d'air nominal. L'efficacité du filtre a été évaluée expérimentalement à 69% avec une incertitude de 3% à un débit inférieur au débit nominal. Les performances du filtre sont légèrement inférieures à celles attendues pour un filtre appartenant à la classe des filtres fins F7 mais les conditions de mesures en termes de vitesse de filtration n'étant pas les mêmes que celles de la norme, cela explique que l'efficacité fractionnelle initiale de filtration puisse être inférieure. En effet, les mesures ont été effectuées à une vitesse de filtration de  $16 \text{ cm.s}^{-1}$ , supérieure à la vitesse nominale qui est de  $5,3 \text{ cm.s}^{-1}$ . Or, selon Thomas (2001) cité dans Joubert (2009), lorsque la vitesse de filtration augmente, l'efficacité des mécanismes de collecte évolue. En effet, pour des

particules de 0,4  $\mu\text{m}$ , les mécanismes de collecte par interception et diffusion sont prédominants. Et bien que le mécanisme d'interception soit peu influencé par la vitesse de filtration, Thomas (2001) montre que l'efficacité de collecte par le mécanisme de diffusion diminue lorsque la vitesse de filtration augmente.

#### II.2.2.2. Filtre en fibres synthétiques

Le média en fibres synthétiques a été soupçonné d'être de type électret et donc d'être composé de fibres comportant des charges électriques. C'est pourquoi l'efficacité de filtration du média en fibres synthétiques a été évaluée par la filtration d'un aérosol de PVA selon différentes configurations de charges :

- Charges naturelles ( $P_c$ ) en réponse au procédé de génération par voie liquide (nébuliseur Devilbiss 40 et AGK 2000, Palas). La loi de charge est modélisée selon l'équation suivante (Bemer et al., 2012) :

$$ne = 92 \times d_p^{1,5} \quad (0,1\mu\text{m} \leq d_p \leq 2\mu\text{m}) \quad (\text{III.3})$$

- Charges neutralisées ( $P_0$ ) par un procédé de neutralisation et de précipitation (Bemer et al., 2012). Tout d'abord, la neutralisation partielle des charges de l'aérosol est obtenue en appliquant un courant (50  $\mu\text{A}$ ) négatif et positif aux deux électrodes d'un chargeur à effet couronne (EAN 581, Topas). Puis, l'élimination des particules chargées résiduelles est obtenue par l'application d'une tension maximale à l'électrode du précipitateur (7,5 kV).

Le chargeur à effet couronne est alimenté par de l'air comprimé filtré. Les particules de l'aérosol sont chargées électriquement par l'introduction d'un air ionisé (+/-) au niveau du flux d'aérosol.

Le filtre a également été testé selon deux configurations :

- Le filtre vierge dans son état d'origine ( $f_c$ ) avec des particules chargées électriquement
- Le filtre vierge après avoir subi la neutralisation de ses charges électriques ( $f_0$ ) en le trempant dans une solution d'isopropanol, suivi d'une phase de séchage sous hotte (inspiré d'une méthode d'essai de la norme NF EN 779, 2012)

La Figure III- 9 présente les efficacités de filtration du filtre synthétique selon ces différentes configurations.

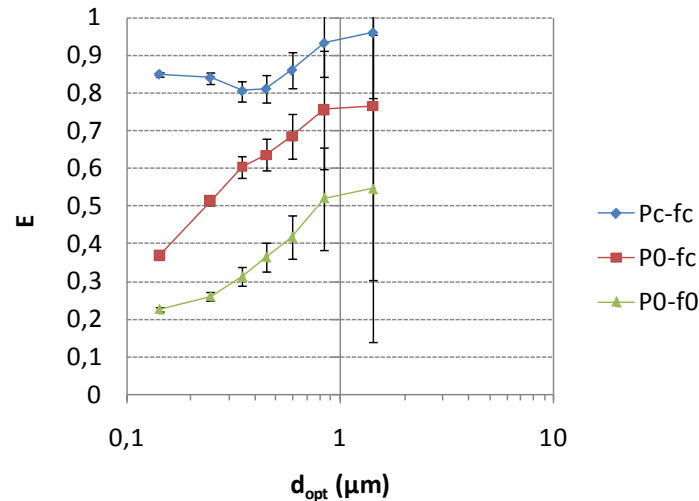


Figure III- 9. Efficacité initiale du filtre en fibres synthétiques selon différentes configurations de charge :  $P_c-f_c$  ;  $P_0-f_c$  ;  $P_0-f_0$

Dans l'état de charge d'origine du filtre ( $f_c$ ) et lorsque les particules sont chargées ( $P_c$ ), le filtre présente une efficacité de collecte typique d'un filtre de haute efficacité de type F7 puisque l'efficacité de capture des particules au diamètre optique de  $0,4 \mu m$  atteint 80%.

Une diminution significative de l'efficacité du filtre, qui n'est plus que de 64%, est observée lorsque les charges des particules sont neutralisées. La chute de l'efficacité du filtre est particulièrement importante pour les particules présentant un diamètre inférieur à  $0,3 \mu m$ . Les performances se dégradent encore plus lorsque les fibres du filtre et les particules sont neutralisées. L'efficacité de collecte des particules présentant un diamètre avoisinant  $0,4 \mu m$  ne dépasse pas 37%. Dans cette configuration, le filtre est loin de présenter les performances d'un filtre de haute efficacité F7.

Ces résultats montrent la présence importante de charges électriques sur les fibres synthétiques du média fibreux dans son état d'origine et confirment que le filtre est de type électret. Sous certaines conditions (quantité de particules collectées, type de particules collectées,...), les charges des fibres de ce type de filtre présentant une distribution de charges électrostatiques peuvent être neutralisées. Des études ont démontré que lorsque les charges des fibres d'un filtre électret sont neutralisées la pénétration peut être beaucoup plus importante, jusqu'à 50 fois, que celle du filtre chargé (Walsh et al. , 1997a; Sea-Lim et al., 2006 ; Chazelet et al., 2011). En effet, dans le cas de la filtration par un filtre électret, en plus des mécanismes classiques de filtration (impaction, diffusion brownienne, inertie) interviennent d'autres forces (§ IV.1.1.3, chapitre 1) :

- ✓ La force de polarisation dans le cas où les fibres sont chargées et les particules neutres ( $f_c/P_0$ )
- ✓ La force image lorsque les particules sont chargées et les fibres neutres ( $P_c/f_0$ )
- ✓ La force coulombienne dans le cas où les particules et les fibres sont chargées ( $P_c/f_c$ )

Ces forces interviennent pour compléter les mécanismes classiques de filtration. Ce type de filtre est particulièrement intéressant lors de son état initial puisqu'il offre de bonnes performances épuratoires pour de faibles pertes de charge, ce qui permet de minimiser les dépenses énergétiques. Seulement, il est important de bien connaître ses limites afin d'assurer une qualité suffisante de la filtration tout au long de la durée de vie du filtre. En effet, des études démontrent qu'un filtre électret se décharge au cours de son vieillissement et notamment en présence de solvants (Payen, 2009).

### II.2.3. Efficacité fractionnelle initiale théorique de filtration

Les résultats expérimentaux d'efficacité initiale de filtration des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques ont été comparés à l'efficacité théorique obtenue à partir des équations I.21 et I.22 (§ IV.1.1.3, chapitre 1). Les efficacités fractionnelles initiales de collecte de chacun des mécanismes par diffusion brownienne, par interception directe, par inertie (impaction inertielle) et pour le filtre en fibres synthétiques, par l'effet des charges électrostatiques, ont également été calculées selon les équations précisées au § IV.1.1.3 du chapitre 1.

#### *II.2.3.1. Filtre en fibres de verre*

La Figure III- 10 représente l'efficacité initiale globale de filtration théorique du filtre en fibres de verre. Les efficacités fractionnelles initiales de collecte des particules par les mécanismes de diffusion brownienne, par interception directe et par inertie sont également représentées.

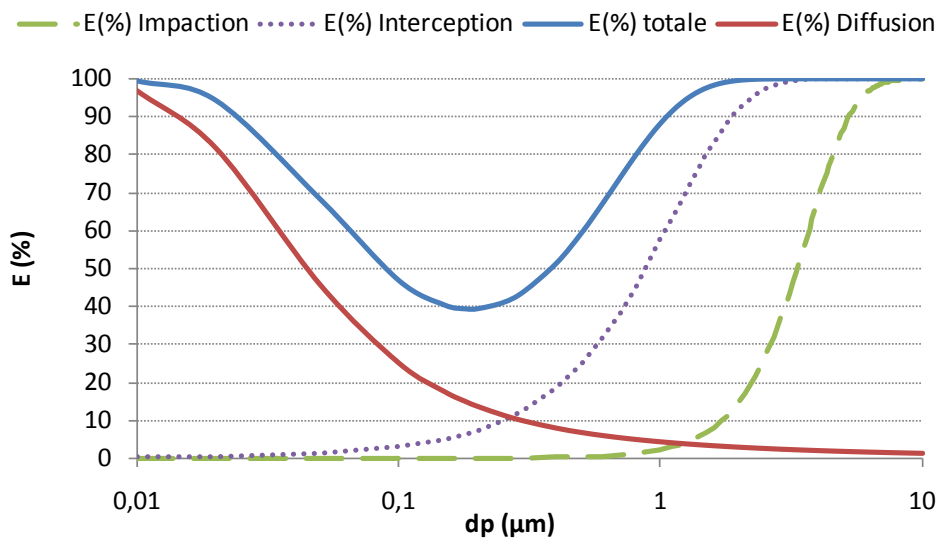


Figure III- 10. Efficacité initiale théorique du filtre en fibres de verre

Le modèle théorique délivre une tendance de l'efficacité initiale de filtration, proche de l'expérimental mais légèrement sous-estimée. Le modèle théorique ne tient compte que des trois principaux mécanismes de collecte des particules (diffusion brownienne, interception directe, impaction inertielle) et ne prend pas en considération d'autres forces extérieures (forces électrostatiques, forces de Van der Waals, forces capillaires,...). De surcroît, le modèle est conçu selon un écoulement autour d'un arrangement idéalisé des fibres supposées monodisperses, ce qui ne reflète pas la réalité (Bemer et al., 2006). Selon la théorie le minimum de filtration (MPPS) du filtre en fibres de verre est atteint vis-à-vis des particules de 0,2 µm. L'efficacité de filtration du filtre en fibres de verre est alors de 39%.

### II.2.3.2. Filtre en fibres synthétiques

Dans un premier temps, l'efficacité initiale globale de filtration théorique du filtre en fibres synthétiques a été calculée sans tenir compte de l'effet des charges électrostatiques sur la collecte des particules. Dans un second temps, l'effet des charges électrostatiques est inclus dans le calcul.

#### a) Efficacité initiale théorique de filtration sans les effets des charges électrostatiques

La Figure III- 11 représente l'efficacité initiale globale de filtration théorique du filtre en fibres synthétiques calculée sans tenir de l'effet des charges électrostatiques sur la collecte des particules. Les efficacités fractionnelles initiales de collecte des particules par les



mécanismes de diffusion brownienne, par interception directe et par inertie sont également représentées.

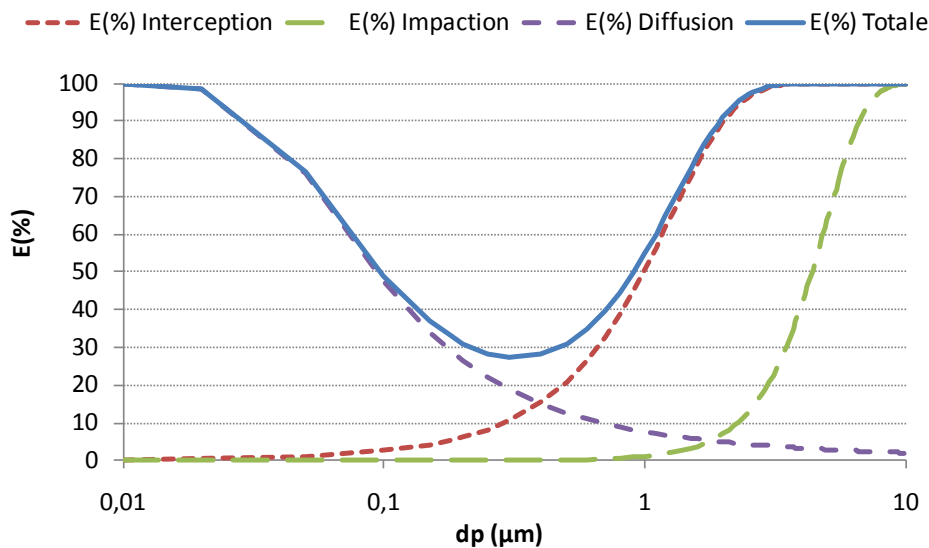


Figure III- 11. Efficacité initiale théorique du filtre en fibres synthétiques

L'efficacité théorique du média en fibre synthétiques est très faible. Cependant, le modèle utilisé ne prend pas en compte les forces générées par les charges des fibres du filtre ainsi que celles des particules collectées (force coulombienne, force de polarisation et force image). Dans le cas du filtre électret, lorsque les fibres sont chargées électriquement, la faible efficacité des mécanismes de collecte " classiques " est compensée par celui impliquant les effets électrostatiques. Expérimentalement, lorsque les fibres et les particules sont chargées, le filtre présente des efficacités de collecte représentatives d'un filtre de haute efficacité du type F7 (Figure III- 9). Le minimum de filtration du filtre en fibres synthétiques est atteint vis-à-vis des particules de 0,3 µm. L'efficacité de filtration du filtre en fibres est alors de 27%.

b) Efficacité initiale théorique de filtration avec les effets des charges électrostatiques

La Figure III- 12 présente l'efficacité fractionnelle théorique déterminée en tenant compte des mécanismes " classiques " de filtration ainsi que des forces coulombiennes (Kraemer and Johnstone, 1955). Les forces coulombiennes s'appliquent lorsque les particules et les fibres sont chargées (§ IV.1.13, chapitre 1). Pour tenir compte de ces forces, il est nécessaire de connaître la charge linéique des fibres du filtre  $\lambda_f$  (C.m<sup>-1</sup>). Celle-ci est déterminée à partir des résultats expérimentaux lorsque l'efficacité de collecte du filtre est mesurée avec des particules et les fibres du média chargées (Figure III- 9).

La charge linéique des fibres est évaluée à  $\lambda_f = 1,1 \cdot 10^{-11}$  C.m<sup>-1</sup>.

A titre de comparaison, Mouret (2008) a déterminé la densité linéique d'un filtre en fibres de polyester, de compacité 0,2, dont le diamètre moyen des fibres a été évalué à 28,3  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur 430  $\mu\text{m}$ . Il obtient  $\lambda_f = 3,37 \cdot 10^{-12} \text{ C}\cdot\text{m}^{-1}$ .

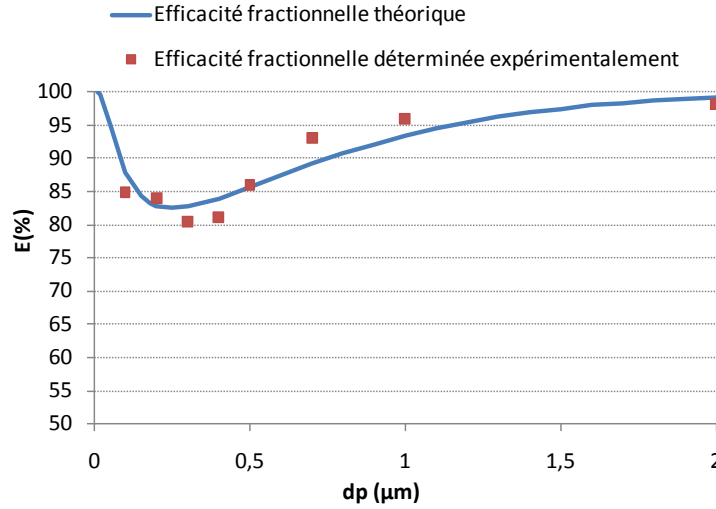


Figure III- 12. Efficacité fractionnelle théorique et expérimentale du média en fibres synthétiques déterminées lorsque les fibres et particules sont chargées

Lorsque les forces coulombiennes sont incluses dans le calcul de l'efficacité initiale théorique de filtration les résultats sont proches de ceux obtenus expérimentalement comme le démontre la Figure III- 12. Le minimum de filtration est alors évalué à 82% pour des particules de diamètre 0,25  $\mu\text{m}$ . Cette valeur est environ 3 fois plus importante que lorsque le modèle théorique ne prend pas en compte l'effet des charges électrostatiques. Il est donc essentiel de tenir compte des forces électrostatiques dans la détermination de l'efficacité fractionnelle théorique de filtration d'un filtre électret. Il est néanmoins intéressant de remarquer que la Figure III- 11 indique que le filtre électret présente une efficacité théorique trop faible pour un filtre F7 en absence de charges électriques.

#### II.2.4. Efficacité initiale de filtration des microorganismes cultivables

##### II.2.4.1. Détermination de l'efficacité initiale de filtration de *S. epidermidis* et *P. oxalicum*

La filtration de particules inertes est un domaine largement étudié tandis que la filtration de particules microbiennes est peu traitée dans la littérature. Il est difficile de prédire le comportement des particules microbiennes tant un nombre considérable de paramètres interviennent lors de la filtration : la forme des microorganismes, la densité de la particule, l'hydrophobicité, (Rengasamy et al., 2004 ; Kowalski et al., 1999). Ces paramètres varient

selon les familles, genres, espèces et l'état des microorganismes lors de la filtration. L'étude de l'efficacité de filtration des microorganismes comporte une difficulté supplémentaire liée au suivi des particules microbiologiques avant et après filtration. Le choix de la méthode de quantification des particules microbiennes est déterminant pour l'interprétation des résultats.

Dans le cadre de cette étude, l'efficacité de filtration des deux espèces microbiennes cultivables générées, à savoir *S. epidermidis* et *P. oxalicum*, est évaluée. La méthode choisie pour la quantification des microorganismes, présents en amont et en aval du filtre, est la mesure des microorganismes cultivables par méthode UFC. L'équation III.4 correspond au calcul de l'efficacité de filtration des microorganismes exprimée en équivalent UFC.

L'efficacité dépend de la fraction cultivable de l'espèce microbienne dans le BioSampler en aval du filtre et de la concentration en éléments cultivables de la même espèce dans le BioSampler témoin localisé sur la ligne de prélèvement ne contenant pas de filtre (voir le schéma illustré en figure II.7 du chapitre 2).

$$E_{UFC}(\%) = \left(1 - \frac{B_j}{B_v}\right) \times 100 \quad \text{(III.4)}$$

$E_{UFC}$  (%) : efficacité de filtration exprimée en % de la fraction cultivable des microorganismes

$B_v$  (UFC/mL) : concentration en microorganismes cultivables dans le BioSampler relié à la ligne de prélèvement ne comportant pas de filtre

$B_j$  (UFC/mL) : concentration en microorganismes cultivables dans le BioSampler relié à la ligne de prélèvement comportant un filtre

$B_v$  est le BioSampler témoin qui prend en considération les pertes des microorganismes engendrées lors de la génération, de l'échantillonnage et lors du trajet des particules dans le dispositif expérimental.

Le Tableau III- 6 synthétise les efficacités de filtration de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* cultivables par les deux médias testés. La quantité de *P. oxalicum* en aval des filtres est constamment inférieure à la limite de quantification par la méthode UFC ce qui conduit à une efficacité de filtration de spores de *P. oxalicum* cultivables supérieure à 98% pour les deux médias. Le diamètre des spores de *P. oxalicum* a été évalué entre 2 et 4  $\mu\text{m}$  (§ III.2.2.1, chapitre 2) tandis que celui de *S. epidermidis* avoisine 0,8  $\mu\text{m}$  selon la littérature (Park et al., 2011).

Tableau III- 6. Tableau récapitulatif des efficacités mesurées lors de la filtration de *S. epidermidis* par les deux médias testés

	Filtre en fibres de verre		Filtre en fibres synthétiques	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. oxalicum</i>
<b>Efficacité moyenne (%)</b>	<b>79,6</b>	<b>&gt; 98</b>	<b>57,1</b>	<b>&gt; 98</b>
<b>Ecart type</b>	2,4	-	16,9	-
<b>Nombre d'essais</b>	63	63	16	16

#### II.2.4.2. Efficacité de filtration vis-à-vis de *S. epidermidis* cultivables

L'efficacité de filtration en *S. epidermidis* cultivables mesurée pour le filtre en fibres de verre est en bonne adéquation avec l'efficacité théorique puisque selon le modèle, les particules de diamètre 0,8 µm sont capturées avec une efficacité de 80% (Figure III- 10). L'écart type de l'efficacité de filtration de *S. epidermidis* cultivables est faible ce qui démontre une bonne reproductibilité de la filtration. De même, ce résultat présente une bonne adéquation avec la mesure de l'efficacité de filtration du filtre en fibres de verre vis-à-vis de particules inertes (Figure III- 8). En effet, l'efficacité de filtration vis-à-vis des particules de PVA dont le diamètre optique est de 0,84 µm est légèrement supérieure à l'efficacité de filtration en *S. epidermidis* cultivables mais avec un écart non significatif puisqu'elle atteint une moyenne de 91% avec un écart type de 13%. Ainsi, l'efficacité UFC prend en compte l'efficacité de capture des particules par le filtre (nombre de microorganismes) et est peu influencée par la possible perte de cultivabilité des microorganismes capturés, dans le cas de *S. epidermidis*, sur le média en fibres de verre et dans les conditions expérimentales de filtration appliquées.

L'efficacité moyenne de filtration de *S. epidermidis* cultivables par le filtre en fibres synthétiques est quant à elle beaucoup plus faible et est égale à 57%. L'écart type est également beaucoup plus important que dans le cas du filtre en fibres de verre puisqu'il est de 17%. La valeur minimale et maximale d'efficacité mesurée est respectivement de 25% et 81%. Pour le filtre en fibres de verre la valeur minimale et maximale était respectivement de 58% et 94%. La disparité importante des valeurs d'efficacité vis-à-vis de *S. epidermidis* mesurées pour le filtre en fibres synthétiques peuvent s'expliquer par le protocole de préparation des filtres avant leur contamination par le consortium microbien dans le dispositif expérimental (Chapitre 2 § IV.1). Les filtres sont préalablement immergés dans une solution d'éthanol afin de les désinfecter. L'éthanol neutralise une partie des charges électriques de

surface des fibres ce qui entraîne la baisse de l'efficacité de collecte du filtre comme il l'a été démontré lors de la filtration de particules inertes dans différentes configuration de charges (Figure III- 9). Néanmoins, pour un diamètre de 0,8  $\mu\text{m}$ , l'efficacité de collecte de *S. epidermidis* est meilleure que celle obtenue dans le cas où les fibres et particules sont neutralisées. Les cellules bactériennes contiennent des charges naturelles qui augmentent probablement l'efficacité de collecte du filtre puisque la charge électrique de l'aérosol est un élément influençant la filtration (Walsh et al., 1997b). De plus, les cellules de *S. epidermidis* sont polymorphes. Il est alors également possible que des cellules présentent un diamètre moyen supérieur à 0,8  $\mu\text{m}$  et contribuent à augmenter l'efficacité moyenne de collecte de *S. epidermidis*.

#### II.2.4.3. Efficacité de filtration vis-à-vis des spores de *P. oxalicum* cultivables

L'efficacité de filtration des spores de *P. oxalicum* cultivables dont le diamètre moyen des spores varie entre 2 et 4  $\mu\text{m}$  (moyenne de 3  $\mu\text{m}$ ) est en bonne adéquation avec l'efficacité d'un filtre F7. L'efficacité de filtration en spores cultivables est en concordance avec les efficacités de collecte mesurées et calculées par une concentration en nombre de particules de PVA pour le média en fibres de verre ainsi que pour le média en fibres synthétiques lorsque les particules et les fibres du filtre présentent des charges électriques. Dans les deux autres configurations testées (P0-fc et P0-f0, Figure III- 9) les écarts types sont trop importants pour des tailles de particules supérieures à 1,5  $\mu\text{m}$  pour que les efficacités moyennes soient considérées. En revanche, le modèle théorique permet d'évaluer l'efficacité de filtration du filtre en fibres synthétiques lorsque les forces électrostatiques ne sont pas intégrées au modèle. L'efficacité de collecte vis-à-vis de particules dont le diamètre est de 3  $\mu\text{m}$  s'élève alors à 99% ce qui est en bonne adéquation avec l'efficacité moyenne UFC mesurée. En conclusion, l'efficacité UFC est également peu influencée par la possible perte de cultivabilité des microorganismes capturés dans le cas de *P. oxalicum* sur les médias en fibres de verre et en fibres synthétiques dans les conditions expérimentales de filtration appliquées.

#### II.2.5. Récapitulatif des résultats d'efficacité initiale de filtration

Les efficacités initiales de filtration obtenues expérimentalement et théoriquement pour les deux médias testés et pour des concentrations en particules exprimées en nombre. $\text{m}^{-3}$  ou en UFC. $\text{mL}^{-1}$  sont regroupées sur les Figure III- 13 et Figure III- 14. Les valeurs d'efficacité de

filtration obtenues vis-à-vis de *S. epidermidis* (diamètre moyen de 0,8  $\mu\text{m}$ ) et *P. oxalicum* (diamètre moyen de 3  $\mu\text{m}$ ) sont précisées sur les graphiques.

#### II.2.5.1. Filtre en fibres de verre

La Figure III- 13 regroupe les efficacités initiales de filtration du filtre en fibres de verre.

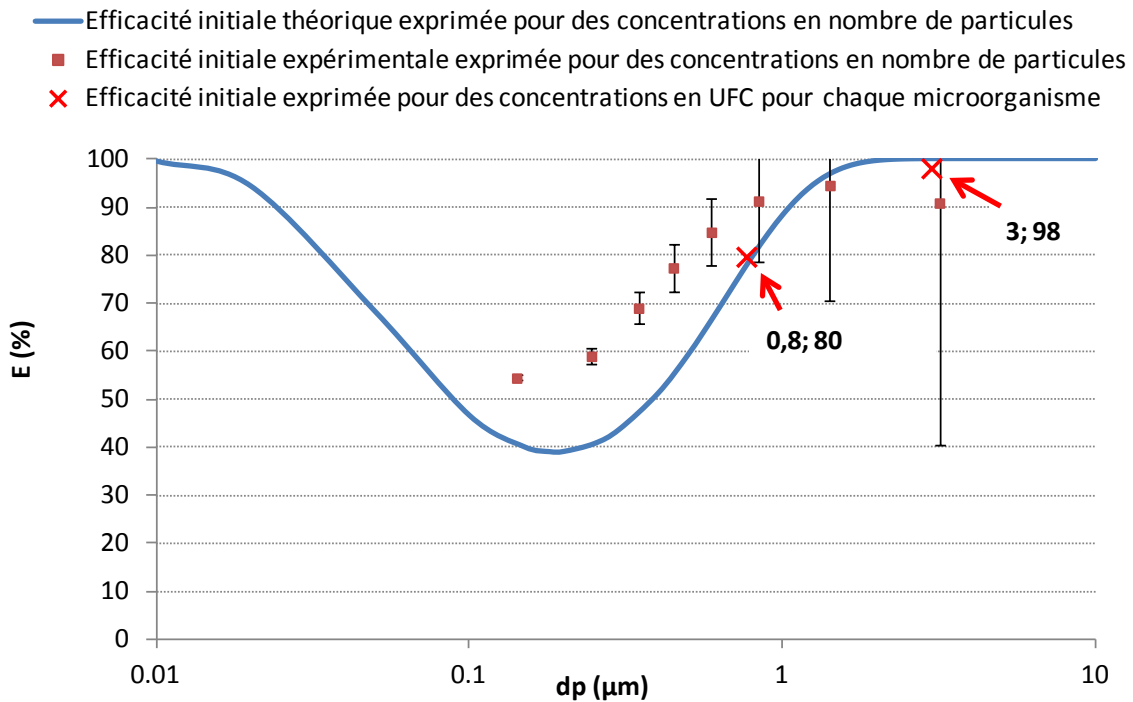


Figure III- 13. Synthèse des efficacités initiales de filtration du filtre en fibres de verre

Les tendances des courbes d'efficacité expérimentale et théorique sont les mêmes dans la gamme étudiée. Les efficacités de filtration de *S. epidermidis* cultivables et des spores de *P. oxalicum* cultivables sont en bonne adéquation avec les résultats obtenus expérimentalement avec des particules inertes ou par modélisation.

#### II.2.5.2. Filtre en fibres synthétiques

La Figure III- 14 regroupe les efficacités initiales de filtration du filtre en fibres synthétiques.

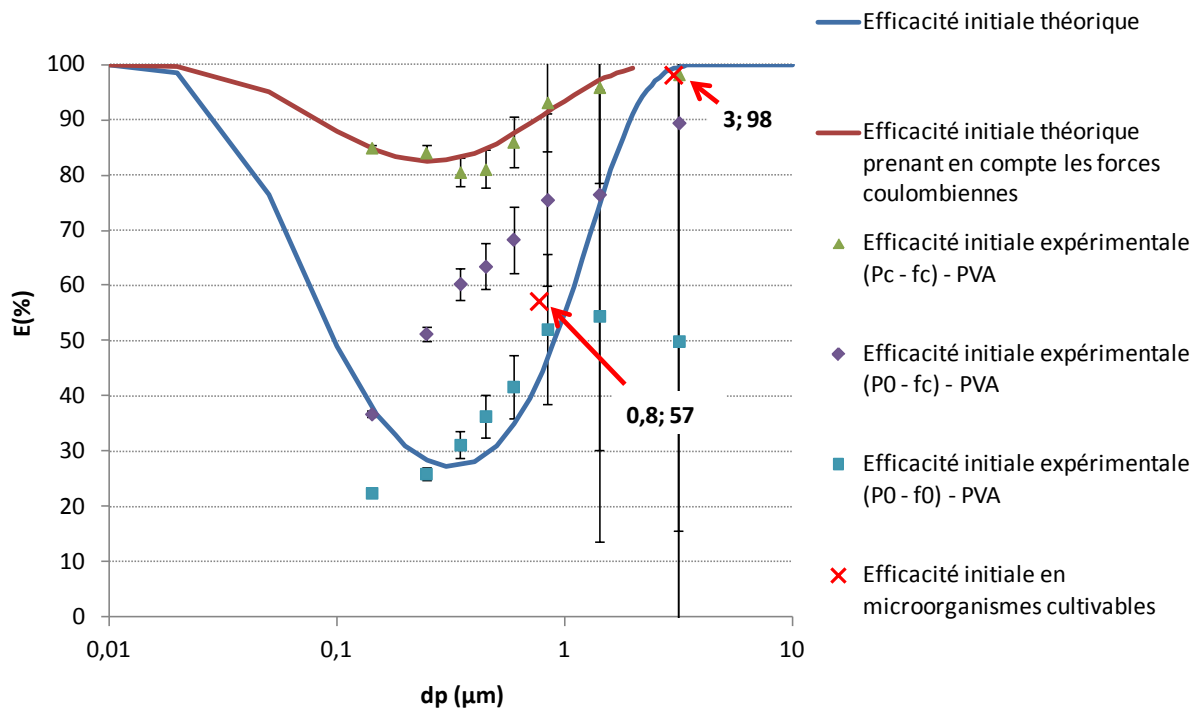


Figure III- 14. Synthèse des efficacités initiales de filtration du filtre en fibres synthétiques

Les efficacités initiales théoriques ainsi que les efficacités initiales expérimentales (Pc – fc ; P0 – fc ; P0 – f0) sont exprimées pour des concentrations en nombre de particules. L'efficacité initiale en microorganismes est exprimée pour des concentrations en UFC pour chaque espèce microbienne : *S. epidermidis* et *P. oxalicum*.

Les efficacités théoriques et expérimentales évaluées lorsque les charges électriques des fibres du filtre et des particules sont neutralisées (P0 – f0) sont en bonne adéquation dans la gamme étudiée. De même, les efficacités de filtration de *S. epidermidis* cultivables et de *P. oxalicum* cultivables sont en bonne adéquation avec ces dernières. En effet, les filtres sont préalablement immergés dans une solution d'éthanol afin de les désinfecter. L'éthanol neutralise une partie des charges électriques de surface des fibres. Cette opération de désinfection est appliquée avant la mesure de l'efficacité de filtration du média en fibres synthétiques vis-à-vis de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum* cultivables.

### III. Etude du comportement microbien en l'absence de flux d'air

L'objectif de cette partie est d'étudier l'influence d'une part de l'humidité relative et d'autre part de la nature du média, sur le développement microbien en l'absence de flux d'air pendant une durée variable. Par ailleurs, l'effet d'un flux d'air auxquels sont soumis les microorganismes après leur capture sur le filtre est également étudié.

#### III.1. Représentation des résultats

Tout au long de ce paragraphe, les concentrations en microorganismes cultivables extraits des filtres testés après un arrêt de 48h et de 168h sont normées selon l'équation III.5.

$$R_1 = \frac{C_{\text{filtre}}}{C_{\text{filtre (t0)}}} \quad (\text{III.5})$$

$C_{\text{filtre}}$  (UFC.mL<sup>-1</sup>) correspond à la concentration en microorganismes extraits du filtre après 48h et 168h d'arrêt

$C_{\text{filtre (t0)}}$  (UFC.mL<sup>-1</sup>) correspond à la concentration initiale de microorganismes extrait d'un filtre directement après sa contamination dans le dispositif expérimental.

Les taux d'ergostérol évalués sur chaque filtre sont également normés selon l'équation III.6 puis illustrés par un graphique.

$$R_2 = \frac{t_{\text{filtre}}}{t_m} \quad (\text{III.6})$$

$t_{\text{filtre}}$  (mg ergostérol/filtre) correspond au taux d'ergostérol extrait du filtre (la surface du filtre est de 12,6 cm<sup>2</sup>) suite à 48h et 168h d'arrêt

$t_m$  (mg. ergostérol/filtre) représente la moyenne du taux d'ergostérol extrait de plusieurs filtres directement après contamination.

Chaque ratio  $R_1$  et  $R_2$  est la moyenne d'un essai avec son répliquât. Les graphiques présentent alors les valeurs moyennes et une barre d'incertitude représentant les valeurs minimales et maximales obtenues.

Des photographies obtenues par microscopie électronique à balayage sont présentées et aident à l'argumentation des résultats. Ces photographies concernent des échantillons de filtre de taille très réduite pour une surface totale étudiée d'environ 12,6 cm<sup>2</sup>. Ces observations



permettent d'obtenir des informations limitées et ne représentent pas la totalité des filtres néanmoins elles délivrent des informations sur un échantillon qui a été choisis afin d'être le plus représentatif de la globalité du filtre.

Enfin le relargage microbien provenant des filtres est déterminé par la mesure de la concentration de microorganismes cultivables relargués par surface de filtre.

### III.2. Influence de l'humidité de l'air

Le taux d'humidité relative de l'air est un facteur important pouvant influencer la croissance microbienne (Pasanen, 1998). Trois taux d'humidité relative ont été retenus pour une température constante de 25°C afin d'étudier le comportement microbien sur le média en fibres de verre selon l'humidité relative :

- ✓ Environ 100% HR, l'air est alors saturé en humidité ce qui correspond au cas témoin idéal
- ✓ 80% HR
- ✓ 60% HR

#### III.2.1. Ajout d'une source de nutriments sur le filtre

Comme indiqué dans le chapitre 2, une source de nutriments est ajoutée sur les filtres (§ IV.1). La solution nutritive nébulisée sur les médias, préalablement à leur contamination par des microorganismes, peut être quantifiée par la présence de Carbone Organique Total (COT) sur les filtres. Des mesures du COT ont permis d'estimer la quantité de carbone organique à  $0,26 \text{ mgCOT.cm}^{-2} \pm 0,05 \text{ mgCOT.cm}^{-2}$ . Afin d'obtenir ce taux de COT, 4 filtres ont été disposés dans le dispositif de contamination des filtres. Suite à l'injection de la solution nutritive pendant 15 min, ceux-ci ont été plongés dans 20 mL d'eau ultra-pure puis mélangés 1 h à 300 rotations.min<sup>-1</sup>. Les filtres sont conservés dans la solution 24h à + 4°C puis sont passés aux ultrasons 20 min (100 W ; 20 kHz). La solution est finalement filtrée (fibres en polysulfone Pall® N° 66 223; 0,45 µm – 47 mm) puis analysée avec un analyseur de carbone en solution (SHIMADZU® TOC-5000A).

#### III.2.2. Croissance microbienne en absence de flux d'air

La Figure III- 15 comprend deux graphiques comparant les concentrations, d'une part des bactéries *S. epidermidis* cultivables et d'autre part des spores de *P. oxalicum* cultivables, extraites des filtres en fibres de verre après 48h et 168h sans flux d'air pour les trois taux d'humidité relative testés.

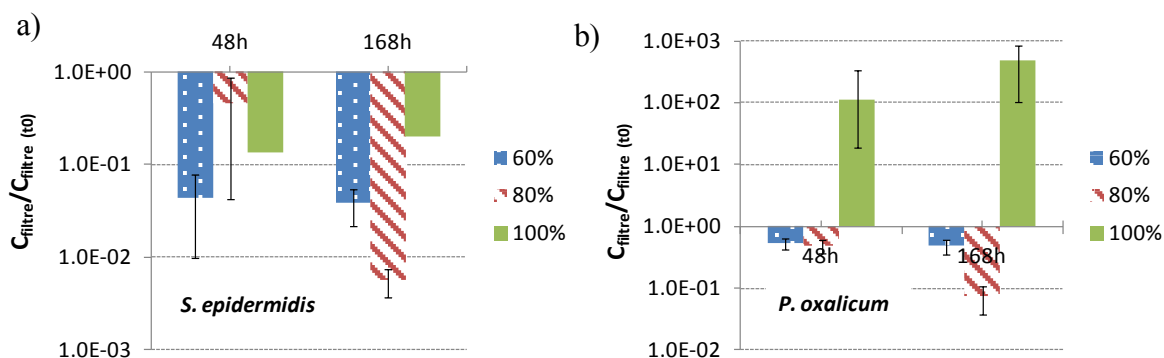


Figure III- 15. Concentrations normées après contamination sur le média en fibres de verre à 25 °C et 60%, 80% et 100 % HR pendant 48h et 168h sans flux d'air : a) *S. epidermidis* – b) *P. oxalicum*

### III.2.2.1. Etude du comportement de *S. epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* ne se développe pas sur les filtres quelles que soient les conditions d'humidité, mais en revanche, la concentration bactérienne diminue pour chaque taux d'humidité étudié. La concentration en bactéries cultivables est minimale lorsque l'humidité relative est de 80% HR. Après 168h en absence de flux d'air à 25°C, la concentration chute alors d'environ 2 log. Lorsque l'humidité relative est à 60% ou lorsque l'air est saturé en humidité, la concentration de *S. epidermidis* cultivable chute d'environ 1 log dans les deux cas. Le taux d'humidité de l'air ambiant ne représente pas le principal facteur limitant à la croissance des bactéries puisque celles-ci ne parviennent pas à se développer quel que soit le taux d'humidité. Pourtant, *S. epidermidis* se multipliait dans une solution nutritive liquide à 25°C et en présence de *P. oxalicum* lors des quatre 1<sup>ers</sup> jours (+ 3 log), comme indiqué au § IV.1 du chapitre 2. Il semblerait donc que la quantité de nutriments présents sur les filtres limite leur croissance. Lorsque les nutriments sont contenus sur les filtres sous forme solide, en quantité limitée, les bactéries ne sont pas capables de trouver les ressources nécessaires pour atteindre ces nutriments. La Figure III- 16 permet d'observer au MEB sur un échantillon de filtre le contraste entre *S. epidermidis* nébulisées sur le filtre (où les bactéries sont alors isolées) et *S. epidermidis* directement déposées sur le filtre (où des agrégats de bactéries sont clairement observés). La génération a probablement eu l'effet de casser les agrégats de bactéries et donc les a fragilisées. Les bactéries étant isolées sur les fibres du filtre, il est aussi possible qu'elles soient plus vulnérables. En effet, les microorganismes de l'air se présentent majoritairement sous forme d'agrégat (Lighthart et al., 1994) afin de se protéger contre la dessiccation, l'oxydation et la lumière.

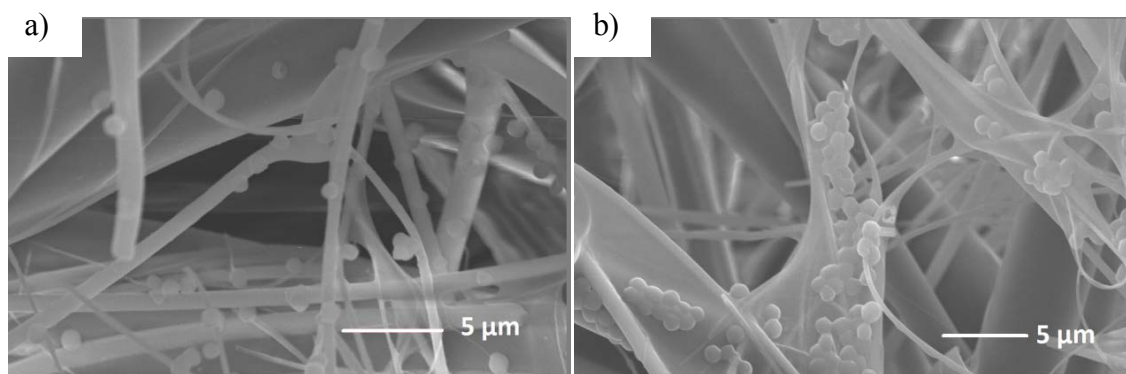


Figure III- 16. Photographies MEB: a) *S. epidermidis* aérosolisées sur un filtre en fibres de verre – b) *S. epidermidis* déposées sur le filtre en fibres de verre

Enfin, les pertes en cellules bactériennes cultivables semblent moindres dans le cas où l'air ambiant est saturé en humidité que lorsque le taux d'humidité est de 60% ou 80%. Cette hypothèse nécessiterait d'être vérifiée. Thompson et al. (2011) ont testé la survie de *S. epidermidis* dans un aérosol selon différents taux d'humidité relative (<20%, 40 - 60%, 70 - 80% et >90%) et ne constatent pas d'influence significative, dans le contexte particulier de l'aérosol, de l'humidité sur la survie bactérienne mais cela sur une faible durée (5h) en comparaison de cette présente étude qui se déroule sur des temps de 48h à 168h.

#### III.2.2.2. Etude du comportement de *P. oxalicum*

Aucun développement microbien de *P. oxalicum* à 60% et 80% HR n'est observé puisque le nombre de spores cultivables diminue respectivement de  $\frac{1}{2}$  et 1 log. Néanmoins, contrairement à *S. epidermidis*, en présence d'air saturé en humidité (environ 100% HR), les spores de *P. oxalicum* se développent rapidement puisqu'après 48h, la concentration augmente de 2 log voire pratiquement 3 log après 168h d'absence de flux d'air à 25°C. Il est alors possible que sous des conditions d'humidité relative suffisantes, *P. oxalicum* est l'avantage de former du mycélium qui lui permet de s'étendre et d'atteindre plus facilement les nutriments que *S. epidermidis* qui se reproduit par simple division cellulaire.

La perte de spores de *P. oxalicum* est plus marquée suite à 168h d'absence de flux d'air à 80% HR et 25°C qu'à 60% HR. Les spores fongiques et les cellules bactériennes peuvent être plus sensibles au stress dans ce contexte où le taux d'humidité relative avoisine les 80%. La spore fongique et la cellule bactérienne déploient une forme de résistance au stress lorsque les conditions sont défavorables. Ce processus s'applique notamment lors de la nébulisation des microorganismes dans le dispositif de contamination des filtres qui représente une situation défavorable (Abee et al., 1999 ; Gocheva et al., 2006). Les cellules microbiennes sont alors stables et plus résistantes tandis qu'à 80%, les microorganismes se situent

probablement entre deux états : l'un où ils pourront éventuellement se développer et l'autre dans lequel ils luttent pour leur survie. En effet, la présence d'un taux humidité relative à 80% doit être suffisante afin de permettre la mise en route du processus de croissance microbienne, mais ce taux n'est pas assez élevé pour permettre un cycle complet de reproduction, d'où une sensibilité et une mortalité plus importante. Maus et al. (2001) en viennent aussi à cette conclusion. Dans leur étude, ils contaminent des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques en générant un aérosol composé de spores de *Bacillus subtilis* et d'*Aspergillus niger*. Certains filtres sont vierges tandis que d'autres ont été utilisés plusieurs mois dans une CTA. Ensuite, ils maintiennent la filtration d'un flux d'air propre et étudient le comportement des microorganismes selon différents taux d'humidité. Ils observent que lorsque le taux d'humidité est supérieur à 85%, la concentration de spores d'*Aspergillus niger* décroît tandis qu'à un taux d'humidité < 35% les spores conservent leur cultivabilité et la concentration ne diminue pas. Ils constatent ce phénomène uniquement sur des filtres neufs. Ils supposent alors que lorsque les filtres contiennent un gâteau de particules atmosphériques, les spores fongiques sont protégées du stress extérieur, en particulier des composants du filtre. Ils supposent que la concentration des spores fongiques diminue sur les filtres neufs car ceux-ci peuvent contenir des éléments antifongiques qui agissent sur les cellules plus exposées au stress lors de leur réhydratation.

En comparaison avec le résultat obtenu pour un taux d'humidité de 80%, la concentration de *P. oxalicum* cultivable demeure stable dans le cas où le taux d'humidité relative est de 60%. Dans ce cas, *P. oxalicum* se présente sous sa forme résistante, dans un état de dormance, afin de survivre lorsque les conditions extérieures ne lui permettent pas de croître.

#### III.2.2.3. Conservation de la cultivabilité

Afin de vérifier le potentiel des spores de *P. oxalicum* à conserver leur cultivabilité et leur capacité de croître lorsque les conditions sont favorables, une opération supplémentaire a consisté à disposer les filtres pendant 168h à 60% HR et 25°C dans la boîte hermétique sans flux d'air, puis à les conserver à nouveau pendant 168h dans cette même boîte mais cette fois en air saturé d'humidité. Une croissance fongique a alors été observée lorsque l'humidité de l'air était suffisamment élevée pour permettre cette croissance. La Figure III- 17 illustre ces résultats.

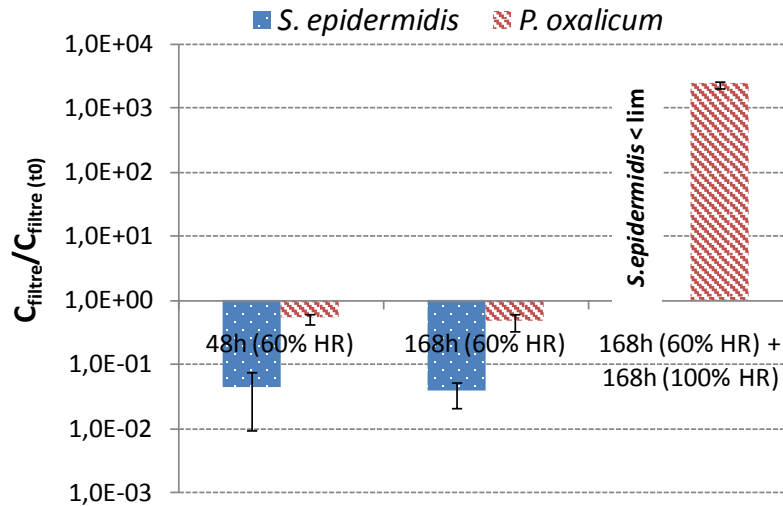


Figure III- 17. Concentrations normées en *P. oxalicum* et *S. epidermidis* après disposition des filtres pendant 48h et 168h à 60% HR et 25°C puis 168h à 100% HR et 25°C

Les résultats démontrent non seulement que les spores de *P. oxalicum* peuvent conserver leur potentiel de croissance lorsque le milieu extérieur leur est hostile mais permet aussi de constater que *S. epidermidis* continue de perdre sa cultivabilité au cours du temps. En effet, la concentration en *S. epidermidis* cultivables se situe sous la limite de détection suite à deux semaines consécutives sur le filtre en fibres de verre à 60% HR puis 100% HR.

Lorsque l'air ambiant est saturé en humidité (environ 100% HR), les spores de *P. oxalicum* arrivent à se développer en formant du mycélium et de nouvelles spores (Figure III- 18). Ainsi, l'humidité relative représente le facteur limitant la croissance fongique dans ce cas d'étude. Comparativement, Maus et al. (2001) constatent que lorsque l'humidité relative est supérieure à 85%, dans le cas où les conditions nutritives suffisantes sont réunies et que les filtres ne sont pas soumis à un flux d'air la croissance d'*Aspergillus niger* sur média fibreux est observée.

#### III.2.2.4. Observations par microscopie électronique à balayage

Afin d'observer le comportement de *P. oxalicum* sur les filtres, des photographies obtenues au MEB offre une appréciation qualitative du comportement microbien selon la condition hygrométrique de l'air ambiant en l'absence de flux d'air. Plusieurs photographies sont présentées en Figure III- 18.

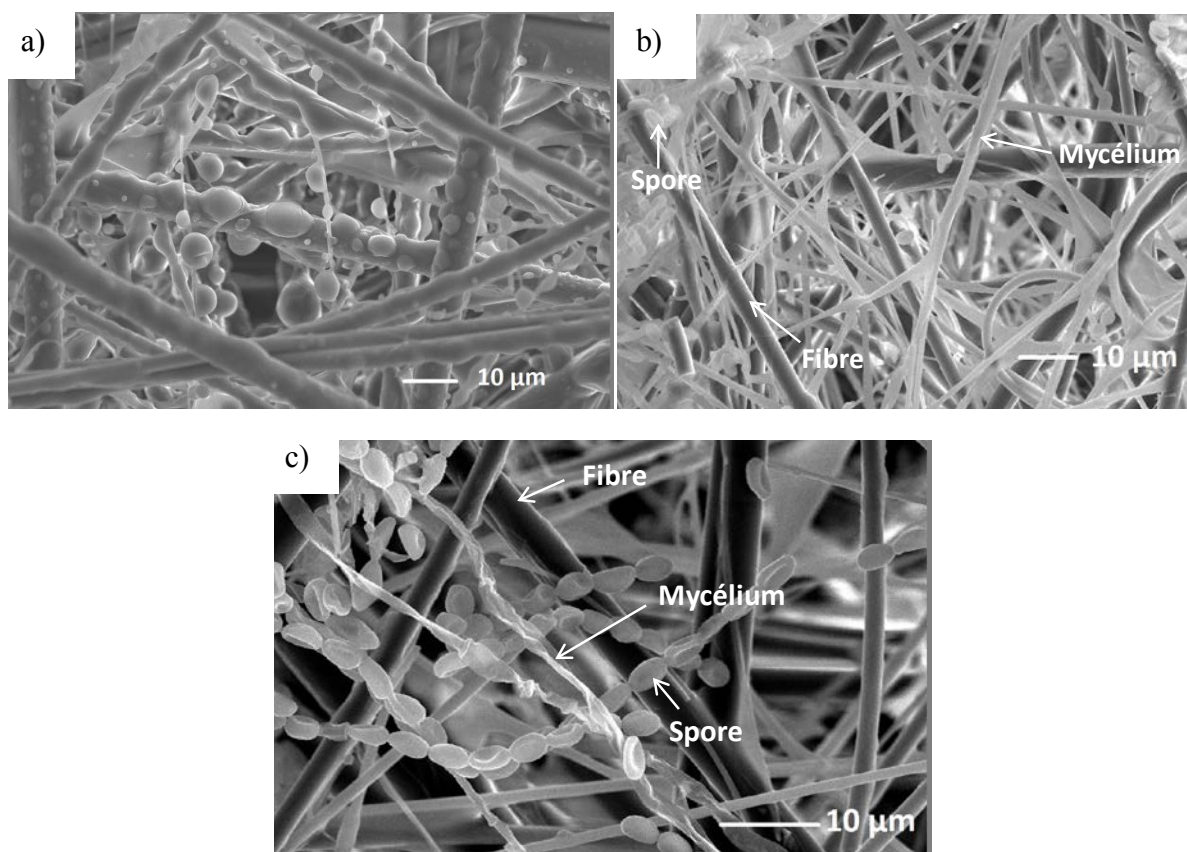


Figure III- 18. Photographies MEB de la face avant à la filtration d'échantillons de filtre en fibres de verre: a) après contamination par le consortium microbien – b) après 48h d'arrêt de ventilation à 25°C et 100% HR – c) après 168h d'arrêt de ventilation à 25°C et 100% HR

Une photographie d'un échantillon de filtre en fibres de verre découpé directement après sa contamination par *S. epidermidis* – *P. oxalicum* est présentée sur la Figure III- 18. Les nutriments déposés sur les fibres du média y sont visiblement majoritaires. Les photographies des échantillons de filtres obtenus après 48h et 168h en absence de flux d'air en conditions contrôlées à 25°C et 60% et 80% HR ne sont pas présentées car similaires à cet échantillon découpé après contamination des filtres.

La photographie de l'échantillon du filtre placé 48h à 100% HR et 25°C met en évidence un développement mycélien important. Ce constat concorde avec les résultats quantitatifs (Figure III- 15) précédents puisque *P. oxalicum* est en pleine croissance suite à 48h dans des conditions d'hygrométrie, de température et de nutrition suffisantes à son développement. Des spores sont également visible bien que nettement moins conséquentes que sur l'échantillon du filtre conservé pendant 168h à 100% HR et 25°C. Après 168h, ce sont les spores qui prédominent (visuellement) sur le filtre. Lorsque les champignons sont en état de stress, ils produisent en réponse des spores adaptées à ces situations. Il est possible qu'une réduction des nutriments conduise les champignons à un état de stress. Dans ce cas, les spores

forment une membrane plus fine comprenant des couches ou pigments supplémentaires. Le cytoplasme est plus dense et certains de ces composants sont moins développés que dans l'hyphe. Les spores contiennent également moins d'eau ainsi qu'un taux de protéines et d'acides nucléiques plus faibles. A contrario, elles stockent un taux important d'éléments énergétiques tel que des lipides, du glycogène ou des tréhaloses (Deacon, 2006). Il est envisageable qu'après une semaine en milieu clos, *P. oxalicum* ait consommé la majeure partie des nutriments qui lui ont permis de se développer, les conditions thermo-hygrométriques étant satisfaisantes par ailleurs. Les nutriments ne se renouvelant pas, les champignons n'ont d'autres possibilités que de se mettre en état de dormance en attendant d'un climat plus favorable à leur développement.

### III.2.2.5. Evolution du taux d'ergostérol

L'ergostérol est un stérol caractéristique des champignons retrouvé au sein de la plupart des membranes cellulaires fongiques mais aucunement chez l'animal ou les plantes (Deacon, 2006). Les composants des membranes cellulaires sont rapidement dégradés suite à la mort cellulaire. La mesure du taux d'ergostérol est alors intéressante comme indicateur microbien dans un échantillon (Tunlid and White, 1992). La Figure III- 19 présente l'évolution du taux d'ergostérol extrait des filtres (ratio  $R_2$  selon la relation III.6). Plusieurs échantillons ont présenté des valeurs inférieures à la limite de détection. Afin de pouvoir les étudier, leur taux d'ergostérol a été fixé à la limite de détection. L'ensemble des valeurs est indiqué dans le Tableau III- 10 en Annexe III- 1.

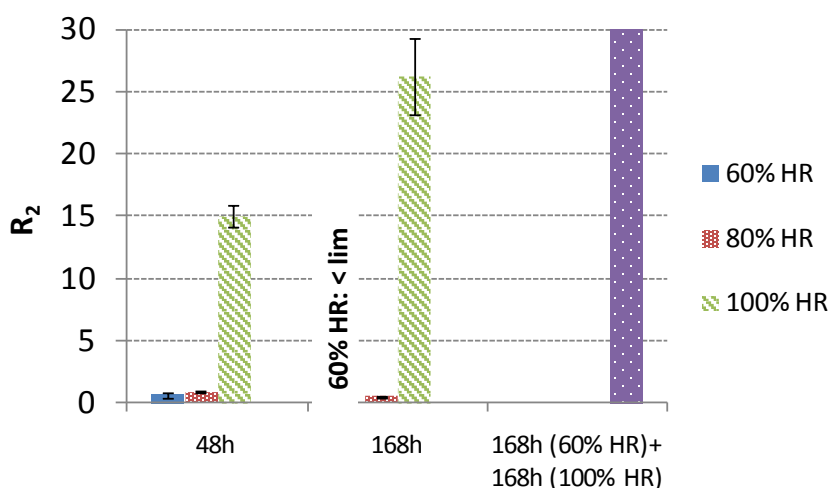


Figure III- 19. Graphique présentant l'évolution du taux d'ergostérol extraits des filtres après 48h et 168h de disposition de ceux-ci à 60%, 80% et 100% HR ainsi que le taux d'ergostérol extrait du filtre après disposition 168h à 60% HR puis 168h à 100% HR.



A l'instar des résultats précédents (Figure III- 15), une forte augmentation du taux d'ergostérol est clairement observée après 48h et 168h en absence de flux d'air. Le taux d'ergostérol après 168h à 100% HR est 1,7 fois plus important qu'après 48h. L'augmentation importante de l'ergostérol est probablement engendrée par le développement mycélien apparu sur le filtre. En effet, le taux d'ergostérol présent dans les membranes des cellules fongiques dépend de l'état physiologique de la cellule (Charcosset and Chauvet, 2001). Or, les spores ont des membranes amincies, avec des éléments biochimiques réduits car elles sont adaptées à des situations de stress (Deacon, 2006). D'ailleurs comme indiqué précédemment, *P. oxalicum* ne présente pas de croissance à 60% et 80% HR. De même, il n'apparaît pas d'augmentation du taux d'ergostérol pour ces deux taux d'humidité relative. En particulier, le taux d'ergostérol présent sur le filtre à 60% HR atteint des valeurs sous la limite de détection après 168h. En revanche, lorsque le filtre est disposé 168h à 60% HR et que le taux d'humidité est ensuite augmenté jusqu'à saturation de l'air en humidité, le champignon reprend sa croissance et le taux d'ergostérol augmente très fortement (Figure III- 19) jusqu'à atteindre un taux de 46,8 mg ergostérol/m<sup>2</sup> de filtre.

Ainsi, l'évaluation du taux d'ergostérol s'avère intéressante pour l'étude de la croissance fongique. Néanmoins, cette méthode est peu sensible lorsque l'ergostérol est extrait uniquement des spores fongiques. En effet, le taux d'ergostérol extrait du filtre après 168h à 60% HR est sous la limite de quantification alors que la concentration des champignons cultivables est loin d'être négligeable puisque qu'elle est évaluée à  $3,4 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$  UFC.m<sup>-2</sup>. Néanmoins, le taux d'ergostérol n'est pas sous la limite de quantification lorsqu'il est extrait du filtre maintenu 168h à 80% HR. La concentration en cellules fongiques est alors de  $2,6 \cdot 10^6 \pm 2,5 \cdot 10^6$  UFC.m<sup>-2</sup>. Ainsi, bien que la concentration en cellules fongiques cultivables soit proche de celle évaluée sur le filtre maintenu 168h à 60% HR, le taux d'ergostérol est plus élevé. Le taux d'ergostérol n'est pas sous la limite de quantification mais n'en demeure pas moins faible. La limite de quantification s'élève à 0,65 mg ergostérol.m<sup>-2</sup> de filtre et le taux d'ergostérol extrait du filtre après 168h sans flux d'air à 80% HR est de  $0,77 \pm 0,06$  mg ergostérol.m<sup>-2</sup>. Aussi, deux hypothèses sont proposées. Dans une 1<sup>ère</sup> hypothèse la différence est considérée comme peu significative et aucune conclusion ne peut être tirée quant au comportement des spores fongiques contenue sur le filtre 168h à 80% HR par rapport au comportement de celles contenues sur le filtre 168h à 60% HR. L'autre hypothèse est la suivante. Comme stipulé auparavant, il est possible que les spores se réhydratent à 80% HR. Cela explique que la concentration des spores fongiques cultivables

diminue puisque les spores sont alors plus sensibles au stress extérieur. En revanche, le taux d'ergostérol peut quant à lui augmenter puisque les spores se réhydratent et que leur morphologie évolue vers un état de croissance.

Selon Olsson et al. (2003), il est très complexe d'étudier la biomasse fongique à partir de marqueur biochimique tel que l'ergostérol ou bien à partir de l'étude des phospholipides présents dans les membranes cellulaires. Les quantités varient trop selon les genres et espèces. Néanmoins, cette méthode est intéressante pour cette présente étude puisqu'elle permet de suivre le taux d'ergostérol présent dans les différentes cellules fongiques (viables et non viables) et cela pour une seule espèce fongique. Elle permet aussi d'émettre ou d'appuyer des hypothèses sur l'état de croissance du champignon.

### III.2.3. Relargage de microorganismes en aval des filtres

A l'issu des tests de croissance microbienne en absence de flux d'air pendant 48h ou 168h, les filtres sont positionnés dans la colonne dédiée à l'étude du relargage et décrite dans le chapitre 2 (figure II.15, § IV.2.2). Le Tableau III- 7 regroupe les concentrations de microorganismes cultivables relargués en aval du filtre lors de la reprise du flux d'air. Les résultats indiquent que seuls les prélèvements d'air effectués en aval des filtres exposés pendant 168h à un air ambiant saturé en humidité sous une température de 25°C présentent une quantité suffisante de microorganismes cultivables pour être quantifiée. La moyenne des concentrations est calculée à partir de 3 essais. L'ensemble des valeurs obtenues est accessible dans le Tableau III- 11 en Annexe III- 1.

**Tableau III- 7. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après 168h 25°C et 60%, 80% et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air**

Après 168h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	2,2 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	2,6 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>	1,5 10 <sup>6</sup>	< limite de quantification	
80% HR	Extrait du filtre testé	1,5 10 <sup>5</sup>	5,1 10 <sup>6</sup>	2,5 10 <sup>6</sup>	7,7 10 <sup>7</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
60% HR	Extrait du filtre testé	1,5 10 <sup>6</sup>	4,9 10 <sup>6</sup>	2,2 10 <sup>8</sup>	4,5 10 <sup>8</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	

Directement après la contamination des filtres en fibres de verre par *S. epidermidis* et *P. oxalicum*, l'étude du relargage permet de constater que ni les spores de *P. oxalicum* cultivables ni les cellules bactériennes ne sont quantifiables en aval des filtres lors de la reprise d'un flux d'air, étape privilégiée pour le décrochage de particules collectées dans des médias fibreux.

#### III.2.3.1. Etude du relargage de *P. oxalicum*

Après avoir disposé les filtres 168h en absence de flux d'air à 100% HR et 25°C, des spores cultivables relarguées en aval du filtre testé sont quantifiées lors de la reprise du flux d'air, le filtre ayant joué un rôle de support de croissance microbienne. La fraction de spores cultivables est faible puisqu'elle représente entre 0,02 et 0,12% de la totalité de la concentration de spores cultivables extraites du filtre testé. Elle n'est pourtant pas négligeable puisque cela correspond à une moyenne de  $12,6 \cdot 10^3$  UFC de spores de *P. oxalicum* générés en aval du filtre par  $\text{m}^3$  d'air filtré, et cela uniquement en raison du développement microbien opéré lors des 168 h de disposition du filtre à 100% HR et 25°C.

En revanche, le filtre F7 testé comprend une proportion importante de mycélium. Or, Kawamoto et al. (1982) démontrent que l'étape du passage du filtre aux ultrasons, comprise dans le protocole d'extraction des microorganismes du filtre, dégage des vibrations importantes dans le liquide d'extraction et déploie une énergie apte à détacher les spores du mycélium mais également à casser les hyphes en des fragments. Cela induirait une surestimation de la concentration de spores extraite du filtre testé et diminuerait le ratio entre spores relarguées et spores extraites du filtre testé.

Jankowska et al. (2000) ont étudié le réentrainement de plusieurs particules collectées sur un filtre en fibres de verre (vitesse de contamination de  $0,09 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de type F8. En particulier, ils ont suivi le réentrainement de *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium melinii* dont les diamètres aérodynamiques des spores sont évalués respectivement à  $2,6 \mu\text{m}$  et  $3,2 \mu\text{m}$ . Leur méthode de quantification consiste à évaluer le nombre de particules en amont et en aval du filtre à l'aide d'un compteur de particules (Aerosizer, Amherst Process Instruments, Inc., Hadley, Massachusetts). Ils ont conclu que lorsque la vitesse de filtration de l'air contenant l'aérosol est la même que celle visant à quantifier le réentrainement des particules, la quantité de *P. brevicompactum* et de *P. melinii* entraînées correspond respectivement pour les deux espèces à 0,009% et 0,33%, sachant que le filtre est chargé à  $\sim 10^8$  particules. $\text{m}^{-2}$  de *P. brevicompactum* et  $\sim 10^9$  particules. $\text{m}^{-2}$  de *P. melinii*. Ils obtiennent

donc une étendue de valeurs plus importante que celle de cette présente étude mais l'ordre de grandeur est le même.

Le Tableau III- 8 récapitule les concentrations en spores de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* extraites du filtre en fibres de verre après 168h à 25°C et 100% ainsi que dans le cas où dans un 1<sup>er</sup> temps le filtre a été conservé 168h à 60% HR et 25°C puis 168h à 100% HR et 25°C. La concentration extraite du filtre est du même ordre de grandeur que lorsque le filtre n'a pas préalablement été disposé 168h à 60% HR, ce qui confirme bien la capacité des spores de *P.oxalicum* à conserver leur cultivabilité. La quantité de *P. oxalicum* cultivables réentraînée en aval du filtre lors de la reprise du flux d'air est alors 3 à 6 fois moins importante que celle de l'essai précédent. Soit une part des spores de *P. oxalicum* a été fragilisée lors de la semaine à 60% HR les rendant plus sensibles à la reprise d'un flux d'air, soit la croissance de *P. oxalicum* a été plus lente en raison du temps nécessaire aux spores pour relancer leur croissance suite aux 168h à 60% HR.

**Tableau III- 8. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après 168h à 25°C et 100% HR ainsi que 168h à 25°C et 60% HR suivi de 168h à 25°C et 100% HR ; Etude du relargage microbien lors de la reprise du flux d'air**

Après 168h à 100% HR	Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )
Extrait du filtre testé	2,2 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	8,1 10 <sup>9</sup>
Relargué du filtre testé	2,6 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>	1,5 10 <sup>6</sup>	< limite de quantification
Après 168h à 60% HR + 168h à 100% HR	Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )
Extrait du filtre testé	9,0 10 <sup>9</sup>	7,0 10 <sup>9</sup>		< limite de quantification
Relargué du filtre testé		5,1 10 <sup>5</sup>		< limite de quantification

Il est important de considérer que des fragments de champignons peuvent également être entraînés en aval de la filtration. Ils ne sont pas dénombrés dans le cadre de cette étude. Ces fragments peuvent se loger dans les zones profondes de la respiration en fonction de leur taille. De plus, en raison de leur petite taille, ces fragments peuvent échapper à la phagocytose par les macrophages de l'organisme humain et s'avérer plus nocifs que les spores elles-mêmes (Reponen et al., 2007; Seo et al., 2009).

Aucun relargage de *P. oxalicum* n'est constaté après 48h en absence de flux d'air, bien que la concentration de champignons extraits du filtre soit significative et proche de celle

obtenue après 168h en atmosphère contrôlée. Au § III.2.2.4, il a été supposé qu'une réduction de la source nutritive disposée sur les filtres, puisse être à l'origine d'une sporulation de *P. oxalicum* après 168h. Après 48h, les conditions ont été probablement favorables à la croissance de *P. oxalicum*, qui se poursuit, et aucun état de stress n'a favorisé la sporulation de *P. oxalicum*. La spore est une forme idéale de dissémination du champignon dans son environnement et dans l'air contrairement au mycélium (Deacon, 2006). Il est donc possible que la sporulation ait pleinement favorisé l'entraînement du champignon lors de la reprise du flux d'air après 168h.

Des photographies prises au MEB sont présentées en Figure III- 20. Des spores sont visuellement présentes sur la face aval du filtre après 168h en atmosphère contrôlée ce qui signifie que sur cet échantillon de filtre, le champignon a réussi à atteindre les profondeurs du filtre et à le traverser lors de sa croissance. Tandis qu'après 48h, la face aval du filtre présente visuellement une grande majorité du mycélium et non de spores de *P. oxalicum*. Dans ce cas le champignon a déjà traversé le filtre mais n'est pas dans sa forme idéale de dispersion, atteinte lors d'un état de stress nutritif.

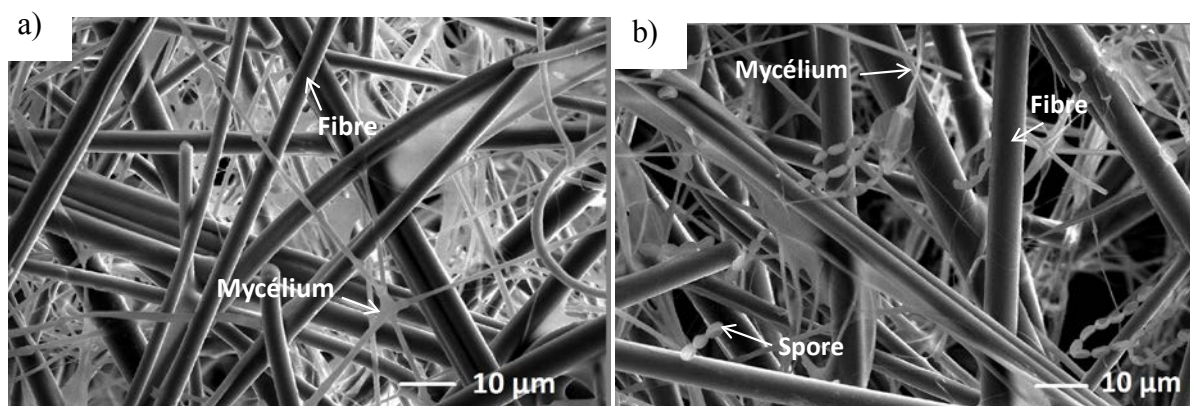


Figure III- 20. Photographies MEB de la face aval de filtre en fibres de verre: a) après 48h à 25°C et 100% HR – b) après 168h à 25°C et 100% HR

#### III.2.3.2. Etude du relargage de *S. epidermidis*

Quelles que soient les conditions d'humidité étudiées, aucun relargage de bactéries en aval du filtre n'est observé. Pourtant, après la contamination des filtres, une grande quantité de bactéries cultivables sont présentes ( $\sim 10^9 - 10^{10}$  UFC.m<sup>-2</sup> de filtre). Plusieurs explications sont envisagées :

- Les bactéries n'atteignent peut être pas des zones suffisamment profondes du filtre pour être relarguées lors de la reprise du flux d'air, la vitesse du flux étant peut-être

elle-même insuffisante pour permettre le décrochage des bactéries collectées par les fibres du filtre.

- Il est également possible que les bactéries soient plus fragiles puisqu'elles sont isolées sur les fibres du filtre (Figure III- 16). Dans ce cas, elles perdent plus facilement leur cultivabilité lors d'une reprise de flux d'air. Les bactéries sont préférentiellement sous forme d'agrégats dans l'air pour résister au stress extérieur causé par des phénomènes de dessiccation, d'oxydation, d'exposition à la lumière,... (Lighthart et al., 1994).

Certaines études dont celle de Möritz et al. (2001) ont mis en évidence une prolifération bactérienne au sein de filtres F7 également en fibres de verre sans observer de développement fongique. Möritz et al. (2001) ont mené une étude sur 15 mois de la filtration d'air extérieur. Ils attribuent des proliférations bactériennes à des expositions prolongées du filtre à un taux d'humidité important (3 jours, > 80% HR) et une température faible (< 12 °C). Ils supposent également que la prolifération bactérienne est favorisée par rapport à celle fongique car les temps d'exposition du filtre à de hauts taux d'humidité ne sont pas suffisamment longs pour permettre un développement significatif des champignons qui, contrairement aux bactéries qui se développent par simple division cellulaire, forment préalablement du mycélium et des conidies avant de pouvoir relarguer des spores dans l'air. Ces résultats ne sont pas contraires à ceux de cette présente étude puisque c'est seulement après 1 semaine que les champignons sont retrouvés en aval des filtres. Mais contrairement à l'étude de Möritz et al. (2001), l'espèce bactérienne *S. epidermidis* n'arrive pas à se diviser et à se développer. Möritz et al (2001) travaillent avec de l'air extérieur qui contient des souches bactériennes adaptées aux conditions stressantes de l'air extérieur et donc plus résistantes. De plus, au fur et à mesure du colmatage du filtre, un gâteau de particules se forme et protège les bactéries contre la dessiccation ce qui n'est pas le cas dans la présente étude.

### III.3. Influence de la nature du média

Les résultats présentés au § III.2 indiquent que le taux d'humidité de l'air lors de l'arrêt du flux d'air a une influence notable sur le comportement des microorganismes préalablement collectés sur les filtres. L'analyse du comportement des microorganismes collectés sur deux matériaux fibreux différents est proposée ci-après et est effectuée à 100% HR et 25°C.

Deux filtres F7 sont testés :

- ✓ Un filtre en fibres de verre
- ✓ Un filtre en fibres synthétiques

Ces médias sont décrits au § II.2 de ce même chapitre

#### III.3.1. Ajout d'une source de nutriments sur les filtres

Comme pour le média en fibres de verre, le taux de carbone organique retenu suite à l'injection de la solution nutritive a été évalué à  $0,22 \pm 0,054 \text{ mgCOT.cm}^{-2}$  pour le filtre en fibres synthétiques, la valeur obtenue pour le filtre en fibres de verre étant de  $0,26 \pm 0,048 \text{ mgCOT.cm}^{-2}$ .

Les taux de carbone retenu sur les deux types de médias sont donc du même ordre de grandeur.

#### III.3.2. Croissance microbienne en absence de flux d'air

La Figure III- 21 illustre les résultats obtenus lors de l'étude réalisée sur les deux médias en termes de concentrations de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* cultivables extraits des filtres après 48h et 168h en absence de flux d'air à 100% HR et 25°C. Les valeurs qui concernent le filtre en fibres de verre sont également celles présentées dans le § III.2 sur l'étude de l'influence du taux d'humidité sur le comportement des microorganismes et qui ont été obtenues dans le cas où le taux d'humidité relative a été testé à 100%.

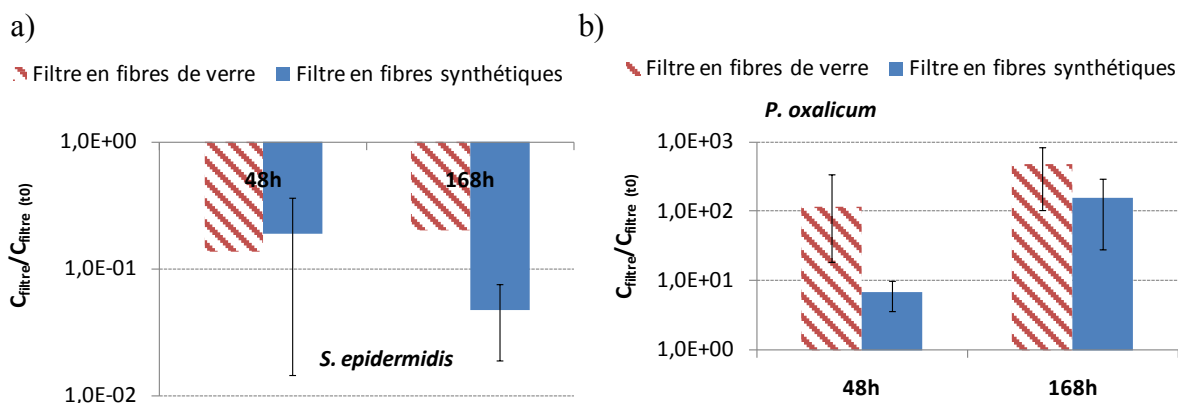


Figure III- 21. Concentrations normées des microorganismes extraits des deux médias fibreux après 48h et 168h à 25°C et 100% HR : a) *S. epidermidis* – b) *P. oxalicum*

La Figure III- 21 présente le comportement des deux espèces microbiennes étudiées. Leur comportement est identique quelle que soit la nature des filtres. La concentration de *S. epidermidis* chute (de 1 à 2 log) tandis que celle de *P. oxalicum* augmente fortement (de 1 à 3 log).

Le comportement de *S. epidermidis* (chute de 1 à 2 log) sur les deux médias est expliqué selon les mêmes hypothèses qui ont été présentées dans le § III.2 de ce même chapitre.

#### III.3.2.1. Etude du comportement de *P. oxalicum*

Bien que l'écart soit peu significatif, la concentration de spores de *P. oxalicum* cultivable est plus importante sur le filtre en fibres de verre que sur celui en fibres synthétiques après 48h sans flux d'air à 100% HR et 25°C. En effet, le ratio entre la concentration de spores après 48h et celle obtenue directement après la contamination du filtre est respectivement pour le filtre en fibres de verre et pour le filtre en fibres synthétiques de 114 (maximum de 227 et minimum de 96) et de 7 (maximum de 10 et minimum de 4). Il semble que les spores se développent moins rapidement sur le filtre en fibres synthétiques que sur le filtre en fibres de verre.

Le taux d'humidité dans l'air environnant les filtres a un impact sur le développement microbien. Dans le § III.2, les résultats indiquent que *P. oxalicum* ne parvient à se développer, dans la gamme d'humidité relative testée, que lorsque l'air est saturé en eau. Il est donc possible que la croissance de *P. oxalicum* soit déclenchée plus rapidement sur le filtre en fibres de verre qui présente une plus grande capacité de rétention d'eau que le filtre en fibres synthétiques (§ II.2.1.2 de ce chapitre).

Le ratio entre la concentration de spores après 168h et celle obtenue directement après la contamination du filtre est respectivement pour le filtre en fibres de verre et pour le filtre en



fibres synthétiques de 475 (maximum de 826 et minimum de 102) et de 159 (maximum de 290 et minimum de 28). Compte tenu de ces résultats, la croissance de *P. oxalicum* sur le filtre en fibres synthétiques semble s'accélérer au cours du temps puisque les écarts entre les ratios sont moindres après 168h entre les deux médias (Figure III- 21). Il est possible que le développement mycélien sur le filtre en fibres synthétiques puisse favoriser l'absorption de l'humidité de l'air environnant.

Simmons and Crow (1995) observent que les espèces fongiques extraites de filtres de matériaux différentes, sont également différentes. Kemp et al. (2001) ont comparé la quantité de microorganismes retenus lors de la filtration d'air extérieur pendant 15 semaines sur deux médias fibreux de type F7, l'un en fibres de verre et l'autre en polymère composé de trois couches. Tout d'abord, ils constatent que les espèces microbiennes extraites des deux médias diffèrent et attribuent cela à la différence de capacité de rétention d'eau des deux matériaux. Ensuite, ils se sont aperçus que la concentration de microorganismes cultivables extraits du filtre en fibres de verre était significativement plus importante lors des 4 premières semaines de filtration (différence de  $3.10^5$  UFC.m<sup>-2</sup>). Néanmoins, il semble que l'influence de la nature du média s'atténue au cours du temps. En effet, après 8 semaines de filtration il n'y a plus de différence marquante entre les deux filtres. Selon eux, le matériau présente une influence sur le comportement des microorganismes lors de la filtration initiale, mais rapidement perd de son impact lorsque le matériau se charge en poussières et particules inertes en recouvrant les fibres du filtre. Ces résultats confirment l'hypothèse de Burge (1987) et Pejtersen (1996) selon laquelle un filtre à air tel qu'un filtre en fibres de verre, est facilement contaminé par des microorganismes en raison de la quantité de matière organiques, de poussières et de débris accumulés sur le filtre et représente une source nutritive favorisant le développement microbien et limitant l'influence première du matériau filtrant alors en partie recouvert.

Ainsi, dans le cas de la présente étude une 1<sup>ère</sup> hypothèse consiste à expliquer les différences de croissance de *P. oxalicum* observées après 48h à 100% HR et 25°C par la meilleure capacité de rétention en eau du filtre en fibres de verre. Une autre hypothèse est la suivante : les nutriments sont moins facilement accessibles sur le filtre en fibres synthétiques en raison d'une épaisseur plus importante que sur le filtre en fibres de verre. En effet, le filtre en fibres synthétiques présente trois couches et une épaisseur de 1,2 mm. Le diamètre moyen de ses fibres est de  $14,8 \mu\text{m} \pm 8,4 \mu\text{m}$ , tandis que celui des fibres du filtre en fibres de verre est de  $3,9 \mu\text{m} \pm 2,4 \mu\text{m}$ , pour une épaisseur de filtre de 0,4 mm. *P. oxalicum* aurait une moins

bonne accessibilité aux nutriments sur le filtre en fibres synthétiques ce qui ralentirait sa croissance et son développement mycélien au départ. Kemp et al. (1995) constatent d'ailleurs qu'un filtre en fibres de verre collecte les particules en surface et moins dans les zones profondes ce qui réduit la surface de dépôt des nutriments et facilite leur accessibilité aux microorganismes.

### III.3.2.2. Evolution du taux d'ergostérol

Les taux d'ergostérol extraits des deux médias fibreux après 48h et 168h à 100% HR et 25°C sont illustrés par la Figure III- 22. L'hypothèse d'un développement fongique plus important sur le filtre en fibres de verre plutôt que sur le filtre en fibres synthétiques est confortée. L'ensemble des valeurs est indiqué dans le Tableau III- 10 en Annexe III- 1.

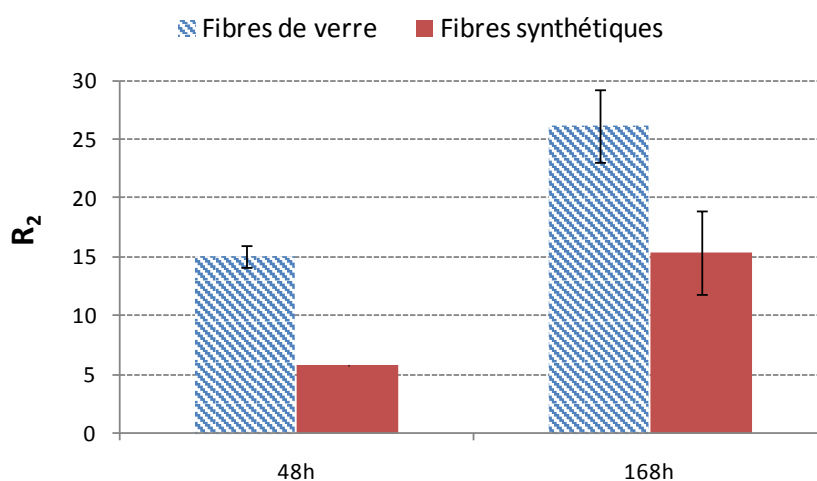


Figure III- 22. Taux d'ergostérol extraits des filtres en fibres de verre et en fibres synthétiques après 48h et 168h à 100% HR et 25°C

L'évolution des taux d'ergostérol extraits des deux médias est comparable. La différence porte sur les quantités d'ergostérol extraites qui sont plus de 2 fois supérieures dans le cas du média en fibres de verre. De plus, le taux d'ergostérol est 1,7 fois plus important après 168h par rapport à 48h d'absence de flux d'air à 100% HR pour le filtre en fibres de verre, tandis que pour celui en fibres synthétiques, le taux est 2,7 fois plus important. Ceci tend à appuyer l'hypothèse que suite à une croissance de *P. oxalicum* sur le média en fibres synthétiques plus lente au départ, le champignon arrive ensuite à se développer après avoir étendu son réseau de mycélium.

### III.3.2.3. Observations par microscopie électronique à balayage

Afin de compléter les résultats précédents, des observations des filtres par microscopie à balayage ont été réalisées. La Figure III- 23 propose des photographies d'échantillons de

filtres des deux médias obtenus suite à la contamination des filtres puis après 48h et 168h d'absence de flux d'air à 100% HR et 25°C. Les échantillons du filtre en fibres synthétiques photographiés correspondent à la couche centrale du média.

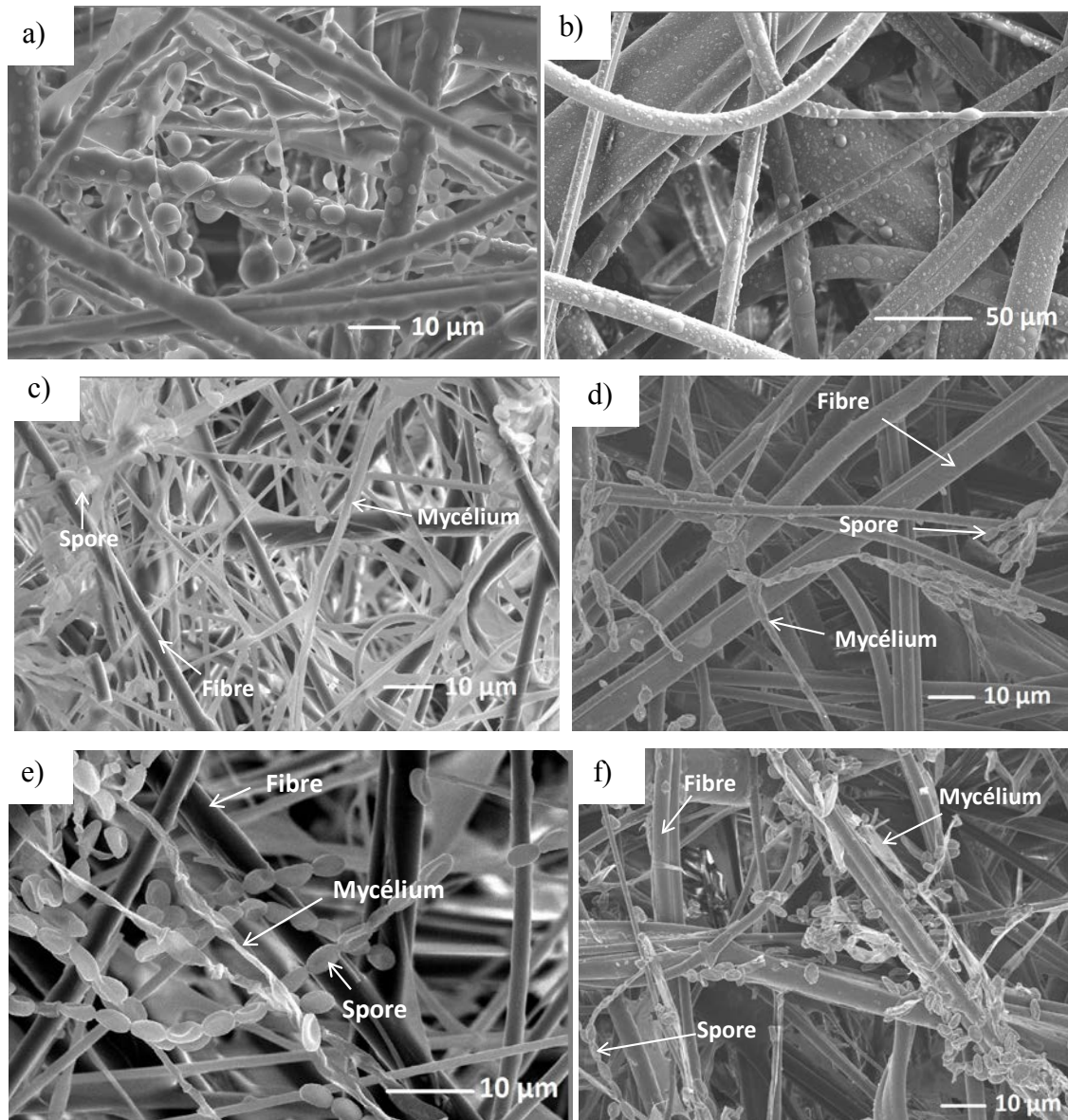


Figure III- 23. Photographies MEB d'échantillons de filtres. Après contamination : a) en fibres de verre – b) en fibres synthétiques. Après 48h à 100% HR et 25°C : c) en fibres de verre – d) en fibres synthétiques. Après 168h à 100% HR et 25°C : e) en fibres de verre – f) en fibres synthétiques

Les photographies a) et b) de la Figure III- 23 présentent respectivement des échantillons du filtre en fibres de verre et en fibres synthétiques directement après contamination microbienne. Les nutriments sont déposés préalablement sur les filtres des deux médias fibreux.

Les photographies c) et d) représentent respectivement des échantillons de filtre en fibres de verre et en fibres synthétiques après 48h en absence de flux d'air à 100% HR et

25°C. Un développement mycélien est observé sur les deux échantillons photographiés bien que nettement plus visible sur l'échantillon du filtre en fibres de verre.

Les photographies e) et f) représentent respectivement des échantillons du filtre en fibres de verre et en fibres synthétiques après 168h à 100% HR et 25°C. Comme explicité au paragraphe III.2, lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments *P. oxalicum* forme des spores, forme de dissémination du champignon. Que ce soit sur l'échantillon du filtre en fibres de verre ou celui en fibres synthétiques, une quantité importante de spores est observée contrairement aux échantillons de média après 48h en absence de flux d'air pour lesquels apparaît une majorité de développement de mycélium pour les échantillons étudiés.

### III.3.3. Relargage de microorganismes en aval des filtres

Le Tableau III- 9 regroupe les concentrations en microorganismes cultivables quantifiés en aval des filtres lors de la reprise du flux d'air. Seuls les prélèvements effectués en aval des filtres exposés pendant 168h à un air ambiant saturé en humidité sous une température de 25°C montrent une quantité significative de *P. oxalicum* cultivables. D'ailleurs, seules les spores de *P. oxalicum* sont quantifiées, la concentration de *S. epidermidis* est sous la limite de quantification pour tous les essais effectués. La moyenne des concentrations pour le média en fibres de verre est calculée à partir de 3 essais tandis que celle du média en fibres synthétiques est obtenue à partir de 2 essais. L'ensemble des résultats (après contamination et après 48h) est présenté dans le Tableau III- 12 en Annexe III- 1.

**Tableau III- 9. Concentrations en microorganismes extraits et relargués des médias fibreux en fibres de verre et synthétiques après 168h à 100% HR et 25°C en absence de flux d'air**

		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
<b>Filtre en fibres de verre</b>						
<b>Après 168h à 100% HR</b>	<b>Extrait du filtre testé</b>	2,2 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	
	<b>Relargué du filtre testé</b>	2,6 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>	1,5 10 <sup>6</sup>	< limite de quantification	
<b>Filtre en fibres synthétiques</b>						
<b>Après 168h à 100% HR</b>	<b>Extrait du filtre testé</b>	9,9 10 <sup>9</sup>	1,7 10 <sup>9</sup>		2,1 10 <sup>9</sup>	2,4 10 <sup>8</sup>
	<b>Relargué du filtre testé</b>	6,2 10 <sup>5</sup>	1,5 10 <sup>5</sup>		< limite de quantification	

Les concentrations de *P. oxalicum* cultivables extraites des deux filtres sont du même ordre de grandeur. Les hypothèses expliquant le relargage observé pour les deux filtres après 168h à 100% HR et 25°C sont les mêmes qu'au § III.2.3. En effet, la formation accentuée de spores après 168h à 100% HR et 25°C, est le reflet d'une croissance importante et une réponse à la limitation de nutriments sur le filtre, ce qui favorise la dispersion de *P. oxalicum* en aval du filtre, dans l'air, lors de la reprise du flux d'air.

La fraction de spores de *P. oxalicum* relarguée est moindre (environ d'1 log) en provenance du filtre en fibres synthétiques que celle en provenance du filtre en fibres de verre. L'épaisseur des médias peut être une voie d'explication. L'épaisseur du filtre en fibres de verre est évaluée à 0,4 mm tandis que celle du filtre en fibres synthétiques, 3 fois plus élevée est de 1,2 mm. Ainsi, pour qu'il soit relargué par le filtre en fibres synthétiques, *P. oxalicum* doit passer au travers d'une épaisseur 3 fois plus importante. Il est donc probable que ce soit un élément expliquant que la fraction de spores relarguée soit moins importante en provenance du filtre en fibres synthétiques qu'en provenance du filtre en fibres de verre.

### III.4. Influence d'un flux d'air

En conditions réelles, les microorganismes collectés sur des filtres de CTA continuent de subir le passage de l'air à épurer durant toute la durée de fonctionnement de la ventilation. En revanche, dans le cas des essais présentés précédemment, les microorganismes ne sont soumis à un débit d'air que sur une durée très courte (65 min) correspondant au temps nécessaire à la génération des microorganismes. Afin de prendre en compte l'influence du flux d'air avant la mise en conditions contrôlées (T, HR), un test supplémentaire a été réalisé avec le média en fibres de verre et en condition de croissance supposée la plus favorable, c'est-à-dire à 100% HR. Les filtres sont soumis au passage d'un air propre à  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et  $30\% \text{ HR} \pm 1\% \text{ HR}$  pendant 8h immédiatement après l'étape de génération et collecte des microorganismes. Le développement des microorganismes est alors observé après une absence de flux d'air pendant 168h à 100% HR et  $25^{\circ}\text{C}$ . La Figure III- 24 présente ces résultats ainsi que ceux présentés au paragraphe précédent sans flux d'air.

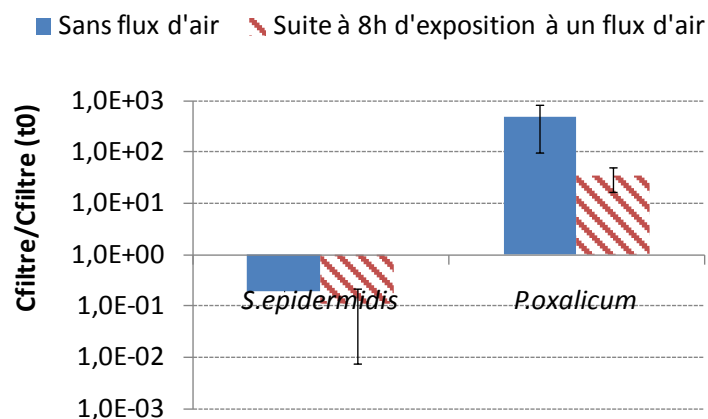


Figure III- 24. Concentrations normées en *P. oxalicum* et *S. epidermidis* extraits des filtres en fibres de verre après 168h d'absence de flux d'air à  $25^{\circ}\text{C}$  et 100% HR directement après contamination des filtres et après maintien d'un flux d'air propre pendant 8h

*S. epidermidis* et *P. oxalicum* suivent les mêmes tendances que celles observées en l'absence de flux d'air pendant 168h à 100% HR (Figure III- 15). La concentration de *S. epidermidis* cultivable diminue d'environ 1 log tandis que *P. oxalicum* se développe. La concentration de *P. oxalicum* cultivable augmente respectivement d'environ 1 et 3 log avec un flux d'air propre et sans flux d'air préalable au maintien des filtres à 100% HR et  $25^{\circ}\text{C}$  en l'absence de flux d'air pendant 168h.

La chute de la concentration de *S. epidermidis* dans les deux cas de figure est expliquée selon les mêmes hypothèses développées dans le § III.2.2.1.

Les concentrations initiales de *P. oxalicum* après contamination des filtres et avant qu'ils soient disposés à 100% HR et 25°C ont été évaluées :

- Dans le cas où les filtres sont directement disposés à 100% HR et 25°C après leur contamination par *S. epidermidis* et *P. oxalicum*, la concentration initiale de *P. oxalicum* cultivables extraite du filtre après contamination est évaluée à  $2,7 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.
- Dans l'autre cas, les filtres sont contaminés puis un flux d'air propre est maintenu pendant 8h. Les microorganismes d'un filtre sont alors extraits et la concentration de *P. oxalicum* est évaluée à  $1,9 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Ces résultats permettent de constater que le flux d'air n'a pas altéré significativement la cultivabilité des spores fongiques.

La concentration de *P. oxalicum* tend à être moins importante lorsqu'un flux d'air propre est maintenu pendant 8h après la contamination des filtres, pour une concentration initiale proches de *P. oxalicum* présents sur les filtres qu'il y ait eu un flux d'air pendant 8h après contamination ou non et avant qu'ils soient disposés à 100% HR et 25°C. Il est donc possible que le maintien d'un flux d'air ait provoqué un ralentissement de la croissance de *P. oxalicum* en raison du stress engendré sur les spores fongiques par le flux d'air. Il est probable que la spore ait évoluée vers une forme de résistance plus forte nécessitant alors un temps plus long de développement cellulaire lorsque les conditions ont à nouveau été favorables à la croissance fongique.

Un flux d'air propre imposé aux microorganismes pendant 8 h suite à la contamination du filtre n'empêche pas la croissance des champignons en conditions idéales, sans flux d'air, en air saturé d'humidité à 25°C et en présence d'une source nutritive, se développent.

## IV. Conclusions

Les filtres à air disposés dans une Centrale de Traitement de l'Air ont pour finalité la réduction de la pollution particulaire. Les filtres collectent, en plus des particules inertes, des particules biologiques. Des études (chapitre 1, § IV.3) ont démontré le rôle du filtre comme support potentiel de prolifération microbienne.

Dans le cadre du travail en laboratoire décrit dans ce chapitre, l'influence de l'humidité relative, de la nature du média fibreux et d'un flux d'air sur le comportement des microorganismes retenus sur des filtres lors de la filtration ont été étudiés. Afin de simuler des arrêts de ventilation, les filtres sont positionnés sous certaines conditions hygrométriques et de température en absence de flux d'air pendant 48h (représentatif d'un week-end) et 168h (représentatif d'une semaine de vacances). Un consortium modèle composé d'une espèce bactérienne et d'une espèce fongique a été utilisé pour cette étude : *S. epidermidis* – *P. oxalicum*.

Le taux d'humidité relative de l'air traversant les filtres lors de l'arrêt de la ventilation s'avère déterminant en ce qui concerne la croissance de *P. oxalicum*. En effet, un développement fongique n'est observé qu'en air saturé d'eau (~ 100% HR, 25°C). A 60% et 80% HR la concentration de *P. oxalicum* cultivables reste stable. Un taux d'humidité insuffisant pour déclencher la croissance microbienne n'empêche pas pour autant les champignons de croître lorsque les conditions sont à nouveau favorables. En effet, lorsque les filtres sont disposés une semaine à 60% HR, *P. oxalicum* ne se développe pas mais lorsqu'ils sont ensuite disposés une semaine à 100% HR ils parviennent alors à se développer. Le comportement des microorganismes collectés sur des filtres qui sont ensuite placés à un taux d'humidité compris entre 80% et 100% HR en absence de flux d'air n'a pas été étudié.

Le comportement de *S. epidermidis* et *P. oxalicum* sur deux types de médias fibreux a été analysé : l'un en fibres de verre et l'autre en fibres synthétiques. Après la contamination des filtres par le consortium microbien, chaque média est disposé dans une atmosphère contrôlée à 100% HR et 25°C en absence de flux d'air. Ce taux d'humidité a été choisi afin de favoriser la croissance microbienne et d'accentuer les tendances comportementales des microorganismes sur les filtres. Les résultats, qui nécessiteraient d'être confirmés par d'autres essais complémentaires mettent en évidence que la croissance de *P. oxalicum* a tendance à se déclencher plus rapidement sur le filtre en fibres de verre que sur le filtre en fibres synthétiques. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :



- Le filtre en fibres de verre détient une plus grande capacité de rétention d'eau et favorise la croissance fongique sensible au taux d'humidité.
- Le filtre en fibres synthétiques composés de 3 couches est 3 fois plus épais que le filtre en fibres de verre et offre une moins grande accessibilité des nutriments aux microorganismes.

Enfin, l'influence d'un flux d'air sur le développement de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* a été étudié. Ainsi, après contamination par le consortium microbien, un flux d'air propre est maintenu pendant 8h consécutives avant que les filtres soient disposés sous atmosphère contrôlée à 100% HR, à 25°C pendant 48h et 168h. Ce flux d'air n'altère pas le potentiel de croissance de *P. oxalicum* puisqu'il se développe. Néanmoins, il est possible que le déclenchement de la croissance fongique soit plus longue lorsque les filtres sont soumis à un flux d'air pendant 8h que lorsqu'ils sont directement placés après contamination sous atmosphère contrôlée à 100% HR et 25°C pendant 48h et 168h.

Sur les deux médias, avec ou sans flux d'air, à 60%, 80% ou 100% HR, *S. epidermidis* ne se développe pas, probablement en raison de son manque d'accessibilité aux ressources nutritives préalablement déposées sur les filtres mais limitées quantitativement.

Le chapitre suivant présente des résultats d'une étude réalisée pendant 5 mois à partir d'un aérosol atmosphérique semi-urbain sur un dispositif de filtration. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus en laboratoire.



# CHAPITRE 4

Evaluation du comportement d'un filtre plan vis-à-vis des aérosols microbiens issus d'un air semi-urbain

---



## I. Introduction

Dans le chapitre précédent, la filtration et le comportement de deux espèces bactérienne et fongique collectées sur des filtres ont été étudiés en conditions de laboratoire à température, humidité relative et vitesse contrôlées. Les résultats de l'étude en laboratoire ont montré la possibilité de croissance de *P. oxalicum* sous certaines conditions d'humidité relative, mais aucune croissance de *S. epidermidis* n'a été observée quelles que soient les conditions expérimentales. Les comportements des deux espèces bactérienne et fongique sont donc différents. Mais ces observations ne peuvent être élargies à un cas général. En effet, chaque espèce bactérienne ou fongique filtrée dans une CTA peut avoir un comportement différent sur le filtre et dans l'air lors de la filtration. Afin d'analyser la filtration de microorganismes " sauvages ", c'est-à-dire directement en provenance de l'air ambiant, une étude a été menée sur plusieurs mois. Elle est présentée dans ce chapitre.

Deux unités de filtration conçues durant ces travaux, contenant chacune un même média en fibres de verre décrit au chapitre précédent, ont été mises en place sur le site de l'Ecole des Mines de Nantes (EMN). Chaque unité filtre le même air de type semi-urbain. Une des deux unités de filtration fonctionne en continu, tandis que l'autre est arrêtée chaque week-end. Plusieurs paramètres (température, humidité relative, pertes de charge des filtres, concentrations massiques des particules, concentrations des particules microbiennes) sont suivis tout au long de la période de fonctionnement du dispositif.

L'objectif de ce chapitre est d'observer le comportement des microorganismes lors de la filtration en conditions réelles selon le mode de fonctionnement des deux unités de filtration. Ainsi, dans un premier temps, l'air à filtrer est caractérisé. Puis les performances des deux filtres sont analysées au cours du colmatage et comparées. Enfin, le comportement des microorganismes lors de la filtration est étudié.

## II. Matériel et méthode

### II.1. Principe expérimental

Le dispositif de filtration est composé de deux sous-unités de filtration d'air qui assurent chacune en parallèle la filtration d'un air semi-urbain par un filtre plan en fibres de verre. Les caractéristiques du filtre sont décrites dans le chapitre 3 au § II.2.1. Par la suite, les deux sous-unités, composantes du dispositif global illustré par la Figure IV- 1, sont nommées UFA<sub>1</sub> et UFA<sub>2</sub>. L'UFA<sub>1</sub> est l'Unité de Filtration d'Air dont la ventilation fonctionne en continu. L'UFA<sub>2</sub> désigne l'unité dont la ventilation subit des cycles arrêt/marche. De nombreuses CTA fonctionnant dans des bâtiments du secteur tertiaire sont régulièrement stoppées lors des week-ends et rallumées le lundi matin dans le but d'économiser de l'énergie. Les cycles arrêt/marche de l'UFA<sub>2</sub> sont établis selon cette fréquence.

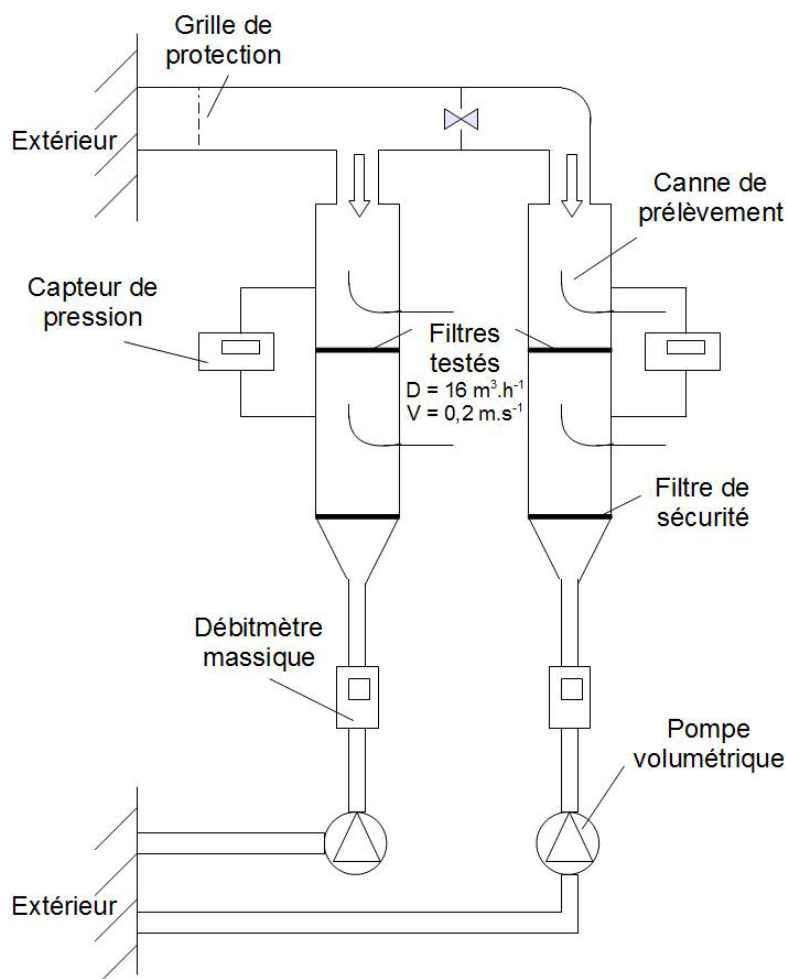


Figure IV- 1. Schéma du dispositif de filtration d'air comprenant deux sous-unités de filtration d'air

Les deux sous-unités de filtration du dispositif sont reliées à une entrée d'air commune. L'air semi-urbain entrant dans chaque unité provient exclusivement de l'extérieur du bâtiment

dans lequel se trouve le dispositif général. Préalablement à son admission dans la conduite de transmission commune aux deux UFA, l'air passe au travers d'une grille de retenue des éléments grossiers indésirables, tels que des feuilles mortes, des brindilles,... Il est ensuite aspiré à un débit de  $16 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  dans chaque UFA par le biais de deux ventilateurs placés en aval de chaque filtre testé. Un média fibreux est disposé dans chaque UFA (dimension du filtre :  $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ ). La vitesse de filtration induite est de  $0,2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Un asservissement maintient cette vitesse constante tout au long du colmatage des filtres par des mesures en continu du débit d'air, réalisées par deux débitmètres massiques en aval de chaque filtre, ainsi que de la perte de charge des filtres. En sortie de chaque UFA, l'air est à nouveau filtré par des filtres de très haute efficacité (HEPA). Les filtres HEPA sont utiles dans la mesure où des tests sont effectués dans les UFA et peuvent nécessiter une élimination de particules avant rejet à l'extérieur du bâtiment. Lorsque la ventilation de l'UFA<sub>2</sub> est stoppée, une vanne positionnée dans la conduite de transmission d'air se ferme afin d'isoler cette unité. Enfin, un emplacement en amont et en aval de chaque filtre est prévu afin d'y positionner des cannes de prélèvement destinées à l'échantillonnage de l'air dans les UFA.

Le schéma de principe du dispositif général ainsi qu'une photographie sont accessibles en Annexe IV- 1.

## II.2. Méthodologie

### II.2.1. Suivi des paramètres en continu

Tout au long de l'étude, plusieurs paramètres sont analysés en continu dans le dispositif.

#### II.2.1.1. Température et humidité relative

La température et le taux d'humidité relative sont enregistrés toutes les minutes par des sondes (Elektronik – série EE08) situées en amont de chaque filtre. Lorsque la ventilation de l'UFA<sub>2</sub> est arrêtée, les mesures se poursuivent dans cette unité.

#### II.2.1.2. Concentration des particules dans l'air

Un TEOM 1405 (Thermo scientific) mesure en continu à un débit de  $0,18 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ , négligeable par rapport au débit d'air de  $16 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  dans l'UFA, la concentration massique (PM totales) des particules de l'air en amont du filtre de l'UFA<sub>1</sub>, qui est approximativement la même que celle en amont du filtre de l'UFA<sub>2</sub>. Le prélèvement de l'air est effectué en condition isocinétique. La description du TEOM est donnée au § VI.2.1 du chapitre 1.

### II.2.1.3. Pertes de charge des filtres

Des capteurs de pression (Druck – LPX 5481 et Setra – modèle 239) sont installés en amont et aval de chaque filtre. Les pertes de charge générées par le filtre sont directement calculées à partir des mesures de pression amont et aval enregistrées toutes les minutes.

### II.2.2. Mesures ponctuelles de la qualité microbiologique de l'air

Des prélèvements hebdomadaires sont réalisés dans le but de quantifier les microorganismes cultivables dans l'air en amont et en aval des filtres. Un seul prélèvement commun est réalisé en amont des filtres tandis que deux prélèvements sont réalisés en aval de chacun des deux filtres. La séquence de prélèvement réalisée est la suivante :

- Mesure en aval de l'UFA<sub>1</sub> pendant 1h
- Mesure en aval de l'UFA<sub>2</sub> pendant 1h réalisée lors du redémarrage de la ventilation de l'unité
- Mesure en amont de l'UFA<sub>2</sub> pendant 1h

L'échantillonnage des particules biologiques est réalisé au moyen d'un impinger, le BioSampler (SKC). Sa description est proposée au § V.2 du chapitre 1. Le prélèvement au BioSampler est en prélèvement isocinétique à un débit de  $0,75 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1} \pm 0,025 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  ( $12,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) dans 20 mL de liquide de prélèvement ( $\text{MgSO}_4$  à 0,01 M).

Les échantillons recueillis sont ensuite analysés par comptage UFC après étalement sur milieux de culture. Pour cela, un volume de 1 mL de la solution de prélèvement est directement étalé sur un milieu solide composé de  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de gélose nutritive. Pour évaluer la répétabilité, deux étalements de 1 mL sont réalisés sur deux boîtes de pétri contenant le même milieu de culture. Ce milieu " universel", à base de tryptone et d'extrait de viande, favorise la croissance des bactéries et des champignons ne nécessitant pas d'exigences particulières. L'analyse sur milieu de culture des microorganismes est limitée puisqu'elle permet uniquement la quantification des cellules cultivables et non des cellules viables non cultivables ou des cellules mortes (Hawksworth, 1991). Néanmoins, c'est une méthode facile à mettre en place, peu coûteuse et qui demeure encore la plus utilisée aujourd'hui.

Les concentrations  $C_t$ ,  $C_b$ ,  $C_{ch}$ , correspondent respectivement à la concentration en microorganismes cultivables totaux, à la concentration en bactéries cultivables totales et à la concentration en champignons cultivables totaux. Dans la suite de l'étude, les concentrations



$C_t$ ,  $C_b$ ,  $C_{ch}$  sont calculées à partir du nombre de colonies ( $n_{t,b,ch}$ ) formées sur chaque boîte de pétri comprenant le milieu nutritif universel. L'échantillonnage s'effectuant sur 1h à un débit de  $12,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , les microorganismes cultivables sont collectés à partir d'un volume de  $0,75 \text{ m}^3$  d'air et dans un volume ( $V_B$ ) de solution comprise dans le BioSampler. Le liquide contenu à l'origine dans le BioSampler est de 20 mL. Une partie de la solution s'évapore au cours du temps d'échantillonnage. Ce volume est pris en compte lors du calcul de la concentration des microorganismes cultivables collectés. Ainsi le volume  $V_B = 20 - V_{\text{évaporé}}$ . Le BioSampler est pesé en début et en fin de prélèvement ce qui permet de déterminer  $V_{\text{évaporé}}$ . Les concentrations  $C_t$ ,  $C_b$ ,  $C_{ch}$  sont finalement calculées en  $\text{UFC}\cdot\text{m}^{-3}$  selon l'équation (IV.1).

$$C_{t,b,ch} = \frac{n_{t,b,ch} \times V_B}{0,75} \quad (\text{IV.1})$$

Le Tableau IV- 1 récapitule les conditions de mesure des grandeurs caractéristiques de l'étude.

**Tableau IV- 1. Récapitulatif des conditions de mesure des paramètres de suivi du fonctionnement des UFA**

	Débit de prélèvement ( $\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ )	Période d'analyse	Période d'échantillonnage	Echantillonneur / Analyseur	Prélèvement
<b>Température (°C)</b>	-	Instantané	1 min	Sonde thermo-hygrométrique	Au niveau de chaque filtre (Amont)
<b>Humidité Relative (%)</b>	-	Instantané	1 min	Sonde thermo-hygrométrique	Au niveau de chaque filtre (Amont)
<b>Perte de charge (Pa)</b>	-	Instantané	1 min	Capteur de pression	Amont/Aval des deux filtres
<b>PM totales (<math>\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}</math>)</b>	0,18	Instantané	Moyenne glissante sur 10 min	TEOM (Ecomesure)	Amont du filtre de l'UFA <sub>1</sub>
<b>Microorganismes cultivables (<math>\text{UFC}\cdot\text{m}^{-3}</math>)</b>	0,75	1h	hebdomadaire	BioSampler (SKC) / Etalement sur milieu de culture	Amont du filtre de l'UFA <sub>2</sub> et Aval des deux filtres

### III. Caractérisation de l'air à filtrer

#### III.1. Caractérisation particulaire de l'air et évolution de la concentration des particules

##### III.1.1. Caractérisation particulaire de l'air

La Figure IV- 2 présente la distribution des concentrations journalières de  $PM_{\text{totales}}$  de l'air extérieur échantillonné au TEOM avant l'étape de filtration. Sur la période d'étude entre le 19 mars et le 20 août 2012, la concentration journalière moyenne est de  $13,2 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Les concentrations de  $PM_{\text{totales}}$  inférieures à  $15 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  représentent 75% de la totalité des valeurs enregistrées sur la période d'étude. L'air filtré est donc globalement de bonne qualité et peu chargé en particules. En effet, la directive européenne 2008/50/CE du 21 mai 2008 impose une valeur limite en  $PM_{10}$  (particules dont le diamètre est inférieur à  $10 \mu\text{m}$ ) de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  en moyenne sur 24h pour l'air extérieur. Elle ne doit pas être dépassée sur l'année. Une exception de 35 dépassements par an est néanmoins acceptée. Les concentrations obtenues sont donc bien en dessous des valeurs limites, d'autant plus que les valeurs correspondent aux  $PM_{\text{totales}}$ .

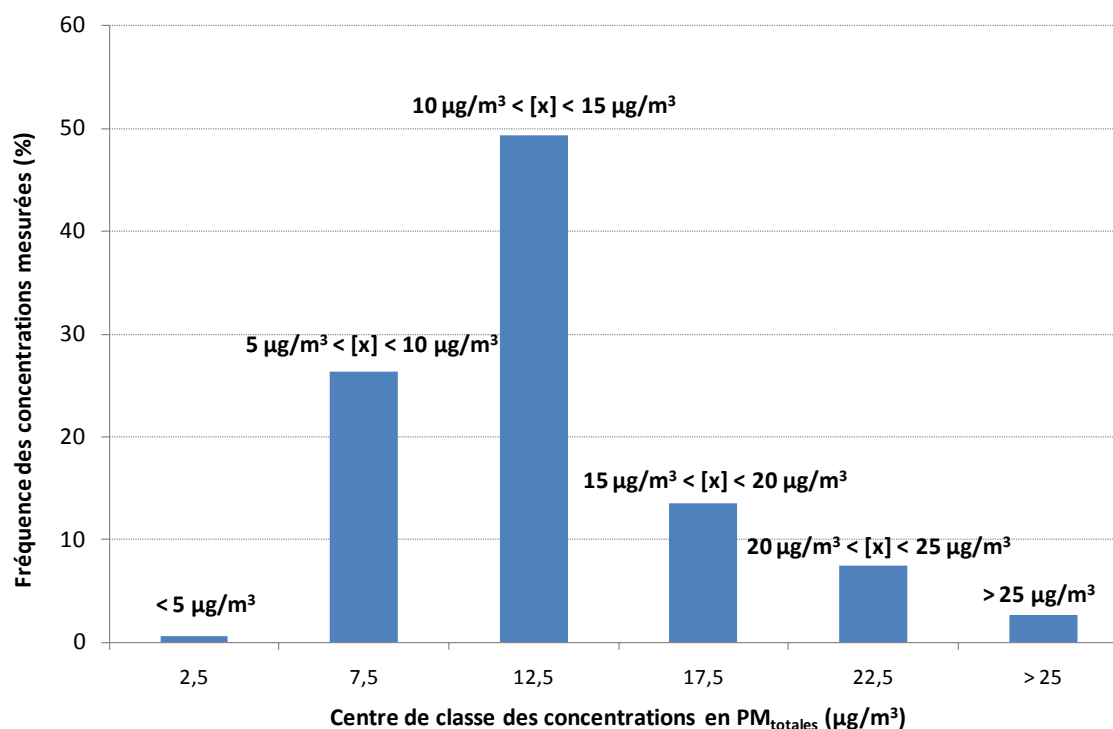


Figure IV- 2. Fréquence des concentrations journalières en particules totales de l'air en amont des filtres

Un rapport de l'Anses, recense (Afsset 2009) plusieurs valeurs saisonnières de  $PM_{10}$  moyennes mesurées dans différentes régions françaises. Le Tableau IV- 2 les répertorie.

Tableau IV- 2. Concentrations saisonnières moyennes des PM<sub>10</sub> en µg.m<sup>-3</sup> dans l'air ambiant

Région	Station	Type	Hiver 2004		Été 2004		Hiver 2005		Été 2005	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Nord-Pas de Calais	46092	Péri-urbaine	17,8	24,3	17,2	23,6	15,2	21,8	17,8	24,2
Picardie	90128	Péri-urbaine	18,5	22,9	15,7	18,8	17,4	21,9	17,3	20,8
	18039	Rurale	16,5		16,2		15,4		17,5	
île de France	12412	Péri-urbaine	19,3	20,3	17,6	18,1	17,5	19,3	16,7	19,9
	8650	Rurale	14,7		14,2		13,9	13,9	15,5	16,3
Rhône-Alpes	89551	Péri-urbaine	23,7	24,3	17,6	19,2	20,2	24	14,4	19,9
	36005	Rurale	-		17,2		11,9		15,2	

La valeur moyenne des concentrations en PM<sub>totales</sub> de 13,2 µg.m<sup>-3</sup>, a été obtenue dans la zone péri-urbaine de Nantes où sont réalisés les prélèvements et est inférieure à celles répertoriées dans le Tableau IV- 2. Selon ce tableau, la concentration moyenne de l'air péri-urbain mesurée dans le cadre de l'étude contient des concentrations de PM<sub>totales</sub> faibles.

Ainsi, l'air extérieur qui est filtré dans le cadre de la présente étude est particulièrement peu chargé en particules, d'autant plus si la concentration moyenne en PM<sub>totales</sub> est comparée à des concentrations massiques de particules de l'air évaluées dans des environnements intérieurs, parfois plus importantes que celles de l'air extérieur, en raison de l'activité anthropique en particulier. En effet, Fromme et al. (2008) ont mesuré des concentrations médianes de PM<sub>10</sub> à l'intérieur et à l'extérieur d'une école munichoise respectivement de 118,2 µg.m<sup>-3</sup> et 24,2 µg.m<sup>-3</sup>. L'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) a calculé dans une étude la valeur médiane des concentrations en PM<sub>10</sub> de 297 logements. La valeur a été évaluée à 31,3 µg.m<sup>-3</sup> (max : 523 µg.m<sup>-3</sup>). De même, Vincent et al. (1997) ont analysé les PM<sub>8</sub> de 133 bureaux parisiens ventilés selon différentes configurations. Ils obtiennent une concentration moyenne de 137 µg.m<sup>-3</sup> dans les bureaux ventilés naturellement, 148 µg.m<sup>-3</sup> dans les bureaux climatisés et 93,5 µg.m<sup>-3</sup> dans les bureaux comprenant une ventilation mécanique contrôlée. Enfin une étude menée aux Etats-Unis dans 100 immeubles de bureaux a mis en évidence des concentrations en PM<sub>10</sub> comprises entre 3 et 35,4 µg.m<sup>-3</sup> (médiane à 11,4 µg.m<sup>-3</sup>) (Afsset, 2009).

### III.1.2. Evolution de la concentration massique des particules

Les Figure IV- 3 et Figure IV- 4 présentent les résultats de l'analyse de la concentration massique des particules de l'air extérieur au cours des 5 mois de l'étude, avant l'étape de filtration.

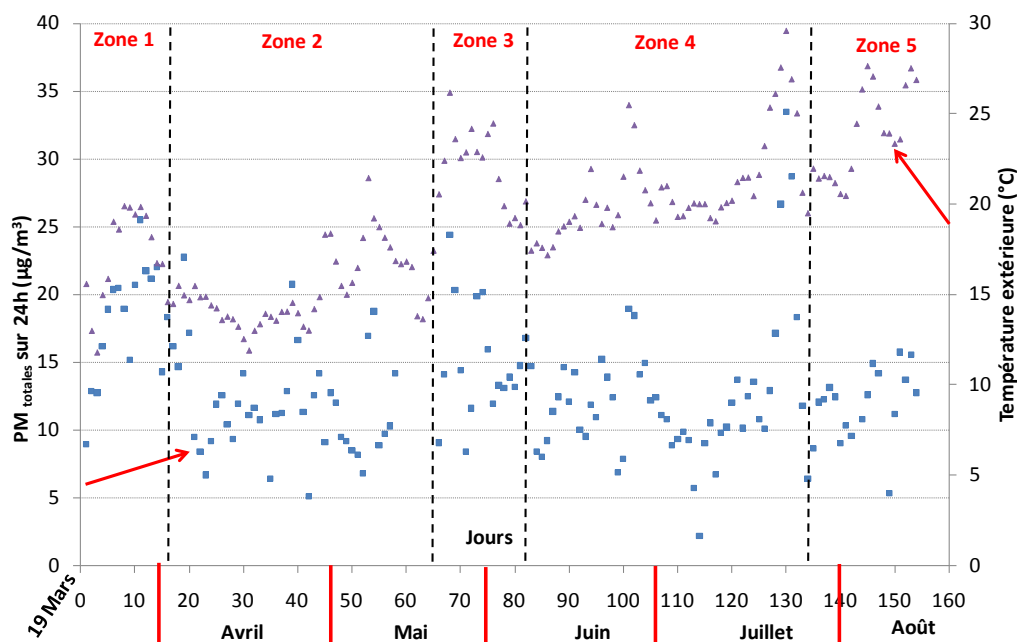


Figure IV- 3. Evolution au cours du temps de la concentration en particules totales sur 24h ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et de la température de l'air extérieur en amont des filtres

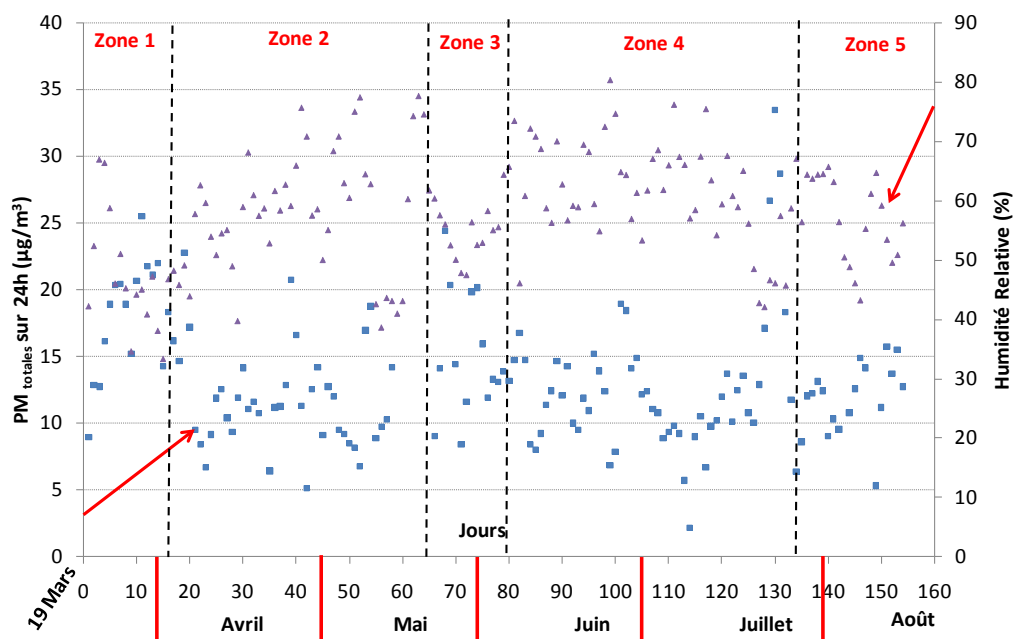


Figure IV- 4. Evolution au cours du temps de la concentration en particules totales sur 24h ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et de l'humidité relative de l'air extérieur en amont des filtres

La température et l'humidité relative de l'air extérieur sont respectivement présentées sur les graphiques de la Figure IV- 3 et Figure IV- 4. Compte tenu des résultats observés sur chacune des deux figures (IV.3 et IV.4), les pics de concentrations massiques journalières des particules totales de l'air semblent liés aux pics de température. Aussi, une augmentation brutale de la température entraîne généralement une augmentation brutale de la concentration

de  $PM_{\text{totales}}$ . En revanche, à l'échelle des mois, la variation progressive de la température entre le mois de mars et le mois d'août n'influe pas sur la concentration de  $PM_{\text{totales}}$ . Plusieurs zones sont indiquées sur les Figure IV- 3 et Figure IV- 4. Elles ont été définies selon la température et le taux d'humidité afin de mettre en évidence des tendances. Le Tableau IV- 3 regroupe les valeurs moyennes et écarts types pour la température, l'humidité relative et la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  de chaque zone.

La température moyenne de la zone 2 est de 15,2°C, celle de la zone 5 est de 23,9°C. Alors que les températures moyennes sont significativement différentes, les concentrations moyennes sur 24h des  $PM_{\text{totales}}$  sont du même ordre pour les zones 2 et 5 et correspondent respectivement à une moyenne de 12,0 et 11,9  $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Néanmoins, le mois d'août est un mois de vacances ce qui implique que l'activité anthropique est diminuée et cela peut influencer sur la concentration de  $PM_{\text{totales}}$ , la température n'étant pas le seul paramètre d'influence de la concentration massique de particules. Aucun lien significatif de la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  et du taux d'humidité relative n'est observé, que ce soit en ce qui concerne la variation de la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  au cours du temps ou lors de pics d'humidité relative.

**Tableau IV- 3. Moyenne de la température, du taux d'humidité relative et de la concentration sur 24h de  $PM_{\text{totales}}$  pour chaque zone**

	<b>Zone 1</b>	<b>Zone 2</b>	<b>Zone 3</b>	<b>Zone 4</b>	<b>Zone 5</b>
<b>Température Moyenne (°C)</b>	<b>17,3</b>	<b>15,2</b>	<b>21,8</b>	<b>20,8</b>	<b>23,9</b>
Ecart type	2,6	2,0	2,9	2,7	2,5
<b>Humidité relative moyenne (%)</b>	<b>47,5</b>	<b>57,5</b>	<b>56,5</b>	<b>61,8</b>	<b>56,9</b>
Ecart type	10,2	10,5	6,7	8,8	7,0
<b><math>PM_{\text{totales}}</math> moyenne (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>18,0</b>	<b>12,0</b>	<b>15,0</b>	<b>12,6</b>	<b>11,9</b>
Ecart type	4,5	3,9	4,6	5,3	2,7

Selon Degaetano et al. (2004), l'évolution spatiale et temporelle des concentrations de particules dans l'air varie sensiblement selon les modifications :

- Anthropiques. Par exemple, ils observent des pics de concentrations de  $PM_{2,5}$  entre 7h et 9h ainsi qu'entre 17h et 23h ce qui correspond aux heures de plus grande activité dans la ville de New York où sont réalisées les mesures. Lors d'une semaine de mesures, les concentrations minimales sont mesurées le samedi et le dimanche.
- Météorologiques. Ils associent par exemple une haute température et un taux élevé en humidité à des concentrations plus importantes de  $PM_{2,5}$ .

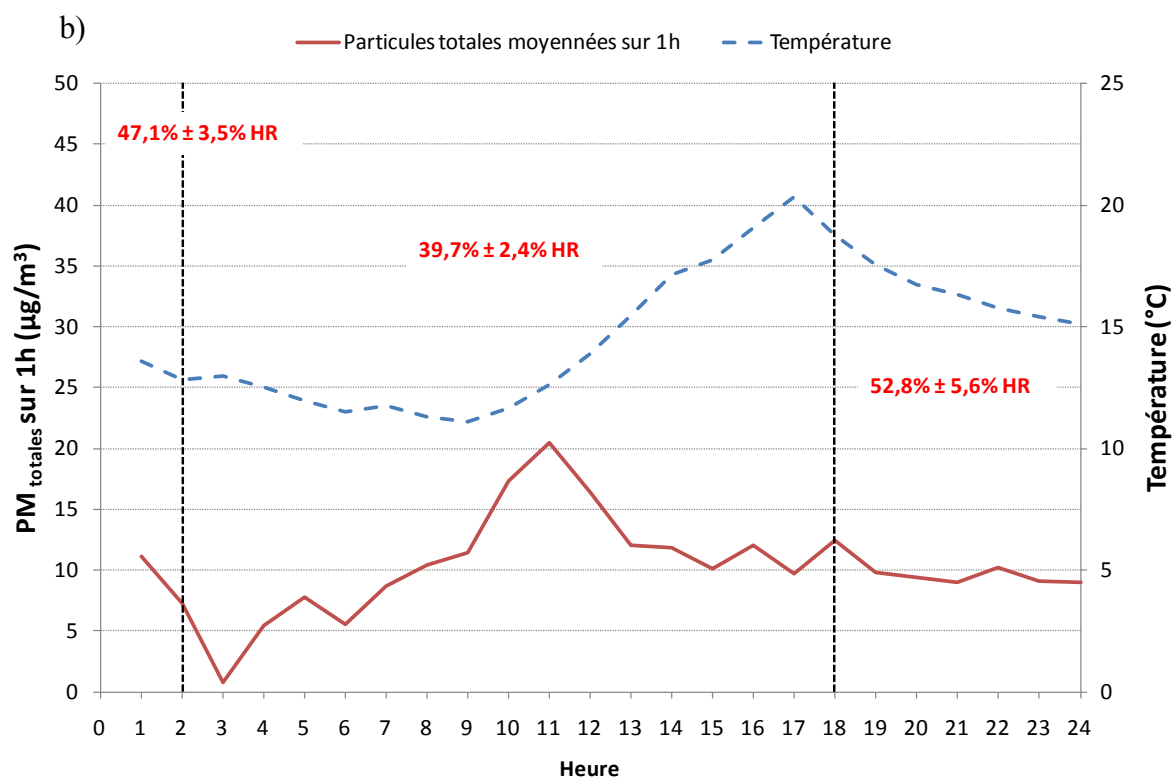
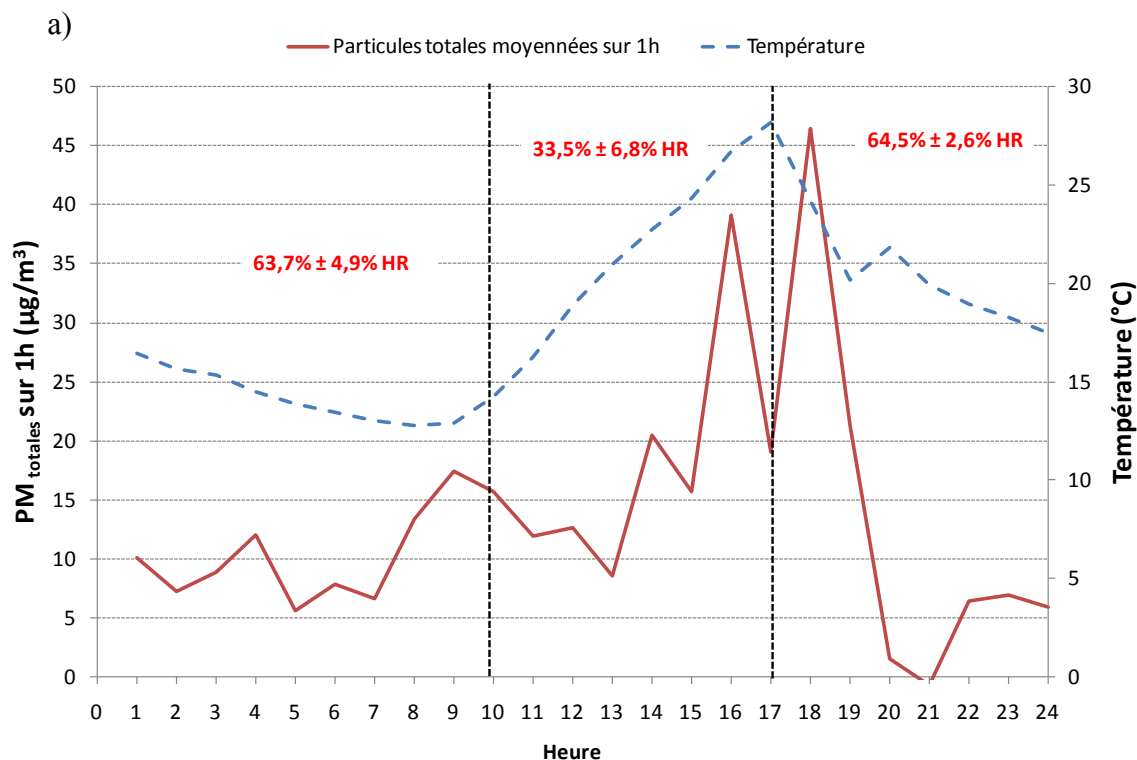
Des auteurs ne constatent pas systématiquement de lien entre les variations climatiques et les concentrations de particules (Samet et al., 2000). Néanmoins, d'autres ont clairement observé de hautes concentrations en  $PM_{2,5}$  en association avec des hautes températures journalières (Jung et al., 2002). Sur la Figure IV- 3, trois pics de concentrations supérieures à  $25 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  sont recensés et sont liés à une augmentation de la température de l'air les 25, 26 et 27 juillet. Lors du pic du 29 mars, la température et le taux d'humidité relative journalière sont respectivement de  $20^{\circ}\text{C}$  et 45% HR. La Figure IV- 4 n'indique pas de relation évidente entre taux d'humidité relative et concentration particulaire en ce qui concerne les  $PM_{\text{totales}}$ . Selon Degaetano et al. (2004), les pics de concentrations de particules fines sont probablement occasionnés par la présence d'aérosols secondaires. Ces aérosols seraient issus de réactions chimiques en raison des pics d'ozone qu'ils ont observés lors des périodes de haute température, à un taux élevé en humidité. De même, selon le rapport annuel d'Air Pays de la Loire pour l'année 2011, deux pics de pollution ont été répertoriés en 2011. Le premier a été observé du 3 au 6 mars. L'analyse des particules a mis en évidence une grande part d'aérosols secondaires générés lors de transformations photochimiques de produits agricoles, ainsi que la présence d'un anticyclone ne favorisant pas la dispersion des polluants. L'autre a été mesuré lors d'une période de grand froid qui a accentué l'émission de particules fines provenant des chauffages et voitures ainsi qu'en présence d'un anticyclone. D'ailleurs, les pics de pollution particulaire sont souvent plus fréquents en hiver dans les agglomérations urbaines, plutôt qu'en été. Cela en raison des émissions accrues de particules fines par les chauffages et les voitures ainsi que des conditions météorologiques alors peu favorables à leur dispersion. Les pics de  $PM_{\text{totales}}$  observés en Figure IV- 3 et Figure IV- 4 ont probablement aussi une origine multifactorielle : une forte température, peu de vent, une présence marquée d'aérosols secondaires,... Il est en outre possible que les pics élevés de particules observés à la fin du mois de mai et au début du mois de juin et associés à des températures importantes soient liés à une présence importante de pollens dans l'air. L'analyse chimique des particules serait nécessaire pour affiner l'analyse de ces pics de pollution.

### III.1.3. Evolution journalière de la concentration massique des particules

La Figure IV- 5 présente l'évolution de la concentration massique des particules totales de l'air semi-urbain (moyenne de la concentration sur 1h) échantillonné au TEOM en amont de l'UFA<sub>1</sub>.

Les évolutions de la concentration massique journalière de journées " types " sont présentées :

- Un premier graphique (Figure IV- 5 a)) concerne le jeudi 3 mai, jour de semaine
- Un second graphique (Figure IV- 5 b)) le samedi 7 avril
- Le dernier graphique le dimanche 27 mai (Figure IV- 5 c))



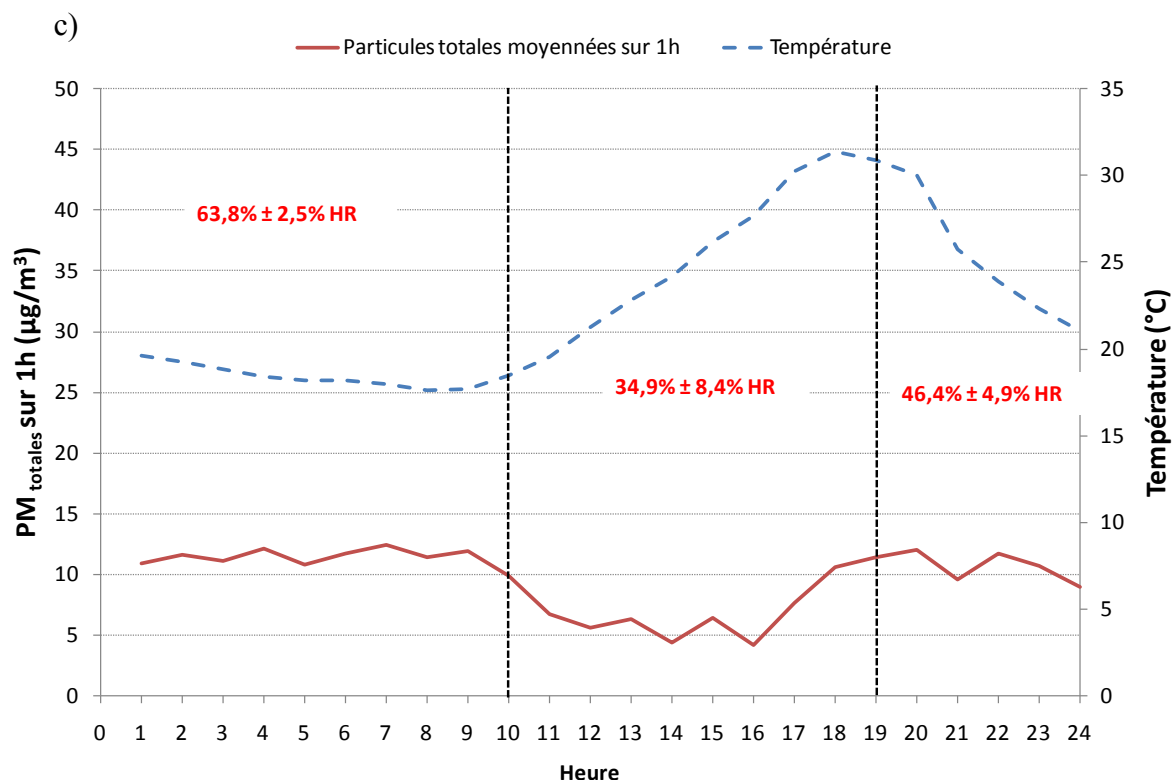


Figure IV- 5. Evolutions journalières de la concentration massique de particules totales ( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) : a) jour de la semaine ; b) samedi ; c) dimanche

L'école des Mines de Nantes où sont effectués les prélèvements, se situe dans une zone d'activité comprenant plusieurs écoles, entreprises et résidences étudiantes.

La Figure IV- 5 a), montre une 1<sup>ère</sup> augmentation de la concentration massique des  $\text{PM}_{\text{totales}}$  à partir de 7h00. Il est probable que l'augmentation de la concentration de  $\text{PM}_{\text{totales}}$  ait une origine anthropique. En effet, 7h00 est l'heure à partir de laquelle les salariés commencent à se rendre sur leur lieu de travail. Un axe routier important (autoroute A11) est proche de la zone d'étude. Aussi il est probable que les particules générées par les voitures sur l'axe routier contribuent aux fluctuations des concentrations de particules massiques et en particulier, lorsque le sens du vent est favorable. Entre 16h et 19h ce sont les heures auxquelles les salariés débauchent et des pics de  $\text{PM}_{\text{totales}}$  sont mesurés. La température est maximale, tandis que le taux d'humidité relative est minimal. Les facteurs conjoints liés aux conditions météorologiques et anthropiques induisent probablement cette augmentation importante de  $\text{PM}_{\text{totales}}$ . En revanche, les concentrations massiques de  $\text{PM}_{\text{totales}}$  diminuent à partir de 19h00, puisque les derniers salariés débauchent et l'activité diminue.

Le graphique de la Figure IV- 5 b), présente l'évolution des concentrations massiques de  $\text{PM}_{\text{totales}}$  lors du samedi 7 avril. Les concentrations évoluent peu tout au long de la journée. En effet, le samedi est un jour de faible activité aux alentours de l'EMN. Une augmentation



de  $PM_{\text{totales}}$  est observée entre 9h00 et 12h00. Il est possible que les vents favorisent une concentration plus importante de particules au niveau du prélèvement en provenance de l'axe routier. La circulation routière devient plus importante le samedi matin à une heure plus avancée qu'en semaine, ce qui peut expliquer dans ce cas du 7 avril, que le pic de  $PM$  s'observe à partir de 9h00.

Enfin, le graphique de la Figure IV- 5 c) présente l'évolution des concentrations massiques de  $PM_{\text{totales}}$  lors du dimanche 27 mai. Peu de fluctuations sont observées. L'évolution des concentrations ne met pas de pic de pollution particulaire en évidence et laisse supposer que l'évolution de la concentration est principalement liée aux conditions climatiques. En effet, l'activité anthropique est beaucoup plus faible le dimanche qu'en semaine, en général ainsi que sur le site de l'EMN. Alors que la température augmente l'après-midi et que l'humidité relative diminue, la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  diminue. L'activité anthropique génère des particules dont la dispersion est favorisée ou non selon les conditions climatiques.

A l'échelle d'une journée, les évolutions des concentrations de  $PM_{\text{totales}}$  ne peuvent être uniquement expliquées par les évolutions de la température et de l'humidité relative. Une fois de plus, il est probable que le vent ait un impact pouvant expliquer dans ce cas la diminution de la concentration en  $PM_{\text{totales}}$ .

Les résultats sur l'étude de la pollution particulaire de l'air permettent de tirer les conclusions suivantes

1) A l'échelle du mois :

- La moyenne de la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  journalière par zone et par mois, évolue peu avec la température et le taux d'humidité relative
- La concentration journalière de  $PM_{\text{totales}}$  évolue sensiblement avec la température lors d'épisode de fortes températures. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux d'humidité relative et la concentration de  $PM_{\text{totales}}$  lors d'épisodes de faible ou fort taux d'humidité relative

2) A l'échelle de la journée :

- La concentration de  $PM_{\text{totales}}$  varie sensiblement en fonction des conditions anthropiques
- Les conditions climatiques ont un impact sur la concentration de  $PM_{\text{totales}}$ . En revanche le taux d'humidité relative et la température ne peuvent expliquer à eux

seuls les variations observées. En particulier, la vitesse et le sens du vent doivent être pris en considération

### III.2. Composition microbienne de l'air

L'évolution au cours du temps de la concentration des microorganismes cultivables dans l'air en amont de la filtration est indiquée sur les Figure IV- 6 et Figure IV- 7 ainsi que les moyennes journalières respectivement de la température et de l'humidité relative. La température et le taux d'humidité relative de l'air extérieur, mesurées au centre ville de Nantes, sont également indiqués respectivement sur la Figure IV- 6 et la Figure IV- 7. La température mesurée au centre ville est globalement inférieure à celle évaluée dans l'UFA<sub>1</sub>, tandis que l'HR est supérieure. Les valeurs ont été obtenues sur un site de données météorologiques (Météorologic). Les concentrations maximales et minimales sont indiquées sur le graphique pour chaque valeur de concentration en microorganismes cultivables totaux.

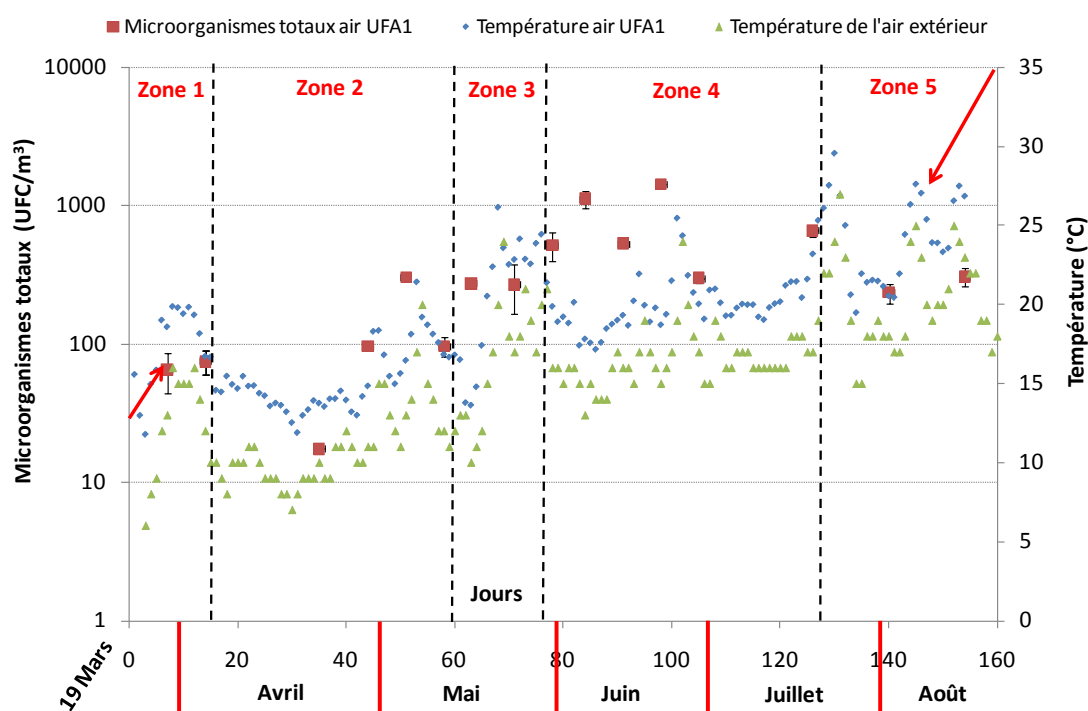


Figure IV- 6. Evolution des concentrations en microorganismes totaux dans l'air en amont de la filtration et de la température au cours du temps

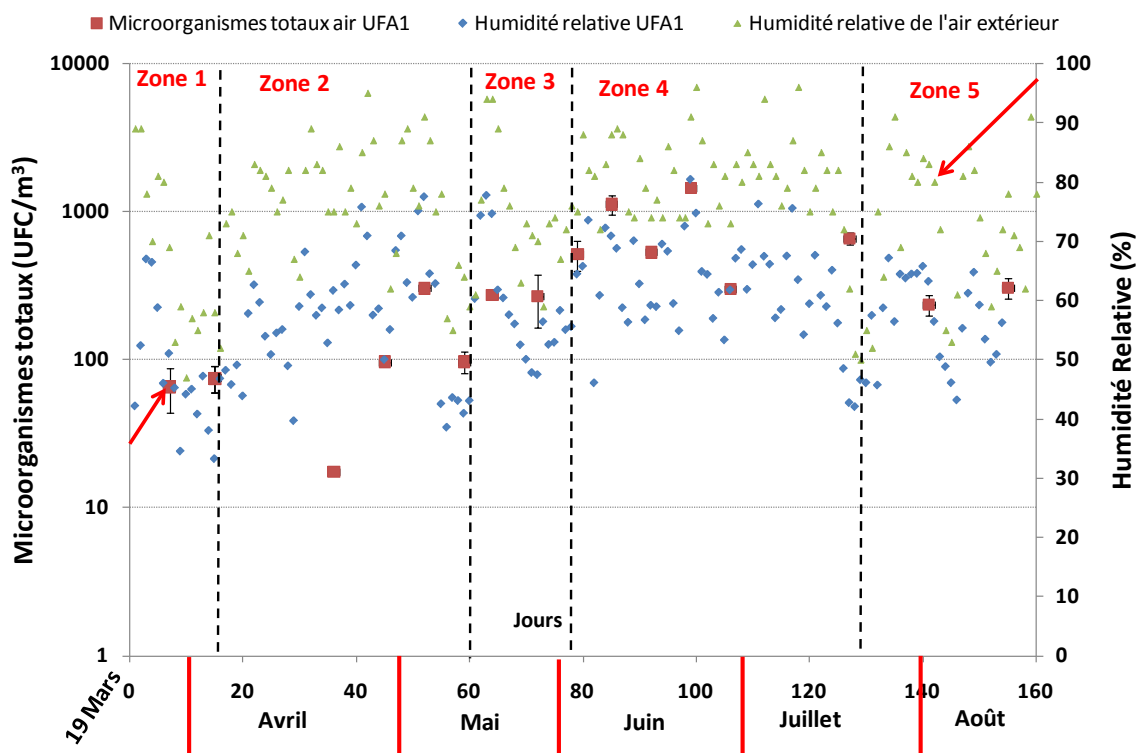


Figure IV- 7. Evolution des concentrations en microorganismes totaux dans l'air en amont de la filtration et du taux d'humidité relative au cours du temps

Entre le mois de mars et le mois de septembre, les concentrations en microorganismes cultivables totaux sont comprises entre 10 et 1500 UFC.m<sup>-3</sup> d'air. Les mesures de la concentration en microorganismes dans l'air varient selon de nombreux facteurs : l'environnement (urbain, rural,...), les espèces échantillonnées, le temps d'échantillonnage (l'échantillonnage pouvant altérer la cultivabilité des microorganismes), le milieu de culture sélectionné pour analyser les microorganismes, les variations saisonnières,... (Jo et al., 2005). Lors de la période d'étude, la température et le taux d'humidité ont beaucoup variés. Jones et al. (2004) constatent des corrélations entre des concentrations en microorganismes et des températures élevées à des faibles taux d'humidité en raison d'une meilleure dispersion dans l'air. La vitesse du vent est aussi un facteur pouvant influencer sur la concentration des microorganismes présents. Il est important de rappeler que les résultats de cette présente étude indiquent une tendance puisque les mesures en microorganismes cultivables sont ponctuelles. En effet, entre le mois de mars et le mois de juillet les analyses des microorganismes cultivables dans l'air sont hebdomadaires. Ensuite elles sont réalisées toutes les deux semaines.

### III.2.1. Influence de la température sur l'évolution de la composition microbienne de l'air

Les concentrations en microorganismes cultivables totaux sont les plus basses aux mois de mars et avril. Elles sont systématiquement inférieures à 100 UFC.m<sup>-3</sup> jusqu'au début du mois de mai. La température dans l'UFA<sub>1</sub> est également strictement inférieure à 20°C jusqu'au mois de mai. Au mois de mai, la température journalière moyenne augmente de 4 à 5°C par rapport au mois d'avril. Une augmentation significative de la concentration de microorganismes cultivables totaux est alors observée. Celle-ci est comprise entre 100 et 400 UFC.m<sup>-3</sup>. C'est finalement dans la zone 4, au mois de juin et jusqu'à la mi-juillet, que les concentrations les plus élevées sont mesurées puisqu'elles sont alors comprises entre 400 et 1500 UFC.m<sup>-3</sup>. La température est en moyenne de 20,8°C et le taux d'humidité relative de 61,8% durant la période comprise dans la zone 4 (Tableau IV- 3). Dans la zone 5, la température journalière moyenne est de 23,9°C. Les concentrations en microorganismes cultivables totaux sont alors comprises entre 200 et 400 UFC.m<sup>-3</sup>. Ce dernier résultat indique que la température n'explique pas à elle seule les évolutions de la pollution microbienne de l'air extérieur observée.

A titre indicatif, en plus de la température de l'air dans l'UFA<sub>1</sub>, la température mesurée au centre ville de Nantes est indiquée sur la Figure IV- 6. Entre le moment où l'air provenant de l'extérieur du bâtiment est aspiré dans la conduite d'aération menant à l'UFA<sub>1</sub> et la mesure de la température dans l'UFA<sub>1</sub>, la température de l'air est légèrement modifiée. La Figure IV- 6 montre que la température est généralement plus basse lorsque les mesures sont effectuées au centre ville de Nantes. Les tendances entre températures et concentrations en microorganismes cultivables sont les mêmes.

### III.2.2. Influence du taux d'humidité relative sur l'évolution de la composition microbienne de l'air

Les résultats semblent aussi indiquer qu'en plus de la température, de hautes valeurs d'humidité relative sont à mettre en relation avec la concentration en microorganismes cultivables totaux. En effet, sur la période d'étude le taux moyen d'humidité relative est le plus important dans la zone 4 avec une valeur de 61,8% dans l'UFA<sub>1</sub>. C'est aussi dans la zone 4 que les concentrations en microorganismes cultivables sont les plus importantes (figure IV.7). De plus, c'est au mois de juin que des pics de concentrations microbiennes sont

analysés alors que la température moyenne continue d'augmenter au mois de juillet et août (respectivement 21,6°C et 24°C). Plus précisément, deux pics constatés en juin sont mesurés lors de deux échantillonnages effectués sur des journées présentant un taux d'humidité particulièrement élevé : moyenne de 71% et 80% d'humidité relative pour des températures moyennes respectives de 17,6 °C et 19,4°C dans l'UFA<sub>1</sub>.

De même que pour la température, le passage de l'air dans le dispositif de filtration modifie le taux d'humidité relative. Le taux d'humidité relative est globalement plus faible dans l'UFA<sub>1</sub> qu'au niveau de la mesure réalisée au centre ville de Nantes.

### III.2.3. Evolution des microorganismes, bactéries et champignons cultivables totaux

La Figure IV- 8 indique les concentrations en microorganismes cultivables totaux de l'air entrant dans le dispositif lors de la période d'étude et précise également celles des bactéries et des champignons cultivables totaux. Le taux d'humidité journalier moyen est également indiqué pour chaque mesure.

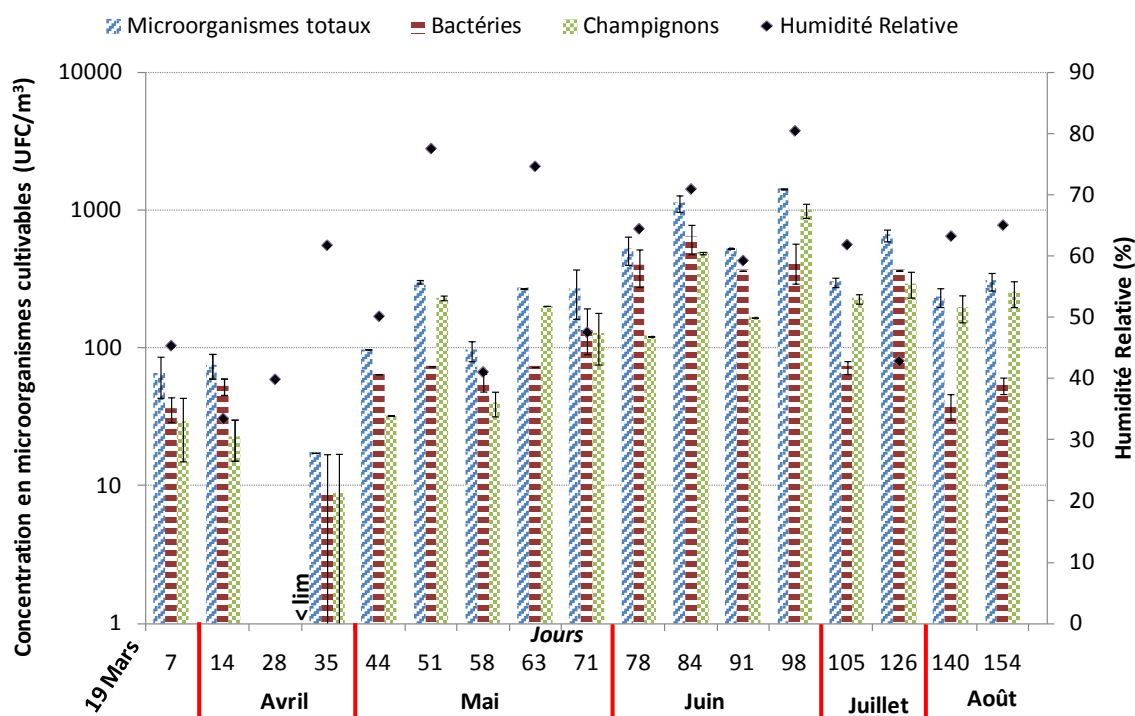


Figure IV- 8. Microorganismes (bactéries et champignons) cultivables dans l'air entrant dans le dispositif de filtration au cours du temps

Lors du mois de juin, deux journées ayant des taux d'humidité relative de 71% et 80% (à des températures respectives de 17,6°C et 19,4°C), présentent des concentrations en espèces fongiques particulièrement élevées, respectivement 500 et 1000 UFC.m<sup>-3</sup>. Au mois de

mai, deux prélèvements sont effectués lors de journées dont le taux d'humidité dépasse 70%. Les concentrations en espèces fongiques augmentent pour la saison, en particulier par rapport à la concentration bactérienne qui elle évolue peu jusqu'au 63<sup>ème</sup> jour. Compte tenu de ces résultats, il est possible de supposer que le taux d'humidité puisse avoir un impact sur la concentration en spores fongiques cultivables.

Selon Lyon et al. (1984), le facteur prédominant en faveur de la production de spores fongiques est le taux d'humidité de l'air. Ils observent que les concentrations de spores de *Fungi imperfecti* les plus élevées sont mesurées lorsque le taux d'humidité est le plus important et la vitesse de l'air minimal. Tandis que Herrero et al (1996), cité dans Jones et al. (2004), constatent que les concentrations d'*Alternaria spp.* les plus élevées sont observées lorsque les températures journalières sont maximales et qu'il n'y a pas de précipitations. En revanche, selon eux, *Cladosporium spp.* est en concentration maximale lorsque la température journalière est minimale.

Les concentrations des bactéries et des champignons cultivables ont toutes deux augmentées au cours des mois de mars à août :

- Les concentrations de bactéries sont jusqu'au mois de juin généralement du même ordre de grandeur que celles des champignons.
- A partir de la fin du mois de juin, chaque analyse ponctuelle de l'air démontre une présence plus marquée de champignons, les concentrations étant alors significativement plus élevées que celles des bactéries. En effet, les concentrations en bactéries cultivables deviennent majoritairement inférieures à 100 UFC.m<sup>-3</sup> tandis que les concentrations en espèces fongiques cultivables se maintiennent autour de 200 UFC.m<sup>-3</sup>.

Les mois de juillet et août sont les plus chauds sur toute la période de mesure. Il est alors possible que l'activité végétale induise d'importantes concentrations de certaines espèces de spores au détriment des bactéries, l'environnement étant semi-urbain et constitué d'une zone végétale relativement importante aux alentours du lieu de prélèvement. Bovallius et al. (1978) ont analysé les concentrations bactériennes de l'air de différents environnements (ruraux, urbains et côtiers) lors de 3 années d'étude. Les concentrations sont d'un ordre de grandeur plus important dans des environnements urbains que ruraux en raison de l'activité anthropique. Sur le site de l'EMN, l'activité anthropique est également diminuée en cette période, les mois de juillet et août étant une période de vacances, il est possible que cela influe sur la diminution de la concentration en bactérie.

A l'échelle de la journée les concentrations en microorganismes cultivables évoluent peu. Di Giorgio et al. (1996) ont réalisé un suivi pendant 12 mois de la concentration en microorganismes cultivables (bactéries et champignons cultivables) dans la ville de Marseille ainsi que dans une réserve naturelle des îles de Porquerolles. Les prélèvements ont été réalisés 2 jours par semaine à 9h, 12h, 14h et 17h. Ils n'observent pas de variations significatives des concentrations bactériennes et fongiques lors d'une journée. En revanche, ils constatent que le vent, la température et l'humidité relative sont les paramètres ayant un impact important sur les variations saisonnières de concentration. Ces résultats concernent des concentrations de microorganismes cultivables mesurées dans de l'air atmosphérique. En air intérieur, les concentrations en bactéries et champignons cultivables peuvent varier beaucoup plus à l'échelle de la journée en raison de l'activité anthropique et des systèmes de ventilation (Law et al., 2001).

Ces résultats mettent en évidence une grande variabilité de la concentration des microorganismes cultivables (bactéries et espèces fongiques) lors de la période d'analyse. Ainsi, les facteurs agissant sur la concentration des bactéries et des espèces fongiques cultivables dans l'air sont multiples et variables selon les genres et espèces. L'environnement influe beaucoup sur les concentrations microbiennes. La température et le taux d'humidité agissent également sur la concentration microbienne mais ne peuvent expliquer à eux seuls les variations des concentrations.

## IV. Performance de filtration des filtres vis-à-vis des particules d'alumine et de fluorescéine ainsi que des particules atmosphériques

### IV.1. Performance du filtre vis-à-vis de particules d'alumine

Les évolutions des pertes de charge et de l'efficacité de filtration au cours du colmatage du média fibreux en fibres de verre ont été déterminées pour des particules d'alumine sur un échantillon de filtre plan en fibres de verre, à la vitesse de  $0,2 \text{ m.s}^{-1}$ . La distribution granulométrique de l'aérosol généré (compteur optique à particules PCS 2010 – Palas) est présentée sur la Figure IV- 9 dans la gamme  $0,2 - 9 \mu\text{m}$ . Le diamètre médian en nombre dans cette gamme de diamètre est évalué à  $0,6 \mu\text{m}$ . Le compteur optique à particules PCS 2010 (Palas) permet de distinguer 51 classes granulométriques dont les centres de classe sont compris entre  $0,25$  et  $9,0 \mu\text{m}$ .

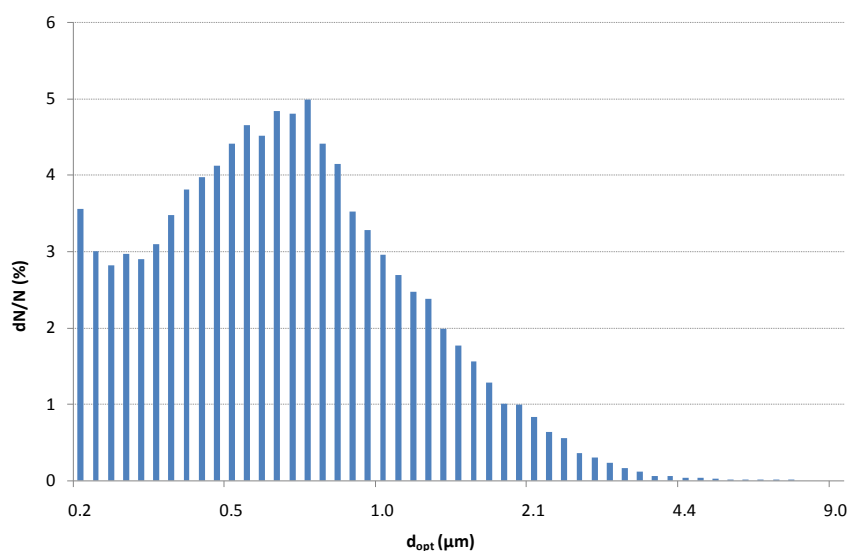


Figure IV- 9. Distribution granulométrique de l'aérosol d'alumine. Compteur optique PCS 2010 (Palas)

La Figure IV- 10 présente l'évolution des performances du média fibreux en fibres de verre au cours du colmatage. Des comptages (compteur optique à particules PCS 2010 - Palas) en amont et en aval du filtre permettent d'évaluer l'efficacité de filtration du média au cours du temps par dénombrement des particules d'alumine. Des capteurs de pression mesurent en continu les pressions en amont et en aval du filtre afin d'en déduire les pertes de charges occasionnées lors du colmatage.



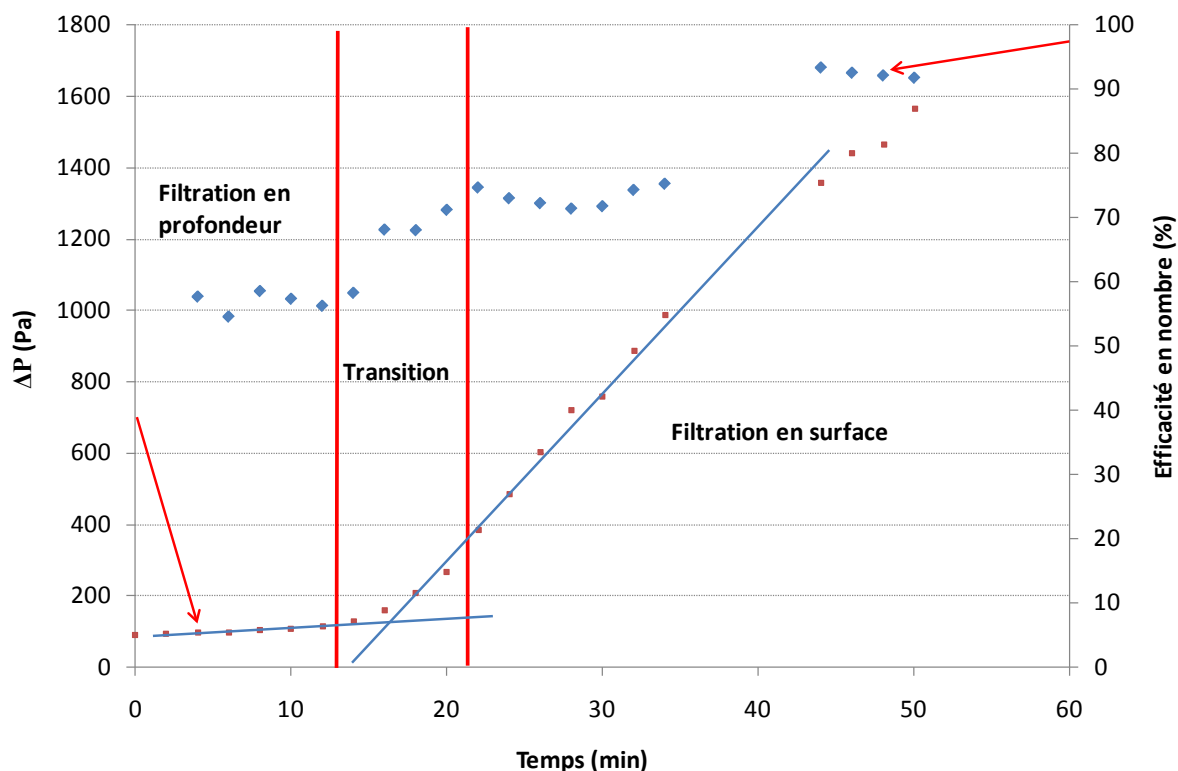


Figure IV- 10. Suivi des performances du filtre en fibres de verre lors du colmatage par des particules d'alumine

Les valeurs d'efficacité et des pertes de charge du filtre au cours du colmatage ne sont pas exprimées en fonction de la masse surfacique de particules déposées sur le filtre car la masse finale du filtre n'a pas pu être accessible. Lors du colmatage, le média fibreux est soumis à différentes étapes de filtration (Figure IV- 10) (Penicot-Bauge, 1998) :

- Lors de la 1<sup>ère</sup> étape de filtration, nommée filtration en profondeur, la perte de charge augmente peu.
- La 2<sup>ème</sup> étape de filtration est une phase de transition lors de laquelle la filtration en profondeur et l'accumulation progressive des particules à la surfaces du filtre coexistent (Bemer et al., 2006).
- Lors de la 3<sup>ème</sup> étape de filtration en surface, le filtre se charge de particules qui colmatent les pores du filtre et forment au fur et à mesure du colmatage un gâteau de particules qui augmente l'efficacité de filtration du filtre. La filtration en surface intervient pleinement lorsque le filtre a accumulé un certain nombre de particules et que le gâteau de particules est suffisamment important pour jouer un rôle de filtre. La perte de charge augmente dans ce cas linéairement au cours du colmatage.

## IV.2. Evolution des pertes de charge au cours du colmatage avec des particules atmosphériques

Des distributions granulométriques en nombre de l'aérosol de particules atmosphériques sont présentées en Figure IV- 11. Les distributions granulométriques en volume sont également présentées en Figure IV- 12, en considérant que les particules sont sphériques. Plusieurs comptages d'une heure ont été réalisés à l'aide du compteur optique à particules PCS 2010 (Palas).

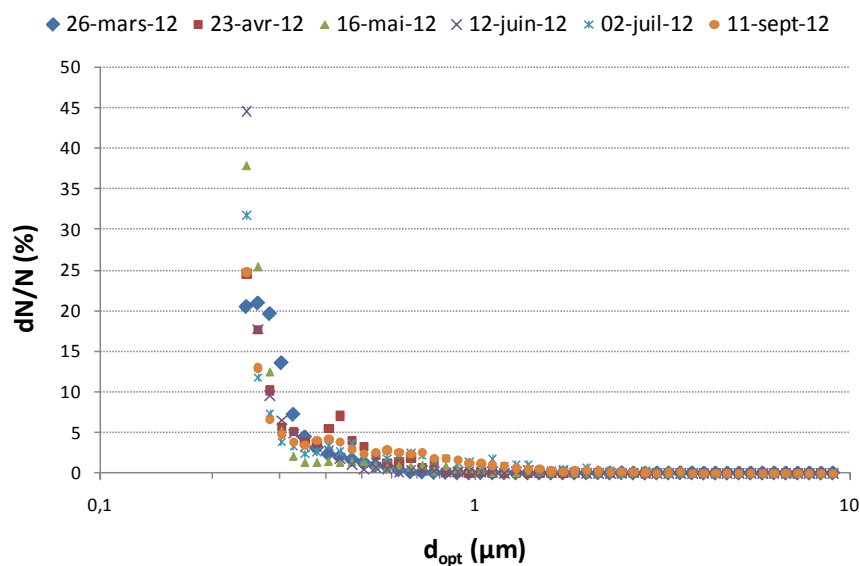


Figure IV- 11. Distribution granulométrique en nombre de l'aérosol atmosphérique échantillonné dans l'UFA<sub>2</sub> (Compteur optique PCS 2010 - Palas)

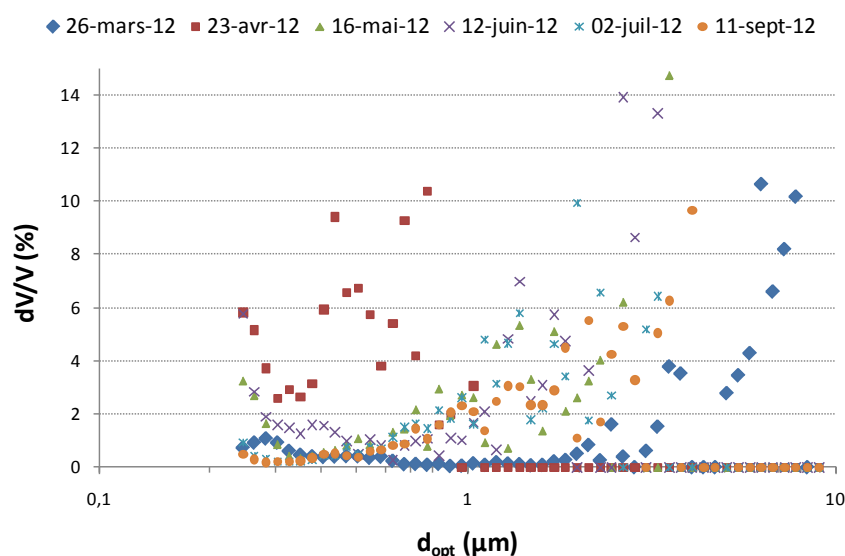


Figure IV- 12. Distribution granulométrique en volume de l'aérosol atmosphérique échantillonné dans l'UFA<sub>2</sub> (Compteur optique PCS 2010 - Palas)

L'échantillonnage de l'aérosol de particules atmosphériques se fait en amont de la filtration dans l'UFA<sub>2</sub>. Avant l'échantillonnage, une grille de protection a pu retenir des éléments grossiers. Il est aussi possible que l'aérosol soit séché entre l'aspiration dans l'UFA<sub>2</sub> et l'échantillonnage, ce qui peut réduire le diamètre de certaines particules et modifier la distribution granulométrique de l'aérosol par rapport à la distribution de l'aérosol de l'air extérieur. Les particules les plus représentées en nombre ont un diamètre d'environ 0,2 – 0,3 µm dans la gamme étudiée comprise entre 0,2 à 9 µm. La distribution granulométrique est plus variable en volume. Les quelques particules de diamètres plus importants pour la gamme de mesure considérée représentent une proportion plus grande que lorsqu'elles sont exprimées en nombre.

La Figure IV- 13 illustre les évolutions des pertes de charge des filtres de l'UFA<sub>1</sub> et de l'UFA<sub>2</sub> en fonction du temps de fonctionnement. L'évolution des pertes de charge est fonction de la durée de l'étude et du temps de filtration réel, c'est-à-dire sans tenir compte des arrêts de la filtration.

Dans le cas du colmatage du média en fibres de verre par des particules atmosphériques, la perte de charge évolue différemment que lorsque le média se charge de particules d'alumine (Figure IV- 10).

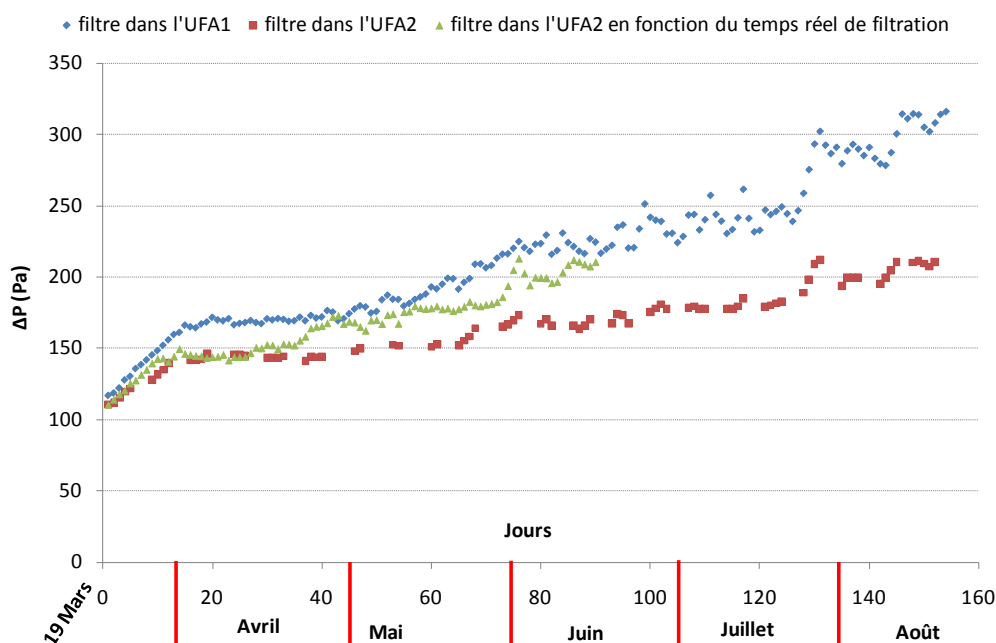


Figure IV- 13. Evolution des pertes de charges des filtres au cours du temps

Une première pente non observée en Figure IV- 10 est visible en Figure IV- 13 pour les deux filtres de chaque UFA jusqu'aux environs du 15 avril. Or, la concentration massique des

particules de l'air entrant dans le dispositif de filtration est un peu plus importante au début de la filtration, jusqu'aux environs du 20 avril, que sur le reste de la période d'étude. La moyenne de la concentration massique des particules sur 24h entre le lancement de l'étude et le 20 avril est de  $15 \mu\text{g.m}^{-3}$  d'air avec plusieurs pointes supérieures à  $20 \mu\text{g.m}^{-3}$ . Il est donc possible que cette augmentation plus importante de la perte de charge au début de l'étude soit en partie le résultat de ces concentrations massiques de particules plus importantes. De plus, quelques moucherons étaient visibles sur les filtres après quelques jours de fonctionnement. Une grille de protection permet d'éviter l'introduction de feuilles, brindilles,... Néanmoins, cette grille présente un maillage grossier pouvant permettre le passage de grosses particules. Compte tenu de ces résultats, l'évolution des pertes de charge en fonction de la masse de particules cumulée en amont du filtre a été déterminée (Figure IV- 14). Elle est calculée en additionnant les masses de particules moyennées sur 24h dans l'air en amont du filtre à partir des concentrations massiques de particules mesurées en amont du filtre de l'UFA<sub>1</sub> par le TEOM.

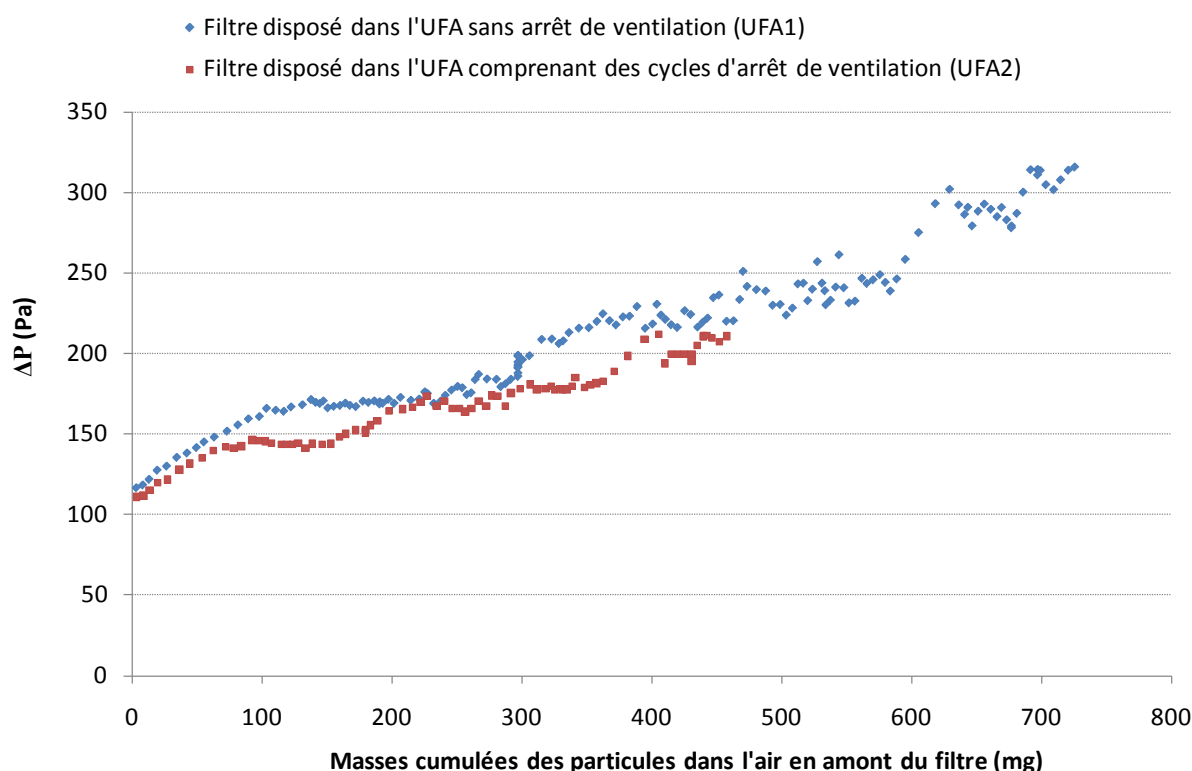


Figure IV- 14. Evolution des pertes de charges des filtres au cours du temps en fonction de la masse de particules cumulées

Cette fois, l'évolution des pertes de charge en fonction de la masse de particules sur le filtre ne présente pas de pente de début de filtration. Les pertes de charge des deux filtres évoluent dès le début de l'étude de façon linéaire par rapport à la masse cumulée sur chaque

filtre. Contrairement à la théorie, aucune phase de filtration en profondeur et de transition ne sont observées ce qui laisse supposer que le filtre se situe dès le début de la filtration dans la phase de filtration en surface. Le colmatage du média fibreux en fibres de verre par des particules d'alumine est différent du colmatage d'un filtre par des particules atmosphériques de tailles, de densités et de formes variables. De plus, l'introduction de particules plus grossières sur les filtres, dès le début de la filtration a probablement accéléré le colmatage du filtre.

### IV.3. Efficacité fractionnelle initiale de filtration vis-à-vis de particules de fluorescéine

L'efficacité fractionnelle initiale de filtration est déterminée à partir de la génération d'une solution de fluorescéine de concentration  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  à un débit de  $4,5 \text{ L.min}^{-1}$ . La génération se fait par voie liquide au niveau de la grille de protection (voir Figure IV- 1) par le nébuliseur médical (§ II.3.2, chapitre 2). Après génération l'aérosol sèche par dilution dans le dispositif d'étude. La Figure IV- 15 présente la distribution granulométrique de l'aérosol de fluorescéine.

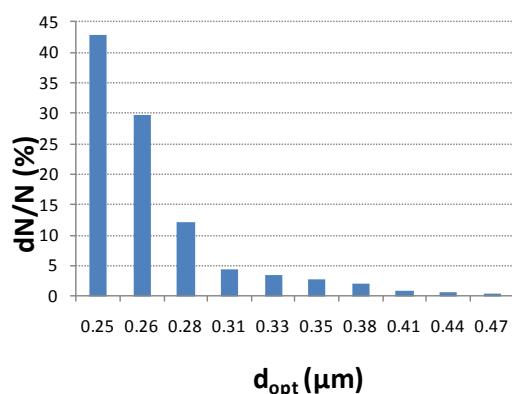


Figure IV- 15. Distribution granulométrique de l'aérosol de fluorescéine (Compteur optique PCS 2010 - Palas).

L'efficacité fractionnelle est déterminée par dénombrements des particules réalisées au compteur optique PCS 2010 (Palas). La Figure IV- 16 illustre les deux efficacités fractionnelles initiales de chacun des deux filtres vis-à-vis des particules de fluorescéine.

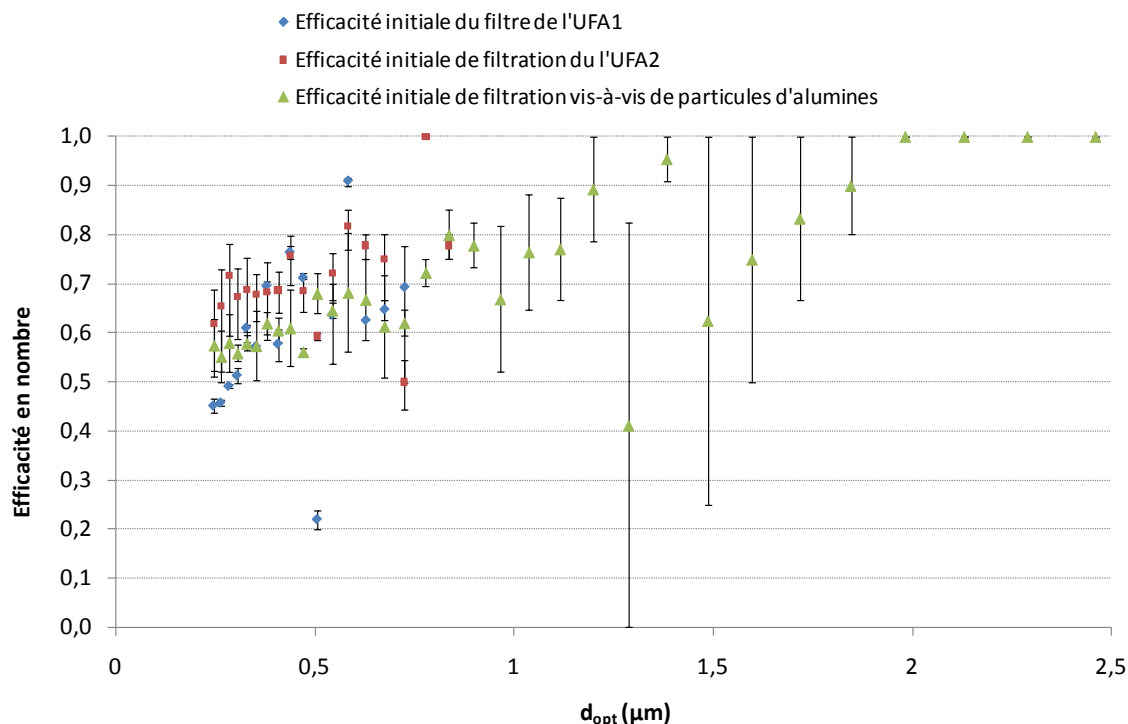


Figure IV- 16. Efficacité initiale de filtration des filtres disposés dans chaque UFA ainsi que d'un échantillon de filtre en fibres de verre vis-à-vis de particules d'alumines

Les efficacités de filtration initiales vis-à-vis des particules de fluorescéine sont respectivement pour le filtre de l'UFA<sub>1</sub> et le filtre de l'UFA<sub>2</sub>, de 58% ( $\pm 5\%$ ) et 69% ( $\pm 6\%$ ) à une vitesse de filtration de  $0,2 \text{ m.s}^{-1}$ . L'efficacité initiale de filtration vis-à-vis de particules d'alumines dont le diamètre médian est évalué à  $0,6 \mu m$  est également indiquée sur la Figure IV- 16 et correspond pour des particules de diamètre  $0,4 \mu m$  à une valeur de  $61\% \pm 3\%$ .

La norme EN 779 prévoit une efficacité de collecte des particules au diamètre de  $0,4 \mu m$ , comprise entre 80% et 90% (Aérosol de DEHS-Di-éthyl-héxyl sébaçate centré à  $0,4 \mu m$ ) au débit d'air nominal pour des filtres de type F7. Les efficacités initiales des deux filtres déterminées expérimentalement vis-à-vis des particules de fluorescéine et d'alumine, indiquent des résultats d'efficacité des filtres pour les particules dont le diamètre est évalué à  $0,4 \mu m$ , inférieurs à ceux indiqués par la norme. Néanmoins, les conditions de détermination de l'efficacité initiale ne sont pas les mêmes en termes de vitesse de filtration. Pour ce filtre, la vitesse de filtration utilisée selon la norme EN 779 est de  $5,3 \text{ cm.s}^{-1}$  tandis que dans le dispositif de filtration, elle est de  $20 \text{ cm.s}^{-1}$ . Or, selon Thomas (2001) cité dans Joubert (2009), lorsque la vitesse de filtration augmente, l'efficacité des mécanismes de collecte évolue. En effet, pour des particules de  $0,4 \mu m$ , les mécanismes de collecte par interception et diffusion sont prédominants. Et bien que le mécanisme d'interception soit peu influencé par la vitesse

de filtration, Thomas (2001) montre que l'efficacité de filtration par le mécanisme de diffusion diminue lorsque la vitesse de filtration augmente.

Les valeurs des efficacités de filtration des filtres en fibres de verre vis-à-vis des particules de fluorescéine et d'alumine sont du même ordre pour des particules dont le diamètre est compris entre 0,25 et 0,8  $\mu\text{m}$ , gamme des diamètres de particules de fluorescéine, et au même débit de filtration. L'objectif de comparer les efficacités de filtration pour les deux aérosols est notamment de valider l'installation des dispositifs UFA<sub>1</sub> et UFA<sub>2</sub> en termes d'étanchéité.

## V. Filtration des particules biologiques et comportement microbien en aval des filtres

Les Figure IV- 17, Figure IV- 18 et Figure IV- 19 présentent respectivement les concentrations moyennes en microorganismes cultivables totaux, en bactéries cultivables et en espèces fongiques cultivables en amont et en aval de chacun des deux filtres des deux UFA. La concentration maximale et minimale est également indiquée pour chaque concentration moyenne.

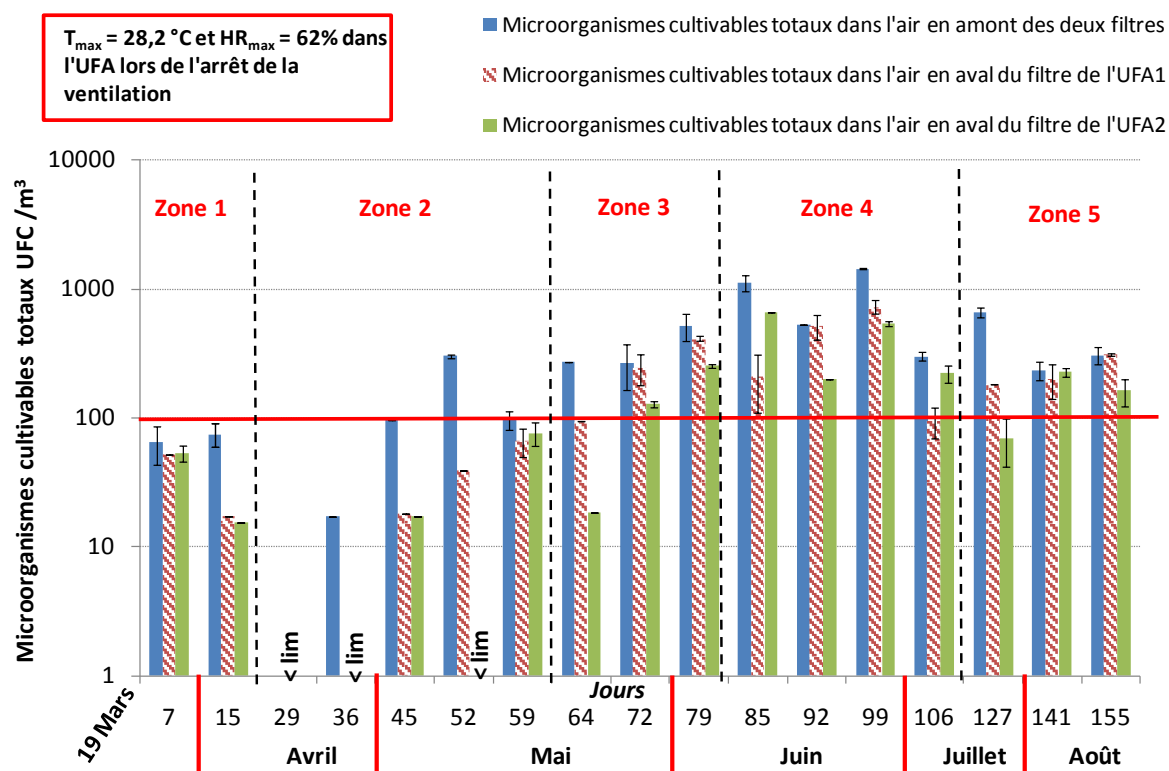


Figure IV- 17. Concentrations en microorganismes cultivables totaux en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps



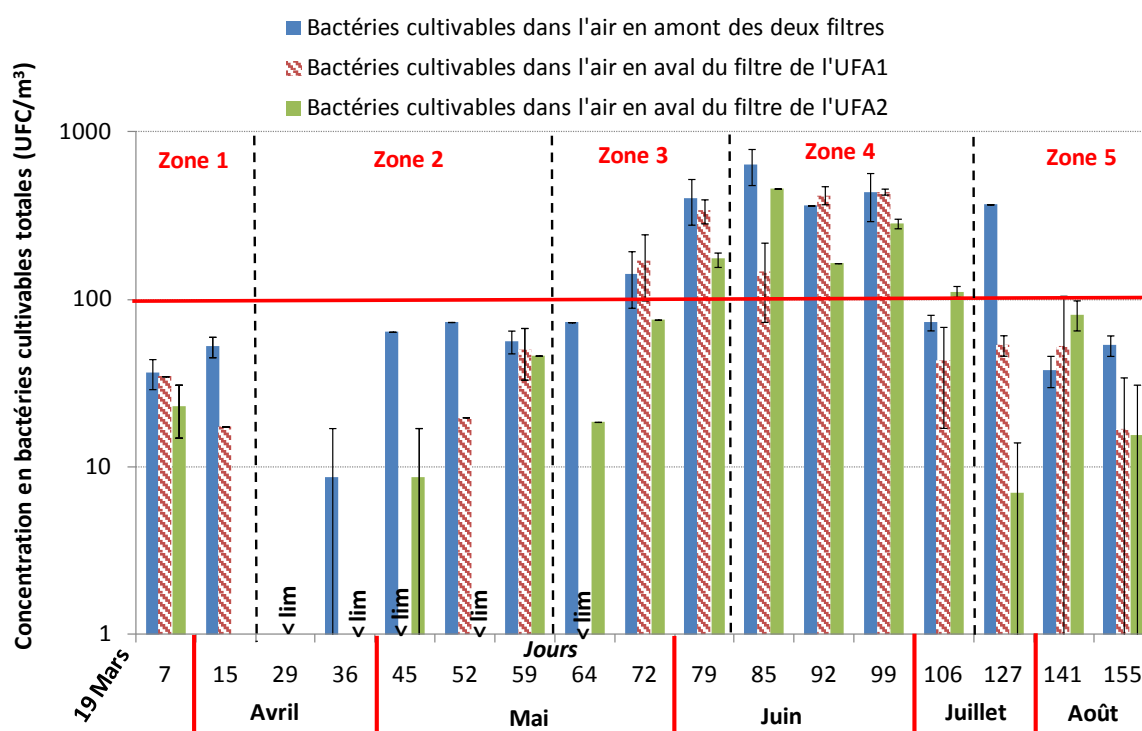


Figure IV- 18. Concentrations en bactéries cultivables en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps

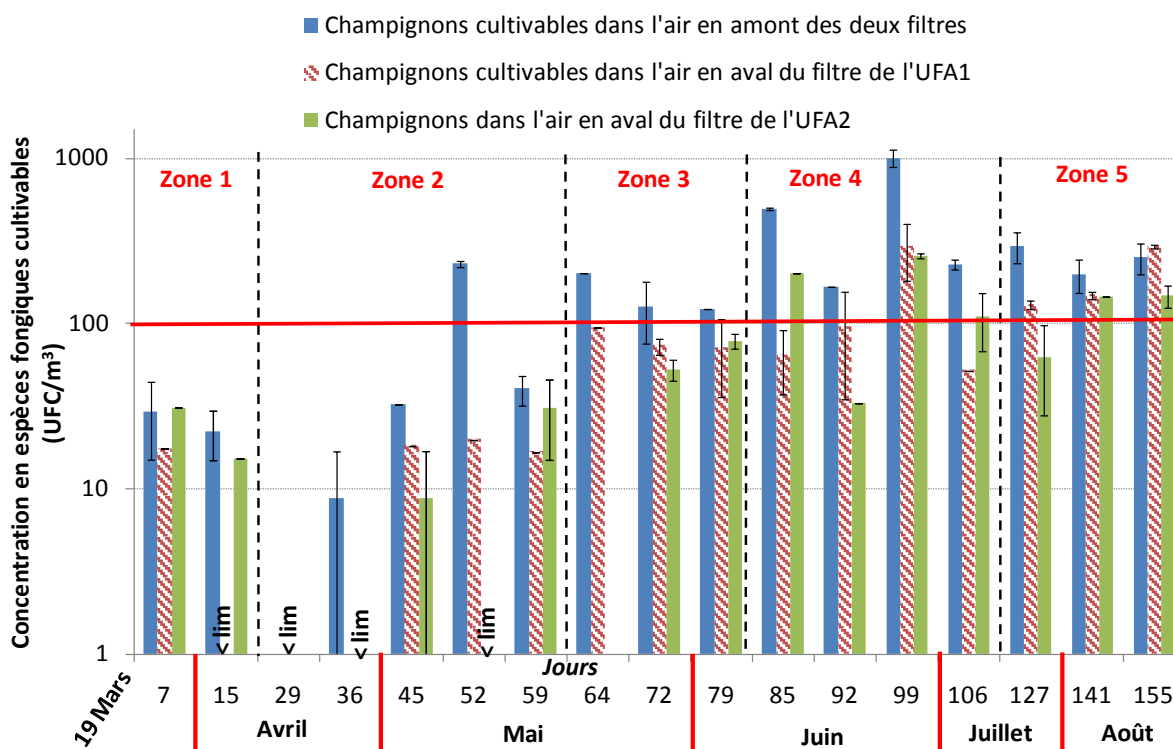


Figure IV- 19. Concentrations en espèces fongiques cultivables en amont et en aval de chaque filtre au cours du temps

Jusqu'au 44<sup>ème</sup> jour de l'étude, après la mise en fonctionnement des UFA, les concentrations en microorganismes totaux, bactéries et espèces fongiques cultivables mesurées ponctuellement chaque semaine sont toutes inférieures à 100 UFC.m<sup>-3</sup>. Les concentrations inférieures à 100 UFC.m<sup>-3</sup>, calculées à partir de l'équation précisée au § II.2.2, sont obtenues à partir d'un nombre de colonies formées sur une boîte de pétri inférieur à 10. Ces valeurs sont donc faibles et considérées comme peu significatives. A partir du mois de mai, la concentration en microorganismes cultivables dans l'air extérieur entrant dans le dispositif augmente significativement, d'un facteur 10. Ces résultats sont commentés au § III.2 de ce chapitre.

### V.1. Présentation des résultats

Les efficacités de collecte des deux filtres ont été déterminées selon l'équation suivante à partir des concentrations indiquées en Figure IV- 17, Figure IV- 18, Figure IV- 19 :

$$E_{UFC} (\%) = \left( \frac{(C_{t,b,ch})_{amont} - (C_{t,b,ch})_{aval}}{(C_{t,b,ch})_{amont}} \right) \times 100 \quad (IV.2)$$

Les Figure IV- 20 et Figure IV- 21 présentent les efficacités moyennes de filtration vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des espèces fongiques cultivables. Elles sont obtenues à partir des concentrations en microorganismes cultivables mesurées chaque semaine selon le protocole décrit au § II.2.2. La valeur minimale et maximale est également précisée pour chaque valeur moyenne. Seules les efficacités obtenues à partir des concentrations significatives en amont des filtres (> 100 UFC.m<sup>-3</sup>) sont indiquées sur chaque graphique.

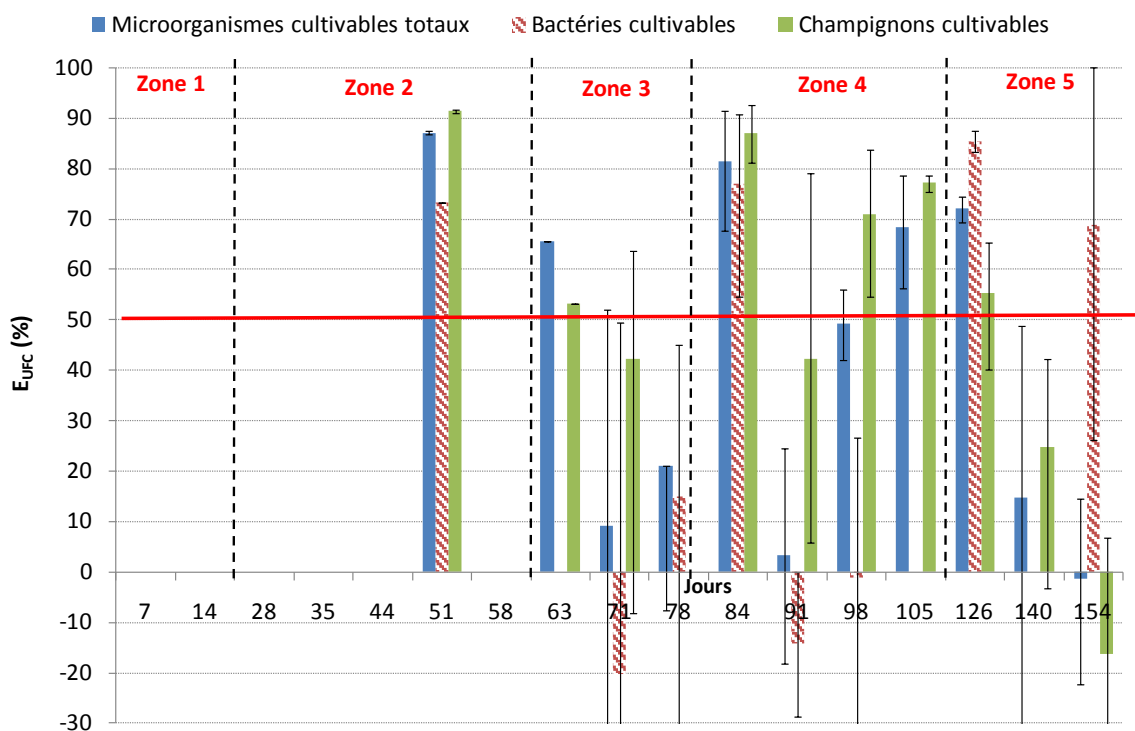


Figure IV- 20. Efficacité de filtration du filtre de l'UFA<sub>1</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables totaux

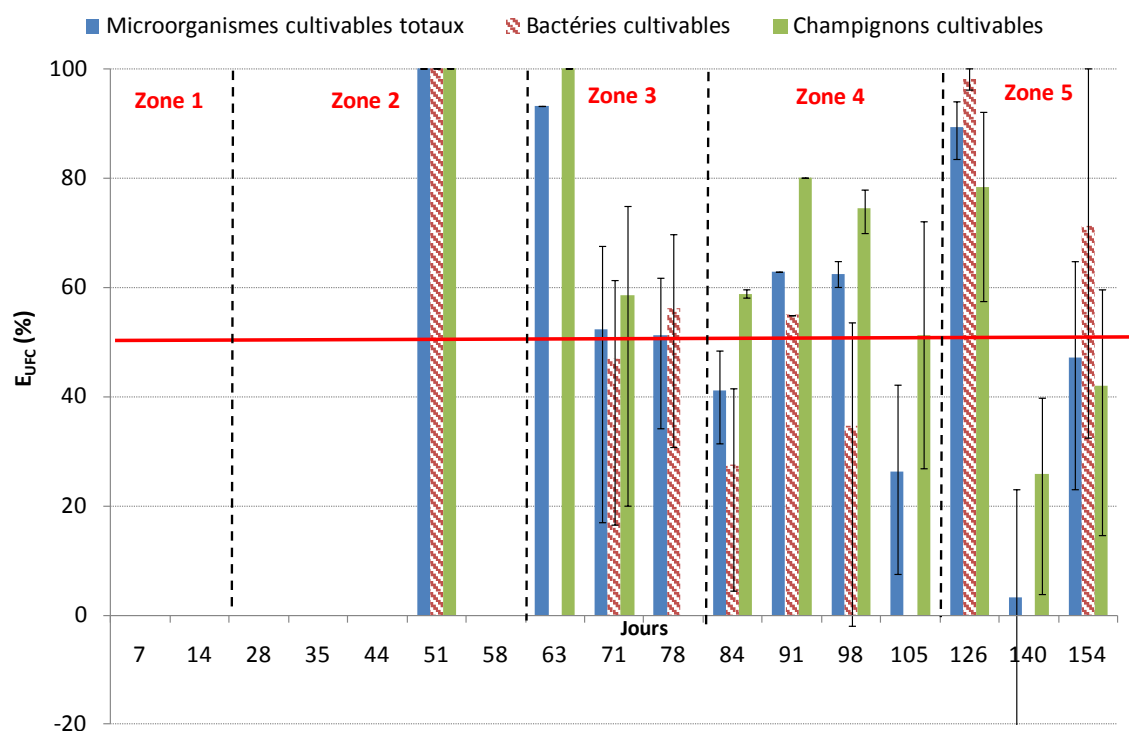


Figure IV- 21. Efficacité de filtration du filtre de l'UFA<sub>2</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables totaux

Afin de compléter les résultats globaux présentés en Figure IV- 20 et Figure IV- 21, le Tableau IV- 4 récapitule la fréquence des efficacités de filtration de chaque filtre vis-à-vis des particules microbiennes cultivables.

**Tableau IV- 4. Fréquences des efficacités de filtration des filtres de l'UFA<sub>1</sub> et de l'UFA<sub>2</sub> vis-à-vis des microorganismes totaux, des bactéries et des champignons cultivables**

	Fréquence des efficacités de filtration du filtre de UFA <sub>1</sub>			Fréquence des efficacités de filtration du filtre de UFA <sub>2</sub>		
	Microorganismes cultivables totaux	Bactéries cultivables	Champignons cultivables	Microorganismes cultivables totaux	Bactéries cultivables	Champignons cultivables
<b>Nombre de valeurs d'efficacités</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
Efficacités < 0%	9%	37,5%	10%	-	-	-
Efficacités comprise entre 0% et 50%	45,5%	12,5%	30%	36%	38%	20%
Efficacités > 50%	45,5%	50%	60%	63%	63%	80%

Deux observations principales peuvent être faites. Tout d'abord, aucune efficacité moyenne du filtre de l'UFA<sub>2</sub> n'est inférieure à 0%, ce qui signifie que le filtre remplit sa fonction de réduire la concentration de particules dans l'air traité. L'efficacité de rétention des espèces fongiques cultivables des deux filtres sont également meilleures que l'efficacité de rétention des espèces bactériennes cultivables.

## V.2. Comparaison des résultats d'efficacité de l'UFA<sub>1</sub> et de l'UFA<sub>2</sub>

Les Figure IV- 20 et Figure IV- 21 ainsi que le Tableau IV- 4 mettent en évidence que les efficacités de filtration vis-à vis des particules microbiennes cultivables sont globalement meilleures pour le filtre de l'UFA<sub>2</sub> que le filtre de l'UFA<sub>1</sub>. Les moyennes des efficacités de filtration des spores cultivables sont respectivement de 53% et 67% pour le filtre de l'UFA<sub>1</sub> et de l'UFA<sub>2</sub> tandis que les efficacités moyennes de rétention des bactéries cultivables sont respectivement de 35% et 61% pour le filtre disposé dans l'UFA<sub>1</sub> et pour le filtre disposé dans l'UFA<sub>2</sub>.

Le dispositif expérimental de filtration est installé dans une pièce. Une vanne se ferme à chaque arrêt de la ventilation, ce qui isole le filtre de l'UFA<sub>2</sub> et le maintien à la température et au taux d'humidité de la pièce dans laquelle se trouve le dispositif général de filtration. Le filtre de l'UFA<sub>1</sub> est quant à lui constamment relié à l'air extérieur et suit les fluctuations du taux d'humidité et de la température de l'air extérieur. Les mesures dans l'UFA<sub>2</sub> sont

effectuées chaque lundi, lors du redémarrage de la ventilation de l'UFA<sub>2</sub>, le filtre de cette unité est donc maintenu à la température et au taux d'humidité relative de la pièce dans laquelle se trouve le dispositif de filtration, en moyenne pendant 60h avant la mesure de la concentration en particules microbiennes cultivables. Alors que le taux maximal d'HR dans l'UFA<sub>2</sub> est de 62%, celui de l'UFA<sub>1</sub> atteint 78%. Il est alors possible que les fluctuations du taux d'humidité et de la température puissent favoriser un développement microbien au niveau du filtre de l'UFA<sub>1</sub>.

Möriz et al. (2001) ont analysé les concentrations en bactéries et champignons cultivables en amont et en aval de deux filtres de deux CTA (F7 et F6) sur une période de 15 mois. Pour cela, ils ont échantillonné l'air en amont et en aval de chaque filtre simultanément en laissant 15 jours d'intervalle entre chaque mesure. Dans leur étude, ils obtiennent pour les deux systèmes de CTA étudiés, des efficacités de rétention des particules microbiennes cultivables des filtres respectivement de 92% et 87%, exprimées à partir des concentrations en UFC, en moyenne pour les champignons cultivables pour chaque CTA. Ce qui correspond à des efficacités moyennes meilleures que celles obtenues dans le cadre de l'étude présentée ici. Ils mesurent également des efficacités moyennes de rétention des bactéries cultivables de 28% et 71%. Selon Möriz et al. (2001), dans le cas où l'efficacité moyenne est de 28%, 50% des valeurs obtenues sont des efficacités négatives, c'est-à-dire avec une concentration plus importante en aval des filtres. Parmi ces 50% de valeurs négatives, 25% présentent des augmentations de la concentration en aval des filtres de l'ordre de 80% à 550%. Dans le cadre de cette présente étude, 37,5% des valeurs d'efficacité bactérienne du filtre de l'UFA<sub>1</sub> sont négatives tandis qu'aucune valeur négative d'efficacité bactérienne du filtre de l'UFA<sub>2</sub> n'est mesurée. Möriz et al. (2001) observent que sur les deux CTA qu'ils ont étudiées, seul le filtre de la CTA qui est directement en contact avec l'air extérieur, présente des efficacités biologiques négatives vis-à-vis des bactéries cultivables. Ils supposent que les bactéries arrivent à se développer sur le filtre, contrairement aux spores de champignons du fait que les bactéries prolifèrent uniquement à partir de division cellulaire tandis que les champignons doivent passer par différentes phases de croissance plus complexes et plus longues.

Il est aussi possible que le gâteau de particules accumulé sur le filtre de l'UFA<sub>1</sub>, vraisemblablement plus important que sur l'UFA<sub>2</sub> compte tenu des pertes de charge, puisse retenir plus facilement l'humidité et favoriser le déplacement des bactéries ou leur croissance

sur le filtre. Le gâteau de particules peut également permettre aux bactéries de se protéger de la dessiccation. Au mois de juin la perte de charge du filtre de l'UFA<sub>1</sub> est comprise entre 220 Pa et 240 Pa tandis que celle du filtre de l'UFA<sub>2</sub> est comprise entre 170 et 180 Pa. C'est au mois de mai - juin, dans les zones 3 et 4, que des efficacités bactériennes négatives du filtre de l'UFA<sub>1</sub> sont mesurées.

### **V.3. Comparaison entre le comportement des particules bactériennes atmosphériques collectées par le filtre en fibres de verre et celui de *S. epidermidis* collectés dans des conditions contrôlées en laboratoire**

Les résultats obtenus avec les particules microbiennes atmosphériques peuvent être comparés à ceux obtenus dans des conditions de laboratoire et analysés au chapitre 3.

Dans le cadre de l'étude menée en laboratoire, aucune croissance de *S. epidermidis* collectées sur des filtres F7 (fibres synthétiques et fibres de verre) n'est observée que ce soit à 60%, 80% ou 100% HR. Une hypothèse pouvant expliquer les faibles valeurs ou les valeurs négatives d'efficacité de filtration mesurées dans l'UFA<sub>1</sub>, serait de supposer qu'un développement bactérien sur le filtre puisse en être la cause.

Les microorganismes présents dans l'air sont des microorganismes capables de résister à un stress important. Selon les espèces bactériennes filtrées, les comportements peuvent différer : certaines parviendront à se développer tandis que d'autres non. Dans l'étude de Noris et al. (2011), l'air et les poussières présentes sur le mobilier d'une résidence ont été analysés sur une période de six mois. Les échantillons sont obtenus par collecte des microorganismes sur un filtre HEPA et par des prélèvements au BioSampler. La qualification des espèces échantillonnées est réalisée par PCR. Ils constatent alors que 96% des genres de bactéries sont des protéobactéries, des actinobactéries et des firmicutes. Les actinobactéries et les firmicutes proviendraient principalement de la présence humaine (Noris et al., 2011 ; Rintala et al., 2008). Les protéobactéries sont supposées présenter une plus grande résistance à l'air. Tringe et al. (2008) observent d'ailleurs que les protéobactéries détiennent de plus grandes résistances à l'oxydation et à la dessiccation. La plupart des protéobactéries possèdent également un flagelle qui leur offre de plus grandes capacités à se déplacer en présence d'un film d'eau. Ce qui leur facilite également l'accessibilité aux nutriments sur un filtre. *S. epidermidis* ne possède pas de flagelle, il est aussi possible que sa mobilité soit réduite. Cela peut être un élément d'explication à son incapacité à se développer sur un filtre en présence limitée de nutriments (chapitre 3) et à un taux d'humidité relative élevé. Il est alors envisageable que les espèces présentes sur les filtres des deux UFA soient plus aptes à se

développer qu'une espèce comme *S. epidermidis* s'il s'avère que les faibles efficacités de filtration ou les efficacités négatives de filtration vis-à-vis des bactéries, soient en relation avec un développement bactérien sur les filtres.

#### **V.4. Influence de la température et du taux d'humidité sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres des deux UFA**

Il est possible que le taux d'humidité puisse favoriser des concentrations bactériennes plus importantes en aval du filtre de l'UFA<sub>1</sub>. D'après les résultats présentés sur la Figure IV-18, les concentrations bactériennes les plus élevées sont situées entre la fin du mois de mai et le mois de juin, dans les zones 3 et 4. Les concentrations bactériennes sont toutes supérieures à 100 UFC.m<sup>-3</sup>. Les efficacités moyennes de rétention des filtres vis-à-vis des bactéries cultivables sur cette période sont respectivement pour l'UFA<sub>1</sub> et l'UFA<sub>2</sub>, de 11% et 44%. Lors de cette période, aucune efficacité négative n'est mesurée pour le filtre de l'UFA<sub>2</sub>, tandis que le filtre disposé dans l'UFA<sub>1</sub> comprend 3 efficacités négatives sur 5 mesures entre le 29 mai et le 25 juin. Le taux d'humidité moyen est de 62% et correspond à la période présentant les taux d'humidité les plus élevés. C'est aussi dans la zone 4 comprise entre le 6 juin et le 30 juillet que le taux d'humidité moyen de 61,8% est le plus important (tableau IV.3). L'humidité relative maximale mesurée entre le début des opérations et le 20 août est de 80%. Dans ce cas, la concentration des espèces fongiques dans l'air entrant dans le dispositif de filtration est nettement augmentée et atteint une concentration de 1005 UFC.m<sup>-3</sup> pour une moyenne de 260 UFC.m<sup>-3</sup> entre le mois de mai et le mois de septembre. L'efficacité de rétention des spores fongiques est alors respectivement pour l'UFA<sub>1</sub> et l'UFA<sub>2</sub>, de 71% et de 74% tandis que l'efficacité de retenue des bactéries est respectivement de -1% et de 35%. Le taux d'humidité relative de l'air contenu dans l'UFA<sub>1</sub> est de 80% HR lors de ce pic d'humidité et la veille il s'élève à 72,5% HR. Le filtre disposé dans l'UFA<sub>2</sub> est placé dans un environnement dont le taux d'humidité est de 52,4% la veille du pic et de 67% le jour du pic, et jusqu'au redémarrage de la ventilation, moment d'échantillonnage de l'air en vue de réaliser les mesures des concentrations microbiennes. Il est possible que ce jour, le taux d'humidité fortement plus élevé dans l'UFA<sub>1</sub> ait eu un impact sur l'efficacité biologique de rétention des bactéries cultivables. Néanmoins, le taux d'humidité ne peut être le seul élément pouvant favoriser une concentration plus importante en aval du filtre. En effet, les deux autres efficacités négatives de filtration vis-à-vis des bactéries cultivables sont obtenues pour les conditions de température et d'humidité relatives suivantes :

- Le 29 mai : 48% HR pour une température de 24°C

- Le 18 juin : 59% HR pour une température de 19°C

Möritz et al. (2001) constatent que leurs résultats mettent en valeur des relations significatives entre le taux d'humidité relative et la filtration des bactéries cultivables, mais aucune relation significative avec la filtration des espèces fongiques. Plus précisément, les concentrations en bactéries cultivables plus importantes en aval des filtres qu'en amont sont selon eux liées à une humidité relative élevée (trois jours d'air > 80% HR) qui provoquerait une prolifération des bactéries sur le filtre, non observée lorsque le taux d'humidité est inférieur à 80% HR. De faibles températures (< 12°C) auraient également une corrélation significative avec des efficacités négatives du filtre étudié vis-à-vis des bactéries cultivables. Dans cette présente étude, lors des prélèvements de l'air pour l'analyse des concentrations microbiennes, les températures journalières sont restées comprises entre 13,2°C et 26,5°C dans l'UFA<sub>1</sub> et entre 15,4°C et 28,1°C dans l'UFA<sub>2</sub>, et aucune corrélation entre température et efficacité négative n'est observée.

De plus, dans le cadre de la présente étude, les concentrations en espèces fongiques augmentent à partir du 9 mai (Figure IV- 19) et jusqu'à la fin du mois d'août elles varient en moyenne autour de 220 UFC.m<sup>-3</sup>, excepté lors de la mesure du 25 juin lorsque le taux d'HR atteint 80% et que la concentration moyenne en champignons cultivables est alors de 1005 UFC.m<sup>-3</sup>. Les efficacités moyennes des filtres de l'UFA<sub>1</sub> et de l'UFA<sub>2</sub> sur la période d'étude sont respectivement de 53% et 67%. Les résultats ne laissent percevoir aucune influence significative de l'humidité relative sur le comportement des espèces fongiques lors de la filtration.

Il est néanmoins possible qu'un développement fongique sur le filtre puisse être limité par la présence de certaines espèces bactériennes produisant des antifongiques. D'ailleurs, des bactéries *Streptomyces sp.* sont retrouvées régulièrement dans les échantillons en amont et en aval des filtres des UFA (voir § IV.7). Ce genre de bactéries est connu pour sa production d'antibiotiques et d'antifongiques.

Trois observations peuvent être tirées des résultats précédents et développées au § V.2, V.3, V.4 :

- Les efficacités de filtration vis-à-vis des particules microbiennes cultivables sont plus élevées pour le filtre contenu dans l'UFA<sub>2</sub>, unité dont la ventilation est arrêtée chaque week-end, que celui contenu dans l'UFA<sub>1</sub>. Il est possible que la configuration de l'UFA<sub>1</sub> constamment sujette aux variations de température,



d'humidité relative et aux particules atmosphériques favorise un développement microbien sur le filtre.

- Les efficacités vis-à-vis des espèces fongiques cultivables sont meilleures que les efficacités des filtres vis-à-vis des bactéries cultivables, que ce soit pour le filtre de l'UFA<sub>1</sub> ou de l'UFA<sub>2</sub>.
- Des efficacités négatives (37,5%) du filtre de l'UFA<sub>1</sub> vis-à-vis des bactéries cultivables sont mesurées.

### V.5. Influence du diamètre des particules microbiennes sur l'efficacité de filtration

L'étude de l'efficacité de filtration des deux filtres vis-à-vis des particules microbiennes cultivables permet avant tout de constater que les filtres ont des efficacités très variables au cours du temps et en particulier vis-à-vis des bactéries cultivables. Des efficacités négatives sont également observées, mais les concentrations moyennes en bactéries cultivables en aval du filtre de l'UFA<sub>1</sub> ne sont pas significativement plus élevées que celles en amont (Figure IV-18). Néanmoins, cela indique que les filtres, pourtant de type F7, démontrent de trop faibles performances épuratoires vis-à-vis des bactéries cultivables.

Une hypothèse pour tenter d'expliquer les faibles efficacités des filtres vis-à-vis des particules microbiennes implique de s'intéresser aux diamètres des microorganismes. Le diamètre moyen des bactéries est compris entre 0,25 µm et 8 µm (Thompson, 1981). Le minimum d'efficacité du filtre en fibres de verre testé dans le cadre de cette étude est évalué théoriquement autour de 0,2 – 0,3 µm (se référer au chapitre 3, § II.2.3). Les bactéries sont concernées par ces tailles. De même, les spores fongiques ont des tailles qui varient entre 0,5 et 30 µm (Yamamoto et al., 2011 ; Hinds, 1999). Ces tailles considèrent également les amas de spores. Les tailles des spores fongiques dans l'air sont plus importantes et cela peut expliquer que les efficacités des filtres vis-à-vis des espèces fongiques soient globalement meilleures que vis-à-vis des bactéries. D'ailleurs, l'étude décrite dans le chapitre 3 de cette thèse, a permis d'évaluer l'efficacité biologique moyenne du même média en fibres de verre vis-à-vis de *S. epidermidis* et de *P. oxalicum*. Le diamètre moyen de *S. epidermidis* est évalué à 0,8 µm et l'efficacité du filtre vis-à-vis de cette espèce bactérienne, de 80%, ± 2,4%. L'efficacité vis-à-vis des spores de *P. oxalicum* au diamètre compris entre 2 et 4 µm (résultats obtenus au MEB) est proche de 100%. La filtration est alors moins efficace vis-à-vis des bactéries, particules plus petites.

En plus de la taille comme élément pouvant limiter l'efficacité de filtration du filtre, les microorganismes diffèrent des particules inertes de part leur densité, la présence de capsules hydrophobes, la présence éventuelle de flagelles, leurs formes variables... Ces facteurs ont un impact sur l'efficacité de filtration d'un filtre (Kowalski et al., 1999). De plus, en situation de stress les bactéries peuvent avoir un diamètre moyen réduit, leurs membranes pouvant s'amincir afin d'évoluer vers une morphologie leur offrant plus de résistance face aux éléments extérieurs.

#### **V.6. Influence du transport des particules microbiennes sur l'efficacité de filtration**

Une autre hypothèse pouvant également expliquer les faibles efficacités de filtration vis à vis de bactéries ou de champignons cultivables est la suivante :

Les bactéries, tout comme les spores fongiques, sont souvent transportées dans l'air sous forme d'amas (Lighthart et al., 1994) ou peuvent être contenues dans des gouttes d'eau. Chaque amas, bien qu'il contienne un certain nombre de bactéries ou de spores de champignons, peut ne former qu'une unique colonie sur un milieu nutritif. Lors de la filtration, l'amas peut être fractionné et libérer plus de bactéries cultivables ou de spores cultivables qui formeront des colonies sur milieu nutritif (Mörizt et al., 2001). L'efficacité de filtration vis-à-vis des particules microbiennes est alors sous-estimée.

#### **V.7. Espèces bactériennes et fongiques analysées**

Dans le cas de la présente étude, plusieurs colonies, apparemment similaires, apparaissent régulièrement sur les milieux de culture lors des 5 mois d'essai. L'identification de ces espèces récurrentes par séquençage de l'ADN par PCR a permis de les qualifier. Les espèces/genres bactérien(ne)s identifiées à partir de la base de données AB\_Bacterial 500 lib MICROSEQ version 2.2, sont les suivantes :

- *Staphylococcus epidermidis* : l'espèce bactérienne est présentée au § II.3.1.1 du chapitre 2. Le diamètre des bactéries est évalué à 0,8  $\mu\text{m}$  (Park et al., 2011).
- *Streptomyces sp.* : les *Streptomyces* font partie des *Actinomycètes*. Selon Byeon et al. (2008), les *Streptomyces sp.* sont des bactéries Gram positif et ont des diamètres aérodynamiques compris entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$ . Les *Actinomycètes*, dont *Streptomyces*, sont des bactéries filamenteuses capables de sporuler et ayant la particularité de se développer sous forme mycélienne, ce qui est un comportement unique chez les

procaryotes. Les *Streptomyces* sont des bactéries d'intérêt majeur car elles produisent des antibiotiques en grande quantité (Leclerc et al., 1999).

- *Micrococcus luteus* : c'est une bactérie Gram positif, sous forme de coque, non mobile et qui ne sporule pas. Elles sont généralement retrouvées en groupe de 4 bactéries. Le diamètre d'une cellule isolée est compris entre 0,9 et 1,8  $\mu\text{m}$  (Wake et al., 1997).

Les espèces fongiques identifiées à partir de la base de données AB\_FungalLib MICROSEQ version 2011 sont les suivantes :

- *Cladosporium cladosporioides* ou *Cladosporium herbarum* ou *Cladosporium oxysporum* ou *Mycosphaerella aronici* : le genre *Cladosporium* comprend plus de 40 espèces. *Cladosporium spp.* est un genre de champignon faisant partie des plus répertoriés dans l'air. *Cladosporium*, *Penicilium*, *Alternaria* et *Aspergillus* sont systématiquement détectés en grande proportion dans les échantillons atmosphériques rapportés dans la littérature (Cooley et al., 1998 ; Fang et al., 2005 ; El-Morsy, 2006). Selon Jung et al. (2010), le diamètre des spores de *Cladosporium* se situe autour de  $3,35 \pm 1,55 \mu\text{m}$ .
- *Acremonium strictum* qui fait partie des deutéromycètes.
- *Aspergillus versicolor* : *Aspergillus spp.* sont fréquemment retrouvés dans l'air et les sols. Le diamètre des spores d'*Aspergillus versicolor* est compris entre 1,8 et 3,5  $\mu\text{m}$  (Jung et al., 2010).

## **VI. Conclusion**

L'analyse microbienne de l'air semi-urbain à l'entrée du dispositif, met en évidence une corrélation entre la température et l'augmentation de la concentration des microorganismes totaux cultivables dans l'air. La période d'étude s'est déroulée entre le mois de mars et la fin du mois d'août. C'est à partir de la fin du mois de mai que les concentrations en microorganismes cultivables totaux deviennent significatives (plus de 100 UFC.m<sup>-3</sup>). L'analyse microbienne de l'air semi-urbain filtré semble également indiquer une relation entre de forts taux d'humidité relative dans l'air et des concentrations en espèces fongiques plus élevées, mais sans modification apparente de l'efficacité des filtres vis-à-vis des spores fongiques. Néanmoins, les évolutions des concentrations des bactéries et des champignons cultivables ne peuvent être uniquement reliées aux évolutions de la température et de l'humidité relative. En effet, d'autres paramètres interviennent : la vitesse du vent, l'éventuelle activité anthropique autour du lieu d'échantillonnage, l'activité végétale saisonnière,...

Il est intéressant de constater que l'arrêt de la ventilation lors des week-ends n'induit pas d'augmentation significative de la concentration des microorganismes en aval du média fibreux. Néanmoins, il est possible que l'isolement du filtre dans son unité de filtration lors des arrêts de la ventilation ait une incidence sur le comportement des microorganismes collectés ainsi que sur la filtration. En effet, le filtre est alors maintenu à la température et au taux d'humidité relative de la pièce dans laquelle se trouve le dispositif de filtration. Le taux d'humidité relative est alors souvent moins important dans la pièce que dans l'air extérieur qui maintient donc le filtre à un taux d'humidité moins important. Il s'avère que les performances vis-à-vis des bactéries sont moins bonnes pour le filtre de l'UFA<sub>1</sub> qui fonctionne en continu que celui de l'UFA<sub>2</sub>. En revanche les performances des deux filtres vis-à-vis des spores fongiques sont globalement les mêmes. Aucune hypothèse concernant l'influence de la température lors de la filtration, sur le comportement des microorganismes n'a pu être émise à partir des résultats obtenus.

En conclusion, ces résultats démontrent une faible efficacité des filtres F7 en fibres de verre vis-à-vis des bactéries. Néanmoins, les résultats sont variables et il est difficile d'établir les raisons exactes de ce manque d'efficacité. Est-ce lié à la taille des microorganismes ? A un

développement bactérien sur les filtres ? Quels sont réellement les impacts de la température, l'humidité relative et le gâteau de particules sur les microorganismes collectés ?

Afin de pouvoir améliorer les efficacités de filtration vis-à-vis des particules biologiques, il est nécessaire de pouvoir répondre à ces questions.



## Conclusions générales et perspectives





L'objectif de cette thèse a été d'apporter des éléments de réponse quant au comportement des microorganismes lors de leur capture sur les filtres de CTA implantées dans les réseaux de ventilation d'immeubles de bureaux.

Les CTA sont conçues pour délivrer de l'air filtré à l'intérieur des bâtiments en assurant le confort des occupants (température, humidité) et en réduisant la concentration des particules de l'air. Les aérosols microbiens sont retrouvés dans diverses composantes d'une CTA tels que les filtres et les conduites de soufflage. Entre l'entrée de l'air dans une CTA et son soufflage dans une pièce d'un bâtiment après traitement, un développement microbien peut survenir et dégrader la qualité de l'air. L'étape de la filtration est cruciale lors du processus de traitement afin de protéger les organes de la CTA de l'encrassement, mais également de réduire la concentration de particules dans l'air traité. Il est à noter que certains pays proposent des recommandations. Par exemple, l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) suggère de ne pas dépasser 1000 UFC.m<sup>-3</sup> en particules microbiennes cultivables dans l'air intérieur. Il est également précisé que cela comprend une valeur maximale de 500 UFC.m<sup>-3</sup> de bactéries cultivables (Kalogerakis et al., 2005). Des valeurs d'exposition limites aux cellules fongiques et aux actinomycètes sont adoptées en Russie à savoir 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> cellules par m<sup>-3</sup> dans des lieux de travail (Eduard et al., 2012).

Il ressort de l'étude bibliographique que des développements microbiens sur des médias fibreux ont été régulièrement observés. Cela peut induire une dégradation de la qualité de l'air qui peut occasionner des gênes auprès des occupants. Or, une prolifération microbienne dépend de plusieurs paramètres : des espèces microbiennes filtrées, du matériau filtrant, de l'encrassement du filtre, du taux d'humidité et de la température auxquels est exposé le filtre.

Cette thèse comporte deux parties expérimentales :

- ✓ Une étude réalisée en conditions contrôlées qui a permis d'observer le comportement d'un consortium microbien selon la nature du média fibreux, le taux d'humidité, l'absence ou la présence d'un flux d'air après contamination ainsi que le relargage microbien.
- ✓ Une étude de la filtration d'un aérosol atmosphérique semi-urbain afin observer le comportement des microorganismes dans un cas réel et selon différentes configurations de fonctionnement des unités de traitement d'air (avec ou sans arrêt de ventilation).

Quels que soient les paramètres étudiés au laboratoire, *Staphylococcus epidermidis* ne présente pas de croissance sur les média fibreux mais au contraire une perte de viabilité. L'hypothèse principale avancée est la non bio accessibilité d'une quantité suffisante en substrat pour permettre une survie cellulaire.

Pour une même température, et lorsque des nutriments sont présents sur les médias fibreux, le taux d'humidité relative est le paramètre limitant de la croissance de *Penicillium oxalicum*. La nature du média peut alors favoriser ou non un développement fongique selon la capacité de rétention en eau du filtre. En effet, le média en fibres synthétiques a montré qu'il était beaucoup plus hydrophobe que celui en fibres de verre.

Le relargage des spores fongiques en aval des filtres après 168h de croissance dans une atmosphère contrôlée (100% HR et 25°C) a été mesuré lors de la reprise d'un flux d'air. Une quantité plus importante de spores (1 log en moyenne) est mesurée en aval du filtre en fibres de verre par rapport à celui en fibres synthétiques.

De plus, il a été constaté qu'après contamination des filtres par le consortium microbien et le maintien d'un flux d'air sans aérosol pendant 8h, la croissance de l'espèce fongique est moins importante que lorsque le filtre est directement récupéré et placé à 25°C et 100 % HR.

Dans le cas de l'étude du comportement d'aérosols microbiens provenant d'un air semi-urbain réel, le suivi de deux unités de filtration a été réalisé pendant 5 mois. Une des unités (UFA<sub>1</sub>) a fonctionné en continu sans arrêt de la ventilation. L'autre, UFA<sub>2</sub>, a fonctionné avec un arrêt hebdomadaire de la ventilation, lors de week-ends. Ainsi, il a été possible d'observer l'influence d'un arrêt prolongé de la ventilation sur la filtration des microorganismes par un filtre en fibres de verre.

Il a été constaté une variation saisonnière de la concentration des microorganismes cultivables dans l'air entrant dans le dispositif de filtration et provenant de l'extérieur des bâtiments. En effet, à partir du mois de mai, lorsque les températures journalières moyennes de l'air ont été supérieures à 15°C, la concentration en microorganismes cultivables a été relativement plus importante (> 100 UFC/m<sup>3</sup>). De plus, lors d'épisodes pour lesquels l'humidité relative a été proche ou supérieur à 75 %, la concentration en spores fongiques a significativement augmenté. Il n'a pas été montré d'effet des arrêts de ventilation sur la qualité de l'air en aval des filtres. Néanmoins, l'efficacité de rétention des bactéries cultivables a globalement été moins bonne dans l'UFA<sub>1</sub> fonctionnant en continu que dans l'UFA<sub>2</sub>.

Les deux échelles étudiées permettent de proposer les recommandations suivantes :

- ✓ Un filtre hydrophobe pourrait ralentir le développement fongique,
- ✓ L'épaisseur des filtres en fibres synthétiques pourrait permettre de diminuer le relargage des spores fongiques,
- ✓ Le maintien d'une HR proche de 50 % dans le réseau de traitement d'air pourrait limiter le développement microbien.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat mettent en évidence l'influence de la capacité de rétention en eau du filtre sur le développement microbien. Dans ce cadre, il serait intéressant d'étudier l'effet du colmatage sur la survie et la prolifération microbienne. En effet, il est possible que le gâteau de particules atmosphériques puisse favoriser la rétention d'eau et ainsi permettre le développement de microorganismes. Dans ce cas, la nature du matériau fibreux n'aurait pas ou peu d'influence sur la croissance microbienne. Il serait par exemple envisageable d'analyser le comportement des microorganismes collectés sur le filtre en fibres synthétiques lorsqu'il est légèrement colmaté par des particules hydrophiles.

L'exposition des microorganismes collectés sur un filtre à un flux d'air prolongé a démontré qu'il est possible que la croissance fongique soit alors moins prononcée que lorsque les microorganismes ne sont pas soumis à un flux d'air après leur capture sur un filtre. Il serait intéressant d'accentuer les tendances comportementales observées en maintenant un flux d'air propre pour des durées supérieures à 8h. Il pourrait aussi être envisagé d'observer le comportement des microorganismes lorsqu'un flux d'air leur est imposé à différents niveaux de colmatage du filtre.

Pour compléter l'étude de la filtration d'un aérosol semi-urbain, il serait aussi intéressant d'étudier l'évolution des concentrations microbiennes et des efficacités des filtres vis-à-vis des microorganismes lors de la période hivernale. Il faudrait également pouvoir optimiser l'échantillonnage afin d'échantillonner sur des durées supérieures à une heure.

Une hypothèse expliquant que les efficacités de filtration des deux unités puissent être faibles consiste à supposer que les diamètres de certaines particules bactériennes présentent des tailles proches du minimum d'efficacité de filtration MPPS du filtre. Afin d'apporter des éléments de réponses quant à cette hypothèse, il pourrait être envisagé de disposer un filtre F7 dans une des deux unités, ainsi qu'un filtre de haute efficacité présentant une valeur similaire de MPPS, et alors de comparer l'efficacité de filtration des deux filtres recevant de l'air à la même vitesse de filtration.

Enfin, il pourrait être intéressant de compléter l'analyse du relargage microbien par l'analyse des sous-produits bactériens et en particulier des endotoxines. En effet, les endotoxines sont des sous-produits pouvant être nocifs. Certains pays se servent des endotoxines pour établir des préconisations quant à l'exposition de personnes à des composés biologiques dans des espaces intérieurs. Des sous-produits microbiens sont soupçonnés d'être des éléments favorisant des SBS. Par exemple, aux Pays-Bas, la valeur limite d'exposition recommandée est fixée par rapport au taux d'endotoxines dans l'air intérieur à 90 unité d'endotoxines par m<sup>3</sup> d'air (Eduard et al., 2012).

# Bibliographie

---

- Abee T., Wouters J.A. (1999).** Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 65–91.
- Ackermann H., Schmidt B. et Lenk V. (1969).** Mycological studies of the outdoor and indoor air in Berlin. *Mykosen*. 12, 309-320.
- AFNOR NF EN 779 (norme) (1993).** Filtres à air de ventilation générale pour l'élimination des particules – Exigences, essais, marquage.
- AFNOR NF EN 779 (norme) (2012).** Filtres à air de ventilation générale pour l'élimination des particules - Détermination des performances de filtration.
- AFNOR NF EN 1822-1 (norme) (1998).** Filtres à air à très haute efficacité et filtres à air à très faible pénétration (HEPA et ULPA) – Partie 1 : classification, essais de performance et marquage.
- AFSSET (2009).** Proposition de Valeurs Guides de Qualité d'Air Intérieur. Rapport d'expertise collective.
- Agranovski I.E. (2010).** *Aerosols – Science and Technology*. Wiley\_VCH. ISBN: 978-3-527-32660-0.
- Ahearn D.G., Crow S.A., Simmons R.B., Price D.L., Noble J.A., Mishra S.K., Pierson D.L. (1996).** Fungal colonization of fiberglass insulation in the air distribution system of a multi-story office building: VOC production and possible relationship to a sick building syndrome. *Journal of Industrial Microbiology*. 16, 280-285.
- Ahearn D., Crow S. A., Simmons R. B., Price D. L., Mishra S. K., and Pierson D. L. (1997).** Fungal colonization of air filters and insulation in a multi-story office building: Production of volatile organics. *Current Microbiology*. 35, 305–308.
- Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H., (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews*. 59, 143–169.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). (1989).** Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment. Cincinnati, Ohio: ACGIH.
- American Conference of Governmental and Industrial Hygienists (ACGIH). (1999).** Bioaerosols: assessment and control. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati.

- Amato P. (2006).** Les communautés microbiennes de l'eau des nuages: implication dans la chimie atmosphérique. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal.
- Andersen A.A. (1958).** New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology*. 76, 471-484.
- Andreasen A.A, Stier T.J.B. (1953).** Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 41,:23-26.
- Andreeva I.S., Belan B.D., Borodulin A.I., Buryak G.A., Zhukov V.A., Panchenko M.V., Penenko V.V., Petrishchenko V.A., Safato A.S. (2001).** Variability of the content of live microorganisms in the atmospheric aerosol in southern regions of western Siberia. *Doklady Biological Sciences*. 381, 530-534.
- Angenent L., Kelley S., Amand A.S., Pace N.R., Hernandez M. (2005).** Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Science*. 102, 4860–4865.
- AFSSET (2009).** Proposition de Valeurs Guides de Qualité d'Air Intérieur. Rapport d'expertise collective.
- ANSI/ASHRAE 52.1 (norme) (1992).** Gravimetric and dust-spot procedures for testing air-cleaning devices used in general ventilation for removing particulate matter.
- ANSI/ASHRAE 52.2 (norme) (1999).** Method of testing general ventilation air-cleaning devices for removal efficiency by particle-size.
- Arnou P.M., Sadigh M., Costas C., Weil D. et Chudy R. (1991).** Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. *Journal of Infectious Diseases*. 164 (5), 998-1002.
- Arrêté du 22 juillet 2004** relatif au mode de gestion du risque lié au radon dans les lieux ouverts au public
- Arrêté du 15 septembre 2009** relatif à l'entretien annuel des chaudières dont la poussière nominale est comprise entre 4 et 400 kW
- Article R1334-18** du code de la santé publique
- Axelsson B.-O., Saraf A., and Larsson L. (1995).** Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 666:77–84.
- Bailly A., Clerc-Renaud M., Rutman E et Ternant C. (2001a).** Traitement de l'air et climatisation, généralités. *Techniques de l'ingénieur – Traité Génie énergétique – BE970 – 1.*
- Bailly A., Clerc-Renaud M., Rutman E et Ternant C. (2001b).** Traitement de l'air et climatisation, aspects thermiques et mécaniques. *Techniques de l'ingénieur – Traité Génie énergétique – BE971 – 2.*

- Ball W.J., Atkinson D.E. (1975).** Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. *Journal of Bacteriology*. 121, 975–982.
- Balty I., David C., Duquenne P., Le Bâcle C. (2006).** Prévention des risques professionnels – Risques biologiques. *Techniques de l'ingénieur*. SE3840.
- Baur X., Behr J., Dewair M., Ehret et al. (1988).** Humidifier lung and humidifier fever. *Lung*. 166, 113-124.
- Bekö G., Clausen G., Weschler C.J. (2008).** Is the use of particle air filtration justified? Costs and benefits of filtration with regard to health effects, building cleaning and occupant productivity. *Building and Environment*. 43, 1647–1657
- Bémer D., Muller J.P. (1997).** Comparaison des efficacités de captage mesurées par traçages gazeux et particulaire. *Cahiers de notes documentaires – Hygiène et sécurité du travail*. N°169, 4<sup>ème</sup> trimestre.
- Bémer D., Régnier R., Callé S., Thomas D., Simon X., Appert-Collin J.C. (2006).** Filtration des aérosols – Performances des médias filtrants. INRS. *Hygiène et sécurité du travail*. *Cahiers de notes documentaires – ND 2241 – 202 – 06*.
- Bemer D., Chazelet S., Masson A., Subra I., Cadavid-Rodriguez M.C. (2012).** Electrical charges of aerosols – Influence on filtration. 11th World Filtration Congress. Graz – Austria.
- Blanchard D.C. et Syzdek L. (1982).** Water-to-air transfert and enrichment of bacteria in drops from bursting bubbles. *Applied and Environmental Microbiology*. 43 (5), 1001-1005.
- Bloom E., Bal K., Nyman E., Must A., Larsson L. (2007).** Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 4211–4217.
- Bluyssen P.M., Seppänen O., De Oliveira Fernandes E., Clausen G., Müller B., Molina J.L., Roulet C.A. (2001).** AIRLESS: a European project to optimise air quality and energy consumption of HVAC-systems. *CLIMA 2000*. September 2001. Naples, Italy.
- Bluyssen P.M., Cox C., Seppänen O., Oliveira Fernandes E., Clausen G., Müller B. et Roulet C.A. (2003).** Why, when and how do HVAC-systems pollute the indoor environment and what to do about it? The European AIRLESS project. *Building and Environment*. 38 (2), 209-225.
- Bonnevie Perrier J.C. (2008).** Etude du comportement des aérosols microbiens dans les filtres des réseaux de ventilation du bâtiment. Thèse de doctorat de l'université de Nantes.

- Bonnevie Perrier J.C., Le Coq L., Andres Y., Le Cloirec P. (2008).** Microbial Growth onto Filter Media Used in Air Treatment Devices. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 6, A9.
- Boreson J., Dillner A.M., Peccia J. (2004).** Correlation bioaerosol load with PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>cf concentrations: a comparison between natural desert and urban fringe aerosols. *Atmospheric Environment*. 38, 6029–6041.
- Bougnoux M.E., Espinasse F. (2003).** Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue Française des Laboratoires*. 351.
- Bovallius Å., Bucht B., Roffey R., Ånäs P. (1978).** Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*. 35(5), 847-852.
- Brasel T. L., Douglas D.R., Wilson S.C., Straus D.C. (2005).** Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 114–122.
- Brousseau L., Chen S.K., Vesley D., Vincent J.H. (1994).** System design and test method for measuring respirator filter efficiency using *Mycobacterium* aerosols. *Journal of Aerosol Science*. 25, 1567 - 1577.
- Brown R.C. (1993).** Air filtration: an integrated approach to the theory and applications of fibrous filters. Pergamon Press, Oxford, Royaume-Uni.
- Buckley R.L., Loyalka S.K. (1989).** Cunningham correction factor and accommodation coefficient. *Journal of Aerosol Science*. 20(3), 347.
- Bünger J., Antlauf-Lammers M., Schulz T.G., Westphal G.A., Müller M.M., Ruhnau P., Hallier E. (2000).** Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occupational and Environmental Medicine* 57 (7), 458–464.
- Burchard (1889).** Dissertation, Rostock, from *Chem. Zbl.* 1, 25.
- Burge P.S., Finnegan M., Horsfield N., Emery D., Austwick P., Davies P.S., Pickering C.A.C. (1985).** Occupational asthma in a factory with a contaminated humidifier. *Thorax*. 40, 248-254.
- Burge H. (1990).** Bioaerosols: Prevalence and health effects in the indoor environment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 86, 687–701.
- Bush R., Portnoy J. M. (2001).** The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 107, S430–S440.



- Buttner M.P., Willeke K., Grinshpun S.A. (1997).** Sampling and analysis of airborne microorganisms. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington DC. 629–640.
- Byeon J.H., Park C.W., Yoon K.Y., Park J.H., Hwang J. (2008).** Size distributions of total airborne particles and bioaerosols in a municipal composting facility. *Bioresource Technology* 99, 5150–5154.
- Calderon C., Ward E., Freeman J., McCartney H.A. (2002).** Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal of Aerosol Science*. 33, 283–296.
- Carman P.C. (1961).** L'écoulement des gaz à travers les milieux poreux – Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires. Presses universitaires de France, Paris, France.
- Cecchini C., Verdenelli M.C., Orpianesi C., Dadea G.M., Cresci A. (2004).** Effects of antimicrobial treatment on fiberglass-acrylic filters. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2), 371–377
- Chang J.C.S., Foarde K.K., VanOsdell D.W. (1996).** Assessment of fungal (*Penicillium chrysogenum*) growth on three HVAC duct materials. *Environment International*. 22 (4), 425-431.
- Chao H. J., Milton D. K., Schwartz J., Burge H. A. (2002).** Dustborne fungi in large office buildings. *Mycopathologia*. 154, 93–106.
- Charcosset J.Y., Chauvet E. (2001).** Effect of Culture Conditions on Ergosterol as an Indicator of Biomass in the Aquatic Hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2051- 2055.
- Chazelet S., Bemer D., Gripari F. (2011).** Effect of the test aerosol charge on the penetration through electret filter. *Separation and Purification Technology*. 79, 352– 356.
- Chen S.-K., Vesley D., Brosseau L.M., Vincent J.H. (1994).** Evaluation of single-use masks and respirators for protection of health care workers against mycobacterial aerosols. *American Journal of Infection Control*. 22 (2), 65–74.
- Chow P., Chan W., et Vrijmoed L. (2005).** An investigation on the occurrence of fungi and bacteria in the MVAC system in an office premise. *Indoor air*. 1096-1100.
- Chun D.T., Chew V., Bartlett K., Gordon T., Jacobs R.R., Larsson B.M., Larsson L., Lewis D.M., Liesivuori J., Michel O., Milton D.K., Rylander R., Thorne P.S., White E.M., Brown M.E. (2000).** Preliminary report on the results of the second phase of a round-robin endotoxin assay study using cotton dust. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 15, 152–7.

**Clausen G. (2004).** Ventilation filters and indoor air quality : a review of research from the international centre for indoor environment and energy. *Indoor Air*. 14, 202-207.

**Code du travail. R.4222-1 à R.4222-26 – R.4412-149 à R.4412-151 – R.4722-1, R.4722-2 – R.4722-13, R.4722-14**

**Comité Européen de Normalisation (CEN). (1993).** Workplace Atmospheres. Size Fractions Definition Procedures for Measurement of Airborne Particles (EN481). Brussels, Belgium. CEN.

**Comiti J., Sabiri N.E. et Montillet A. (2000).** Experimental characterization of flow regimes in various porous media – III: limit of Darcy's or creeping flow regime for Newtonian purely viscous non Newtonian fluids. *Chemical Engineering Science*. 55, 3057 – 3061.

**Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A. et Straus D.C. (1998).** Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*. 55(9), 579-584.

**Cowan D. A., Russell N.J., Mamais A., Sheppard D. M. (2002).** Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass. *Extremophiles*. 6, 431–436.

**Cowan D. A., Casanueva A. (2007).** Stability of ATP in Antarctic mineral soils. *Polar Biology*. 30, 1599–1603.

**Cox CS, Wathes CM. (1995).** Bioaerosols in the environment. In *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers; Edited by CS Cox and CM Wathes. 11-14.

**Cox C.S. (1987).** The aerobiological pathway of microorganisms. Wiley, UK.

**Creager J.G., Black J.G., Davison V.E., (1990).** *Microbiology. Principles and Applications*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

**Crook B., Burton N. (2010).** Indoor moulds, Sick Building Syndrome and building related health. *Fungal Biology reviews*. 24, 106 – 113.

**Davies C.N. (1973).** Air filtration. Academic Press Inc., ISBN 0-12-205660-4.

**Deacon J. (2006).** *Fungal biology – Fourth edition*. ISBN: 978-1-4051-3066-0.

**De Baudouin C. (2006).** Qualité de l'air intérieur dans les bâtiments de bureaux : spécificités de la problématique et propositions d'études à mener (Tome 1). Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique.

**Debono O. (2011).** Oxydation photocatalytique de composés organiques volatils et suivi de leurs intermédiaires réactionnels : étude en réacteur statique et dynamique à des concentrations typiques de l'air intérieur. Thèse de doctorat de l'École des Mines de Nantes soutenue le 15 décembre 2011.

**Décret n° 94-352 du 4 mai 1994** relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques et modifiant le code du travail (deuxième partie : décrets en Conseil d'État). Journal officiel. 6620- 6623.

**Décret n°2011-1728 du 2 décembre 2011** relatif à la surveillance de la qualité de l'air intérieur dans certains établissements recevant du public.

**Degaetano A.T., Doherty O.M. (2004).** Temporal, spatial and meteorological variations in hourly PM<sub>2.5</sub> concentration extremes in New York City. Atmospheric Environment. 38, 1547–1558.

**Dharan S, Pittet D. (2002).** Environmental controls in operating theatres. Journal of Hospital Infection. 51, 79-84.

**Di Giorgio C., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tiret C., Dumenil G. (1996).** Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. Atmospheric Environment, 30, (1), 155-160.

**Dockery D. W., Pope C. A., Xu X., Spengler J. D., Ware J. H., Fay M. E., Ferris B. G., Speizer F. E. (1993).** An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. New England Journal of Medicine. 329, 1753–1759.

**Douwes J, Heederik D. (1997).** Epidemiologic investigations of endotoxins. International Journal of Occupational and Environmental Health. 3(suppl), S26–31.

**Douwes J., Thorne P., Pearce N., & Heederik D. (2003).** Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects. Annals of Occupational Hygiene. 47(3), 187-200.

**Douwes J .(2005).** (1→3)-beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. Indoor Air. 15, 160–169.

**Dullien F.A.L. (1989).** Industrial gas cleaning. Academic Press, Londres, Royaume-Uni.

**Duquenne P., Greff-mirguet G. (2005).** L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. Cahiers de Notes Documentaires. INRS. 198 (23), 1-6.

**Eduard W., Heederik D. (1998).** Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. American Industrial Hygiene Association Journal. 58(2), 113-127.

**Eduard W .(2006).** Fungal spores. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risk from Chemicals. Arbete och Hals. 21, 1–145.

**Eduard W., Heederik D., Duchaine C., Green B.J. (2012).** Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. Journal of Environmental Monitoring. 14, 334.

- El-Morsy E.S.M. (2006).** Preliminary survey of indoor and outdoor airborne microfungi at coastal buildings in Egypt. *Aerobiologia*. 22 (3), 197-210.
- Elixmann J.H., Jorde W., Linskens H.F. (1987).** Filters of an airconditioning installation as disseminators of fungal spores. In: Boehm, G. (Ed.), *Advances in Aerobiology*. Birkha Kuser Verlag, Switzerland. 283-286.
- Fajardo-Cavazos P., Schuerger A.C., Nicholson W.L. (2008).** Persistence of biomarker ATP and ATP-generating capability in bacterial cells and spores contaminating spacecraft materials under earth conditions in a simulated martian environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(16), 5159-5167.
- Fang Z.G., Ouyang Z.Y., Hu L.F., Wang X.K., Zheng H. et Lin X.Q. (2005).** Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China. *Science of the Total Environment*. 350 (1-3), 47-58.
- Fannin K.F., Vana S.C., Jakubowski W., (1985).** Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses. *Applied and Environmental Microbiology*. 49, 1191-1196.
- Ferro A.R., Kopperud R.J., Hildemann L.M. (2004a).** Elevated personal exposure to particulate matter from human activities in a residence. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 14, S34 – S40.
- Ferro A.R., Kopperud R.J., Hildemann L.M. (2004b).** Source strengths for indoor human activities that resuspend particulate matter. *Environmental Science and Technology*. 38, 1759 – 1764.
- Finnish Society of Indoor Air Quality and Climate. (2001).** Classification of indoor climate 2000. Espoo, Finnish Society of Indoor Air Quality and Climate (Publication 5 E).
- Fisk W.J., Faulkner D., Palonen J., Seppanen O. (2002).** Performance and costs of particle air filtration technologies. *Indoor Air*. 12, 223–234.
- Foarde K., VanOsdel D., Chang J.A. (1996).** Evaluation of fungal growth on fiberglass duct materials for various moisture, soil, use, and temperature conditions. *Indoor Air*. 6 (2), 83-92.
- Foarde K., VanOsdel D., Menetrez M.Y., Chang J. C. S. (1999).** Investigating the influence of relative humidity, air velocity, and amplification on the emission rates of fungal spore. 507–512. In **Raw G., Aizlewood C., Warren P. (ed.)**. *Proceedings of Indoor Air 99 Conference*, (1). CRC Ltd., London, United Kingdom.
- Fromme H., Diemer J., Dietrich S., Cyrus J. et al. (2008).** Chemical and morphological properties of particulate matter (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>) in school classrooms and outdoor air. *Atmospheric Environment*. 42(27): 6597-6605.

- Garrett M., Rayment P. R., Hooper M. A., Abramson M. J., and Hooper B. M. (1998).** Indoor airborne fungal spores, house dampness, and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clinical and Experimental Allergy*. 28, 459–467.
- Gilbert Y., Duchaine C. (2009).** Bioaerosol in industrial environments : a review. NRC Research Press (2009). *Canadian Journal of Civil Engineering*. 36, 1873–1886.
- Gillespie V.L., Clark C.S., Bjornson H.S., Samuels S.J., Holland J.W. (1981).** A comparison of two-stage and six-stage Andersen impactors for viable aerosols. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 42, 858–864.
- Ginestet A., Mann S., Parat S., Laplanche S., Salazar JH., Pugnet D., Ehrler S., Perdrix A. (1996).** Bioaerosol filtration efficiency of clean HVAC filters and shedding of micro-organisms from filters loaded with outdoor air. *Journal of Aerosol Science*. 27(suppl 1), 5619 – 5620.
- Gocheva Y.G., Krumova E.T., Slokoska L., Miteva J.G., Vassilev S.V., Angelova M.B. (2006).** Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. *Mycological research*. 110, 1347 – 1354
- Gorny R. L., Reponen T., Grinshpun S. A., Willeke K. (2001).** Source strength of fungal spore aerosolization from moldy building material. *Atmospheric Environment*. 35, 4853–4862.
- Gorny R. L., Reponen, T., Willeke, K., Schmechel D., Robine, E., Boissier, M., Grinshpun S. A., (2002).** Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (7), 3522-3531.
- Goyer N., Lavoie J., Lazure L., Marchand G. (2001).** Les bioaérosols en milieu du travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. Programme soutien analytique. IRSST T-23.
- Green B.J., Schmechel D., Summerbell R.C. (2011).** Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living. Ed. O Adnan and R.A. Samson, Wageningen academic publishers, Amsterdam. 211 – 245.
- Gregory P.H. (1973).** The microbiology of the atmosphere. Plymouth: Leonard Hill Books. 39–72.
- Griffiths W.D., De Cosemo G.A.L. (1994).** The assessment of bioaerosols: a critical review. *Journal of Aerosol Science*. 25, 1425–1458.
- Grinshpun S.A., Chang C.W., Nevalainen A., Willeke K. (1994).** Inlet characteristics of bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science*. 25, 1503–1522.
- Gustavsson J. (2000).** Can we trust air filters? – *Filtration & Separation* – 37 (2) : 16-22.
- Gustavsson J. (2006).** Trends in air filtration. *ASHRAE journal* 2005 – 2006.

- Gustavsson J., Ginestet A., Tronville P., Hyttinen M. (2010).** Air filtration in HVAC systems. REHVA guidebook. ISBN 978-2-930521-01-5.
- Hagege R. (1993).** Fibres à usages techniques, Fibres, fils et tissus textiles. Techniques de l'ingénieur – Traité Plastiques et composites – A3980.
- Hamada N., Fujita T. (2002).** Effect of air-conditioner on fungal contamination. *Atmospheric Environment*. 36(35), 5443-5448.
- Harrison R. M. (2004).** Key pollutants - airborne particules. *Science of the Total Environment*. 334-335, 3-8.
- Hawksworth D. L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 95, 641–655.
- Heinman S., Beguin H., Nolard N. (1994).** Biocontamination in air-conditioning. In: Samson, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C., Hoekstra, E. (Eds.), *Health Implications of Fungi in Indoor Environments*. Elsevier, Amsterdam. 179–186.
- Herrero B., Fombella-Blanco M.A., Fernandez-Gonzalez D., Valencia-Barrera R.M. (1996).** The role of meteorological factors in determining the annual variation of *Alternaria* and *Cladosporium* spores in the atmosphere of Palencia, 1990 – 1992. *International Journal of Biometeorology*. 39, 1339 – 1342.
- Hess D.R. (2000).** Nebulizers : Principles and performance. *Respiratory care*.45(6).
- Hinds W.C. (1999).** Aerosol technology, properties, behavior and measurement of airborne particles. (2nd ed.). Wiley-Interscience:NewYork.
- Hirvonen M. R., Ruotsalainen M., Savolainen K., Nevalainen A. (1997).** Effect of viability of actinomycete spores on their ability to stimulate production of nitric oxide and reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Toxicology*. 124, 105–114.
- Horak B., Dutkiewicz J., Solarz K. (1996).** Microflora and acarofauna of bed dust from homes in Upper Silesia, Poland. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 76, 41 - 50.
- Horner W.W., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B. (1995).** Fungal allergens. *Clinical Microbiology Reviews*. 8, 161–179.
- Hull S.E., Woolfson M.M. (1976).** Crystal structure of ergosterol monohydrate. *Acta Crystallographica*. B32:2370-2373.
- International Organization for Standardization (ISO). (1992).** Air Quality — Particle Size Definitions for Health-related Sampling (ISO/DIS 7708). Geneva: ISO.
- INRS. (2012). Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. Aide mémoire technique. ED 984.

**INVS – DGS. (2010).** Guide pratique de gestion de la qualité de l'air intérieur dans les établissements recevant du public.

**Jankowska E., Reponen T., Willeke K., Grinshpun S.A., Choi K.J. (1999).** Collection on fungal spores on air filters and spore reentrainment from filters into air. *Journal of Aerosol Science*. 31(8), 969 - 978.

**Japuntich D. A., Stenhouse J. I. T., Liu B. Y. H. (1994).** Experimental results of solid monodisperse particle clogging of fibrous filters. *Journal of Aerosol Science*. 25(2), 385–393.

**Jensen P.A., Todd W.F., Davis G.N., Scarpino P.V. (1992).** Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 53 (10), 660–667.

**Jo W.K., Seo Y.J. (2005).** Indoor and outdoor bioaerosol levels at recreation facilities, elementary schools and homes. *Chemosphere*. 61, 1570 – 1579.

**Jones B.L., Cookson J.T. (1983).** Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(3), 919-934.

**Jones A.P. (1998).** Athma and domestic air quality. *Social Science and Medecine*. 47 (6), 755-764.

**Jones A.M., Harrison R.M. (2004).** The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Science of the Total Environment*. 326, 151 – 180.

**Joubert A. (2009).** Performances des filtres plissés à Très Haute Efficacité en fonction de l'humidité relative de l'air. Thèse de doctorat – Institut National Polytechnique de Lorraine.

**Jung, I., Kumar, S., Kuruvilla, J., Crist, K. (2002).** Impact of meteorology on the fine particulate matter distribution in central and southeastern Ohio. Preprints American Meteorological Society 12th Joint Conference on Applications of Air Pollution Meteorology with the Air and Waste Management Association Norfolk, VA. American Meteorological Society, Boston, MA.

**Jung J.H., Lee J.E., Kim S.S., Bae G.N. (2010).** Size reduction of *Aspergillus versicolor* fungal bioaerosols during a thermal heating process in continuous-flow system. *Journal of Aerosol Science*. 41, 602–610

**Kasper G., Preinig O., Matteson M.J. (1978).** Penetration of a multistage diffusion battery at various temperatures. *Journal of Aerosol Science*. 9 (4), 331-338.

**Kawamoto I., Oka T., Nara T. (1981).** Spore resistance of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis* and related organisms. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46 (1), 221-231.

**Kelkar U., Bal A.M., Kulkarni S. (2005).** Fungal contamination of air conditioning units in

operating theatres in India. *Journal of Hospital Infection*. 60 (1), 81-84.

**Kemp S.J., Kuehn T.H., Pui D.Y.H. Vesley D., Streifel A.J. (1995).** Filter collection efficiency and growth of microorganisms on filters loaded with outdoor air. *ASHRAE Transactions*. 101, 228-238.

**Kemp P.C., Neumeister-Kemp H.G., Lysek G. et Murray F. (2001).** Survival and growth of micro-organisms on air filtration media during initial loading. *Atmospheric Environment*. 35(28), 4739-4749.

**Klis FM (1994).** Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10, 851–869.

**Knutsen A.P., Bush R.K., Demain J.G., Denning D.W., Dixit A., Fairs A., Greenberger P.A., Kariuki B., Kita H., Kurup V.P., Moss R.B., Niven R.M., Pashley C.H., Slavin R.G., Vijay H.M., Wardlaw A.J. (2012).** Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *Journal of allergy and clinical immunology*. 129(2), 280 – 291.

**Koistinen K.J., Edwards R.D., Mathys P., Ruuskanen J., Künzli N., Jantunen M.J. (2004).** Sources of fine particulate matter in personal exposures and residential indoor, residential outdoor and workplace microenvironments in the Helsinki phase of the EXPOLIS study. *Scandinave Journal of Work Environment and Health*. 30(Supl. 2), 36 – 46.

**Kowalski W.J., Bahnfleth W.P., Whittam T.S. (1999).** Filtration of airborne microorganisms: modeling and prediction. *ASHRAE Transaction*. 2, 4 – 17.

**Kraemer H.F., Johnstone H.F. (1955).** Collecte of aerosol particles in presence of electrostatic fields. *Industrial and Engineering Chemistry*. 47, 2426 – 2434.

**Kumari D.N.P., Haji T.C., Keer V., Hawkey P.M., Duncanson V. et Flower E. (1998).** Ventilation grilles as a potential source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing an outbreak in a orthopaedic ward at a district general hospital. *Journal of Hospital Infection*. 39 (2), 127-133.

**Kurup V. P., Shen H. D., and Banerjee B. (2000).** Respiratory fungal allergy. *Microbes and Infection*. 2, 1101–1110.

**Kurup V.P., (2003).** Fungal allergens. *Current Allergy and Asthma Reports*. 3, 416–423.

**Kuwabara S. (1959).** The forces experienced by randomly distributed parallel circular cylinders or spheres in viscous flow at small Reynolds number. *Journal of Physical Society of Japan*. 14 (4), 527-532.

**Lacey J., Dutkiewicz J. (1994).** Bioaerosols and occupational lung disease. *Journal of Aerosol Science*. 25, 1371 - 1404.



- Laitinen S., Kangas J., Kotimaa M., Liesivuori J., Martikainen P.J., Nevalainen A., Sarantila R., Husman K. (1994).** Workers exposure to airborne bacterial and endotoxins at industrial wastewater treatment. *American Industrial Hygiene Association*. 55, 1055-1060.
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science*. 82, 6955–6959.
- Law A.K.Y., Chau C.K., Chan G.Y.S. (2001).** Characteristics of bioaerosol profile in office buildings in Hong Kong. *Building and Environment*. 36, 527 – 541.
- Leclerc H., Meyer A., Deiana J. (1999).** Cours de microbiologie générale. ISBN 2 – 70 – 40 – 0745 – 4.
- Le Coq L. (1996).** Mise en œuvre et modélisation de médias fibreux pour la filtration d'huile. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Grenoble.
- Le Coq L. (2008).** Influence on permeability on the structural parameters of heterogeneous porous media. *Environmental Technology*. 29, 141 – 149.
- Lee K.W., Liu B.Y.H. (1982a).** Experimental study of aerosol filtration by fibrous filters. *Aerosol Science and Technology*. 1, 35 – 46.
- Lee K.W., Liu B.Y.H. (1982b).** Theoretical study of aerosol filtration by fibrous filters. *Aerosol Science and Technology*. 1, 47 – 61.
- Levy J. I., Hammit J. K., Spengler J. D. (2000).** Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability? *Environmental Health Perspectives*. 108, 109–117.
- Li C., Hsu L. Y., Chou C. C., and Hsieh K. H. (1995).** Fungus allergens inside and outside the residences of atopic and control children. *Archives of Environmental Health*. 50, 38–43.
- Li Y., Leung G.M., Tang J., Yang X., Chao C., Lin J.Z., Lu J. W., Nielsen P. V., Niu J., Qian H., Sleight 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.
- Liceaga-Gesualdo A., Li-Chan E.C.Y., Skura B.J. (2001).** Antimicrobial effect of lactoferrin digest on spores of a *Penicillium sp.* Isolated from bottled water. *Food Research International*. 34, 501 – 506.
- Liebermann C. (1885).** Ber. dtch. chem. Ges. 18, 1803.
- Lighthart B., Kim J. (1989).** Simulation of airborne microbial droplet transport. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(9), 2349-2355.

- Lighthart B. (1994).** Physics of bioaerosols. In *Atmospheric Microbial Aerosols: Theory and Applications*. Edited by Lighthart B, Mohr. J. New York. Chapman and Hall. 5-27.
- Lighthart B. (1997).** The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 23 (4), 263-274.
- Lin X., Reponen T.A., Willeke K, Grinshpun S.A., Foarde K.K., Ensor D.S. (1999).** Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid. *Atmospheric Environment*. 33, 4291-4298.
- Lin X., Reponen T., Willeke K., Wang Z., Grinshpun S.A., Trunov S. (2000).** Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection. *Aerosol Science and Technology*. 32(13), 184 – 196.
- Liu B.Y.H., Rubow K.L. (1990).** Efficiency, pressure drop and figure of merit of high efficiency fibrous and membrane filter media. 5<sup>th</sup> World Filtration Congress, Nice. 5-8 juin 1990. Société Française de Filtration, Paris, 3, 112.
- Liu J., Han G., Li Q. (2009).** Survival of airborne microbes on fibrous filter media. 9<sup>th</sup> international conference on industrial ventilation 2009.
- Lorenz W., Sigrist G., Shakibaei M., Mobasheri A., Trautmann C. (2006).** A hypothesis for the origin and pathogenesis of rheumatoid diseases. *Rheumatology International*. 26, 641–654.
- Lundholm I.M. (1982).** Comparison of methods for quantitative determinations of airborne bacteria and evaluation of total viable counts. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(1), 179-183.
- Lyon F.L., Kramer C.L., Eversmeyer M.G. (2004).** Variation of airspora in the atmosphere due to the weather conditions. *Grana*. 23, 177 – 181.
- Madelin, T.M.(1994).** Fungal aerosol: A review. *Journal of Aerosol Science*. 25, 1405–1412.
- Maher N., Dillon H.K., Vermund S.H., Unnasch T.R. (2001).** Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 449–452.
- Mainelis G., Berry D., Reoun An H., Yao M., DeVoe K., Fennell DE., Jaeger R. (2005).** Design and performances of a single-pass bubbling bioaerosol generator. *Atmospheric Environment*. 39 (19), 3521-3533.
- Martell M. Gomez J., Esteban J. I., Sauleda S., Quer J., Cabot B., Esteban R. Guardia J. (1999).** High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 327-332.

- Maroni M., Bersani M., Cavallo D., Anversa A., Alcini D. (1993).** Microbial contamination in buildings: comparison between seasons and ventilation systems. Proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air and Climate, Helsinki. 4, 137-142.
- Mastorides S.M., Oehler R.L., Greene J., Sinnott J.T., Sandin R.L. (1997).** Detection of airborne Mycobacterium tuberculosis by air filtration and polymerase chain reaction. Clinical and Infectious Disease. 25, 756.
- Mauret E., Renaud M. (1997).** Transport phenomena in multi-particle systems – I. Limits of applicability of capillary model in high voidage beds – application to fixed beds of fibers and fluidized beds of spheres. Chemical Engineering Science. 52 (11), 1807-1817.
- Maus R., Umhauer H. (1997).** Collection efficiencies of coarse and fine dust filter media for airborne biological particles. Journal of Aerosol Science. 28(3), 401 – 415.
- Maus R., Goppelsröder A., Umhauer H. (2001).** Survival of bacterial and mold spores in air filter media. Atmospheric Environment. 35, 105-113.
- McGrath J., Wong W. C., Cooley J. D., and Straus D. C. (1999).** Continually measured fungal profiles in sick building syndrome. Current Microbiology. 38, 33–36.
- Mendell M.J., Smith A.H. (1990).** Consistent pattern of elevated symptoms in airconditioned office buildings: a reanalysis of epidemiologic studies. American Journal of Public Health. 80, 1193–1199.
- Mendell M.J., Naco G.M., Wilcox T.G. et Sieber W.K. (2003).** Environmental risk factors and work-related lower respiratory symptoms in 80 office buildings: an exploratory analysis of NIOSH data. American Journal of Industrial Medicine. 43(6), 630-641.
- Mendell M.J., Cozen M., Lei-Gomez Q., Brightman H.S., Erdmann C.A., Girmand J.R., Wombled S.E. (2006).** Indicators of moisture and ventilation system contamination in US office buildings as risk factors for respiratory and mucous membrane symptoms: analyses of the EPA BASE data. Journal of Occupational and Environmental Hygiene. 3, 225–233.
- Météorologic :** [http://www.meteorologic.net/metar-climato\\_LFRS.html?m=02&y=12](http://www.meteorologic.net/metar-climato_LFRS.html?m=02&y=12)
- Michel O, Kips J, Duchateau J., Vertongen F., Robert L., Collet H., Pauwels R., Sergysels R. (1996).** Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 154, 1641–6.
- Miller J.D., Laflamme A.M., Sobol Y., Lafontaine P. et al. (1988).** Fungi and fungal products in some Canadian houses. Int. Biodeterior. Bull. 24, 103-120.
- Millner P.D., Olenchock S., Epstein E., Rylander R., Haines J., Walker J., et al. (1994).** Bioaerosols associated with composting facilities. Compost Science and Utilization. 2 (4), 8–57.

**Mohr A.J. (2002).** Microorganisms fate and transport. In *Manual of Environmental Microbiology*, edn 2. Edited by Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G., McInerney M., Stetzenbach L.D. Washington D.C. ASM Press:827-838. This reference illustrates the physical and environmental factors affecting the dispersal and survival of bioaerosols.

**Mohr A.J. (2007).** Fate and transport of microorganisms in air. In *Manual of Environmental Microbiology*. Edited by C.J. Hurst, R.M. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills, and L.D. Stetzenbach. ASM Press, Washington, DC. 961–971.

**Möritz M, Martiny H. (1997).** Fungi and bacteria on air filters from heating, ventilation and air-conditioning systems: a method for determination of fungi and bacteria on air filters. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 199(6), 513-26.

**Möritz M., Schleibinger H., Rüden H. (1998).** Investigations on the survival time of outdoor microorganisms on air filters. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 201(2), 125-33

**Möritz M., Peters H., Nipko B., Rüden H. (2001).** Capability of air filters to retain airborne bacteria and molds in heating, ventilating and air-conditioning (HVAC) systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 203 (5-6), 401-409.

**Mosqueron L., Nedellec V. (2001).** Inventaire des données françaises relatives à la qualité de l'air intérieur des bâtiments. Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur, DDD/SB-2002-23.

**Moularat S., Hulin M., Robine E., Annesi-Maesano I., Caillaud D. (2011).** Airborne fungal volatile organic compounds in rural and urban dwellings Detection of mould contamination in 94 homes determined by visual inspection and airborne fungal volatile organic compounds method. *Science of the Total Environment.* 409, 2005–2009.

**Mouret G. (2008).** Etude de la filtration des aérosols nanométriques. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.

**Muilenberg M.L. (1989).** Aeroallergen assessment by microscopy and culture. *Immunology and Allergy Clinics of North America.* 9, 245–268.

**Myatt T., Johnston S.L., Zuo Z.W.M., Keadze T., Rudnick S., Milton D.K. (2004).** Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 169, 1187–1190.

**Nevalainen A., K. Willeke F. Liebhaber J. Pastuszka et al. (1993).** Bioaerosol sampling. In *Aerosol Measurement*, K. Willeke, and P.A. Baron (eds.). New York: Van Nostrand Reinhold. 471–492.

**Newman SP. (1991).** Aerosol generators and delivery systems. *Respir Care.* 36(9), 939–951.

- Nielsen K., Gravesen S., Nielsen P. A., Anderson B., Thrane U., and Frisvad J. C. (1999).** Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*. 145, 43–56.
- Niemeier R. T., Sivasubramani S. K., Reponen T., Grinshpun S. A.. (2006).** Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 3, 262–273.
- Noris F., Siegel J.A., Kinney K.A. (2011).** Evaluation of HVAC filters as a sampling mechanism for indoor microbial communities. *Atmospheric Environment*. 45, 338 – 346.
- Novitsky J.A et Morita R.Y. (1978).** Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Marine Biology*. 48 (3), 289-295.
- O'Connor G.T., Walter M., Mitchell H., Kattan M., Morgan W.J., Gruchalla R.S., et al. (2004).** Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: the Inner-City Asthma Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 114, 599–606.
- Olsson P.A., Larsson L., Bago B., Wallander H., Van Aarle I.M. (2003).** Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist Letters*. 159, 7 – 10.
- Pace N.R. (1997).** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. 276, 734–740.
- Pakarinen J., Hyvärinen A., Salkinoja-Salonen M., Laitinen S., Nevalainen A., Mäkelä M.J., Haahtela T., von Hertzen L. (2008).** Predominance of gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia. *Environmental Microbiology*. 10, 3317 - 3325.
- Palmgren U., Strom G., Blomquist G., Malmberg P., (1986).** Collection of airborne microorganisms on nucleopore filters, estimation and analysis—CAMNEA method. *Journal of Applied Bacteriology*. 61, 401–406.
- Panikov N.S. (1995).** *Microbial growth kinetics*. Springer. 238-253.
- Parat S., Fricker-Hidalgo H., Perdrix A., Bemer D., Pelissier N., Grillot R. (1996).** Airborne fungal contamination in air-conditioning systems: effect of filtering and humidifying devices. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 57, 996-1001.
- Parat S., Perdrix A. et Dechenaux J. (2004).** *Climatisation et aérobiocontamination*, APPA, DDASS Isère. 1-14.
- Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. (2001).** House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 163, 322–8.

- Park CW., Yoon KY., Kim YD., Park JH., Hwanga J. (2011).** Effects of condensational growth on culturability of airborne bacteria: Implications for sampling and control of bioaerosols. *Journal of Aerosol Science*. 42 (4), 213-223.
- Pasanen A.-L., Pasanen P., Jantunen M. J., Kalliokoski P. (1991).** Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment*. 25, 459-462.
- Pasanen P. (1998).** Emissions from filters and hygiene of air ducts in the ventilation systems of office buildings. *Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences* 80, 77. ISBN 951-781-718-5, ISSN 1235-0486.
- Pasanen A.L, Yli-Pietilä K., Pasanen P., Kalliokoski P., Tarhanen J. (1999).** Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology*. 138-142.
- Pascual L., Perez-Luz S., Moreno C., Apraiz D., Catalan V. (2001).** Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*. 47, 341-347.
- Payen J. (2009).** Etude et développement de structures fibreuses non tissées dédiées à la filtration de particules fines dans l'air. Thèse de doctorat. Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis.
- Payet S., Boulaud D., Madelaine G., Renoux A. (1992).** Penetration and pressure drop of a HEPA filter during loading with submicron liquid particles. *J. Aerosol Sci.* 23(7), 723 – 735.
- Pedgley D.E. (1991).** Aerobiology: the atmosphere as a source and sink for microbes. In *Microbial Ecology of Leaves*. Edited by Andrews JH, Hirano JJ. New York: Springer-Verlag. 43-59.
- Penicot-Bauge P. (1998).** Etude de la performance de filtres à fibres lors de la filtration d'aérosols liquides ou solides submicroniques. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Persoons R., Parat S., Stoklov M., Perdrix A., Maitre A. (2010).** Critical working tasks and determinants of exposure to bioaerosols and MVOC at composting facilities. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 213, 338-347.
- Pitkäranta M., Meklin T., Hyvärinen A., Paulin L., Auvinen P., Nevalainen A. et Rintala H. (2008).** Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 233-244.
- Prescott, Harley, Klein. (1993).** *Microbiologie*. De Boeck université.
- Price D.L., Simmons R.B., Ezeonu I.M., Crow S.A., Ahearn D.G. (1994).** Colonization of

fiberglass insulation used in heating, ventilation and air conditioning systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 13 (3), 154-158.

**Qiagen. (2009).** Critical factors for successful Real-Time PCR. Real-Time PCR brochure.

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

**Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. (2008).** Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology* 99, 4559–4565.

**Ranalli G., Bottura G., Taddei P., Garavani M., Marchetti R., Sorlini C. (2001).** Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries. Bioindicators of monitoring and compost maturity. *Journal of Environmental Science and Health*. 36, 415–436.

**Rault J.Y. (1991).** La filtration de l'air, Les Editions Parisiennes. Chaud-Froid-Plomberie, Paris.

**REHVA (2007a).** Cleanliness of ventilation systems. Brussels, Federation of European Heating and Air-conditioning Associations (Guidebook No. 8).

**REHVA (2007b).** Hygiene requirement for ventilation and air-conditioning. Brussels, Federation of European Heating and Air-conditioning Associations (Guidebook No. 9).

**Rengasamy A., Zhuang Z., BerryAnn R. (2004).** Respiratory protection against bioaerosols: Literature review and research needs. *AJIC State of the science report*. 32(6), 345 – 354.

**Renoux A., Boulaud D. (1998).** Les aérosols : Physique et Métrologie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France.

**Reponen T., Willeke K., Ulevicius V., Reponen A., Grinshpun S.A. (1996).** Effect of relative humidity on the aerodynamic diameter and respiratory deposition of fungal spores. *Atmospheric Environment*. 30(23), 3967–3974.

**Reponen T., Willeke K., Ulevicius V., Grinshpun S., Donnelly J. (1997).** Techniques for dispersion of microorganisms into air. *Aerosol Science Technology*. 27(3), 405-421.

**Reponen T., Seo S.C., Grimsley F., Lee T., Crawford C., Grinshpun S.A. (2007).** Fungal fragments in moldy houses: a field study in homes in New Orleans and Southern Ohio. *Atmospheric Environment*. 41, 8140 – 9.

**Reynolds O. (1900).** Papers on mechanical and physical subjects. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni.

- Reynolds S, Thorne P, Donham K et al. (2002).** Interlaboratory comparison of endotoxin assays using agricultural dusts. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 6, 430–438.
- Richard J.L., Plattner R.D., May J. et Liska S.L. (1999).** The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*. 146 (2), 99-103.
- Rim D., Novoselac A. (2010).** Ventilation effectiveness as an indicator of occupant exposure to particles from indoor sources. *Building and Environment*. 45, 1214–1224.
- Rintala H., Pitkäranta M., Toivola M., Paulin L., Nevalainen A. (2008).** Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiology*. 8, 56 - 69.
- Robine E., Lacaze I., Moularat S., Boissier M., Ritoux S. (2006).** Mesure des aérosols fongiques dans l'air : utilisation de l'ergostérol. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 46, 174-179.
- Rozsak D.B., Colwell R.R. (1987).** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 51 (3), 365-379.
- Sae-Lim W., Tanthapanikoon W., Kanaoka C. (2006).** Correlation for the efficiency enhancement factor of a single electret filter. *Journal of Aerosol Science*. 37, 228–240.
- Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986).** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 324, 163-6.
- Saint-Louis R., Pelletier E. (2004).** Sea-to-air flux of contaminants via bubbles bursting. An experimental approach for tributyltin. *Marine Chemistry*. 84 (3/4), 211–225.
- Samet, J.M., Dominici, F., Curriero, F.C., Coursac, I., Zeger, S.L. (2000).** Fine particulate air pollution and mortality in 20 ARTICLE IN PRESS A.T. DeGaetano, O.M. Doherty / *Atmospheric Environment*. 38, 1547–1558 1557 US cities, 1987–1994. *The New England Journal of Medicine*. 343, 1742–1749.
- Sawant A.A., Kwangsam N., Xiaona Zhu X., Cocker K., Butt S., Song C., Cocker D.R. (2004).** Characterization of PM<sub>2.5</sub> and selected gas-phase compounds at multiple indoor and outdoor sites in Mira Loma, California. *Atmospheric Environment*. 38, 6269 – 6278
- Sawyer M.H., Chamberlain C.J., Wu Y.N., Aintablian N., Wallace W.R. (1994).** Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *Journal of Infectious Disease*. 169, 91–94.
- Schafer M.P., Martinez K.F., Mathews E.S., (2003).** Rapid detection and determination of the aerodynamic size range of airborne Mycobacteria associated with whirlpools. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 18, 41050.



- Schrivver-Mazzuoli L. (2009).** La pollution de l'air intérieur. Sources – Effets sanitaires – Ventilation. Dunod. ISBN 978-2-10-051606-3.
- Schwartz J., Dockery D. W., Neas L. M. (1996).** Is daily mortality associated specifically with fine particles? *Journal of the Air and Waste Management Association*. 46, 927–939.
- Seguin D., Montillet A., Comiti J. et Huet F. (1998).** Experimental characterization of flow regimes in various porous media – II: Transition to turbulent regime. *Chemical Engineering Science*. 53(22), 3897 – 3909.
- Seitz L.M., Mohr H.E., Burroughs R., Salier D.B. (1977).** Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*. 54, 1207-1217.
- Seitz L. M., Sauer D. B., Burroughs R., Mohr H. E., Hubbard J. D. (1979).** Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69, 1202–1203.
- Selan L., Berlutti F., Passariello C., Thaller M.C., Renzini G. (1992).** Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 1739– 1742.
- Seliger H.H. (1989).** Some reflections on McElroy and bioluminescence. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 4, 26–28.
- Seo S.C., Reponen T., Levin L., Grinshpun S.A. (2009).** Size-fractionated (1→3)- $\beta$ -D-glucan concentrations aerosolized from different moldy building materials. *Science of the Total Environment*. 407, 806–14.
- Seppanen O., Fisk W.J. (2004).** Summary of human responses to ventilation. *Indoor Air*. 14(Suppl. 7), 102–118.
- Seppänen O. (2006).** Ventilation strategies for good indoor air quality and energy efficiency. *International Journal of Ventilation*. 6(4), 1473-3315.
- Seshadri S., Han T., Krumins V., Fennell D.E., Mainelis G. (2009).** Application of ATP bioluminescence method to characterize performance of bioaerosol sampling devices. *Aerosol Science*. 40, 113 – 121.
- Shaffer B.T., Lighthart B. (1997).** Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest and coastal. *Microbial Ecology*. 34, 167-177.
- Shen H., Tam M. F., Chou H., and Han S. H. (1999).** The importance of serine proteinases as aeroallergens associated with asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*. 119, 259–264.
- Simmons R.B., Crow S.A. (1995).** Fungal colonization of air Filters for use in heating, ventilating, and air conditioning (HVAC) systems. *Journal of Industrial Microbiology*. 14, 41 - 45.

- Simmons R.B., Noble J.A., Rose L., Price D.L., Crow S.A., Ahearn D.G. (1997a).** Fungal colonization of automobile air conditioning systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19(2), 150-153.
- Simmons R.B., Price D.L., Noble J.A., Crow S.A., Ahearn D.G. (1997b).** Fungal colonization of air filters from hospitals. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 58(12), 900-904.
- Simon X., Duquenne P., Koehler V., Faure M., Greff-Mirguet G. (2009).** Caractérisations physique et biologique d'un bioaérosol expérimental généré par bullage d'air à travers un film de suspension bactérienne. 24ème Congrès Français sur les Aérosols, Paris. 6.
- Simon X., Duquenne P., Koehler V., Piernot C., Coulais C., Faure M. (2011).** Aerosolisation of *Escherichia coli* and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator. *Journal of Aerosol Science*. 42, 517–531.
- Siragusa G.R., Dorsa W.J., Cutter C.N., Perino L.J., Koohmaraie M. (1996).** Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination on poultry carcasses. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 11, 297– 301.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1), 76-85.
- Song C.B., Park H.S. et Lee K.W. (2006).** Experimental study of filter clogging with monodisperse PSL particles. *Powder Technology*. 163(3), 152-159.
- Stanley P.E. (1989).** A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 4, 375– 380.
- Stark K.D.C., Nicolet J., Frey J. (1998).** Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 543–548.
- Stenhouse J.I.T. (1974).** The influence of electrostatic forces in fibrous filtration. *Filtration and Separation*. 11, 25 – 26.
- Stewart S.L., Grinshpun S.A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V., Donnelly J., (1995).** Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1232–1239.
- Stetzenbach L.D. (2007).** Introduction to aerobiology. In *Manual of Environmental Microbiology*. Edited by C.J. Hurst, R.M. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills, and L.D. Stetzenbach. ASM Press, Washington, DC. 925–938.

- Stone B.A., Clarke A.E. (1992).** Chemistry and biology of (1→3)- $\beta$ -glucans. Melbourne, Victoria, La Trobe University Press.
- Stone R.C., Johnson D.L. (2002).** A note on the effect of nebulization time and pressure on the culturability of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. *Aerosol Science and Technology*. 36 (5), 536-539.
- Tardieu D., Bailly J.D., Benard G., Guerre P. (2007).** Comparison of two extraction methods for ergosterol determination in vegetal feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 158(8-9), 442-446.
- Täubel M., Rintala H., Pitkäranta M., Paulin L., Laitinen S., Pekkanen J., Hyvärinen A., Nevalainen A. (2009).** The occupants as a source of house dust bacteria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124, 834 - 840.
- Terzieva S., Donnelly J., Ulevicius V., Grinshpun AS., Willeke K., Stelma G., Brenner K. (1996).** Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2264-2272.
- Thatcher T.L., Layton D.W. (1995).** Deposition, resuspension and penetration of particles within a residence. *Atmospheric Environment*. 29, 1487 – 1497.
- Thomas D., Contal P., Renaudin V., Penicot P., Leclerc D., Vendel J. (1999).** Modelling pressure drop in HEPA filters during dynamic filtration. *Journal of Aerosol Science*. 30(2), 235-246.
- Thomas D., Penicot P., Contal P., Leclerc D. et Vendel J. (2001).** Clogging of fibrous filters by solid aerosol particles – Experimental and modelling study. *Chemical Engineering Science*. 56(11), 3549-3561.
- Thompson W.A.R. (1981).** Black's medical dictionary. Ed. Adam and Charles Black.
- Thompson K.A., Bennett A.M., Walker J.T. (2011).** Aerosol survival of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Hospital Infection*. 78, 216 – 220
- Thorne P.S., Kiekhaefer M.S., Whitten P., Donham K.J. (1992).** Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(8), 2543-2551.
- Thorne P.S., Reynolds S.J., Milton D.K. et al. (1997).** Field evaluation of endotoxin air sampling assay methods. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 58, 792–9.
- Toivola M., Alm S., Reponen T., Kolari S., Nevalainen A. (2002).** Personal exposures and microenvironmental concentrations of particles and bioaerosols. *Journal of Environmental Monitoring*. 4, 166–174.

- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0001862.
- Tseng C.H., Wang H.C., Xiao N.Y., Chang Y.M. (2011).** Examining the feasibility of prediction models by monitoring data and management data for bioaerosols inside office buildings. *Building and Environment*. 46, 2578 – 2589.
- Tunlid A., White D.C. (1992).** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. *Soil biochemistry*, Vol. 7. New York, NY, USA: Dekker. 229 – 262.
- Tyler M.E., Shipe E.L. & Painter R.B. (1959).** Bacterial aerosol samplers. III. Comparison of biological and physical effects in liquid impinger samplers. *Applied Microbiology* 7, 355-362.
- Van Brakel J., Modry S., Svata M. (1981).** Mercury porosimetry: State of the art, *Powder technology*. 29, 1 – 12.
- Venkateswaran K., Hattori N., La Duc M. T., Kern R. (2003).** ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods*. 52, 367–377.
- Verdenelli M.C., Cecchini C., Orpianesi C., Dadea G.M., Cresci A. (2003).** Efficacy of Antimicrobial Filter Treatments on Microbial Colonization of Air Panel Filters. *Journal of Applied Microbiology*. 94(1), 9-15.
- Verein Deutscher Ingenieure. (1997).** Hygienic standards for ventilation and airconditioning systems – offices and assembly rooms. Dusseldorf, Verein Deutscher Ingenieure (Association of German Engineers) (VDI 6022).
- Verhulst P.F. (1838).** Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corr. Maths et Physique*. 10, 113–121.
- Vincent D., Annesi I., Festy B. et al. (1997).** Ventilation System, Indoor Air Quality, and Health Outcomes in Parisian Modern Office Workers. *Environmental Research*. 75, 100-112.
- Vincent D., Cabanes P.A., Lambrozo J. (1998).** La colonisation microbiologique des systèmes de traitement d’air est elle susceptible d’entraîner la contamination des personnes exposées ? *Energie Santé*. 3 (90), 309-319.
- Wake D., Bowry C., Crook B., Brown R.C. (1997).** Performance of respirator filters and surgical masks against bacterial aerosols. *Journal of Aerosol Science*. 28(7), 1311 – 1329.

- Wakefield A.E. (1996).** DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 1754–1759.
- Walinder R, Norback D, Wessen B, Venge P. (2001).** Nasal lavage biomarkers: effects of water damage and microbial growth in an office building. *Archives of Environmental Health*. 56, 30–6.
- Walsh D.C. (1996).** Recent advances in the understanding of fibrous filter behaviour under solid particle load. *Filtration & Separation*. 33 (6), 501-506.
- Walsh D.C, Stenhouse J.I.T. (1997a).** The effect of particle size, charge and composition on the loading characteristics of an electrically active fibrous filter material. *Journal of Aerosol Science*. 28, 307–321.
- Walsh D.C, Stenhouse J.I.T. (1997b).** Clogging of an electrically active fibrous filter material: experimental results and two-dimensional simulations. *Powder Technology*. 93, 63-75
- Wan G.-H., Lu S.-C., Tsai Y.-H. (2004).** Polymerase chain reaction used for the detection of airborne *Mycobacterium tuberculosis* in health care settings. *American Journal of Infection Control*. 32, 17–21.
- Wan G.H., Chung F.F., Tang C.S. (2011).** Long-term surveillance of air quality in medical center operating rooms. *American Journal of Infection Control*. 39, 302-8.
- Wang Z., Reponen T., Grinshpun S.A., Gorny R.L., Willeke K. (2001).** Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *Journal of Aerosol Science*. 32(5), 661 – 674.
- Wargocki P., Djukanovic R. (2003).** Estimate of an economic benefit from investment in improved indoor air quality in an office building. *Healthy Buildings. Proceedings 7<sup>th</sup> International Conference*. National University of Singapore. 3, 382 – 387.
- Weete J.D., Gandhi S.R. (1996).** Biochemistry and Molecular Biology of Fungal Sterols. In the *Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. (Brambl. R and Marzluf G. eds). 3, 421-438.
- Weil J.H. et al. (1987).** *Biochimie générale*. Masson – 5ème edition. 114.
- WHO guidelines for indoor air quality (2009).** dampness and mould.
- Willeke K., Qian Y., Donnelly J., Grinshpun S., Ulevicius V. (1996).** Penetration of airborne microorganisms through a surgical mask and a dust/mist respirator. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 57, 348-355.

- Williams DL .(1997).** Overview of (1→3)- $\beta$ -D-glucan in immunobiology. *Mediators of Inflammation*. 6, 247–250.
- Wilson J.C., Liu B.Y.H. (1980).** Aerodynamic Particle Size Measurement by Laser-Doppler Velocimetry. *Journal of Aerosol Science*. 11(2), 139 – 150.
- Wilson K.H., et al., (2002).** High-density microarray of small subunit ribosomal DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 2535–2541.
- Wilson M., Lindow S.E. (1992).** Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (12), 3908-3913.
- Wilson T., Hastings J.W. (1998).** Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 14, 197– 230.
- Woese C.R., (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51, 221–271.
- Woodward E.D., Friedlander B., Leshner R.J., Font W. et al. (1988).** Outbreak of hypersensitivity pneumonitis in an industrial setting. *The Journal of the American Medical Association*. 259, 1965-1969.
- Wu Z., Wang X.-R., Blomquist G. (2002).** Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi. *Journal of Environmental Monitoring*. 4, 377–382.
- Yamamoto N., Schmechel D., Chen B.T., Lindsley W.G., Peccia J. (2011).** Comparison of quantitative airborne fungi measurements by active and passive sampling methods. *Journal of Aerosol Science*. 42, 499–507.
- Yao M., Mainelis G. (2007).** Use of portable microbial samplers for estimating inhalation exposure to viable biological agents. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 17(1), 31 – 38.
- Yu B.F., Hu Z.B., Liu M., Yang H.L., Kong Q.X., Liu Y.H. (2009).** Review of research on air-conditioning systems and indoor air quality control for human health. *International journal of refrigeration*. 32, 3 – 20.
- Zeiler W., Boxem G. (2009).** Effects of thermal activated building systems in school on thermal comfort in winter. *Building and Environment*. 44, 2308-2317.

# Annexes

---





Annexe II- 1 : Protocole d'extraction et de mesure de l'ergostérol (à partir d'un protocole provenant du CSTB)

Annexe III- 1 : Valeurs de l'étude sur l'influence du taux d'humidité et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés

Tableau III- 10 : Ensemble des valeurs du taux d'ergostérol extrait des filtres dans le cadre de l'étude de l'influence du taux d'humidité relative et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres

Tableau III- 11 : Ensemble des valeurs de concentrations de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* extraits des filtres et obtenues dans le cadre de l'étude de l'influence du taux d'humidité relative sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres

Tableau III- 12 : Ensemble des valeurs de concentrations de *P. oxalicum* et *S. epidermidis* extraits des filtres et obtenues dans le cadre de l'étude de l'influence de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres

Annexe IV- 1 : Dispositif de filtration

- 1- Schéma de principe du dispositif de filtration
- 2- Photographie du dispositif global



**Annexe II- 1 : Protocole d'extraction et de mesure de l'ergostérol (à partir d'un protocole provenant du CSTB)**

**1 – Etape initiale**

Suite à la contamination du filtre, le plonger dans 20 mL de MeOH, puis le placer sous agitation (300 tr/min) pendant 1 h. Ensuite, le placer dans un bain à ultra-sons pendant 15 min.

Transférer les 20 mL de MeOH dans un flacon en téflon.

**2 – Saponification**

Ajouter 5 mL de MeKOH à 2 mol/L dans le flacon en téflon.

Plonger le flacon dans un bain-marie bouillant (100 °C) pendant 5 min.

Laisser refroidir pendant environ ½ heure.

**3 – Neutralisation**

Ajouter 5 mL de HCl à 1 mol/L, agiter.

**4 – Extraction**

Dans une ampoule à décanter de 60 mL, transvaser l'échantillon, rincer le flacon avec 10 mL d'eau déionisée.

Ajouter 10 mL de pentane, homogénéiser en dégazant régulièrement. Laisser décanter à l'abri de la lumière.

Récupérer la phase supérieure (pentane), dans un autre flacon en téflon, puis recommencer l'extraction 2 autres fois avec 5 mL de pentane, en laissant à l'abri de la lumière.

Après extraction, placer les flacons sous un flux d'azote jusqu'à ce que le pentane soit totalement évaporé.

**5 – Echantillonnage final**

Lorsque le pentane est évaporé, reprendre l'échantillon avec E = 1 mL de méthanol, rincer bien les parois du flacon.

Placer le flacon aux ultra-sons pendant 15 min en prenant soin d'homogénéiser celui-ci toutes les 5 min.

Filtrer l'échantillon à l'aide d'une seringue de 5 mL et d'un filtre Whatman 10 IC à 0,2 µm et déposer le filtrat dans un flacon ambré.

Le dosage de l'ergostérol se fait alors par HPLC ou bien stockage de l'échantillon au réfrigérateur pour un dosage ultérieur.



**Annexe III- 1 : Valeurs de l'étude sur l'influence du taux d'humidité et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés**

**Tableau III- 10. Taux d'ergostérol extrait de chaque filtre dans le cadre de l'étude sur l'influence du taux d'humidité et de la nature du média sur le comportement des microorganismes collectés sur les filtres**

Filtre en fibres de verre		Taux d'ergostérol par filtre (mg)	
60 % HR	Après contamination	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
	Après 48h	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$
	Après 168h	< lim	< lim
80 % HR	Après contamination	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-4}$
	Après 48h	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
	Après 168h	$9 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
100 % HR	Après contamination	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
	Après 48h	$3,1 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$
	Après 168h	$5,7 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$
Après 168h à 60% HR puis 168h à 100% HR		$5,9 \cdot 10^{-2}$	
Filtre en fibres synthétiques		Taux d'ergostérol par filtre (mg)	
100 % HR	Après contamination	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-4}$
	Après 48h	$1,1 \cdot 10^{-2}$	
	Après 168h	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$

Tableau III- 11. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre après contamination, 48h et 168h d'absence de flux d'air à 25°C et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air

Après contamination		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	2,1 10 <sup>7</sup>	4,6 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>6</sup>	8,1 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
80% HR	Extrait du filtre testé	3,9 10 <sup>6</sup>	4,6 10 <sup>7</sup>		6,7 10 <sup>8</sup>	1,0 10 <sup>10</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
60% HR	Extrait du filtre testé	5,3 10 <sup>6</sup>	7,9 10 <sup>6</sup>		1,0 10 <sup>10</sup>	8,3 10 <sup>9</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
Après 48h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	3,9 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>9</sup>	7,4 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
80% HR	Extrait du filtre testé	2,4 10 <sup>6</sup>	1,7 10 <sup>7</sup>		5,9 10 <sup>8</sup>	4,4 10 <sup>8</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
60% HR	Extrait du filtre testé	3,3 10 <sup>6</sup>	3,4 10 <sup>6</sup>		7,9 10 <sup>8</sup>	8,2 10 <sup>7</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
Après 168h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	2,2 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	2,6 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>	1,5 10 <sup>6</sup>	< limite de quantification	
80% HR	Extrait du filtre testé	1,5 10 <sup>5</sup>	5,1 10 <sup>6</sup>		2,5 10 <sup>6</sup>	7,7 10 <sup>7</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
60% HR	Extrait du filtre testé	1,5 10 <sup>6</sup>	4,9 10 <sup>6</sup>		2,2 10 <sup>8</sup>	4,5 10 <sup>8</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	

Tableau III- 12. Concentrations en microorganismes extraits du filtre en fibres de verre et du filtre en fibres synthétiques après contamination, 48h et 168h à 25°C et 100% HR et relargage microbien lors de la reprise du flux d'air

*Filtre en fibres de verre*

Après contamination		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	2,1 10 <sup>7</sup>	4,6 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>6</sup>	8,1 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
Après 48h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	3,9 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>9</sup>	7,4 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification			< limite de quantification	
Après 168h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )			Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	2,2 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	
	Relargué du filtre testé	2,6 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>	1,5 10 <sup>6</sup>	< limite de quantification	

*Filtre en fibres synthétiques*

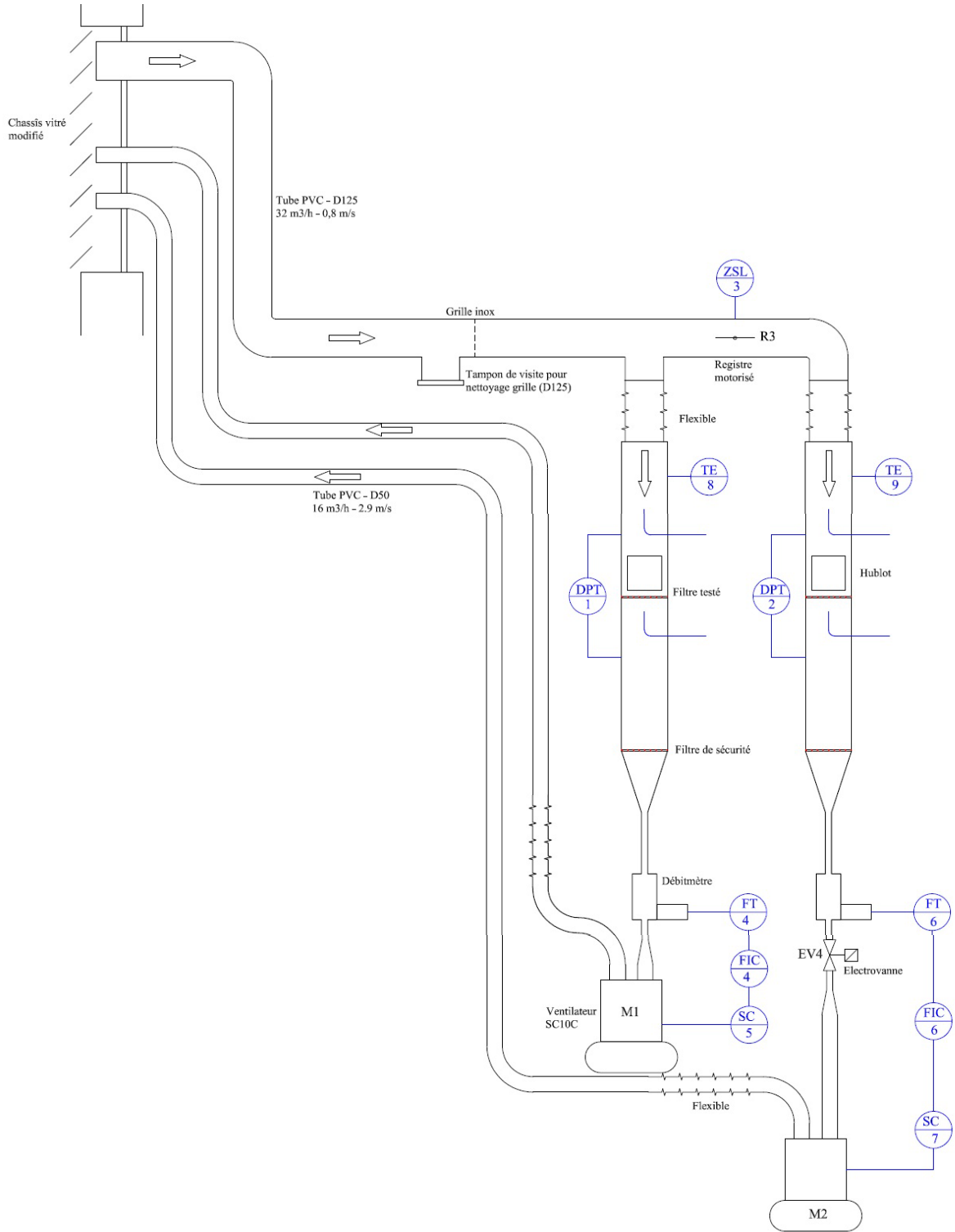
Après contamination		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )		Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	3,4 10 <sup>7</sup>	6,1 10 <sup>7</sup>	2,7 10 <sup>10</sup>	1,3 10 <sup>10</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification		< limite de quantification	
Après 48h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )		Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	1,2 10 <sup>8</sup>	6,0 10 <sup>8</sup>	1,0 10 <sup>10</sup>	1,8 10 <sup>8</sup>
	Relargué du filtre testé	< limite de quantification		< limite de quantification	
Après 168h		Concentration en <i>P.oxalicum</i> (UFC/m <sup>2</sup> )		Concentration en <i>S.Epidermidis</i> (UFC/m <sup>2</sup> )	
100% HR	Extrait du filtre testé	9,9 10 <sup>9</sup>	1,7 10 <sup>9</sup>	2,1 10 <sup>9</sup>	2,4 10 <sup>8</sup>
	Relargué du filtre testé	6,2 10 <sup>5</sup>	1,5 10 <sup>5</sup>	< limite de quantification	





Annexe IV- 1 : Dispositif de filtration

1- Schéma de principe du dispositif de filtration



## 2- Photographie du dispositif global









## Audrey Forthomme

# Caractérisation du comportement des aérosols microbiens dans les réseaux de ventilation d'espaces occupés

## Microbial aerosol behavior in HVAC systems

### Résumé

La qualité microbienne de l'air intérieur représente un enjeu sanitaire important, notamment dans le secteur professionnel. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier les conditions favorisant le développement des espèces microbiennes collectées sur des médias fibreux utilisés dans des CTA, ainsi que leur réentraînement en aval de la filtration, susceptible de dégrader la qualité de l'air. La première partie de l'étude s'est déroulée en laboratoire à partir de la filtration d'un consortium bactérien – fongique composé de *Staphylococcus epidermidis* et *Penicillium oxalicum*. L'influence de trois paramètres a été étudiée sur la croissance microbienne : le taux d'humidité relative (HR) de l'air, la nature du média fibreux, la présence/absence de flux d'air. Les résultats ont révélé notamment que quelles que soient les conditions, *S. epidermidis* n'arrive pas à croître. En revanche, lorsque l'HR de l'air approche 100%, *P. oxalicum* se développe sur les filtres et des spores sont relarguées en aval des filtres après une reprise de la filtration. Une seconde partie de l'étude a consisté à travailler avec un aérosol atmosphérique semi-urbain. Deux unités de filtration d'air ont fonctionné pendant 5 mois en parallèle. La ventilation d'une des deux unités a été stoppée chaque week-end et redémarrée en début de semaine. Un suivi de la température, de l'humidité de l'air, de la perte de charge des filtres et de la concentration des particules totales dans l'air en amont de la filtration a été assuré tout au long de l'étude. Les concentrations en microorganismes cultivables ont été mesurées chaque semaine en amont et en aval de chaque filtre, notamment au redémarrage de la ventilation. En fonction des variations saisonnières de la concentration des microorganismes, les résultats ont montré en particulier des efficacités de filtration vis-à-vis des particules bactériennes faibles, voire négatives, dans l'unité de filtration fonctionnant en continu.

### Mots clés

CTA, médias fibreux, efficacité de filtration, aérosol microbien, relargage microbien, qualité de l'air intérieur

### Abstract

Microbial indoor air quality is an important issue in particular in the professional sector. This thesis aims to investigate the conditions leading to microbial development onto fibrous filters and to microbial release downstream of filters that could decrease air quality. The first part of the thesis was realized on laboratory and consisted in the filtration of a microbial consortium composed with *Staphylococcus epidermidis* (bacterium specie) and *Penicillium oxalicum* (fungi specie). The effects of three parameters on the microbial behavior were studied: the relative humidity (RH) of the air, the filter material, the airflow presence/absence. Whatever conditions, *S. epidermidis* did not grow up. However, *P. oxalicum* has demonstrated its ability to develop itself when RH was close to 100% and some *P. oxalicum* spores were released downstream of filter after growth, when ventilation was restarted. The second part of the thesis consisted in working with a semi-urban outdoor air. Two air handling unit (AHU) have operated during 5 months. The ventilation of one AHU was stopped each week-end and restarted each beginning of week. Temperature and RH of the air, filters pressure drop and total concentration of PM in air before filtration were monitored. Concentration of total cultivable microorganisms upstream and downstream of both filters was also measured each week, in particular at the restart of ventilation for one AHU. According to seasonal variations of microbial concentrations, results have revealed for instance that the filtration efficiency of cultivable bacteria was particularly weak, and sometimes negative, for the AHU operating continuously.

### Key Words

HVAC, fibrous filters, filtration efficiency, microbial aerosol, microbial release, indoor air quality