

ASSAINISSEMENT MICROBIOLOGIQUE DE L'AIR ET DES SYSTÈMES DE VENTILATION AU MOYEN D'HUILES ESSENTIELLES

THÈSE N° 3311 (2005)

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ ENVIRONNEMENT NATUREL, ARCHITECTURAL ET CONSTRUIT

Institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement

SECTION D'ARCHITECTURE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Marie-Cécile PIBIRI

ingénieure chimiste diplômée EPF
de nationalité suisse et originaire du Grand-Saconnex (GE) et Remaufens (FR)

acceptée sur proposition du jury:

Prof. C.-A. Roulet, directeur de thèse
Dr G. Billerbeck, rapporteur
Dr G. Ducel, rapporteur
Prof. P. Péringier, rapporteur

Lausanne, EPFL
2006



A Thomas Pibiri,

*Voici l'accomplissement de ces trois dernières années
passées sur cette thèse de Doctorat.*

*De mon mieux j'ai concilié vie de famille et carrière, dans
un environnement où la réalité est souvent contradictoire
avec les messages d'encouragements des carrières
féminines.*

*A toi maintenant d'apprécier quand tu auras l'âge et la
maturité de comprendre ce travail,*

s'il vaut les longues heures passées loin de toi,

et laquelle de mes deux créations j'ai le mieux réussi !

Ta maman qui t'aime fort

VERSION ABREGEE

ASSAINISSEMENT DE L'AIR ET DES SYSTEMES DE VENTILATION AU MOYEN D'HUILES ESSENTIELLES

Les systèmes de traitement d'air des bâtiments, abritent de nombreux microorganismes susceptibles d'avoir des effets néfastes sur la santé des personnes exposées, en particulier dans les milieux hospitaliers.

Parmi les différents moyens à disposition pour empêcher un développement microbien, on peut citer les huiles essentielles. Ces extraits de végétaux odorants sont l'objet de nombreuses recherches scientifiques dans le domaine médical et ils ont démontré leur efficacité pour le traitement de nombreuses pathologies. Au contraire de la grande majorité des agents antimicrobiens utilisés pour la désinfection de l'air, ces substances ne sont pas ou sont peu toxiques.

Afin de proposer une méthode de purification de l'air intérieur basée sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles, nous avons sélectionné

- les souches test pathogènes : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*
- le **protocole Afnor NF-72-281** de désinfection des surfaces par voie aérienne permettant de démontrer l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens utilisés en phase gazeuse
- le dispositif expérimental spécifique
- les **huiles essentielles** parmi les plus actives : la **Sarriette des montagnes**, le **Thym à thymol** et l'**Origan vulgaire** et la **Cannelle écorce**

Le protocole a été appliqué à un composé chimique de référence dans les milieux hospitaliers, le **formaldéhyde** et à des huiles essentielles riches en phénols.

Nous avons démontré que les huiles essentielles testées en phase gazeuse ont bien un effet létal sur les souches test, même à des doses faibles.

Dans un bâtiment, une diffusion contrôlée d'huiles essentielles rigoureusement sélectionnées et sous leur forme volatile contribuerait valablement :

- au **confort des occupants** en améliorant la perception de l'air ambiant,
- à la **prévention des contaminations microbiennes** indésirables,
- à l'**assainissement microbiologique** de l'air et des systèmes de ventilation.

ABSTRACT

INDOOR AIR PURIFICATION AND VENTILATION SYSTEMS SANITATION WITH ESSENTIAL OILS

Ventilation systems often host bacteria and fungi that may be dangerous for the health of exposed people.

Essential oils are one means among others to prevent microbial development. Used as a basis for many traditional therapies, these odorant plant extracts have been studied extensively in the medical domain and their effectiveness in the treatment of numerous pathologies has been demonstrated. As opposed to most antimicrobial agents currently used for air disinfection, essential oils are not toxic.

With a view to proposing an indoor air purification method based on the germicidal and odorant properties of essential oils, we selected:

- the pathogenic test strains : *Staphylococcus aureus*
Pseudomonas aeruginosa
- the **Afnor NF T72-281 protocol** for the disinfection of surfaces through the air, which showed the germicidal activity of antimicrobial agents used in gaseous phase
- a specific experimental apparatus
- some of the most active **essential oils** : **mountain savory, thyme thymol, oregano (vulgare)** as well as **cinnamon bark**.

The protocol was applied to a chemical reference compound of hospitals, the formaldehyde as well as to phenol rich essential oils.

We demonstrated that the tested essential oils in gaseous phase do have a lethal effect on all bacteria that have been exposed to them, even in small doses.

In buildings, controlled diffusion of rigorously selected essential oils in volatile form would validly contribute to:

- **occupant comfort**, through improvement of the perception of indoor air quality,
- **the prevention of microbial contamination,**
- **microbiological purification** of air and **sanitation** of ventilation systems.

REMERCIEMENTS

Ce projet a bénéficié du soutien financier du Fond National Suisse pour la recherche sous la forme de subsides Marie Heim-Vögtlin visant à encourager les carrières féminines. Le travail a été encadré par le Laboratoire d'Energie Solaire et de Physique du Bâtiment (LESO-PB) de l'EPFL, sous la direction du Pr Claude-Alain Roulet. J'ai eu la chance de travailler avec ce grand physicien du bâtiment, qui a accepté et suivi ce travail avec disponibilité, patience, ouverture et bienveillance.

J'ai beaucoup aimé travailler avec l'équipe du LESO ; administration, informatique, service technique, direction, tous les lézards et la nouvelle relève des têtards, collègues et amis qui ont accueilli les huiles essentielles avec curiosité et intérêt, et qui ont toujours mis le meilleur d'eux-mêmes à disposition du projet. Un tout grand merci à Pierre Loesch d'avoir mis toute son ingéniosité et sa patience, son savoir faire et sa créativité dans le développement et la conception du laboratoire de microbiologie et des supports des manipulations. Merci Ashish Goel venu d'Inde l'espace d'un été pour m'aider dans l'avancement des expériences, avec malice et intelligence.

François, Flou, Antoine, Marilyne et Marylène, mes bons amis ex-lézards, j'ai regretté terminer ce travail sans votre compagnie. Claire, l'équipe CNV et le Shiatsu de l'EPFL, je vous remercie pour le précieux soutien et les bons moments partagés.

Merci à ceux qui ont généreusement partagé leur temps et leur bienveillance pour contribuer à la réalisation du fonds et de la forme de cette thèse. Merci Daniel de ta vivacité de lecteur et de ta diligence de correcteur.

Je tiens particulièrement à remercier aussi tout ceux qui ont pris bien soin de Thomas pour que je puisse réaliser ce travail; la garderie la Croquignole à l'EPFL, ses précieuses familles d'accueil, et ses grands parents chez qui il a passé bien des semaines de vacances pour que je puisse avancer dans mon travail.

Merci à ma toute ma famille et à mes amis de coeur pour les encouragements réitérés.

Je m'incline devant cette passion des huiles essentielles dans laquelle j'ai puisé la motivation d'élaborer le sujet, de chercher le financement, d'équiper le laboratoire et d'apprendre la microbiologie. Elles m'ont insufflé le courage nécessaire d'aller jusqu'au bout de cette thèse. Un grand merci à mes fournisseurs préférés, qui par leur amour des plantes et de l'Homme, source de leur formidable éthique sont les garants des qualités exceptionnelles avec lesquelles j'ai la chance de travailler.

Eric, tu as accompagné mes angoisses dans la certitude et le réconfort. Je te remercie de ta grande confiance en moi. Toi et Thomas, vous me rendez la vie belle !

Marie-Cécile Pibiri, le 9 décembre 2005

TABLE DES MATIERES

VERSION ABREGEE	III
ABSTRACT	V
REMERCIEMENTS	VII
TABLES DES MATIERES	IX
PREAMBULE	XIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
A) LES BATIMENTS : QUALITE DE L’AIR ET MICROBIOLOGIE	3
1. LES SYSTEMES DE VENTILATION	3
1.1 Définition	3
1.2 Nature des sources de pollution	5
2. MICROBIOLOGIE DE L’AIR INTERIEUR	6
2.1 Bioaérosols	6
2.2 Flores spécifiques des bâtiments	7
2.3 Unités de traitement de l’air et contaminations microbiennes	8
2.4 Méthodes de prélèvement et de dénombrement des microorganismes	11
3. LA NOTION DE SANTE DANS LES BATIMENTS	13
3.1 Quelques définitions de l’état de santé et de la maladie	14
3.2 Conséquences des contaminations microbiennes	15
3.3 Milieu hospitalier et infections nosocomiales	17
3.4 Quelques microorganismes incriminés	19
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.4.3 <i>Aspergillus sp.</i>	19
3.4.4 <i>Legionella sp.</i>	20
4. METHODES DE TRAITEMENT DE L’AIR	20
4.1 Définitions et généralités	20
4.2 Utilisation de gaz	22
4.3 Utilisation de dispersats	23
4.4 Désinfection par Voie Aérienne	24
4.4.1 Agents de désinfection	26
4.4.2 Niveaux de désinfection et souches test	26
B) LES HUILES ESSENTIELLES	28
1. PRINCIPES GENERAUX	29
1.1 Matériel végétal	30
1.2 Composition chimique	30
1.2.1 Structure de base et sites fonctionnels	31
1.2.2 Contrôle qualité	32
1.3 Toxicité pour l’homme	34
1.3.1 Toxicité par ingestion	34
1.3.2 Toxicité dermique	35
1.3.3 Toxicité selon la composition	35
1.3.4 Toxicité sur cellules animales ou humaines	35
1.4 Applications thérapeuthiques	36
2. ACTIVITE DES HUILES ESSENTIELLES	36
2.1 Historique	36

2.2	Activité antibactérienne	36
2.2.1	Bactéricidie et bactériostase	36
2.2.2	Souches microbiennes	37
2.2.3	Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité	38
2.2.3. a)	Association d'huiles essentielles	38
2.2.3. b)	Activité liée à la composition chimique	39
2.3	Méthodes de détermination de l'activité	41
2.3.1	Aromatogramme	41
2.3.2	Microatmosphères	42
3.	ASSAINISSEMENT DES UNITES DE TRAITEMENT DE L'AIR AU MOYEN D'HUILES ESSENTIELLES	45
3.1	Etat de l'art	45
3.1.1	Produits commerciaux	45
3.1.2	Recherches académiques	46
3.2	Potentiel de l'utilisations des huiles essentielles	48
3.2.1	Qualité de l'air intérieur et confort olfactif	48
3.2.2	Modes de diffusion	49
3.2.3	Avantages des huiles essentielles	50
3.2.4	Développement durable	50
CHAPITRE II-	ESSAIS PRELIMINAIRES	53
4.	INFLUENCE DES HUILES ESSENTIELLES SUR LES MICROORGANISMES PRESENTS DANS LES SYSTEMES DE VENTILATION	53
4.1	Sites de prélèvement	54
4.2	Matériel utilisé	54
4.3	Déroulement des expériences	55
4.4	Résultats	56
4.4.1	Contamination du système	56
4.4.2	Effets des huiles essentielles en phase gazeuse	58
5.	CHOIX DES SOUCHES MICROBIENNES	59
6.	DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX PROPOSES	59
7.	METHODES DE DENOMBREMENT	60
CHAPITRE III-	SELECTION DES HUILES ESSENTIELLES	63
A) AROMATOGRAMMES ET MICROATMOSPHERES		63
1.	INTRODUCTION	63
2.	MATERIEL & METHODES	64
2.1	Produits actifs	64
2.1.1	Disques pour aromatogrammes	64
2.1.2	Huiles essentielles	64
2.1.3	Composés de référence	65
2.1.4	Composés chimiques actifs des huiles essentielles	67
2.2	Souches microbiennes	68
2.2.1	Origine	68
2.2.2	Milieux de culture	69
2.2.3	Conservation	69
2.2.4	Entretien	69
2.2.5	Concentration bactérienne	69
2.3	Protocoles	69
2.3.1	Méthode des aromatogrammes	69
2.3.1. a)	Description	70
2.3.1. b)	Ajustements	70
2.3.2	Les microatmosphères ou méthode en phase vapeur	70
2.3.2. a)	Description	71

2.4	Expression des résultats	71
2.4.1	Calculs d'erreurs	73
B)	ESSAIS AVEC <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	75
1.	AROMATOGRAMMES EXPLORATOIRES	75
1.1	Optimisation de la quantité d'huiles essentielles	76
1.2	Nature de l'activité antibactérienne	77
1.3	Considérations générales sur <i>Staphylococcus aureus</i>	77
2.	RESULTATS	78
2.1	Témoins et contrôles	78
2.1.1	Contrôle de l'activité de la souche	78
2.2	Antibiotiques	79
2.3	Huiles essentielles	80
2.4	Composés chimiques purs et leurs associations selon leur pourcentage dans les huiles essentielles	84
3.	ANALYSE DES RESULTATS ET COMPARAISON AVEC LES RESULTATS PUBLIES	85
3.1	Antibiotiques	85
3.2	Huiles essentielles	87
3.3	Composés chimiques purs	89
C)	ESSAIS AVEC <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	90
1.	RESULTATS	90
2.	ANALYSE DES RESULTATS ET COMPARAISON AVEC LES RESULTATS PUBLIES	90
CHAPITRE IV- ACTIVITE DE LA PHASE VOLATILE DES HUILES ESSENTIELLES SELON LA NORME AFNOR NF T72-281		93
A)	BIOREACTEUR DE 7L	93
1.	DESCRIPTION DU CHOIX DE LA METHODE	93
2.	PROTOCOLE	94
3.	MATERIEL	96
3.1	Souches microbiennes	96
3.2	Bioreacteur	96
3.3	Suspensions et milieux utilisés	98
3.4	Agents antimicrobiens	99
B)	NORME AFNOR NF T 72-218: EXPERIENCES ET RESULTATS	
4.	VERIFICATIONS PRELIMINAIRES	100
4.1	Temps de vie des bactéries sur les supports	100
4.2	Evaporation des huiles essentielles dans le réacteur	101
4.3	Utilisation de gélose neutralisante pour les dénombrements	102
4.4	Effets qualitatifs des huiles essentielles en phase gazeuse	103
4.4.1	Microatmosphères dans le bioréacteur	103
4.4.2	DVA avec des boîtes de Pétri gélosées comme « porte germes »	104
5.	NORME NF T72-281	106
5.1	Expression des résultats	106
5.2	Conditions expérimentales	107
5.3	Validité des Essais préliminaires	108
5.4	Essais proprement dits	109
5.4.1	Influences des différents laits	110
5.5	Vérifications complémentaires	112
5.5.1	Séchage des verres de montres	112
5.5.2	Présence de lait dans l'inoculum	113

6. OPTIMISATION DU PROTOCOLE AUX HUILES ESSENTIELLES	114
6.1 Effet protecteur du lait	115
6.2 Substitution du lait par un milieu de culture	116
7. RESULTATS SELON LE PROTOCOLE OPTIMISE	117
7.1 Résultats avec le milieu nutritif	117
7.2 Variation du temps de contact	118
7.3 Concentrations actives	118
7.4 Comparaison avec les résultats de la littérature	119
CONCLUSION	121
1. RECAPITULATIF	121
1.1 Chapitre I : Etude bibliographique	121
1.2 Chapitre II : Essais préliminaires	121
1.3 Chapitre III : Sélection des huiles essentielles	122
1.4 Chapitre IV : Activité de la phase volatile selon la norme NF T72-28	123
2. PERSPECTIVES	124
3. SYNTHÈSE PERSONNELLE	125
ANNEXES	127
A) COMPLEMENTS	127
1. LES AGENTS ANTIMICROBIENS	127
1.1 Mécanismes d'action	127
1.2 Quelques agents spécifiques	128
1.3 Antibiotiques	129
1.4 Problématique des résistances bactériennes	130
2. LE SYSTEME OLFACTIF	133
2.1 Mécanisme du système olfactif	133
2.2 Les odeurs	134
B) TEST STATISTIQUE : EVALUATION DE LA DIFFERENCE ENTRE LES MOYENNES DE DEUX ENSEMBLES	135
C) PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	136
D) LISTE DES HUILES ESSENTIELLES TESTEES	144
E) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS D'ORIGANUM COMPACTUM	147
F) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS DE THYMUS THYMOL	148
G) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS DE SATUREJA MONTANA	150
BIBLIOGRAPHIE	153
CURRICULUM VITAE	161

PREAMBULE

« On ne cherche que ce que l'on espère trouver » E. Ancelet.

Ce document est divisé en plusieurs chapitres qui abordent des thèmes différents, à l'image de son sujet qui lui-même est **pluridisciplinaire**. Il est destiné à être compris par le plus grand nombre et c'est pour cela que nous n'avons pas hésité à donner des explications relativement détaillées afin que les lecteurs de diverses spécialités puissent se situer dans les différents domaines présentés.

Le **PREMIER CHAPITRE** d'introduction est consacré à expliciter les différents termes et implications du titre de la thèse : la **qualité de l'air**, les **systèmes de ventilation**, la nature des **microbes** et l'écologie microbienne des **bâtiments**, la notion de **santé** et les **incidences** de la présence de microorganismes, en particulier dans les **milieux hospitaliers** qui sont les systèmes les mieux investigués à l'heure actuelle. Sont aussi présentées les méthodes pour pallier aux contaminations indésirables. Une présentation des huiles essentielles est incluse, ainsi que la justification du choix de consacrer cette étude à leur utilisation.

Les **TROIS CHAPITRES SUIVANTS** concernent la manière dont nous avons travaillé pour atteindre nos objectifs : démontrer que les huiles essentielles peuvent être utilisées pour assainir les systèmes de ventilation et l'air qui y circule. Cela passe par le choix des **huiles essentielles**, le choix des **souches microbiennes**, et le choix des **méthodes** mises en œuvre pour arriver à nos fins.

Le **CHAPITRE FINAL** fait le point sur l'état des résultats et en tire les conclusions sur la **faisabilité** de l'idée présentée. Il ouvre aussi les **prochaines étapes** recommandées pour donner une suite aux manipulations et établir les axes de recherche pour une poursuite du projet.

Viennent ensuite en **ANNEXE**, un rappel de microbiologie et quelques notions d'olfaction, les différents protocoles opératoires et les caractéristiques des huiles essentielles mentionnés dans le texte.

Cet ouvrage se termine par la **BIBLIOGRAPHIE** exhaustive sur laquelle s'appuie ce travail.

Dans le plan initial de ce travail, il était prévu une seconde étape afin de déterminer comment l'utilisation d'huiles essentielles en diffusion atmosphérique participe au confort olfactif et si cela permet de favoriser le bien-être général. Le temps imparti n'a malheureusement pas été suffisant pour envisager de tels tests.

Cette thèse de doctorat a été réalisée en trois ans exactement, de la date d'inscription de la candidate à l'examen final. Elle a été financée par une bourse du Fonds National Suisse destinée à l'encouragement des carrières féminines académiques, avec un complément de l'EPFL.

INTRODUCTION

INNOVATION ET ORIGINALITE : DES HUILES ESSENTIELLES DANS L' AIR

La crainte d'une contamination microbienne via l'air et les systèmes de ventilation dans les lieux publics, les bureaux, les hôtels, les hôpitaux est un phénomène d'actualité. On se souvient de l'épidémie SRAS¹ en 2003 qui a paralysé l'Asie et inquiété le reste du monde. Le nombre de cas croissant de légionellose en France a aussi contribué à raviver cette peur de la maladie invisible, que l'on attrape malgré soi, dont on ne maîtrise ni la contagion, ni le traitement.

De nombreux micro-organismes pathogènes font l'objet de recherches approfondies dans le domaine thérapeutique (*Zimmermann, 1998*) et pharmaceutique (*Poudevigne, 1991; Hermal, 1993*). Grâce aux technologies actuelles on connaît notre « envahisseur », c'est à dire la nature du virus, du champignon, ou de la bactérie dont nous sommes l'hôte. En revanche, on maîtrise moins les mesures à prendre une fois le patient infecté. Certaines espèces bactériennes se sont si bien adaptées aux antibiotiques qu'elles y sont de moins en moins sensibles (*Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline ou SARM; Entérocoques résistants à la Vancomycine ou ERV) et développent des résistances multiples. Il en résulte un énorme problème dont sont déjà conscients les milieux hospitaliers.

La nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour. Certains extraits de plantes, notamment les huiles essentielles, sont utilisées à la manière des antibiotiques ou d'autres préparations chimiques pour leurs fortes actions antimicrobiennes, fongicides et virucides (*Belaiche, 1979*). En effet, nombre de ces produits naturels bénéficient d'une composition chimique adéquate et ont l'avantage d'être nettement moins toxiques que d'autres désinfectants de synthèse pour un résultat comparable. Par leurs caractère « naturels » et donc fluctuants, ils sont actuellement trop souvent mis à l'écart par le domaine médical et scientifique en général. Cependant leur composition chimique, leur nature extrêmement volatile qui leur ajoute un caractère odorant plaisant, en font des agents de choix pour le traitement de l'air et des systèmes de ventilation.

¹ SRAS : le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère est une pneumopathie virulente.

L'objet de cette recherche est de proposer une solution possible aux problèmes liés plus spécifiquement aux bâtiments équipés de systèmes de circulation d'air, qui contribuent à la dissémination des germes et à la contagion des occupants.

L'originalité de ce travail consiste en l'utilisation de produits inhabituels à cette application. Les recherches approfondies dans ce sens sont encore peu nombreuses.

Au cours des paragraphes suivants, nous allons décrire comment nous avons procédé pour montrer que **l'usage d'huiles essentielles est une solution d'avenir pour assainir l'air et les systèmes de ventilation.**

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A) LES BATIMENTS : QUALITE DE L' AIR ET MICROBIOLOGIE INTERIEURE

« Pour parler de microbiologie et de qualité de l'air intérieur, il est nécessaire de l'évoquer sous trois aspects : le bâtiment, l'aspect microbiologique et l'aspect médical »
Suzanne Gravesen.

1. LES SYSTÈMES DE VENTILATION

1.1 DEFINITION

La ventilation d'un bâtiment est étudiée pour produire des conditions intérieures optimales. Une bonne qualité de l'air dans un local est le résultat d'un ensemble d'opérations qui créent et maintiennent les conditions déterminées des différents facteurs listés ci-dessous (*Parat et Perdrix, 1999*).

Ainsi la qualité de l'air intérieur est le résultat de conditions :

- **physiques** (température, humidité, vitesse de l'air, taux de renouvellement d'air, ionisation, concentration de particules ou de fibres),
- **chimiques** (oxydes de carbone, ozone, composés organiques volatils ou COV),...
- **microbiologiques** (bactéries, champignons, virus, toxines...).

Dans les bâtiments, le système qui applique les consignes en terme de qualité de l'air est appelé un **système de ventilation**.

Il est conçu pour assurer un environnement intérieur confortable tout en maintenant les occupants en bonne santé (*Roulet, 2004*). Comparable à un poumon, il fournit de l'air idéalement pur, frais et neuf dans les lieux qu'il ventile. Pour cela, un système de ventilation traite l'air vicié par les polluants inhérents au type de bâtiment : appartements, maisons, bureaux, industries, hôpitaux..., puis le rejette à l'extérieur.

Deux formes principales de ventilation se retrouvent dans les bâtiments :

1. La ventilation dite **NATURELLE** est un moyen « passif » d'assurer l'aération. L'air est poussé par des forces naturelles (vent, différence de température) au travers d'ouvertures ou de canaux de ventilation.
2. La ventilation **MECANIQUE** consiste à faire circuler de l'air à travers une unité de distribution et de conditionnement appelée unité de traitement de d'air (UTA) dans le bâtiment par des canaux de ventilation (Photo 1). Ces systèmes sont principalement composés des unités de traitements suivantes : des batteries de filtres, des récupérateurs de chaleur, des caissons d'humidification, des tours de chauffage et de refroidissement ainsi que des ventilateurs (Figure 1).



Photo 1 : Vue extérieure d'un système de ventilation d'une salle de cours à l'EPFL.

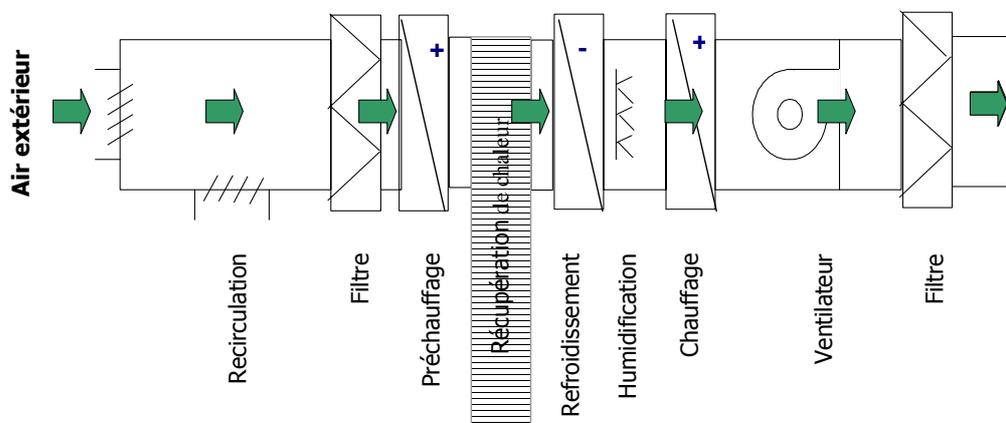


Figure 1 : Différentes unités de traitement de l'air d'un système de ventilation mécanique

Un système de ventilation fonctionnant correctement est le garant du bien-être et de la sécurité des occupants car il élimine de manière continue les divers polluants générés dans le bâtiment, susceptibles de rendre l'atmosphère malodorante, voire toxique.

1.2 NATURE DES SOURCES DE POLLUTION

Le niveau et le type de pollution d'un bâtiment varie selon l'emplacement, l'activité pratiquée dans les locaux, la nature des matériaux de construction, et les conditions physico-chimiques intérieures (*EPA et sponsors, 1998*). Les polluants communément rencontrés sont de toutes sortes : polluants chimiques inorganiques (radon) ou organiques (VOC), particules, odeurs (*Manley, 1993*), gaz toxiques, microorganismes ou plus simplement le bruit... Ils sont souvent la cause de désagréments (*Moffat, 1997*). Ils sont plus ou moins gênants et plus ou moins nuisibles et peuvent avoir des répercussions sur la santé des occupants (*WHO, 2000; Bluysen, Cox et al., 2003*). Une liste plus complète des divers polluants inertes et de leurs effets sur les bâtiments et leurs occupants se trouve dans les ouvrages spécialisés (*Maroni, Seifert et al., 1995; Roulet, 2004*).

Alors que les normes de ventilation actuelles (*ASHRAE, 1989; CEN, 1998; 2003*) considèrent les occupants comme principale source de pollution, la majeure partie de la pollution intérieure provient en fait du bâtiment lui-même et des installations de traitement d'air (*Fanger, 1988; Bluysen, De Oliveira Fernandes et al., 1995a; Björkroth, Müller et al., 2000*). Une grande variété de microorganismes tels que des champignons microscopiques (moisissures et levures) et leurs spores, des bactéries, des virus peuvent proliférer dans des conditions climatiques observées dans ces installations (*Bonadio, 1995; Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail, 1995; Burge, 1995a; Bardana et Anthony, 1996; Möritz, 1996; Flückiger, 1999; Salthammer, 1999; Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air, 2000*). Les unités de traitement d'air défectueuses ou mal entretenues, peuvent fournir des milieux propices à une croissance microbienne. La contamination du système complet est ensuite assurée par la circulation de l'air (*Bonadio, 1995; Bardana et Anthony, 1996; Parat et Perdrix, 1999*) avec des répercussions plus ou moins néfastes sur le bâtiment et ses occupants. Les phénomènes d'adhérence, de déposition et de relargage de microorganismes sur les surfaces (*Robine, 1999*) permettent de suivre la trajectoire des particules microbiennes à l'intérieur des bâtiments et dans les systèmes de ventilation (A. J. Mohr (*Burge, 1995a*)).

2. MICROBIOLOGIE DE L'AIR INTÉRIEUR

"We know so little about the microbial world. Imagine if our entire view of biology was based upon a visit to the zoo. That's exactly the situation were in the context of the natural microbial world." Norman R. Pace

2.1 BIOAEROSOLS

Les pollutions microbiologiques lorsqu'elles sont aéroportées se trouvent sous la forme d'aérosols.

Les aérosols sont constitués de particules inertes, solides ou liquides, en suspension dans l'air pour autant que leur taille le leur permette (Sherertz, 1993). Certaines d'entre-elles véhiculent des microorganismes (bactéries, champignons microscopiques, virus) mais aussi pollens, algues et acariens, leurs fragments ou leurs sous-produits. Ces particules biologiques isolées ou en agrégats, vivantes ou inertes s'appellent des **BIOAEROSOLS** (Figure 2). Leur taille est généralement comprise entre 0.5 et 30 µm de diamètre (Gravesen, ; Cox, 1987 ; Sherertz, 1993 ; Wanner, Verhoef et al., 1993; Burge, 1995a ; 1995b ; Hurst, 1997).

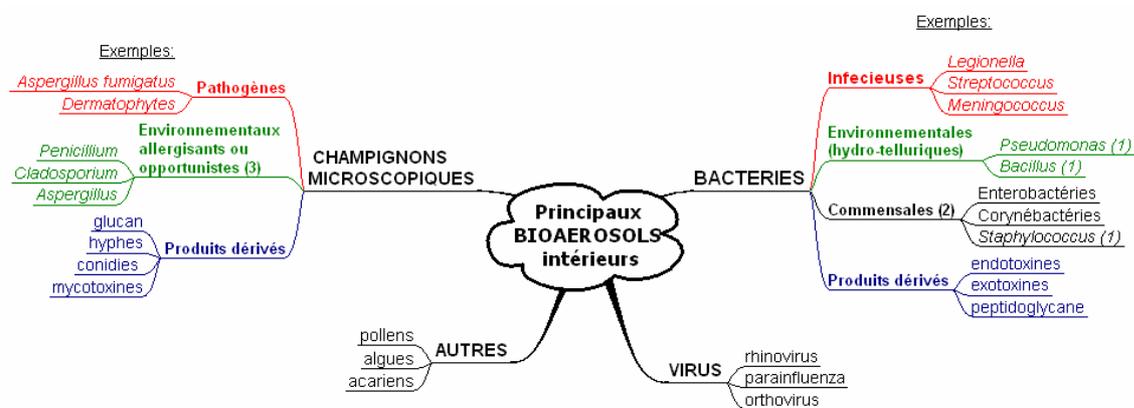


Figure 2 : Schéma euristique des principaux bioaérosols dans l'air intérieur ((1) espèces pathogènes)

Ces structures biologiques complexes peuvent être aéroportées et aéro-déposées à l'intérieur d'un bâtiment, véhiculées par les courants d'air dus à la ventilation naturelle ou mécanique (Salthammer, 1999). Leur transport et leur destination sont liés à leurs propriétés physiques (*taille densité, forme*) et aux paramètres environnementaux (*température et humidité relative*) dans lesquels elles évoluent.

Un microorganisme qui se retrouve dans l'air a un avenir très incertain. La dessiccation de la cellule elle-même ou de son vecteur aqueux est la cause principale de l'inactivation des microorganismes aéroportés. Cependant, certains types de bioaérosols ne sont que peu influencés par les conditions extérieures. Ils bénéficient alors de structures qui les protègent des stress dus à leur environnement comme la sécheresse, de fortes températures, de la présence d'U.V. ou de radiations solaires, et de certains composés chimiques et ioniques dans l'air. Il s'agit des formes sporulées des bactéries ou des spores de champignons, ainsi que de certains virus : tous sont protégés par une enveloppe lipidique très résistante (A. J. Mohr (*Burge, 1995a*)) (*Baron et Willeke, 1993*). Il est généralement admis que seul le 1% des particules totales inertes est composé de bactéries (*Isoard, Calop et al., 1982*).

2.2 FLORES SPECIFIQUES DES BATIMENTS



Figure 3 : Nature des différentes sources de pollutions des bâtiments

La microbiologie de l'air et plus particulièrement celle de l'air intérieur est un sujet vaste, car chaque bâtiment a son écosystème microbien particulier. Dans les bâtiments les pollutions microbiologiques sont de nature différente selon leur origine : les contaminations atmosphériques sont propres aux espaces « libres » et diffèrent des contaminations dues à la présence de l'homme (*Isoard, Calop et al., 1982*).

Ces premières contaminations dites exogènes (Figure 3) pénètrent dans les bâtiments via les occupants et via les systèmes de ventilation. Elles constituent une flore de base, issue de l'atmosphère et qui se caractérise par la présence majoritaire de bactéries saprophytes **d'origine hydro-tellurique**, nommée **FLORE EXOGENE OU FLORE ATMOSPHERIQUE**.

Dans nos régions jouissant d'un climat tempéré, nous passons approximativement six mois avec des conditions dites arctiques pendant la saison froide et six mois avec des conditions dites tropicales pendant la saison chaude. Les bâtiments sont donc conçus pour être chauffés et refroidis (*Roulet, 2004*).

Ainsi, les conditions d'humidité relative intérieures varient de manière saisonnière. Ces caractéristiques sont déterminantes pour la contamination microbienne issues de la flore exogène, car à l'intérieur d'un bâtiment, la charge microbienne n'est pas constante (*Burge, 1995a*). Elle subit des fluctuations diurnes et annuelles. Les minima sont en général atteints de jour en période froide et sèche de l'hiver (A. J. Mohr (*Burge, 1995a*)). Pour un climat tropical comme Singapour, les concentrations microbiennes exogènes sont relativement stables toute l'année (*Sekhar, Tham et al., 1998*).

A la flore exogène se superpose le profil microbien spécifique du lieu considéré, constitué de la **FLORE ENDOGENE**. Les contaminations endogènes sont issues des émissions, de la survie et du développement dans le bâtiment de microorganismes d'**origine humaine** (rhinopharyngé et cutané). Elles dépendent directement de l'activité des occupants. Les émissions d'origine humaine varient en fonction du site, de l'âge, du temps, de l'individu et de l'endroit où elles sont prélevées. La peau recèle surtout des bactéries à Gram positif.

Il est établi que les bactéries peuvent se propager via l'air sur des particules aéroportées assez grosses (environ 13 µm de diamètre) ou dans des gouttelettes d'eau. En effet, la desquamation cutanée s'élève à 7.10⁶ squames par minute pour une superficie cutanée moyenne de 1.8 m². Et lors de toux ou d'éternuement, un certain nombre de gouttelettes (gouttelettes de Pflügge¹ ou droplet nuclei²) sont extériorisées jusqu'à une distance de un mètre (*Isoard, Calop et al., 1982*).

2.3 UNITES DE TRAITEMENT DE L'AIR ET CONTAMINATIONS MICROBIENNES

La conséquence directe de l'élévation du nombre de microorganismes dans un système est une augmentation de l'intensité des odeurs dégagées par les différentes unités de traitement d'air, et en particulier la zone des filtres (Figure 4).

¹ **Pflügge** : nom du médecin qui fût le premier à les incriminer dans la transmission des infections.

² **Droplet nuclei** : noyaux des gouttelettes de Pflügge dont l'eau s'est évaporée lorsque l'air devient trop sec (en dessous de 30%) ne laissant que la partie organique, solide contenant les germes.

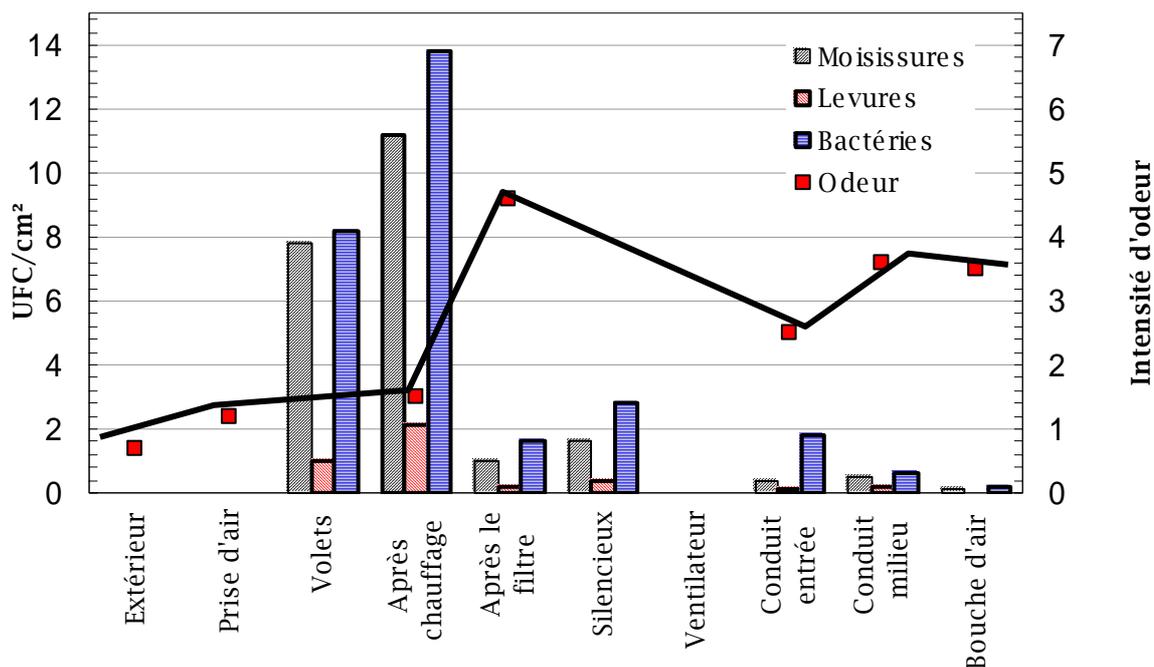


Figure 4 : Intensité d'odeur et charge microbienne (moisissures, levures et bactéries) dans les différentes unités de traitement d'air d'un système de ventilation (Bluyssen, Cox et al., 2003)

Plus spécifiquement, les différentes parties d'une unité de traitement d'air (Figure 1) incriminées dans la formation, l'amplification et la diffusion des bioaérosols sont :

- Les **canaux de ventilation sales** (Torkki et O., 1996 ; Pasanen, 1998 ; Buttner, Cruz-Perez et al., 1999 ; Björkroth, Müller et al., 2000).

La présence de spores fongiques n'est pas systématique et dépend uniquement du niveau de contamination globale de l'installation (Pasanen, 1998).

Dans les habitations, on retrouve en moyenne 10^7 à 10^8 spores par gramme de poussière récoltée dans les canaux, pour une valeur de 10^4 à 10^7 UFC (Unités Formant Colonies¹)/g de spores cultivables. Ces valeurs sont en général plus élevées que dans les bureaux ventilés mécaniquement (Pasanen, 1998). La croissance et la dissémination ces spores sont indépendantes des matériaux de fabrication des canaux.

- Les **filtres couverts de poussières organiques**, (Möriz, 1996 ; Pasanen, 1998 ; Bluyssen, Cox et al., 2000 ; Roulet, 2004).

¹ UFC = nombre de colonies de bactéries issues de la multiplication de chaque bactérie sur la gélose.

En effet, les filtres et pré-filtres des installations mal entretenues sont des sources de pollutions par relargage de particules et d'odeurs (Figure 5).

Ces émissions augmentent avec le taux d'humidité relative de l'air, la température et lorsque les filtres sont humides (Bluyssen, Cox et al., 2000; Bluyssen, Cox et al., 2003). Dans ces conditions, les microorganismes présents sur la surface ($2 \text{ à } 6 \cdot 10^5$ UFC) et à l'intérieur des filtres dégagent, en phase de croissance, des émissions malodorantes issues de leur métabolisme. Le temps théorique de survie des microorganismes sur les filtres est de trois jours environ. (Pasanen, 1998).

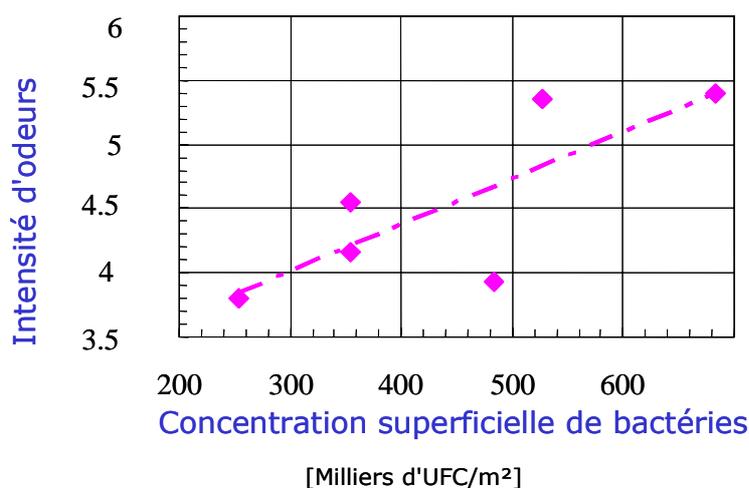


Figure 5 : Augmentation de l'intensité des émissions odorantes en fonction de la concentration superficielle de bactéries présentes sur des filtres. Résultats du projet européen AIRLESS 2000 (Bluyssen, M. Björkroth et al., 2000)

- Les **eaux stagnantes** dans les humidificateurs, les **bacs de condensation** des systèmes de refroidissement (Müller, Fitzner et al., 2000).
- Les intérieurs caractérisés par des **taux d'humidité trop élevés** (Bluyssen, M. Björkroth et al., 2000).

Les unités de traitement de l'air qui sont caractérisées par un taux d'humidité élevé lié à la présence directe d'eau comme les tours de chauffage et de refroidissement et les bacs d'humidification sont généralement chargées en microorganismes comme indiqué au tableau suivant (Tableau 1).

- La grande surface poreuse des **échangeurs de chaleur rotatifs**, qui permet la transmission des polluants organiques de l'air vicié à l'air neuf (Pejtersen, 1996; Ruud et Carlsson, 1996; Pibiri, Roulet et al., 2002), est probablement aussi un milieu propice au développement des microorganismes.
- **L'air brassé** par le système a aussi une incidence sur le niveau de la contamination globale. Des recherches ont montré que la vitesse minimum de l'air

requis pour déloger des conidies¹ varie entre 0.4 et 2 m/s selon l'espèce (*Buttner, Cruz-Perez et al., 1999*)[^]

Tableau 1 : Charge bactérienne dans les diverses UTA qui fonctionnent avec la présence d'eau dans le système (*Hurst, 1997*), (*Pasanen, 1998*)

UNITES DE TRAITEMENT D'AIR CONCERNEE	ESPECES	CONCENTRATION	
		Air (UFC/ m ³)	Surfaces (UFC/m ²)
Chauffage/refroidissement	<i>Pseudomonas sp.</i>	30-70	45 à 10 ⁶
	<i>Staphylococcus sp.</i>	80-130	50
Bacs d'humidification	<i>Pseudomonas sp.</i>	480-1200	-

2.4 METHODES DE PRELEVEMENT ET DE DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES

La collecte de bioaérosols biologiques est basée sur les mêmes principes d'échantillonnage que ceux des aérosols inertes. La principale différence est le maintien de leur activité biologique pendant et après les prélèvements. La gestion, le stockage et les analyses des aérosols collectés sont aussi très différents de ceux des particules physiques (*Burge et al. (Baron et Willeke, 1993) (Jensen et Schafer, 1998)*).

Toutes les particules microbiennes ne réagissent pas de la même manière aux stress provoqués par :

- le prélèvement,
- le transfert jusqu'au laboratoire,
- les changements de conditions physicochimiques lors des prélèvements et de leur traitement (dénombrement, analyses).

Certaines, comme les spores de champignons, de bactéries ou les pollens sont protégées par une enveloppe. D'autres en revanche sont fragiles et supportent mal le stress dû aux changements. Les cellules végétatives bactériennes survivent dans l'air si elles se sont protégées par la présence de substrat ou si elles sont adaptées à des environnements secs (*Macher, 2000*).

¹ **Conidies** = spore assurant la reproduction asexuée de certains champignons (*Larousse*).

Tableau 2 : Différentes méthodes de prélèvement et dénombrement des bioaérosols
(Pasquarella, Pitzurra et al., 2000)

MICROORGANISMES VIABLES ET CULTIVABLES

Sédimentation - Centrifugation	}	+ Dénombrement sur milieu gélosé
Filtration		
Impaction en milieu solide ou liquide		

MICROORGANISMES TOTAUX (VIABLES ET NON VIABLES)

Comptage direct par microscopie (classique, épi fluorescence, balayage électronique)
Biologie moléculaire, dosages

MESURE DES COMPOSANTS DES MICROORGANISMES

Aéro-allergènes : tests immuno-chimiques
Endotoxines, glucans, mycotoxines, polysaccharides extracellulaires
Chimie analytique

Il n'y a pas de méthode universelle de prélèvement à cause de la diversité de matériel biologique (Tableau 2). Le grand nombre d'études sur les différentes techniques de prélèvement et d'évaluation le montrent bien (Baron et Willeke, 1993; Maroni, Seifert et al., 1995; Jensen et Schafer, 1998; Pasanen, 1998; Salthammer, 1999; Portnoy, Flappan et al., 2001). Certaines se basent sur des prélèvements d'air (bioaérosols aéroportés) et d'autre sur des échantillonnages de surfaces (bioaérosols aérodéposés) (Chasseur, 2002). Une corrélation entre les résultats des différentes méthodes semble difficile.

Selon la méthode de dénombrement utilisée il est possible de différencier la viabilité et la « cultivabilité » des microorganismes en conditions de laboratoire et de mettre en évidence leur activité métabolique.

Les cellules viables potentiellement reproductibles sont de deux natures : cultivables et non cultivables en conditions contrôlées. Un très petit nombre de bactéries terrestres et aquatiques sont cultivables (1 à 10%) et il est fort possible que cela soit vrai aussi pour les bioaérosols (Burge, 1995a). Les milieux sur lesquels sont cultivés les microorganismes ont leur importance, car certains milieux sont sélectifs ou spécifiques et ne sont adaptés que pour la croissance et la mise en évidence de certains microorganismes (Burge, 1995a).

Les microorganismes non viables sont incapables de se reproduire. Ils sont donc énumérés et identifiés par microscopie, microbiologie classique, microbiologie moléculaire et par des techniques immunochimiques (Jensen et Schafer, 1998).

Alors que le comptage direct de composants chimiques de la cellule microbienne et le comptage par microscopie donnent des résultats immédiats, les résultats des

techniques mettant en œuvre la culture des microorganismes demandent un délai : le temps nécessaire de 24 heures à 48 heures pour la croissance des bactéries jusqu'au stade de colonies décelables à l'oeil nu. Les résultats sont exprimés en UFC/cm² lorsqu'il y a comptage des colonies sur boîtes de Pétri ou rapportées par unité de volume en UFC/m³ d'air. Les résultats sont influencés par de nombreux facteurs : condition de culture (milieu de culture, température d'incubation, durée d'incubation) et fiabilité très variable des appareils de mesure (débit d'aspiration et efficacité de collecte) (*Parat et Perdrix, 1999*). Les méthodes avec cultures sont faciles à mettre en œuvre, mais en contrepartie il en résulte souvent une sous-estimation de la concentration microbienne globale (*Pasanen, 1998*) rendant toutes comparaisons délicates.

3. LA NOTION DE SANTÉ DANS LES BÂTIMENTS

*« La santé est la définition médicale du bien-être »
(Ancelet, 2001)*

Avant d'aborder la santé du point de vue des occupants humains exclusivement, il est utile et important de rappeler que la « santé » d'un bâtiment peut aussi être altérée par des contaminations microbiennes. En effet, les matériaux de construction sont sensibles aux altérations dues aux microorganismes. Le bois est directement attaqué par certains champignons comme la « mэрule des maisons », *Serpula lacrymans*. C'est le mycélium qui se nourrit de la cellulose du bois, provoquant ainsi sa destruction. De plus, ce champignon peut être la cause d'allergies chez l'homme.



Photo 2 : Dégâts provoqués sur la charpente en bois par *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un autre exemple de champignon attaquant le bois et potentiellement pathogène pour l'homme (Photo 2). Les microorganismes attaquent

aussi des matériaux synthétiques comme les polymères sur lesquels ils provoquent des changements de coloration, l'apparition de mauvaises odeurs ou la formation de fissures.

Les contaminations de surface se développent soit à partir d'une fine couche de matières organiques (projections, salissures, dépôts biologiques, ...) présentent sur les surfaces, soit à partir d'une dégradation progressive de la surface du matériau (Hulak, 1999). Celles-ci peuvent être dues à un excès d'humidité par exemple. Dans les habitations mal ventilées, il est fréquent de trouver des traces de moisissures reconnaissables par leur couleur noire qui se développent sur les murs, sur les peintures ou sur les papiers peints, sur les joints de carrelage en ciment, en plâtre ou en silicone.

3.1 QUELQUES DEFINITIONS DE L'ETAT DE SANTE ET DE LA MALADIE

La définition de la maladie est unique. **La maladie correspond à la dégradation et à l'absence de santé.**

En revanche les définitions de la santé sont nombreuses et diverses.

Selon le Larousse, « **la santé est l'état de quelqu'un dont l'organisme fonctionne bien** ».

Pour l'OMS¹, « **la santé humaine est un état de complet bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité** ».

Cependant la définition qui nous paraît le mieux correspondre à ce que l'on peut attendre pour les occupants des bâtiments est celle de Nicolas Schöffer² :

« La santé est un état d'équilibre physique et psychique qui assure, pour l'ensemble des fonction externes et internes d'un être vivant, l'optimum et le maximum de son efficacité ».

¹ OMS : 'Organisation mondiale de la Santé, 1946 (<http://www.who.int/about/definition/fr/>).

²Nicolas Schöffer (1912-1992) peintre, puis sculpteur, urbaniste, architecte, théoricien de l'art, et l'un des artistes non commerciaux les plus importants de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, père de l'Art Cybernétique (<http://www.olats.org/schoffer/index.htm>).

3.2 CONSEQUENCES DES CONTAMINATIONS MICROBIENNES

Les virus (*rhinovirus -refroidissements, orthomyxovirus -grippe influenza, rougeole, rubéole, oreillons*), les bactéries aéroportées cultivables ou non, les champignons microscopiques saprophytes, leurs fragments (*fragments cellulaires, flagelles et matériel génétique*) et leurs métabolites (*COV¹, endotoxines, mycotoxines*), sont largement responsables d'une variété de maladies liées à leur présence dans les bâtiments (L. Stetzenbach (*Hurst, 1997*)) (*Thorne and Heedrik, 1999*) (*Rylander, 1998*). Dans les lieux publics, les centres commerciaux, les musées, les établissements de loisirs, dans les transports publics, les bureaux, les écoles et les lieux d'habitations, la vie en collectivité accroît le risque infectieux et favorise la transmission des infections respiratoires majoritairement (*Squinazi, 2002*). Parmi les exemples célèbres d'infections acquises en collectivité, on peut noter la bronchiolite chez les jeunes enfants qui se propage dans les crèches et la légionellose dans les lieux publics.

Ainsi pour la médecine actuelle, la présence d'une certaine quantité de microorganismes peut entraîner des réactions de type allergique ou des maladies chez les occupants des bâtiments et ainsi nuire à leur état de santé général (*Bardana et Anthony, 1996; Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air, 2000*). Les germes qui ne sont pas intrinsèquement pathogènes provoquent des symptômes de processus inflammatoires, de stimulations des réponses immunitaires, de largages de substances toxiques ou d'allergènes (*Salthammer, 1999; Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air, 2000*). Les premières parties atteintes du corps sont les yeux, le nez et la gorge.

Les types de maladies principalement concernées sont des irritations et des inflammations du système respiratoire, des maladies infectieuses et virales et des allergies. Il existe quelques cas rares de cancers et d'immunosuppressions (Figure 6).

Alors que toutes les moisissures et leurs spores ne sont pas pathogènes, ils peuvent déclencher des maladies respiratoires de type allergique chez des personnes prédisposées et sensibles et déclencher ou aggraver des crises chez les asthmatiques (*Gumowski, Grange et al., 1987*).

¹ COV: composé organique volatil.

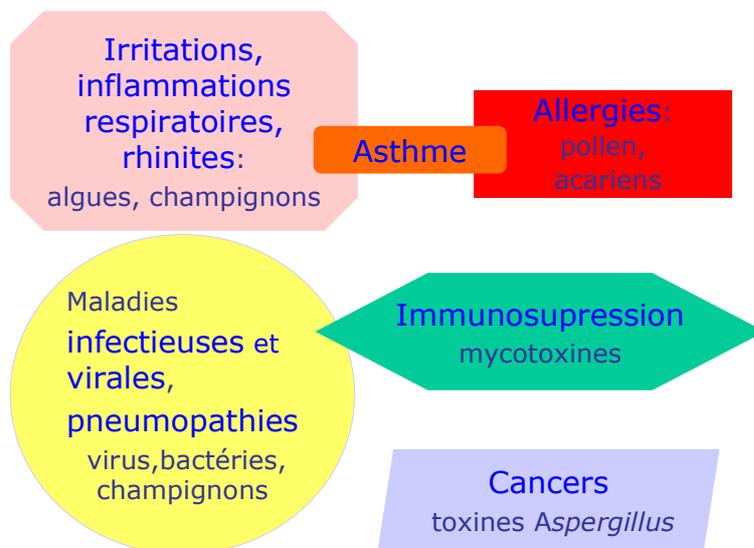


Figure 6 : Diverses maladies et leurs origines microbiennes

La nature mais aussi la taille des cellules sont déterminantes pour les risques encourus lors d'une contamination. En règle générale, plus la particule est petite plus le risque est grand car les petites particules, telles les bactéries et les virus qui pénètrent jusqu'aux bronchioles et alvéoles, ne sont pas expulsés facilement lors de l'expiration (Figure 7).

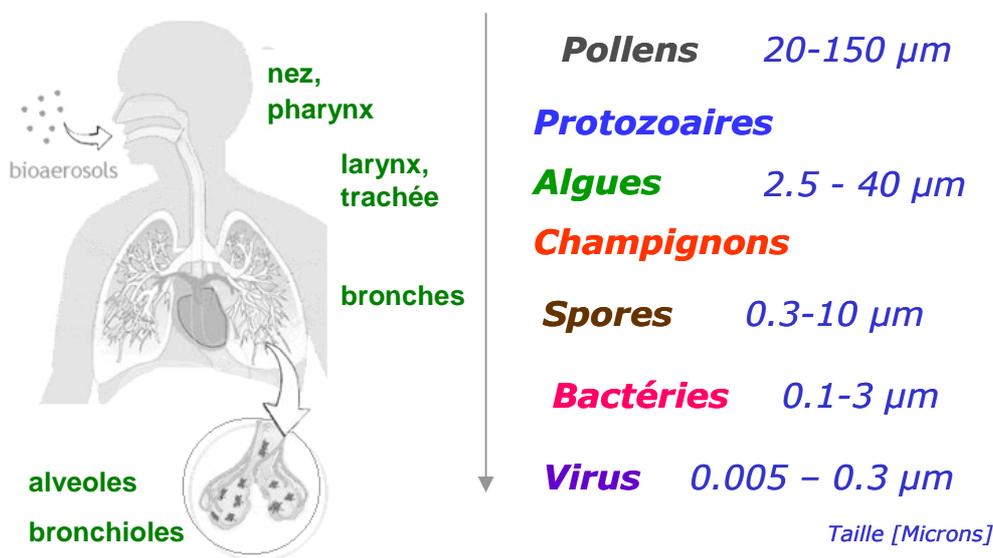


Figure 7 : Pénétration des microorganismes selon leur taille dans le système respiratoire

3.3 MILIEU HOSPITALIER ET INFECTIONS NOSOCOMIALES

Les milieux hospitaliers sont un terrain de choix pour approcher le sujet sensible et actuel de la transmission des maladies par l'air car la fréquence et la gravité des cas y est généralement plus élevée que dans tout autre bâtiment.



En France entre 6 et 7 % des patients hospitalisés ont contracté une infection au cours de leur séjour (1996). Leur nombre dépasse 10 % pour la Suisse (Troillet, Francioli et al., 2001). L'OMS estime qu'en moyenne 190 millions de personnes sont hospitalisées chaque année dans

le monde et que 9 millions d'entre elles contractent une infection à cette occasion (Borrel, 2000).

Les infections liées à l'hospitalisation sont appelées infections **nosocomiales** (du grec *nosos*= maladie et *komein*= soigner, et par extension, du latin *nosocomium*= hôpital) et concernent toute affection à microorganisme (bactéries 90% et champignons) survenant chez un malade hospitalisé et sans rapport, à priori, avec l'affection qui a motivé son intervention. Elles sont soit liées à un soin (ou une intervention) ou simplement dues à l'environnement hospitalier. Ces infections se présentent sous diverses formes : infections urinaires, respiratoires, digestives et post-opératoires. Elles peuvent aussi être dues à la contamination du matériel : cathéters et tubes trachéaux. Paradoxalement liées au développement des technologies médicales et à leur caractère invasif, la généralisation de ces infections représente un souci en terme de santé et de vies humaines, mais aussi en terme de surcoût de la prise en charge hospitalière. Le coût total et global lié aux infections nosocomiales pour la France est estimé à 3 milliards d'euros par an (Borrel, 2000).

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des microorganismes d'origine humaine ou environnementale. Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et au sein d'un même établissement, en fonction des patients, des techniques et des soins pratiqués.

Les microorganismes présents dans un univers hospitalier sont extrêmement variés et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme.

Les microorganismes incriminés dans les infections nosocomiales sont rarement des protozoaires, quelques fois des champignons et des levures (*Candida*, *Aspergillus*,

Cryptococcus) et parfois des virus (hépatites, herpès, grippe). On retrouve très souvent des bactéries ou leurs formes altérées, dont l'apparition est favorisée par l'usage des antibiotiques (Annexes A) :

- Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus*, *Enterococcus*.
- Bactéries à Gram négatif : *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*,...), *Pseudomonadaceae* (*Haxhe et Zumofen, 1999*).

Des détails concernant la classification des agents contaminants et de leurs habitats, leur fréquence, les pathologies développées et leur incidence, se trouvent dans les Notions d'Hygiène Hospitalières du Professeur Haxhe (*Haxhe et Zumofen, 1999*).

Dans les hôpitaux, la classification des risques de contamination des différentes zones est déterminée selon : 1. le niveau de contamination du lieu et 2. les caractéristiques pathologiques des patients qui y séjournent. Le risque le plus faible (niveau 1) se situe dans les couloirs et les bureaux alors que le risque est le plus élevé (niveau 4) dans les blocs opératoires pour les sujets immunodéprimés (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des zones à risques dans les hôpitaux (Isoard, Faure et al., 1991)

Risque	LIEUX	CARACTERISTIQUES	BACTERIES	PARTICULES > 0.5 µm
4	Blocs opératoires : cardiologie, neurologie, orthopédie.	Sujets immunodéprimés	<1	3 500
3	Salles d'opération : autres, Conditionnement du matériel stérile	Sujets à haut risque infectieux	<100	350 000
2	Chambres des malades	Hospitalisation générale	<500	3 500 000
1	Couloirs, bureaux...	-	-	-

Au niveau de la contamination bactérienne de l'air, une étude anglaise, menée en 1959 par Lidwell, Lowbury et Blowers et citée par (*Isoard, Faure et al., 1991*) établit une corrélation entre le nombre de bactéries aérotransportées et le pourcentage de septicémies : pour 400 bactéries/m³ le taux de septicémie est de 4 %, mais pour la valeur de 1 bactérie/m³ il est de 0.8 %.

La capacité des microorganismes de créer une infection chez l'homme découle ensuite de plusieurs facteurs dont la nature du microbe et la réceptivité de l'hôte (*Haxhe et Zumofen, 1999*). La sensibilité des malades peut être due à certains extrêmes comme l'âge et le poids, ainsi que la présence de diabète ou de leucémie, la malnutrition, le stress et même le coma. Elle peut être aussi acquise suite à des traitements à base d'immunodépresseurs, de stéroïdes, de radiothérapie (*Borrel, 2000*).

3.4 QUELQUES MICROORGANISMES INCRIMINES

On sait que très peu de bactéries se retrouvent dans l'air, cependant certaines sont souvent citées pour leur virulence et pour leur lien avec des contagions aéroportées ou des infections nosocomiales.

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille de *Micrococcaceæ* qui regroupe des espèces bactériennes constituées de cellules arrondies (cocci à Gram positif) immobiles et disposées en amas. *Staphylococcus aureus* ou Staphylocoque doré est une espèce saprophyte présente sur le corps et les muqueuses, et souvent responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales (20 % des cas (Fauchère et Avril, 2002; Régnier, 2005)). Cette bactérie est responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang (de Billerbeck, 2005). Elle acquiert facilement des résistances aux antibiotiques et en particulier à la pénicilline, à la méthicilline¹ (MRSA), et aux fluoroquinolones (Haxhe et Zumofen, 1999).

3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie à Gram négatif.

Agent pathogène opportuniste² actif, il contamine particulièrement tous les milieux aqueux. On le retrouve sur les mains du personnel soignant, mais surtout dans les canalisations d'eau, les réservoirs, les siphons et surtout dans les aérosols issus de l'utilisation des chasses d'eau dans les sanitaires (Isoard, Calop et al., 1982). Bien que rare, la présence dans l'air de cette bactérie est connue depuis 1954 (Haxhe et Zumofen, 1999).

Une antibiothérapie prophylactique favorise les surinfections à *Pseudomonas aeruginosa*, dont le taux de mortalité est élevé (Fauchère et Avril, 2002). Les difficultés de traitement et la grande résistance sont connus (Borrel, 2000). Elle représente 11 % des infections nosocomiales (Régnier, 2005), sous forme d'infections urinaires, d'infections du sang, des plaies et de l'appareil respiratoire (de Billerbeck, 2005).

3.4.3 *Aspergillus sp.*

L'aspergillose invasive nosocomiale correspond au développement d'un champignon filamenteux, *Aspergillus sp.* au niveau pulmonaire. Cette infection est fréquente chez

¹ **MRSA** : Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*.

² Agent **opportuniste** : se dit d'un germe qui ne devient pathogène que dans un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies; se dit de l'infection due à ce type de germe (Larousse).

les patients immunodéprimés ou soumis à des thérapies agressives. Son évolution est très fréquemment mortelle. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus communément isolée suivie d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*. Ces moisissures ubiquitaires sont très allergènes (Bonadio, 1995; Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air, 2000; Morris, Kokki et al., 2000).

3.4.4 *Legionella sp.*

Legionella (L) pneumophila est une bactérie à Gram négatif découverte à la suite d'une épidémie de pneumopathies mortelles lors d'un congrès aux USA de 200 légionnaires américains en 1976, dont 29 moururent. Elle est présente dans notre environnement hydro-tellurique et se développe dans les installations techniques. Cette bactérie se loge principalement dans les tours de refroidissement humides et dans les conduites d'eau où elle prolifère jusqu'à une température de 52 °C (Parat et Perdrix, 1999).

La légionellose, souvent appelée « maladie de la climatisation » est l'exemple le plus connu et aussi le plus meurtrier de contamination de l'air des systèmes de ventilation et de climatisation (Collectif, 2001).

4. MÉTHODES DE TRAITEMENT DE L'AIR

4.1 DEFINITIONS ET GENERALITES

Les microbes sont rarement isolés dans l'air, mais survivent sur les surfaces ou dans des liquides (Morawska, 2005). L'air contient toutefois des aérosols à la surface desquels ou dans les quels peuvent survivre des microbes.

Le premier traitement de l'air dans un bâtiment s'opère généralement grâce à des filtres choisis en fonction de la qualité de l'air souhaitée. Cependant pour certaines applications, en particulier dans les établissements médicaux, d'autres traitements spécifiques sont appliqués conjointement.

La suppression des pollutions indésirables se traduit dans le domaine scientifique et médical par la pratique de la stérilisation et de la désinfection.

STERILISATION :

« Opération permettant de tuer ou d'éliminer les micro-organismes portés par des milieux inertes contaminés, le résultat de l'opération, non limité à la durée de l'application, étant l'état de stérilité ». La stérilité s'obtient par la chaleur sèche ou humide, les rayons ultraviolets (U.V.) et la diffusion de certains gaz.

DESINFECTION :

« Opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes (...) portés par des milieux inertes contaminés en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération. Elle s'opère avec un désinfectant pour les surfaces inertes ou par un antiseptique sur la peau ».

Il existe au moins 3 procédés pour désinfecter les surfaces d'un local :

1. Les **DESINFECTANTS DE CONTACT** : produits liquides à application locale (descriptif des agents antimicrobiens et des mécanismes d'action en annexe A).
2. Les **RAYONS ULTRAVIOLETS** qui émettent une longueur d'onde bactéricide (253,7 nm), pour autant que le rayonnement soit direct, la surface suffisamment proche, la longueur d'onde stable et l'intensité suffisante.
3. La **DESINFECTION PAR VOIE AERIENNE (DVA)**, par la **DIFFUSION DE GAZ** : généralement du formaldéhyde, la dispersion d'agents antimicrobiens sous forme de **SPRAYS**, ou par l'intermédiaires d'appareils générateurs de microgouttelettes ou **AEROSOLS**.

Il existe deux stades de DVA :

- la désinfection terminale hors présence humaine,
- la désinfection en présence humaine, qui exige en plus une innocuité des produits (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

En règle générale, il est préférable de traiter l'air à sa production et de substituer l'entretien des gaines de ventilation et des systèmes de filtration à la DVA (*Fleurette, Freney et al., 1995*). Cette pratique quoique ancienne a l'avantage de traiter l'air et les surfaces, mais peut s'avérer plus dangereuse qu'efficace, en raison des produits utilisés. Actuellement, en milieu hospitalier, la désinfection par voie aérienne est une méthode très controversée. Faute de produits adéquats et de résultats validés, elle est pratiquement tombée en désuétude car la désinfection par contact direct présente un rapport efficacité sur risque toxique très supérieur.

Toutefois, ce procédé est appliqué dans les industries biotechnologiques, pharmaceutiques, cosmétiques, et agro-alimentaires car son efficacité est importante pour un coût relativement faible.

4.2 UTILISATION DE GAZ

« Pour chasser l'air mauvais, apporte du soufre et donne du feu : je veux soufrer la salle (...). Ulysse en imprégna salle, manoir et cour. » Odyssée d'Homère, VIIIe s. av. J.-C

La désinfection « chimique » des locaux et l'utilisation d'un gaz, le dioxyde de soufre, remonte au moins au VII^e siècle av. J.-C. De nombreux gaz sont toujours utilisés pour désinfecter, voire stériliser. Certains ont été abandonnés en raison de leur toxicité, comme le bromure de méthyle qui était utilisé pour la désinfection des cargaisons des navires. Les gaz d'usage courant sont le dioxyde de soufre, le chlore, et le dioxyde de propylène (Fleurette, Freney et al., 1995).

En milieu hospitalier, l'oxyde d'éthylène et le formaldéhyde sont les deux seuls gaz utilisés couramment pour une stérilisation à basse température, entre 37°C et 55°C. Celle-ci s'opère dans des espaces clos et sur des objets et matériaux inertes. Des tentatives d'utilisation d'ozone, de dioxyde de chlore et de peroxyde d'hydrogène ont été tentées, mais leur utilisation n'a pas été retenue dans la pratique (Fleurette, Freney et al., 1995).

FORMALDEHYDE (Formol gazeux, aldéhyde formique)

L'efficacité et le pouvoir de diffusion du formaldéhyde gazeux sont à l'origine à la fois de ses avantages et de ses inconvénients. Son spectre d'action très large, actif sur les formes végétatives et sporulées¹ des microorganismes, et sa capacité à atteindre les endroits les plus inaccessibles en font le procédé considéré comme le plus efficace.

Pour être efficace, la concentration de formaldéhyde gazeux doit être de 2 à 4 g/cm³, avec une humidité relative d'environ 80 % et un temps de contact de 2 heures. Cette désinfection a son utilité dans la lutte contre les infections nosocomiales. Elle permet de résoudre le problème posé par le matériel ne pouvant être stérilisé par aucun autre procédé. Toutefois, le formaldéhyde est corrosif. Il peut s'adsorber à la surface des objets ou diffuser dans la matière, puis se désorber après leur sortie de l'enceinte de désinfection (Fleurette, Freney et al., 1995).

Une utilisation optimale de ce produit requiert des conditions souvent difficiles à réaliser : nécessité d'une parfaite étanchéité des locaux et du maintien des conditions de température et d'humidité relative élevée (80 %), une neutralisation finale et totale par l'ammoniac pour éviter tout risque d'incommoder des patients par la présence d'éventuels résidus toxiques et très irritants. Cette toxicité est le facteur déterminant

¹ **Sporuler** : se couvrir d'une coque protectrice qui permette de traverser le temps sous un forme dormante.

qui fait que ce composé utilisé pur n'est plus agréé depuis une dizaine d'années en France (Wack E., 2000) (Chantefort A., 1994).

A titre comparatif, dans l'air **extérieur** les concentrations de formaldéhyde habituellement rencontrées sont très faibles et pratiquement toujours inférieures à 10 µg/m³. À l'**intérieur** (Tableau 4) la valeur maximale admise par l'OMS pour des personnes normales et non sensibilisées est de 100 µg/m³ avec une limite d'exposition de 30 minutes.

La concentration limite fixé par l'OFSP¹ est 125 µg/m³ dans les pièces habitées. Cependant, dans certains cas, ces concentrations peuvent être nettement supérieures et dépasser 1 mg/m³ (Roulet, 2004).

CONCENTRATIONS (mg/m ³)	OBSERVATIONS
0,03 - 0,6	- Odeur perceptible
0,6 - 1,2	- Irritation des yeux
5 - 6	- Larmes, pénible à supporter
37-60	- Danger immédiat pour la santé
60-125	- Décès

4.3 UTILISATION DE DISPERSATS

L'utilisation de dispersats est plus populaire que la diffusion de gaz. Il existe deux sortes de dispersats (Wack E., 2000) (Chantefort A., 1994):

1. les dispersats **non dirigés**, appelés **AEROSOLS**. La mise en œuvre du procédé est simple, pratique, peu onéreuse et ne nécessite aucune présence humaine. Le résultat est un film uniforme de désinfectant qui couvre l'ensemble des surfaces. Le temps pour arriver à ce résultat est relativement long, 4 heures en général. Pour les formulations à base de formaldéhyde, les contraintes sont identiques au procédé gazeux.
2. les dispersats **dirigés**, appelés **SPRAYS**. D'utilisation manuelle, ce procédé a l'avantage de pouvoir être utilisé dans des locaux non étanches ou d'occupation permanentes car la brièveté de leur application (quelques minutes) permet une

¹ OFSP : Office Fédéral de la Santé Publique.

réutilisation rapide des lieux. Pour l'AISS¹ ce procédé devrait être proscrit. La toxicité et la forte teneur en alcool des formulations nécessitent des précautions indispensables quand à la protection du personnel contre les intolérances, le risque d'inflammabilité potentiel et la responsabilité d'une utilisation non conforme ou insuffisante. De plus, on lui reproche un certain manque d'efficacité « in situ ».

4.4 DESINFECTION PAR VOIE AERIENNE

En milieu hospitalier français, la DVA est définie comme « **une désinfection obligatoire, effectuée hors présence humaine, à l'aide de procédés utilisant un couple appareil/produit agréé par le Ministère de la Santé** » Elle vise à réduire la contamination des surfaces de l'environnement proche du patient.

Jusqu'en 1974 cette méthode était aussi appelée désinfection terminale, et définie comme « une désinfection obligatoire des surfaces hors présence humaine, utilisant la voie aérienne, employant un produit désinfectant à base d'aldéhyde formique et utilisée après la sortie ou le décès d'un malade présentant une maladie à déclaration obligatoire » (*Wack E., 2000*). Le qualificatif de terminale laisse supposer un résultat total, c'est à dire absolu et définitivement maintenu. Cette affirmation est fautive et induit une erreur d'interprétation (*Chantefort A., 1994*). Après une désinfection, une surface peut être porteuse de microorganismes en nombre appréciable (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

En France, le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) dépendant du Ministère de la Santé depuis 1988 rédige et valide les protocoles des désinfections adaptés aux différentes situations à risque. La DVA est jugée utile dans les secteurs à haut risque infectieux (bloc opératoire) et les secteurs protégés (greffés, brûlés et hématologie). Elle est aussi recommandée dans les cas d'aspergilloses, de salmonelloses, de tuberculoses et d'infection à des germes résistants à au moins trois antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* méticilline-résistant, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella sp.* (*Wack E., 2000*).

Actuellement, la désinfection des surfaces d'un local n'est obligatoire en France, qu'après une maladie à déclaration obligatoire et ceci exclusivement avec des procédés ayant reçu un agrément ministériel.

La DVA à base de produits formolés hautement allergiques n'est préconisée que pour des patients profondément immunodéprimés, et lorsque les autres techniques se sont avérées insuffisantes (*Ducruet L., 2000*). Tous les procédés utilisant le formaldéhyde sous forme gazeuse ne sont plus reconduits actuellement (*Wack E., 2000*).

¹AISS : Association Internationale de Sécurité Sociale.

L'efficacité du produit doit être testé selon la norme Afnor NF T 72-281 intitulée « **Procédé de désinfection des surfaces par voie aérienne** » et le procédé doit être soumis pour évaluation au Laboratoire National de la Santé Publique. Sont agréés au niveau européen : 13 appareils générateurs d'aérosols, 12 formulations liquides aldéhydiques (formaldéhyde et glutaraldéhyde) pour une formulation à base de sels d'argent, de peroxyde d'hydrogène, d'acides acétiques et peracétiques. Deux formulations aldéhydiques contiennent du thymol (ES 312 de Diversey-Lever et R 406 Terminal de Phagogène).

La désinfection chimique de l'air a divisé la communauté médicale et scientifique des milieux hospitaliers pendant les années 80. Cependant, le fait que la DVA est appropriée pour la désinfection des surfaces fait l'unanimité des chercheurs.

LES PARTISANS DE LA DVA

La revue de la littérature à ce sujet montre qu'il y a des partisans du rôle infectieux des bactéries aéroportées (Ducel, Thaler et al., 1998) et de l'utilité de la DVA (Isoard, Calop et al., 1982). Une étude conduite dans un hôpital en Suisse montre que les bactéries trouvées dans la plaie opératoire d'une intervention orthopédique proviennent à 98% de l'air. Ces travaux considèrent la contamination induite par l'air comme la conséquence de la sédimentation directe des microorganismes sur les diverses surfaces des salles d'opérations. Il est alors capital de prévenir l'aéro-biocontamination directe ou indirecte via les instruments et les intervenants (Ducel G., 1998).

LES OPPOSANTS A LA DVA

« On ne désinfecte pas l'air d'un bloc opératoire, on le renouvelle ! » A. Chantefort

Tous les chercheurs n'adhèrent pas à une contamination des patients par les microorganismes dans l'air. Selon eux¹, la DAV est mythe ou un bluff et seule la filtration est efficace.

Ils estiment que son efficacité est généralement très surestimée par suite d'erreurs de méthodologie. Une fois celles-ci corrigées, la DVA reste un leurre car aucune preuve scientifique ni support théorique ne prouve que la désinfection des locaux entraîne une diminution notable des infections nosocomiales. Car rares sont les bactéries pathogènes à Gram négatif non sporulées capables de survivre longtemps hors de l'organisme humain (Fleurette, Freney et al., 1995).

¹ A. Chantefort, J. Druilles et M. Huet du Laboratoire National de la Santé et le CLIN Sud-Est notamment.

Aux USA le CDS (Centre for Disease Control) d'Atlanta classe la désinfection des locaux dans la catégorie faiblement recommandée. En Allemagne et en Suisse, la désinfection des surfaces par nébulisation, et par vaporisation d'aldéhyde formique fait partie des mesures de désinfections inutiles (Walsh, Maillard et al., 2003).

Nous avons vérifié cela à l'hôpital universitaire de Lausanne, le CHUV¹. Selon le Dr D. Blanc, épidémiologiste, les maladies contractées par l'air ne représentent que 1 % de la contamination de l'établissement. Les investigations dans ce sens ne sont pas encouragées.

4.4.1 Agents de désinfection

Les agents de désinfection de la DVA sont spécifiques au procédé. Pour obtenir cette appellation en France, les produits doivent subir un certain nombre de tests proposés par le comité normatif de l'Afnor. Dans tous les cas et sans exception, les agents désinfectants doivent faire la preuve de leur activité létale. Celle-ci équivaut à un abattement minimum de 10^5 microorganismes de la population initiale (bactéries ou champignons de souches définies) pour des conditions expérimentales données.

Selon la nature du contact entre le produit étudié et le ou les germes testés, ces essais peuvent avoir lieu en suspension ou selon la méthode dites des « portes germes ». Pour cette méthode, les microorganismes sont immobilisés sur des supports inertes. Ces supports sont ensuite exposés au produit en question soit par immersion totale, soit par application en surface d'un liquide, d'un aérosol ou de vapeurs.

4.4.2 Niveaux de désinfection et souches test

Il existe différents niveaux de désinfection qui correspondent chacun à un type de microorganisme ciblé (Tableau 5).

La bactéricidie sur les bactéries végétatives est le niveau de désinfection le plus bas, et le premier en général à être testé dans la recherche d'un agent de désinfection. Selon les résultats, il est alors possible d'augmenter le niveau de désinfection aux champignons, aux mycobactéries, à certains virus et finalement aux spores, espèce la plus résistante.

L'évaluation de l'activité d'un produit antimicrobien découle de l'extrapolation des résultats obtenus sur des souches test à des populations microbiennes, connues ou non. Pour cela, les souches test peuvent être sélectionnées pour être représentatives de flore standard, ou pour leur capacité de résistance. Les bactéries sélectionnées pour leur résistance entraînent une augmentation du coût des procédés, car les doses de

¹ CHUV : centre hospitalier universitaire vaudois, Lausanne.

désinfectant nécessaires sont généralement élevées. Les risques de toxicité et de corrosion augmentent par la même occasion (Fleurette, Freney et al., 1995).

Dans le cas de souches de flore standard, la présence d'une espèce inattendue qui présente la particularité (naturelle ou acquise) de ne pas répondre comme la flore standard, entraîne le risque de sélection d'une souche « résistante ». Malgré cela, et en règle générale, c'est la flore standard qui est examinée pour la constitution de souches test et notamment dans le cadre des normes françaises (AFNOR) et Européennes (CEN) (Fleurette, Freney et al., 1995).

Tableau 5 : Niveaux de désinfection par degrés de résistance (http://prodhybase.univ-lyon1.fr)		
Niveau désinfection	Cibles	Exemples de micro-organismes
BAS (bactéricidie)	Bactéries végétatives Gram positif et Gram négatif	Toutes les bactéries dans leur forme non sporulée et multi résistantes
BAS + compléments (fongicide)	Fungi : moisissures et levures	Moisissures : <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> y compris sous leur forme sporulée. Levures : <i>Candida</i> , <i>Pityriasis</i>
BAS + compléments	Petits virus et virus non lipidiques	Virus des hépatites, rotavirus, RSV.
INTERMEDIAIRE	Mycobactéries	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HAUT (sporocidie)	Spores	<i>Clostridium difficile</i> ou <i>Perfringens</i> sous leur forme sporulée

B) LES HUILES ESSENTIELLES

« Ce que voient les yeux n'est pas le remède ; lorsque la distillation aura transformé le végétal, alors le remède deviendra manifeste » Paracelse¹.

Les essences parfumées connues dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées à des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante de mondes antiques, de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce (*Blanc-Mouchet, 1987*). Parallèlement, on retrouve l'utilisation de végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation (*Franchomme, Pénéol et al., 1990*).

Les plantes, tout d'abord utilisées fraîches après la cueillette dans l'alimentation, sont séchées pour être conservées plus longtemps. Elles sont ainsi consommées en décoctions et en infusions et utilisées dans les formules de bains thérapeutiques. Puis les plantes odorantes sont brûlées en fumigations², mises à macérer dans des huiles végétales et dans des vins aromatiques. A cette époque apparaît la notion d'activité liée au pouvoir odorant des végétaux, car ils ont la vertu de traiter le corps et l'esprit. La recherche de moyens d'extraire ces principes odorants aboutit à l'invention de la distillation en Perse, entre 5 000 ans (découverte du premier alambic en terre cuite) et 1 000 ans avant notre ère. Le terme d'huile essentielle, encore utilisé de nos jours est lié au développement et au perfectionnement de ce procédé.

¹ Theophrastus Bombastus von Hohenheim, dit **Paracelse**: alchimiste et médecin suisse (1493 - 1541).

² **Fumigation** : technique ancestrale qui consistait à exposer une partie du corps à des fumées ou à des vapeurs médicamenteuses.

1. PRINCIPES GÉNÉRAUX

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs. Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limité ; *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* par exemple (Bruneton, 1999).

Selon la définition de la norme française¹ NF T 75-006 (AFNOR, 1980), l'huile essentielle est « **un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe² des Citrus, soit par distillation sèche** ».

Certaines fleurs dont les molécules sont trop fragiles pour survivre à une hydrodistillation sont extraites soit par des solvants organiques (hexane, éther de pétrole, éthanol) qui permettent l'obtention de concrètes³ ou d'absolues⁴ (Mimosa, Narcisse, Rose, Tubéreuse...), soit sur des supports lipidiques par la technique ancienne de l'enfleurage⁵ (Jasmin et Rose de Grasse). Les qualités organoleptiques de ces produits sont surtout exploitées dans l'industrie des arômes alimentaires et de la parfumerie. Dans ces domaines, les essences sont souvent modifiées, neutralisées, décolorées, rectifiées pour éliminer certains produits indésirables potentiellement irritants, allergènes ou photosensibilisants. Ces produits ne font pas partie de l'arsenal thérapeutique (**AROMATHERAPIE**), par opposition à la qualité modifiée utilisée en **AROMACHOLOGIE**⁶, qui mélange les produits synthétiques et les naturels.

¹ **AFNOR** : Association Française de Normalisation, Tour Europe, Cedex 7 - 92080 Paris.

² **Epicarpe**: pellicule, peau qui recouvre un fruit, partie externe du péricarpe (Larousse).

³ **Concrète** : produit solide ou semi-solide obtenu après l'extraction au solvant (ether de pétrole) des principes odorants de certaines matières premières végétales (jasmin, rose, mousse de chêne, etc.).

⁴ **Absolue** : les absolues sont des essences obtenues à partir de concrètes ou de résinoides par lavage de concrète à l'alcool éthylique. Après glaçage et filtrations pour éliminer les cires, elles sont concentrées par distillation sous pression réduite afin d'éliminer l'alcool.

⁵ **Enfleurage** : extraction des parfums des fleurs par contact avec une matière grasse.

⁶ **Aromachologie** : Concept datant des années 80, lors des premières études sur l'influence des parfums sur l'humeur et le comportement humain (Jellinek, 1995).

1.1 MATERIEL VEGETAL

Les huiles essentielles sont des mélanges odorants, complexes et variables de composés volatils extraits par distillation de matériel végétal de diverses origines :

Racine (*Vétiver*) - **bulbe** (*Ail*) - **rhizome** (*Gingembre*)

Tige (*Petits grains*) - **bois** (*Bois de Rose, Cèdre, Santal*) - **écorce** (*Cannelle*)

Feuille (*Citronnelle, Eucalyptus*) - **bourgeon** (*Pin*) - **sève** (*Encens, Myrrhe*)

Fleur (*Ylang-ylang, Rose, Lavande*) - **fruit** (*Orange*) - **graine** (*Muscade, Anis*)

Afin de leur garantir une composition 100 % naturelle, les plantes choisies sont sauvages ou proviennent de cultures écologiques et biologiques. Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (*Menthes*), pendant (*Romarin, Lavande*) et après celle-ci (*plantes à graines*) ou encore après la rosée du matin (*fleurs fragiles*).

Les rendements des procédés d'extraction sont en général extrêmement faibles. Le temps de distillation varie entre 1 et 2 heures. Pour obtenir 1 kg d'huile essentielle il faut compter :

4 à 12 tonnes d'herbe de Mélisse citronnée,

3,5 à 4 tonnes de pétales de Rose de Damas soit la superficie d'un ha de rosiers,

150 kg de sommités fleuries de Lavande fine,

50 kg de Lavandin,

20 kg de fruits de Badiane de Chine,

6 à 7 kg de boutons floraux de Clous de Girofle.

Les huiles essentielles sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate : à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de température.

1.2 COMPOSITION CHIMIQUE

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion.

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont **poly-moléculaires**, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on

retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Il existe quelques huiles dites **mono-moléculaires**, telle le Bois de Rose (*Aniba rosaeodora*), la Menthe Pouliot (*Mentha pulegium*) ou la Gaulthérie couchée (*Gaultheria procubens*) qui sont constituées presque exclusivement d'une molécule majoritaire.

La Sauge sclarée (*Salvia sclarea*), le Citron (*Citrus reticulata*) et le Clou de Girofle (*Eugenia Caryophyllus*) sont **bi-** et **tri-moléculaires**.

Les huiles essentielles sont aussi **homogènes** ou **hétérogènes** dans leur composition au regard de la structure chimique des composés. Extrêmement nombreux - près de 10000 sont chimiquement définis - on peut les grouper dans les différentes familles de composés chimiques.

Les composés des huiles essentielles ont une masse moléculaire relativement faible (terpènes : 136 u.m.a.¹, terpénols : 154 u.m.a., et sesquiterpènes : 200 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives.

1.2.1 Structure de base et sites fonctionnels

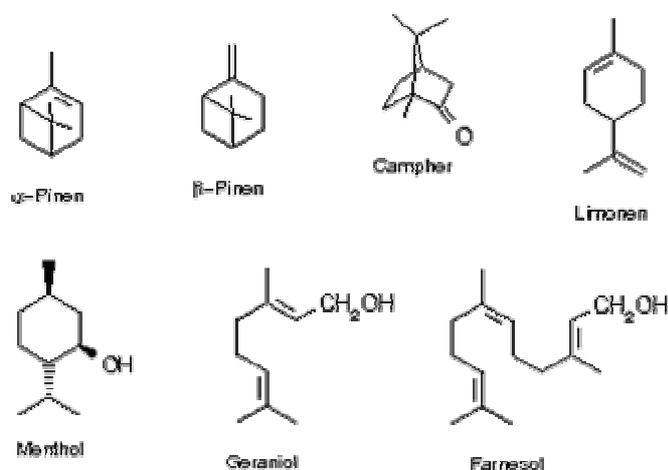


Figure 8 : Structure chimiques de quelques composés extraits des huiles essentielles

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés -N ou soufrés -S (Figure 8).

¹ u.m.a. : unité de masse atomique.

Cette structure varie en fonction (*Franchomme, Pénoël et al., 1990; Mailhebiau, 1994*) :

- Du **nombre d'atomes de carbone** qui la constitue :
 - les monoterpènes C_{10} ,
 - les sesquiterpènes C_{15} ,
 - et plus rarement diterpènes C_{20} .
- Du caractère **saturé** ou **insaturé** des liaisons.
- De leur agencement : **linéaire** ou **cyclique**.
- De la **configuration spatiale** (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).
- De la nature des groupes fonctionnels :
 - Terpènes $R_1-HC=CH-R_2$ -Alcools terpéniques $R-OH$ -Cétones R_1-CO-R_2
 - Phénols C_6H_6-OH - -Aldéhydes $R-CHO$ -Esters $R_1-COO-R_2$
 - Ethers R_1-O-R_2 .

1.2.2 Contrôle qualité

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants.

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Figure 9).

Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement « végétale », contrairement aux essences synthétiques ou « identiques naturelles » intégralement reconstituées à partir de composés chimiques de synthèse.

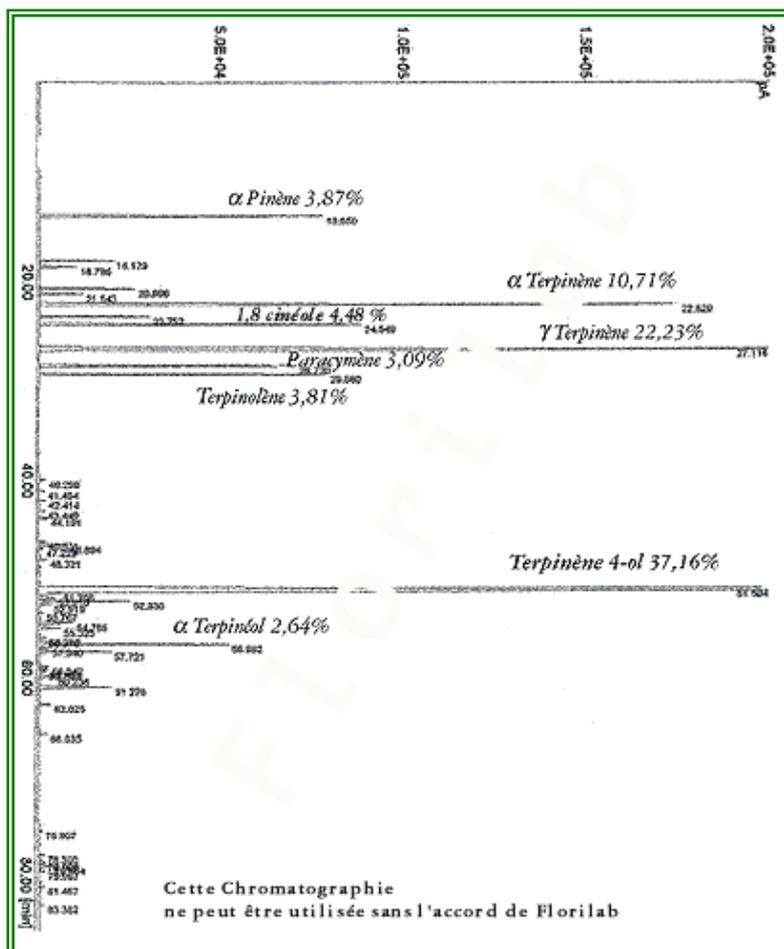
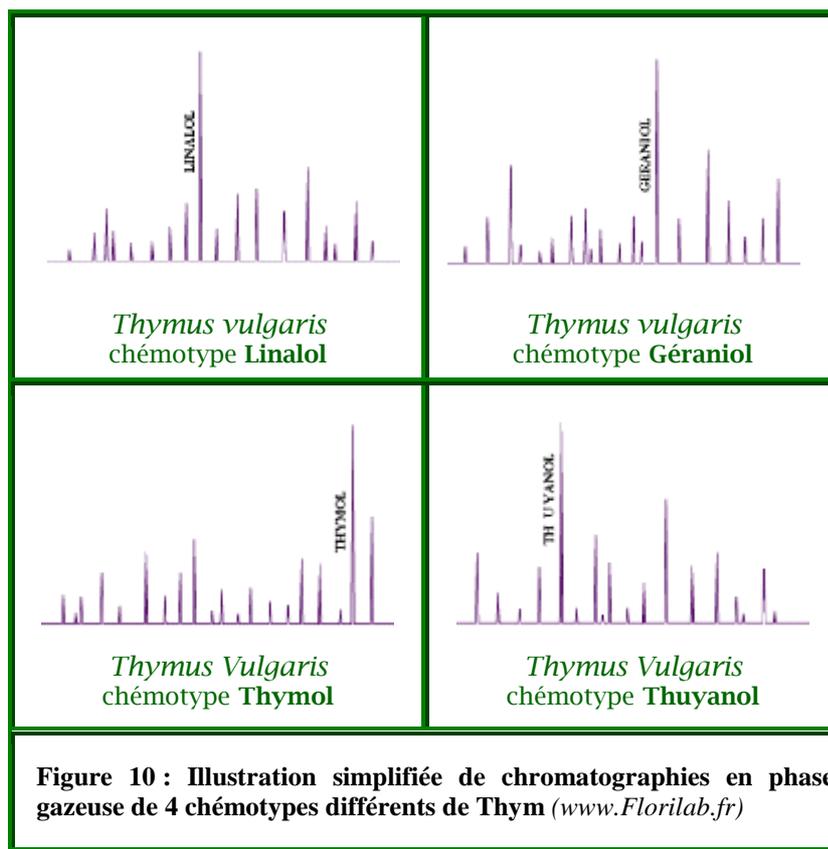


Figure 9 : Profil chromatographique d'une huile essentielle de Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*) et ses composés majoritaires

En aromathérapie, l'utilisation de tels profils est indispensable pour différencier dans une même espèce les variations chimiques induites par différents facteurs qui ont une influence sur la biosynthèse végétale, tels que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol. Ils permettent de définir le **CHÉMOTYPE** ou race chimique de l'espèce concernée. En effet, l'observation d'un massif de Thym et la connaissance de son origine ne suffisent pas à caractériser son huile essentielle.

Par exemple, une huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut être à chémotype thymol, linalol, thuyanol, géraniol (Figure 10). Botaniquement, il s'agit de la même plante de la famille des *Lamiacées* (ou *Labiées*).

Cette notion de chémotypes est fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques spécifiques peuvent être très différentes.



1.3 TOXICITE POUR L'HOMME

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées.

On trouve cependant quelques informations sur les toxicités suivantes :

1.3.1 Toxicité par ingestion

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 ¹ supérieure à 5 g/kg. En ce qui concerne la Sarriette et l'Origan la toxicité est un plus élevée autour des 1.4 g/kg (données observée chez l'animal) (Bruneton, 1999). Chez l'homme des intoxications aigues sont

¹ La DL 50, ou dose létale (ou mortelle) à 50%, est l'abréviation utilisée pour désigner la dose entraînant la mort de 50% de la population examinée. La DL50 est exprimée en milligrammes par kilogramme de poids corporel de l'animal soumis à l'essai.

possibles. Les accidents graves, le plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles : Girofle (eugénol), Eucalyptus, Gaulthérie (salicylate de méthyl). Un cas de décès aux USA a été enregistré après l'ingestion de 60 ml de Gaulthérie¹.

1.3.2 Toxicité dermique

Le large usage que font la parfumerie et la cosmétique de ces huiles essentielles a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aigue ou chronique) par application locale. Tous les ouvrages traitant des huiles essentielles donnent des concentrations maximales, les évictions, et les mises en garde nécessaires. Le Thym, l'Origan, la Sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant, l'Angélique et la Bergamote sont photosensibilisantes, la Cannelle est dermocaustique et allergisante pour les terrains sensibles.

1.3.3 Toxicité selon la composition

Certains auteurs (*Franchomme, Pénoël et al., 1990; Mailhebiau, 1994*) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des huiles essentielles à thuyones (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) est neurotoxique. Ces huiles, dont la liste n'est pas exhaustive, sont inscrites dans un décret du Code de la Santé Publique Française datant de 1986 visant à interdire leur vente en France. Certaines d'entre elles sont néanmoins en vente libre dans les autres pays européens moins restrictifs, la Suisse incluse.

1.3.4 Toxicité sur cellules animales ou humaines

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques.

Les huiles essentielles de Thym et de Lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du Thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la Lavande (*Inouye, 2003a*)), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'Origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (*Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996*).

¹ Noter la quantité impressionnante que représente l'ingestion de 60 ml. En aromathérapie, la quantité ingérable d'une huile essentielle est de quelques gouttes (20 µl environ) dans du miel ou dans un dispersant.

1.4 APPLICATIONS THERAPEUTHIQUES

Les applications thérapeutiques des huiles essentielles sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain.

Nous recommandons les ouvrages spécifiques au traitement par les huiles essentielles suivant (*Valnet, 1964; Tisserand, 1988; Franchomme, Péroël et al., 1990, 1990; Schnaubelt, 1998; Zimmermann, 1998; Bruneton, 1999; Schnaubelt, 1999; Baudoux, 2000; Bosson et Dietz, 2004*), sans toutefois négliger l'importance d'un diagnostic précis établi par un professionnel compétent.

2. ACTIVITÉ DES HUILES ESSENTIELLES

2.1 HISTORIQUE

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr Gattefossé, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées (*de Billerbeck, 2000*), et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (*Pibiri, Seigniez et al., 2001*).

2.2 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

2.2.1 Bactéricidie et bactériostase

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes une activité létale (**bactéricidie**) et une inhibition de la croissance (**bactériostase**).

L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant les études suivantes ont montré que certains constituants chimiques des

huiles essentielles ont des **propriétés bactéricides** (Kunle, Okogun et al., 2003), (Carson et Riley, 1995), (Lambert, Skandamis et al., 2001), (Walsh, Maillard et al., 2003) et fongicides (Hammer, Carson et al., 2003).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium K^+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémice de leur mort (Helander, Alakomi et al., 1998; Lambert, Skandamis et al., 2001). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines huiles essentielles (Cox, Mann et al., 2000).

Une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de Thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montrée que dans la majorité des expériences, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles incriminées sont bactéricides (Cosentino, Tuberoso et al., 1999).

Des clichés de microscopie électronique illustrent ces études en montrant les dommages de cellules des microorganismes suivants:

1. *Staphylococcus aureus* en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols (Franchomme, Pénoël et al., 1990),
2. des cellules d'*Escherichia coli* visiblement très endommagées par l'Origan compact qui collapsent après 1 minute de contact (Burt et Reinders, 2003),
3. la lyse de cellules fongiques provoquée par la Citronnelle de Java, *Cymbopogon nardus* (de Billerbeck, 2000).

2.2.2 Souches microbiennes

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle.

Les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram- (Zaika, 1988). Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000), ou dépend des huiles essentielles utilisées (Deans et Ritchie, 1987).

Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Cosentino, Tuberoso et al., 1999; de Billerbeck, 2000).

2.2.3 Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité

Selon la littérature, la diffusion sur gélose et la dispersion en microatmosphères mettent en évidence l'activité biostatique (Hermal, 1993), et les mélanges en bouillon nutritif, l'activité biocide (Sarbach, 1962). Mais des études récentes se sont affranchies de la méthodologie et des essais gélosés peuvent aussi bien démontrer des effets biocides (Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996).

2.2.3. a) Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- **Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

EXEMPLES

Bactéries à Gram positif : des associations d'huiles essentielles **Cannelle** et de **Thym** sont synergiques ou indifférentes sur *Staphylocoque aureus*. En revanche elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus* (Hermal, 1993).

Bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* : des associations ne sont pas plus efficaces que les huiles essentielles pures et sont souvent indifférentes. En revanche une prédominance de Cannelle est plus efficace que celle de Thym, contrairement aux bactéries à Gram positif (Hermal, 1993).

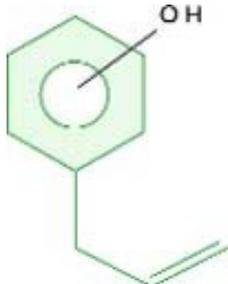
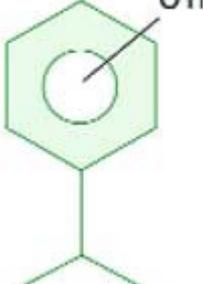
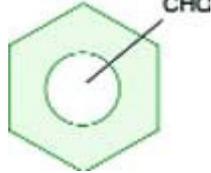
2.2.3. b) Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés **minoritaires** agissent de manière **synergique**. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « **totum** », c'est à dire dans l'**intégralité** de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Les molécules réputées actives sont des **terpénoïdes**, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (Griffin, Wyllie et al., 1999). L'effet des terpénoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule (Knobloch et al. 1986, 1988 (Dorman et Deans, 2000).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des **phénols** (*thymol*, *carvacrol* et *eugénol*) des **alcools**, (*α-terpineol*, *terpinen-4-ol*, *linalol*), des **aldéhydes**, des **cétones** et plus rarement des **terpènes** (Cosentino, Tuberoso et al., 1999; Dorman et Deans, 2000). Les principaux terpénoïdes actifs sont décrits ci-dessous et illustrés dans le (Tableau 6).

Tableau 6 : Structure générale des principaux agents antimicrobiens		
 <p>ALCOOLS</p>	 <p>PHENOLS</p>	 <p>ALDEHYDES</p>

● Les **ALCOOLS** sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (*Dorman et Deans, 2000*).

● Les **ALDEHYDES** sont de puissants agents antimicrobiens. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (*Franchomme, Pénoël et al., 1990; Dorman et Deans, 2000*).

● Les **PHÉNOLS** sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le **thymol** et l'**eugénol** sont responsables de l'activité fongicide (*Bennis, Chami et al., 2004*) et bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (*Cox, Mann et al., 2000; Lambert, Skandamis et al., 2001; Walsh, Maillard et al., 2003*). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Echericha coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K^+ . En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (*Walsh, Maillard et al., 2003*). Plus les teneurs phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (*Cosentino, Tuberoso et al., 1999*). Cependant les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (*Cosentino, Tuberoso et al., 1999*).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des composés chimiques isolés est **qualitativement identique**. Cependant il existe des différences **quantitatives**.

Certaines études ont montré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément (*Lahlou, 2004*). Les **composés purs**, le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de Thyms. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (*Didry, Dubreuil et al., 1993*)

Cependant une étude (*Lambert, Skandamis et al., 2001*) ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés. Une combinaison de concentrations comparables en thymol et en carvacrol reproduit bien l'inhibition de l'huile essentielle mais les autres composés minoritaires ont pour effet de **diminuer** l'effet des principaux composés actifs phénolés.

2.3 METHODES DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité anti-microbienne des huiles essentielles. L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

1. selon le **milieu** dans lequel se fait la **diffusion** de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
2. selon la nature du **contact** de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

Ces différentes techniques sont répertoriés et décrites dans des mémoires de thèses de doctorat (*Porcher-Pimpard, 1942; Auriol, 1990; Poudevigne, 1991; de Billerbeck, 2000*) ainsi que dans différentes publications (*Zaika, 1988; Smith et Navilliat, 1997; Mann et Markham, 1998; Lahlou, 2004*).

2.3.1 Aromatogramme

« **L'aromatogramme est à la Phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la Pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine** ». Cette transposition due au Dr M. Girault dès 1971, est décrite dans le tome III du Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie (*Belaiche, 1979*).

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (*Fauchère et Avril, 2002*). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar¹ réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (Figure 11).

¹ L'**agar** est un polysaccharide extrait d'algues et capable d'absorber jusqu'à 500 fois son volume d'eau. Il est soluble dans l'eau à 100°C. Une fois solidifié, la solution d'agar est un gel transparent chimiquement inerte et stable.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère et Avril, 2002).

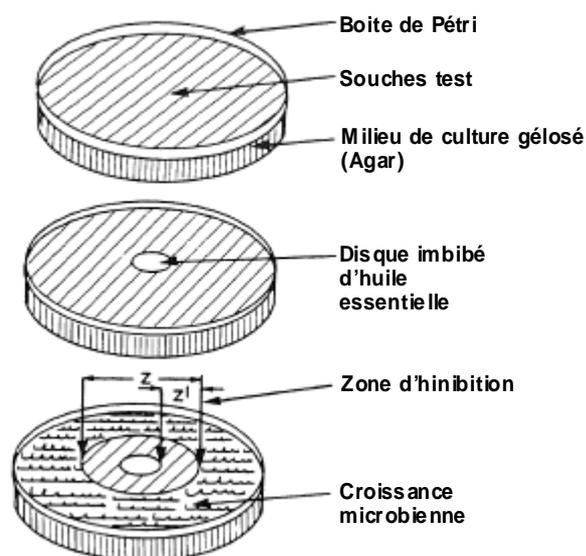


Figure 11 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988)

Cette méthode utilisée par certains auteurs (Deans et Ritchie, 1987; Zaika, 1988; Carson et Riley, 1995; Pattnaik, Subramanyam et al., 1996; Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996; Smith-Palmer, Stewart et al., 1998; Lis-Balchin, Hart et al., 2000; Burt et Reinders, 2003; Faleiro, Miguel et al., 2003; Kunle, Okogun et al., 2003) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer dans un premier temps les huiles essentielles sélectionnées dans la littérature pour leur activité antimicrobienne.

2.3.2 Microatmosphères

Dérivé de la méthode précédente le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure 12).

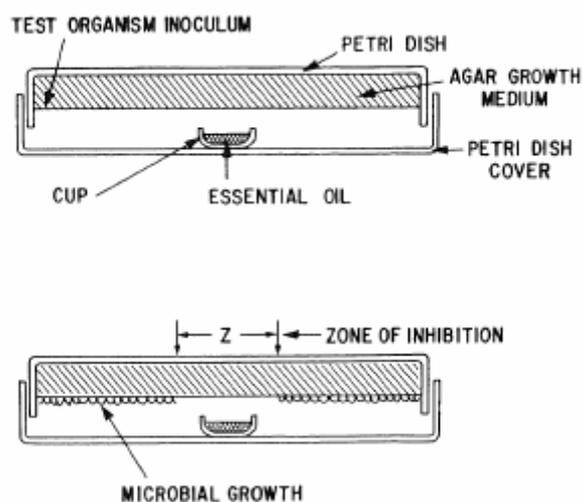


Figure 12 : Illustration de la méthode des microatmosphères (Zaika, 1988)

Nous les avons utilisés pour nous rapprocher un peu plus du sujet de cette thèse dont le but est d'exploiter les propriétés de la phase volatile des huiles essentielles. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (Sarbach, 1962; Didry, Dubreuil et al., 1993; de Billerbeck, 2000; Pibiri, Seigniez et al., 2001).

ASSAINISSEMENT DES UNITÉS DE TRAITEMENT DE L'AIR AU MOYEN D'HUILES ESSENTIELLES

« La désinfection par voie aérienne se développera encore lorsque l'on aura mis au point des produits sans formol efficaces, moins irritants que les formulations actuelles »

A. Chantefort

2.4 ÉTAT DE L'ART

Dès les temps les plus anciens, des substances d'origine naturelle ont été utilisées pour supprimer les effluves imputées à la putréfaction des matières organiques (Fleurette, Freney et al., 1995).

Jusqu'aux premiers travaux sur les microorganismes, vers 1860, les odeurs sont même tenues responsables de nombreuses maladies. Les termes de « miasmes morbides », d'un « air infecté d'exhalaisons morbidiqes », de « corruption meurtrière de l'air » montrent la puissance des croyances de l'époque, qui attribuent aux mauvaises odeurs véhiculées par l'air un pouvoir mortel sur les individus. Pour purifier l'atmosphère, chasser l'air vicié et se protéger des maladies, une profusion de substances odorantes est utilisée afin de créer des atmosphères qui se substituent aux odeurs mortelles (Blanc-Mouchet, 1987).

« Plus l'odeur est forte, plus l'effet est puissant ». Cette affirmation est demeurée ancrée dans l'inconscient collectif, car longtemps l'efficacité des procédés chimiques de désinfection de l'air a été mesurée à l'intensité de l'odeur dégagée, cela suffisait à persuader les gens de l'efficacité du procédé (Chantefort A., 1985).

Utiliser les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles pour proposer une alternative efficace et saine aux produits utilisés dans les systèmes de ventilation est l'idée originale et innovatrice présentée dans ce travail.

2.4.1 Produits commerciaux

Alors que les agents de désinfection évoqués sont souvent composés de produits généralement nocifs, nombreuses sont les formulations sur le marché qui revendiquent la présence d'huiles essentielles. Les fabricants se basent sur l'activité présumée d'extraits végétaux pour satisfaire à la demande du marché en produits naturels, cherchant à séduire le consommateur.

Dès les années 80 les japonais furent les premiers à diffuser des parfums dans les bâtiments via les systèmes de ventilation. Cependant la réponse des occupants n'a jamais été définie avec précision. Il semblerait que 32% des installations ne soient plus en fonction et qu'aucun effet psychologique ou physiologique n'ait été démontré (*Nakagaki, M. et al., 1996*). A l'époque quelques sociétés européennes se sont aventurées dans le parfumage de l'air, la plus part ont fait faillite, les produits n'étant pas adéquats ou le marché pas encore mûre.

Les compositions à base de produits chimiques identiques aux huiles essentielles, pris individuellement ou en mélange (terpènes, oxydes, phénols par exemple) font l'objet de nombreux brevets actuels (US -Patent & Trademark Office, F -Institut National de la Propriété Industrielle)¹ Certains brevets mettent en avant l'utilisation de produits dérivés des huiles essentielles, laissant sous-entendre la présence de composés naturels (US 5403587). D'autres avancent des caractéristiques « non toxiques » des huiles essentielles dans des formulations semi synthétiques ou totalement synthétiques (WO 97/25404). Deux formulations agréées de désinfection sur le marché français comportent du thymol synthétique, un phénol présent dans certaines huiles essentielles (*Wack E., 2000*).

Une étude parue en 1985 (*Chantefort A., 1994*) passe en revue divers procédés et formulations de désinfection par voie aérienne. Deux d'entre elles contenaient des huiles essentielles, testées avec un générateur d'aérosol dans les conditions expérimentales suivantes :

Formulation produit a : phénols, camphre, huiles essentielles d'Eucalyptus, Girofle, Pin. Pulvérisation de 500 µl/m³ d'air toutes les 12 heures.

Formulation produit b : phénols, alcools terpéniques, huiles essentielles de Thym, Lavandin, Menthe, Eucalyptus, Pin et Citronnelle. Pulvérisation de 400 µl/m³ d'air toutes les 6 heures.

Les résultats ne commentent pas malheureusement pas la présence de produits naturels ou synthétiques. Ils mettent seulement en avant la faible efficacité de la DVA.

2.4.2 Recherches académiques

Trois études ont inspiré ce travail de thèse.

● La première étude exhaustive, à notre connaissance, sur la désinfection de l'air au moyen d'huiles essentielles est un travail de doctorat français intitulé : « **Contribution**

¹ <http://fr.espacenet.com>

à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères » (Sarbach, 1962). Ce travail quoiqu' ancien est extrêmement pertinent, même si il n'inclue ni les dernières découvertes sur la microbiologie de l'air, ni l'avancement de la recherche sur les huiles essentielles. L'auteur passe en revue la nature et les modalités des contaminations microbiennes de l'air, il y fait le point sur les méthodes de prélèvement et les moyens chimiques de désinfection de l'époque. L'étude concerne l'action antimicrobienne de 54 huiles essentielles, selon trois techniques proposées, testées sur 6 germes avec un comparatif sur 23 antibiotiques. Il conclue par l'activité bactéricide et sporicide des huiles essentielles en phase liquide et par l'activité bactériostatique selon la méthode des aromatoigrammes et des microathmosphères. Le lien avec l'air est peu explicite.

● Le deuxième ouvrage sur lequel s'appuie ce travail est un mémoire de thèse paru en France juste au moment de l'élaboration du plan de cette thèse : « **Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus Niger*. Evaluation d'un bio réacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur** » (de Billerbeck, 2000). Orienté plus particulièrement sur les dégradations du patrimoine dans les musées, ce travail très complet passe tout d'abord en revue les différentes méthodes existantes, pour se concentrer dans la seconde partie sur la conception de réacteurs afin d'évaluer uniquement l'activité de la phase gazeuse d'une huile essentielle sélectionnée. Les techniques présentées sont : microathmosphères, micro-chambres sur lames gélosées, chambres de cultures à deux compartiments, réacteurs de 2 et 16 litres. Ce travail de thèse contient la preuve irréfutable de l'action des huiles essentielles en phase gazeuse sur *Aspergillus niger*. Des photos prises tout au long des expériences montrent les modifications morphologiques létales dues à l'effet de l'huile essentielle choisie.

● Actuellement une équipe, au Japon, travaille sur l'activité des huiles essentielles en **phase gazeuse** (Inouye, Abe et al., 2003; Inouye, 2003a, 2003b). Leur dispositif expérimental permet d'effectuer des prélèvements dans des boîtes test étanches de 1,3 litres afin de déterminer les concentrations en huiles essentielles. Selon les résultats, les valeurs des doses minimales inhibitrices (MID) des huiles essentielles en phase gazeuses sont plus faibles que les concentrations minimales inhibitrices (MIC) en phase liquide. La bioactivité des huiles essentielles est plus importante en phase gazeuse qu'en phase liquide, en particulier sur les champignons filamenteux et sur les bactéries à Gram négatif. Ceci est en accord avec la sensibilité des germes aux huiles essentielles.

Ces trois études arrivent à une conclusion identique : la **sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles en phase gazeuse** et le **potentiel d'utilisation en diffusion aérienne**.

● Nous pouvons encore citer une étude anglaise récente (*Higgins, Gaunt et al., 2004*) sur l'activité bactéricide de **bougies aux huiles essentielles**. La présence d'espèces ionisées par la flamme et bactéricides, et les huiles essentielles contenues dans la bougie montre un effet synergique de l'activité bactéricide sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette activité est nettement supérieure à l'utilisation des huiles essentielles en phase gazeuse seules. Selon nous, les techniques de diffusion par évaporation forcée ou par combustion directe sont à éviter à cause de la dégradation des huiles essentielles au contact de températures élevées.

2.5 POTENTIEL DE L'UTILISATIONS DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES SYSTEMES DE VENTILATION

*« Le principal soing que j'aye à me loger, c'est de fuir l'air puant et pesant. Les medecins pourroient (ce crois-je) tirer des odeurs, plus d'usage qu'ils ne font : car j'ay souvent apperceu qu'elles me changent, et agissent en mes esprits »
Montaigne 1580, Des Senteurs, Essais-Livre I, chapitre LV.*

La qualité de l'air à l'intérieur des bâtiments publics et des habitations nous touche particulièrement; nous y passons 80 % de notre temps. Alors que la présence de microorganismes indésirables peut nuire à l'état de santé général des occupants, la présence de composés odorants a aussi un impact important sur le sentiment de bien-être des mêmes occupants dans les bâtiments.

2.5.1 Qualité de l'air intérieur et confort olfactif

Dans les bureaux le confort ressenti, appelé parfois « bien-être sur la place de travail », dépend de nombreux paramètres comme la température, l'humidité, la ventilation, la qualité de l'air, la lumière, le bruit, le taux d'occupation. La composante olfactive de la qualité de l'air est un facteur déterminant de ce sentiment de confort. En effet, le confort olfactif est le second critère de perception de la qualité de l'air, après le confort thermique (*von Kempfski, 1998*). Cette notion est aussi associée à la productivité et la performance des occupants, qui peuvent augmenter jusqu'à 10% après une amélioration des conditions environnementales et en particulier de la qualité de l'air intérieur (*Clements-Croome et Baizhan, 2000; Wargocki, Wyon et al., 2000*).

Compte tenu du lien particulier et privilégié entre l'odorat et le cerveau (Annexe A-II), notre perception des odeurs a une grande influence sur notre comportement (*Schön et Hübner, 1996*). Il est donc raisonnable de considérer l'impact neurophysiologique et psychologique que peuvent avoir les mauvaises odeurs, mais aussi les « bonnes odeurs ». L'élimination de toutes substances odorantes dans l'air n'augmente pas le

taux de satisfaction de tous les occupants, qui jugent parfois l'air « artificiel », et peuvent invoquer le manque d'air frais dans leurs critères d'évaluation (*Schreiber et Fitzner, 2000*). La qualité « gustative » de l'air intérieur est un facteur déterminant du sentiment de confort général ressenti.

L'environnement urbain et le raffinement obtenu après les unités de traitement de l'air fournissent un air terriblement appauvri en substances olfactives. La qualité de l'air est nettement améliorée si l'on agit conjointement sur le confort thermique et sur le confort olfactif. Une utilisation très parcimonieuse des stimulants olfactifs naturels, à des concentrations à la limite du seuil de détection est souhaitable (*von Kempster, 1997*). Si l'on compare la pureté de l'air avec celle de l'eau, cette thèse a tout son sens. Une eau trop pure n'a pas un bon goût. De la même manière un air pur peut ne pas être perçu comme agréable.

La qualité de l'air et les mauvaises odeurs sont des sujets bien étudiés, pour tout ce qui concerne la caractérisation et la suppression des sources polluantes souvent accompagnées d'émissions malodorantes. Ces recherches sont nécessaires et justifiées, ce qui n'est pas encore le cas pour toute amélioration par addition ou simple recherche esthétique dans le domaine de la qualité de l'air. Il est souvent délicat d'introduire (voir d'imposer) des produits odorants, sources potentielles de gêne et d'allergies pour les occupants. Les notions de confort et de bien-être appliquées au sens olfactif sont relativement récentes et les parfums d'ambiance, diffuseurs, bougies parfumées sont un marché jeune et en pleine expansion bien que parfois leur toxicité soit avérée. Une étude parue dans le Magazine « Que Choisir » (*Chesnais et Corre, 2004*) dresse le portrait de désodorisants d'intérieur synthétiques ou à base de produits naturels et de leurs émissions en produits cancérigènes et allergènes. Il est relevé que les produits à base d'huiles essentielles, contrairement aux produits de synthèse, sont notés pour leur pouvoir allergisant ou irritant et non pour le relargage de substances cancérigènes (benzène, formaldéhyde, styrène et naphthalène) ou de perturbateurs endocriniens (phtalates, muscs) ou d'autres substances préoccupantes comme le toluène qui est neurotoxique, les xylènes, l'acétaldéhyde potentiellement cancérigènes et le paradichlorobenzène, puissant irritant respiratoire.

2.5.2 Modes de diffusion dans les installations de ventilation

Le procédé consiste à évaporer des huiles essentielles dans le flux d'air, à des dosages tels que la concentration soit non allergène, mais aussi agréable au niveau de la perception olfactive. Ces concentrations sont faibles, et peut être insuffisantes pour avoir un effet significatif sur les bactéries aéroportées. Toutefois, les composants volatils des huiles s'adsorbent sur les parois et les composants des installations de

ventilation, et la concentration superficielle peut être suffisante pour avoir un effet bactériostatique, voire bactéricide.

2.5.3 Avantages des huiles essentielles

La qualité de l'air et les mauvaises odeurs sont deux sujets bien étudiés, pour tout ce qui concerne la caractérisation et la suppression des sources polluantes souvent accompagnées d'émissions malodorantes. Ces recherches sont nécessaires et justifiées, ce qui n'est pas encore le cas pour toute amélioration par addition ou simple recherche esthétique dans le domaine de la qualité de l'air. Il est souvent délicat d'introduire (voir d'imposer) des produits odorants, sources potentielles de gêne et d'allergies (*Schreiber et Fitzner, 2000*).

Les huiles essentielles sont connues et utilisées depuis plus de 6000 ans. Ces extraits odorants de plantes ont de multiples vertus thérapeutiques. En plus de leurs actions bactéricides et fongicides, elles ont la particularité d'avoir des effets psychophysiologiques (*Tisserand, 1988*). Ces effets sont mesurés au niveau cérébral par CNV¹ ou par électroencéphalographies. Certaines huiles essentielles sont stimulantes : Basilique, Patchouli, Menthe, Pin, et d'autres sont sédatives : Bergamotte, Camomille, Géranium, Bois de Santal et Citron (*Manley, 1993*).

2.5.4 Développement durable

L'utilisation de produits désinfectants classiques se fait de plus en plus au détriment de la nature et des hommes puisque les produits chimiques utilisés sont souvent dangereux à manipuler et participent à la dégradation de l'environnement (résidus polluants et nocifs, dans l'air et dans l'eau). L'objectif de l'utilisation des huiles essentielles est de répondre de manière écologique aux divers problèmes de contaminations des systèmes de ventilation. Les huiles essentielles sont généralement bien acceptées en diffusion aérienne et les réactions allergiques sont considérablement réduites par rapport à l'utilisation de parfums et autres préparations conventionnelles de nature synthétique. Il faut tout de même savoir que nombreux sont les produits désodorisants et les produits d'entretien parfumés utilisés couramment dans les bâtiments. Personne ne mentionne les possibles effets et incidences sur le bien-être, ou sur la santé de ces substances. On sait pourtant que l'industrie de la parfumerie s'est vue interdire il y a quelques années l'utilisation de certains composés toxiques dans la formulation de parfums bon marché.

¹ CNV : Contingent negative variation ; technique de mesure de l'activité cérébrale et des réponses aux stimuli olfactifs.

Les huiles essentielles diffusées dans l'air peuvent ne pas être appréciées pour leur odeur, cependant les réactions négatives sont rares puisqu'elles reproduisent des odeurs propres à la nature.

Nous pouvons recommander l'usage d'huiles essentielles sélectionnées pour la désinfection des atmosphères tant en raison de leur indéniable pouvoir bactériostatique et bactéricide qu'en raison de l'agrément de leur emploi et de leur absence de nocivité » R. Sarbach

CHAPITRE II

ESSAIS PRELIMINAIRES

EFFETS QUALITATIFS DES HUILES ESSENTIELLES, CHOIX DES SOUCHES MICROBIENNES ET DES METHODES

La problématique de la thèse est de rester le plus proche possible des conditions réelles des systèmes de ventilation.

Pour cela, nous avons d'abord vérifié :

- la présence de microorganismes dans l'air et dans les systèmes de ventilation,
- les effets des huiles essentielles sur ces divers microorganismes.

Nous avons appliqué plusieurs méthodes d'échantillonnage car les germes se présentent sous différentes formes dans les systèmes de ventilation. Ils peuvent être aéroportés ou aérodéposés et fixés dans des biofilms, à la surface des canaux et des différents unités de traitement de l'air.

Comme la suite du travail consiste à démontrer l'effet bactéricide ou bactériostatique des huiles essentielles, nous avons défini les souches bactériennes test et sélectionné le dispositif expérimental.

3. INFLUENCE DES HUILES ESSENTIELLES SUR LES MICROORGANISMES PRÉSENTS DANS LES SYSTÈMES DE VENTILATION

Les essais suivants ont permis de :

1. vérifier le fonctionnement de l'appareillage de mesure,
2. évaluer la faisabilité des mesures,
3. tester sur des microorganismes variés une huile essentielle modérément active.

3.1 SITES DE PRELEVEMENT

Une série de 3 mesures a été effectuée à l'EPFL entre avril et mai 2001 dans des salles de cours, des bureaux et des installations de ventilation soit :

- **Bureau LE-101** au LESO¹, bâtiment LE,
- **Salle de cours GR B30** du bâtiment de Génie Rural,
- **Systèmes de ventilation** du Centre Ouest (P11/E11, P12/E12, P15/E15).

3.2 MATÉRIEL UTILISÉ

PRELEVEMENT DES MICROORGANISMES : Parmi les méthodes de prélèvement mentionnées dans le Chapitre I (centrifugation, électroprécipitation, impacteur, « liquid impiger », filtration d'air) nous avons choisi un aérobiocollecteur, appelé aussi impacteur. Il s'agit du modèle MAS 100 Eco de la société MBV (Photo 3).



Photo 3 : Impacteur MAS-100 Eco de MBV.

C'est un appareil portable et programmable, prévu pour des manipulations simples de contrôle de la charge microbienne. Il collecte un volume précis l'air à travers 400 trous calibrés pendant un temps défini, à la vitesse de 100 l/minute. L'air collectée est projetée sur une boîte de Pétri gélosée pour permettre le décompte des colonies formées (UFC) après incubation.

¹ **LESO** : Laboratoire d'Energie Solaire et de Physique du Bâtiment.

MILIEU GELOSE : milieu gélosé non spécifique et favorable au développement des bactéries et champignons en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre (Plate-count-agar PCA Merk 1.05463).

HUILE ESSENTIELLE : une huile essentielle recommandée pour les enfants, riche en monoterpénols et exempte de phénols a été sélectionnée pour son caractère antimicrobien « doux » : **Bois de Rose** du Brésil, *Aniba roseodora* (Oshadi).

3.3 DEROULEMENT DES EXPERIENCES

Deux séries de prélèvements d'air d'un volume de 250 et de 500 l ont été réalisées pour un échantillon témoin et un échantillon test destiné à être mis en contact de l'huile essentielle choisie sur chaque site, soit :

- la salle de cours GR B30,
- le bureau LE-101,
- et chaque point de mesures des trois installations de ventilation du Centre Ouest (P11/E11, P12/E12 et P15/E15) (Figure 13) avec :
 - « **Outdoor air** » = air arrivant de l'extérieur,
 - « **Supply air** » = air pulsé dans l'espace ventilé,
 - « **Extract air** » = air vicié extrait de l'espace ventilé,
 - « **Exhaust air** » = air extrait vers l'extérieur de l'installation.

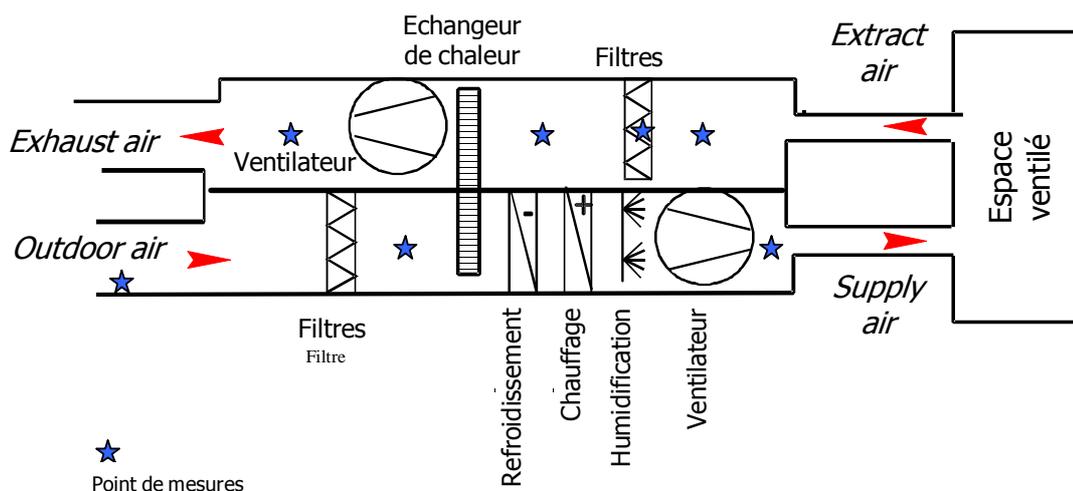


Figure 13 : Lieux de prélèvement des échantillons dans les installations de ventilations

Par ailleurs, des prélèvements de poussières par tapotage de filtres au dessus d'une boîte de Pétri de façon à récupérer les poussières et dénombrer les bactéries et par application de la gélose sur la surface interne de gaines ont été réalisés dans une installation de ventilation.

Enfin des mesures par impaction et par sédimentation, en laissant des boîtes de Pétri ouvertes pendant 16 heures, ont été réalisées dans le bureau 101 du bâtiment du LESO-PB.

Pour chaque prélèvement différent, un papier filtre de 2cm de diamètre imprégné de 20 µl d'huile essentielle de Bois de rose a été déposé dans le couvercle des boîtes de Pétri test. Elles ont ensuite été scellées avec du Parafilm et mise à l'étuve à 30°C pendant quelques jours, en même temps que les boites témoins, scellés également.

3.4 RESULTATS

3.4.1 Contamination du système

Globalement, nous avons mis en évidence dans nos prélèvements la présence de colonies bactériennes et de moisissures de morphologies et de colorations différentes (Photo 4). Les dénombrements ne sont pas tous comparables, mais ils montrent la diversité de la population microbienne présente dans l'air (Tableau 7).



Photo 4 : Prélèvement effectué à l'intérieur d'une gaine de ventilation par application de la gélose à sa surface

Pour les mesures avec l'impacteur, les résultats des dénombrements microbiens pour les volumes de 250 l et de 500 l sont proches. Pour la suite des expériences nous avons prélevé uniquement un volume de 250 l par échantillon.

Tableau 7 Résultats des différents échantillonnages

IMPACTION			SEDIMENTATION			TAPOTAGE		
Points de mesures	N	Moyenne [UFC]/m ³	N	Points de mesures	Moyenne [UFC]/boîte	N	Points de mesures	Moyenne [UFC]/boîte
Bureau LE-101	3	216 ± 28	2	Bureau LE-101	29 ± 1			
Salle GR B 30	2	112 ± 0						
Outdoor air	2	16 ± 4						
Supply air	8	8 ± 4						
Extract air	3	30 ± 4						
Exhaust air	3	41 ± 12						
Filtres ³	2	24 ± 8				2	Filtres	87 ± 7
Filtres ³ secoués	2	64 ± 8						

³ échantillons pris après les filtres à l'outdoor et à l'extract

Quelques soient les points de mesure des systèmes de ventilation, les résultats sont relativement proches. Pour les différents points de mesures dans les installations de ventilation, le nombre de microorganismes (bactéries et champignons) se situe entre 8 ± 4 et 41 ± 12 UFC/ m³. Ces valeurs sont très en dessous des limites de tolérance de 400 UFC/ m³ données par la SUVA¹ pour les bureaux (SUVA, 2001).

Dans les locaux non ventilés la contamination microbienne est au maximum à 216 ± 28 UFC pour un temps de sédimentation de 16 heures.

La contamination des installations de ventilation visitées est extrêmement faible. Nous avons appris que plusieurs d'entre elles avaient été complètement nettoyées, désinfectées et les filtres changés quelques jours avant notre passage lors d'un nettoyage de toutes les installations du site de l'EPFL. Cependant cela n'explique pas complètement les résultats. En effet, la méthode d'impaction ne semble pas être adéquate pour des prélèvements dans des systèmes de ventilation en état de marche. Cette technique d'échantillonnage n'est pas adaptée aux vitesses d'air élevées et aux turbulences rencontrées dans ces systèmes lorsque ceux-ci fonctionnent. Un appareil mieux adapté aurait permis de contourner ce problème. Le MAS 100 avec anémomètre intégré permet de vérifier que débit de l'appareil reste constant malgré les courants d'air environnants.

¹ SUVA : Caisse nationale suisse en cas d'accidents, Fluhmattstrasse 1, CH-6002 Lucerne (www.suva.ch).

Des mesures identiques devraient être effectuées dans des systèmes à l'arrêt, car les mesures par impaction dans les pièces non ventilées, développent un nombre 10 fois plus important de colonies.

3.4.2 Effets des huiles essentielles en phase gazeuse

Afin de vérifier les effets de la phase gazeuse, un buvard imprégné d'huile essentielle a été déposé dans le couvercle d'une boîte contenant un prélèvement par tapotage effectué sur les filtres d'une installation de ventilation (Photo 5). Un témoin à l'identique sans huile essentielle a été réalisé conjointement. Les boîtes ont été incubées 18 heures à 37°C.



Photo 5 : Effets qualitatifs de la phase volatile d'une huile essentielle de Bois de Rose sur un prélèvement effectué dans une installation de ventilation : (haut) essai en présence d'huile essentielle, (bas) essai témoin

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle de Bois de Rose sur le développement des microorganismes a été constaté puisque une seule colonie résistante a été trouvée dans les boîtes contenant l'huile essentielle. Alors que la croissance a eu lieu normalement dans la boîte gélosée témoin sans huile essentielle (à droite en bas), le second prélèvement mis en contact avec la phase volatile de l'huile essentielle de Bois de Rose ne s'est absolument pas développé.

Le repiquage de la surface du milieu de culture avec une anse de platine étant négatif, l'effet semble donc bactéricide pour les divers microorganismes présents dans l'unité de traitement d'air concernée. Cependant pour vérifier cet effet bactéricide, le repiquage aurait du être fait en milieu liquide (subculture classique).

Les résultats démontrent l'**efficacité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de Bois de Rose**. Ils sont très encourageants pour notre projet visant à utiliser des huiles essentielles pour assainir l'air et les systèmes de ventilation.

4. CHOIX DES SOUCHES MICROBIENNES

Nous avons mis en évidence la grande diversité des souches microbiennes qui se trouvent dans l'air. Pour nos travaux deux options sont ouvertes :

- la (ou les) souche(s) représente(nt) la flore standard pathogène ou non,
- des souches sont choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens.

Pour répondre à cette question, nous avons examiné les procédés d'évaluation des désinfectants, décrits par les normes françaises (AFNOR) et européennes (CEN) actuelles ainsi que les souches conseillées pour ces tests. L'évaluation de l'activité d'un produit découle d'une **extrapolation** des résultats obtenus sur quelques souches à des populations microbiennes connues ou inconnues. On attend d'un désinfectant une action à large spectre sur l'ensemble des bactéries : sur les espèces à Gram positif et à Gram négatif sans exclure le groupe CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*). Ces trois groupes de bactéries se distinguent par la structure de leur paroi cellulaire dont dépendent les perméabilités aux agents antimicrobiens (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

Les souches bactériennes qui ont été retenues pour ce travail sont celles proposées par l'AFNOR, norme NF EN 1040 (*CEN, 1997*) **Antiseptiques et désinfectants chimiques, Activité bactéricide de base**. Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* et d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* décrites au chapitre III-2-2.

5. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX PROPOSÉS

Pour pallier au manque de représentativité de nos essais, nous avons envisagé deux montages pour des expériences futures (Figure 14) :

MONTAGE A : l'air stérile est chargé en microorganismes par barbotage dans une solution microbienne avant de séjourner dans une chambre dont l'atmosphère est saturée en huiles essentielles. Des échantillons sont ensuite prélevés par filtration, en faisant varier le temps de contact entre la suspension bactérienne et l'huile essentielle.

La charge en microorganisme peut-être établie par différentes techniques de mise en évidence: Baclight¹ ou filtre déposés sur milieux gélosés.

MONTAGE B : la suspension bactérienne est déjà présente dans l'enceinte et l'huile essentielle est apportée avec le flux d'air généré par aspiration.

Le montage finalement choisi est bien plus simple que les deux précédents qui nécessitent d'être entièrement construits. Nous avons sélectionné comme bioréacteur un conteneur de transport étanche d'un volume de 7 litres, dans lequel nous avons inclus afin d'évaporer les huiles essentielles, un papier filtre immobilisé devant un petit ventilateur. Les microorganismes sont immobilisés sur des supports, maintenu à équidistance de la source d'huile essentielle.

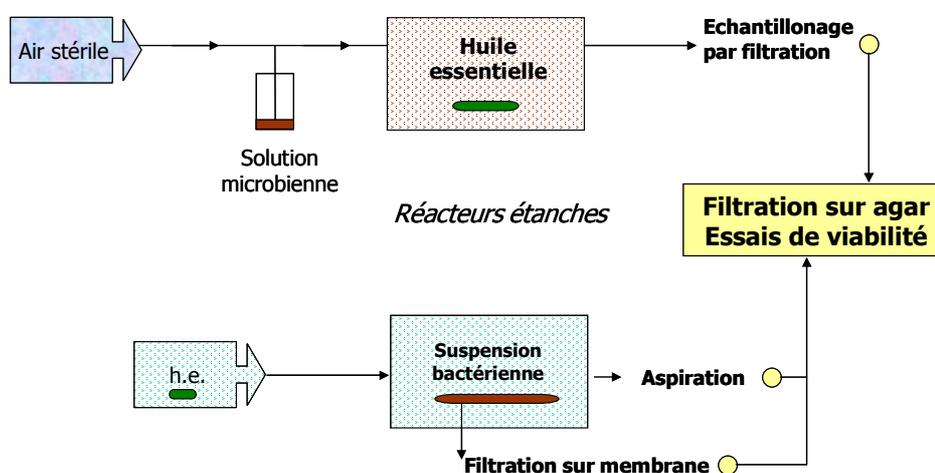


Figure 14 : Montages expérimentaux imaginés pour mettre en évidence l'activité des huiles essentielles en phase gazeuse

6. MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT

Différentes méthodes de dénombrement bactérien ont été testées.

Les kits de viabilité des bactéries (pour échantillons liquides) permettent de distinguer par coloration différentielle, les bactéries dont la membrane a été lésée et les bactéries à membrane intègre (Live/Dead BaClight, Molecular Probes). Le dénombrement des bactéries se fait au microscope optique à épi-fluorescence, qui permet de visualiser les couleurs différentes des bactéries selon leur état. Nous avons testé quelques bactéries

¹ **Baclight** : méthode de dénombrement par coloration et dénombrement sous U.V.

non pathogènes en milieu liquide, avant et après mise en contact avec une huile essentielle très antibactérienne : la Cannelle écorce *Cinnamomum zeylanicum*, (Aries Réf. n°26). Nous avons observé comme tendance générale une plus faible proportion de bactéries viables dans les échantillons en contact avec la Cannelle. Cependant certaines bactéries, comme *Micrococcus pyrogenes* se regroupent en agrégats difficiles à compter et d'autres, comme *Pseudomonas putida*, sont inconstantes dans leur coloration durant la durée de l'observation au microscope. C'est pourquoi nous avons donné une préférence aux méthodes de dénombrement par culture des microorganismes.

La **méthode des dilutions** de suspensions bactériennes suivie de l'ensemencement d'une quantité aliquote dans la masse de la gélose nutritive sera retenue par rapport à la méthode de filtration, qui n'élimine pas l'étape de dilution et complique en fait la manipulation. La filtration sur membranes est plus appropriée au dénombrement d'un nombre restreint de colonies.

CHAPITRE III

SELECTION DES HUILES ESSENTIELLES

A) AROMATOGRAMMES & MICROATMOSPHERES

Ce chapitre décrit les deux méthodes choisies pour mettre en évidence l'activité des huiles essentielles par diffusion dans les milieux de culture et par voie gazeuse dans le volume de 98 cm³ d'une boîte de Pétri sur des souches de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats qualitatifs nous ont permis de sélectionner les huiles essentielles les plus actives pour des mesures en phase aérienne, qui seront présentées au Chapitre V.

1. INTRODUCTION

Si l'on consulte la littérature, sources scientifiques et vulgarisation confondues, presque toutes les huiles essentielles sont mentionnées au moins une fois pour un quelconque effet antimicrobien. Une sélection est alors assez difficile. C'est pourquoi nous avons établi une liste de critères afin d'établir un premier choix parmi les quelques 200 huiles essentielles répertoriées, chémotypes inclus.

1. Les huiles essentielles sont **100% pures** et **naturelles** (qualité utilisée en aromathérapie).
2. **L'activité** est soit scientifiquement **prouvée** et **décrite** dans la littérature, soit présumée par sa composition. Des essais avec des souches bactériennes identiques aux nôtres sont un avantage.
3. Les huiles essentielles sont « **communes** » : c'est à dire qu'elles ne sont ni rares ni précieuses. Le prix ne doit pas être un obstacle à leur utilisation dans les installations de ventilation.
4. Pour la même raison, le prix doit être stable, ce qui implique que les plantes soient facilement **disponibles** et **cultivables**. Les rendements à l'extraction sont si possible élevés.
5. **L'odeur** est **agréable** et se laisse combiner en mélanges harmonieux. Car il est préférable que l'odeur de l'agent antimicrobien soit attractive, et si possible à des concentrations proches du seuil de la perception. Il est en effet

inacceptable de perturber ou même de polluer l'environnement olfactif des occupants par des odeurs intruses et mal adaptées.

6. Les espèces **indigènes** sont favorisées par souci de créer des mélanges harmonieux par rapport au lieu d'utilisation. Notre climat continental est riche en plantes à huiles essentielles dont le parfum nous est familier. Ce n'est pas le cas des espèces exotiques, plus typées au niveau de leurs caractéristiques olfactives. Celles-ci peuvent être la source de confusion et de non-sens dans la dynamique olfactive d'un lieu, désirée la plus neutre possible.

Ces critères nous ont permis de faire un tri judicieux parmi toutes les huiles essentielles réputées antimicrobiennes et d'en éliminer un certain nombre.

2. MATÉRIEL & MÉTHODES

2.1 PRODUITS ACTIFS

2.1.1 Disques pour aromagrammes

Pour nos expériences, les supports des huiles essentielles sont des Sensi-Disc™ non imprégnés de Becton Dickinson¹ (Testblättchen unbeschickt réf. 254862, divers lots) et des Antimicrobial Susceptibility TEST DISCS d'OXOID² (blank discs CT0998B). Température de conservation entre 2°C et 8°C. Leur diamètre est de 0.6 cm, ce qui correspond à un disque de 0.28 cm² de surface.

2.1.2 Huiles essentielles

Nous avons testé l'activité d'une centaine d'huiles essentielles de sources différentes. Les huiles essentielles sont conservées dans leurs flacons originaux, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Elles sont listées selon la dénomination latine (Annexe D).

¹BD: Becton Dickinson GmbH, Diagnostic Systems, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Allemagne.

²Oxoid Limited, Wade Road Basingstoke, Hampshire RG24 8PW England (www.oxoid.com).

PROVENANCES :

- Echantillons de l'Aromathèque¹ et lots de l'herboristerie ARIES SA, à Biolay Orjulaz VD,
- Production artisanale de la distillerie et herboristerie de Yannoula à Koracou ramenés de Chypre en 2001 (Photo 6),
- Lots distillés à la distillerie de Bassin (VD), (Photo 6).
- Sociétés suisses spécialisées dans la distribution d'huiles essentielles comme Oshadi à Morges (VD), Farfalla à Uster (ZH), Santissa à La Sage (VS).



Photo 6 : Cuves de distillation artisanale d'une installation chypriote à Koracou (*gauche*) et installation de distillation professionnelle à Bassins (*droite*)

2.1.3 Composés de référence

Les composés de référence varient selon le type de méthode utilisée.

- Dans le cas des **aromatogrammes** nous avons utilisé divers antibiotiques réputés actifs sur nos souches. Pour ce faire nous avons :
 - consulté le site de la BIAM¹, la Banque de Données Automatisée sur les Médicaments, destinée aux professionnels de la santé, représentés en tout premier lieu par les médecins praticiens et les pharmaciens du secteur privé et public.

¹**Aromathèque**: collection d'échantillons de 2 ml de 144 huiles essentielles ARIES réunies dans un coffret en bois.

- vérifié ce qui est utilisé par les laboratoires d'analyses médicales : l'Institut de Chimie Clinique et Bactolab à Lausanne.
- Confirmé les informations auprès du fournisseur Becton Dickinson.

Les **antibiotiques** que nous avons sélectionnés, dans leurs concentrations courantes, sont :

IMPENEME (IPM 10- réf. n° 254797, lot 3009804 / 10µg - BD Sensi-Disc)

Classe chimique des carbapénèmes. Antibiotique à large spectre de la famille des bêta-lactamines.

Action : Inhibe la synthèse du peptidoglycane par fixation sur certaines protéines (les PBP2). Actif sur les bactéries Gram positif et Gram négatif, aérobies ou anaérobies. Leur usage est exclusivement hospitalier et réservé aux cas difficiles.

Staphylococcus aureus : sensible,

Pseudomonas aeruginosa: inconstamment sensible.

GENTAMICINE SULFATE (GM 10- réf. n° 254726, lot 2232836/ 10µg - BD Sensi-Disc)

Classe chimique des aminosides et des cyclohexanols. Antibiotique de large spectre (sauf bactéries anaérobies) de la famille des aminosides ou aminoglycosides.

Action : Inhibe la synthèse des protéines bactériennes qui deviennent alors non fonctionnelles. Il existe des résistances dues à la production d'enzymes inactivatrices² : les chimistes tentent de modifier la formule pour protéger le site actif.

Staphylocoque aureus: sensible

Pseudomonas aeruginosa : inconstamment sensible.

TRIMETHOPRIME (TMP 5-réf. n° 254714, lot 123SK / 5µg - BD Sensi-Disc)

Antibiotique à large spectre (sauf *Pseudomonas aeruginosa*.) de la famille des di-amino-pyrimidines.

Action : Empêche la formation d'un acide nécessaire à la biosynthèse des purines intervenant dans la formation des acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN.

Pas de données sur la sensibilité.

¹BIAM, 21 rue Camille Desmoulins-92789 Issy les Moulineaux Cedex9 (www.biam2.org).

² Les enzymes **inactivatrices** s'attaquent à un site particulier de l'antibiotique.

Nous avons aussi utilisé des **produits courants** utilisés dans les milieux médicaux, et dans le nettoyage d'unités de ventilations :

SANOSIL[®] (Sanosil SA Eichtalstrasse 49, CH-8634 Hombrechtikon) est un désinfectant liquide à composants multiples utilisé entre autres dans la désinfection des unités de traitement de l'air. Son efficacité est due au renforcement mutuel des propriétés de deux constituants:

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), agent d'oxydation,

L'argent (Ag^+) avec ses fortes propriétés oligo-dynamiques et catalytiques.

SANOSIL[®] détruit toutes les bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (MRSA et VRE), les biofilms, les champignons, les spores, les virus, les amibes, etc. (www.sanosil.com).

STERILLIUM (Bode SA réf. N°9643.1) est désinfectant des mains par friction sans rinçage utilisé dans le domaine médical et hospitalier. Substances actives : 2-propanol, 1-propanol, et de l'éthyl sulfate de mecetronium. Bactéricide, fongicide, tuberculocide, inactive les virus (HBV, HIV, BVDV*, virus de l'herpès, rotavirus, papovavirus, virus de la vaccine), influenza virus (www.bode-france.fr).

● Pour les test en **microatmosphères**, les agents antimicrobiens sont le formaldéhyde (désinfectant aérien de référence) et le Sanosil.

FORMALDEHYDE CH_2O (CAS 50-00-0)

Le formaldéhyde, est utilisé sous forme de solution aqueuse à 40 % appelée aussi Formaline ou Formol et vendue en droguerie. La molécule pure de formaldéhyde a été commandée chez Fluka 47629 puriss p.a. CH-Gift

2.1.4 Composés chimiques actifs des huiles essentielles

Grâce aux profils chromatiques des huiles essentielles de Sarriette des montagnes, de Thym thymol et d'Origan compact (Annexes D, E, et F) nous avons pu identifier les proportions des phénols, thymol et carvacrol, responsables de l'effet antimicrobien (Tableau 8). Les produits purs liquides ou solides sont dilués selon leurs pourcentages dans de l'éthanol 100 % (testé inactif sur nos souches).

Tableau 8 : Pourcentages de thymol, carvacrol et phénols selon les profils chromatographiques

HUILE ESSENTIELLE	% THYMOL	% CARVACROL	% PHENOLS
Sarriette (Aries lot 17 209)	1.5	47.1	49.3
Thym thymol (Aries lot 17 308)	11.4	29.4	41.7
Origan compact (Aries lot 17 209)	13.2	30.2	44.0

ETHANOL : C_2H_5 -OH Ethanol absolu PH.EUR 4 (A15) Reactolab.

THYMOL : $C_{10}H_{14}O$ 2-isopropyl-5-ethylphenol 98%, CAS 89-83-8, CH-Gift 3, Aldrich 11209-7.

CARVACROL : $C_{10}H_{14}O$ 5-isopropyl-2-ethylphenol 98%, CAS 499-75-2, CH-Gift 2, Aldrich 28219-7.

PHENOL : C_6H_6 -OH Mono-hydroxybenzène, CAS 108-95-2, T-toxique, Fluka 77613.

2.2 SOUCHES MICROBIENNES

2.2.1 Origine

Les souches bactériennes utilisées sont celles proposées par l'AFNOR, dans la norme NF EN 1040 (1997) **Antiseptiques et désinfectants chimiques, Activité bactéricide de base** (CEN, 1997). Les deux souches proposées de classe de biosécurité¹ 2 et leurs références (numéros de collection de cultures des différents fournisseurs de souches microbiennes) sont:

● *Pseudomonas aeruginosa* ATCC² 15442 CIP³ 103467 DMS⁴ 939.

● *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 CIP 4.83 DMS 799.

¹ **Classe de biosécurité** : classification des bactéries en fonction du risque d'infection pour l'homme selon la Communauté Européenne. Le groupe de bactéries du groupe 2 est composé d'agents biologiques pathogènes, qui peuvent constituer un danger pour les travailleurs. Sa propagation dans la collectivité est improbable et il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace (www.bacdico.net).

² **ATCC**: American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Maryland 20852-1776, USA.

³ **CIP** : Collection de l'Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France.

⁴ **DMS**: Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, Germany.

2.2.2 Milieux de culture

Les différents milieux de culture solides et liquides sont décrits dans le Protocole 3 et le Protocole 5 (Annexe C). Nous avons principalement utilisé Trypcase Soja Agar (Oxoid CM 0131) et Trypticase Soja Broth (Oxoid MC 0129).

2.2.3 Conservation

La congélation des souches à -80°C (Protocole 2 en Annexe) permet une conservation sur de longues périodes tout en assurant un minimum de changements morphogénétiques dus à des repiquages successifs qui garantit leur stabilité dans le temps. Les souches ainsi congelées se conservent indéfiniment (A. Crémieux, O. Gaudin dans (Fleurette, Freney et al., 1995)).

Pour l'usage courant au laboratoire, les cryotubes de *Staphylococcus aureus* peuvent être déposés entre les repiquages dans un congélateur à -20°C. A ces conditions de température, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* ne se conserve pas au delà d'un mois.

2.2.4 Entretien

L'entretien des souches se fait sur milieu Trypcase Soja Agar (OXOID CM 0131) par prélèvements des souches stock et 2 repiquages successifs tous les 15 jours environ ou avant chaque nouvelle série de tests.

2.2.5 Concentration bactérienne

La concentration bactérienne des différentes solutions et inoculums est évaluée par turbidité et est exprimée par la mesure de la Densité Optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre (Personal Cell Density Meter Biowave de WPA, modèle CO8000).

2.3 PROTOCOLES

2.3.1 Méthode des aromagrammes

La méthode des aromagrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des différentes huiles essentielles issues de l'application de nos critères (Chapitre III-1).

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide.

Les premiers aromagrammes nous ont été enseignés au laboratoire de microbiologie de l'Institut de Chimie Clinique de Lausanne selon le protocole créé par le Dr Vrantchev, Technique pour AntibioGramme. Nous y avons apporté quelques modifications issues de notre pratique expérimentale (Annexe C).

2.3.1. a) Description

Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri. L'ensemencement de l'inoculum de 1 ml est réalisé en surface (ensemencement en nappe) après solidification du milieu. Le surplus d'eau est évaporé dans la hotte jusqu'à ce que la gélose soit sèche. Un ou plusieurs disques pour aromatoigrammes sont déposés au centre de la boîte. Chaque disque est ensuite imprégné d'une quantité variable (entre 1 et 10 μ l) de l'huile essentielle sélectionnée. La boîte est ensuite fermée et mise à l'étuve à 37° pendant 12 à 18 heures.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en cm, soit en mm.

La boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'huiles essentielles.

Le témoin est une boîte de Pétri ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.

2.3.1. b) Ajustements

Le protocole de base des aromatoigrammes tel qu'il nous a été proposé par le laboratoire de microbiologie de l'Institut de Chimie Clinique de Lausanne (Annexe C) a été modifié pour la suite des nos expériences. Nous avons effectuée les ajustements suivants :

1. Volume de l'inoculum pour *Staphylocoque aureus* ajusté à 40 μ l (au lieu des 20 μ l) de suspension bactérienne par ml d'eau physiologique de densité optique comprise entre 0.11 et 0.15 à 600 nm, afin obtenir des **tapis de colonies confluentes suffisamment denses**. Les boîtes de contrôle et les témoins effectués parallèlement aux essais avec les huiles essentielles nous ont permis d'ajuster la concentration de l'inoculum qui était manifestement trop faible.
2. Quantité d'huile essentielle déposée sur le disque de 2 μ l à 4 μ l pour observer des effets bactéricides mesurables à **l'intérieur de la boîte de Pétri**.
3. Volume de l'inoculum par boîte de Pétri de 1 ml pour avoir des **étalements très homogènes** des colonies après incubation. En effet, nous avons noté que des tapis trop irréguliers peuvent rendre la lecture de certains aromatoigrammes ambiguë.

2.3.2 Les microatmosphères ou méthode en phase vapeur

Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri.

2.3.2. a) Description

La technique consiste à disposer le disque imbibé d'une quantité déterminée d'huile essentielle au milieu du couvercle de la boîte de Pétri et non plus en contact direct avec la gélose ensemencée. La boîte est fermée avec le couvercle en bas (ce qui empêche le disque de tomber sur la gélose) et mise à l'étuve à 37° pendant 12 à 18 heures. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré. Les résultats se lisent avec un pied à coulisse et s'expriment par un diamètre moyen en cm, ou mm.

Le témoin réalisé pour chaque expérience est une boîte ensemencée dont le disque déposé sur le couvercle n'est pas imbibé d'huile essentielle. La boîte de contrôle est une boîte de Pétri ensemencée dans les conditions de l'expérience. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.

2.4 EXPRESSION DES RESULTATS

Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats des aromatogrammes et des microatmosphères sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions, en cm ou mm (*Deans et Ritchie, 1987; Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996; Smith-Palmer, Stewart et al., 1998; Dorman et Deans, 2000; Lis-Balchin, Hart et al., 2000; Faleiro, Miguel et al., 2003; Kunle, Okogun et al., 2003*).

Cette mesure est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité 0, ±, +, ++, +++ (Tableau 9).

Tableau 9 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huiles essentielles (*Belaiche, 1979*).

INHIBITION*	TRANSCRIPTION	SENSIBILITE
0	0	Résistant
0,5 cm	±	Peu sensible
1 cm	+	Sensible
2 à 3 cm	++	Assez sensible
> 3 cm	+++	Très sensible

* valeur du diamètre du disque imbibé soustraite

Pour chaque test réalisé, le nombre de croix « + » obtenu par type d'huile essentielle est additionné. Ce nombre est comparé au résultat hypothétique d'une activité maximale de « +++ » pour toutes les mesures, calculé pour un même nombre d'essais. Cet indice est appelé indice aromatique (*Belaiche, 1979*) et est généralement utilisé dans le cadre médical (Laboratoires Sanoflore, Bactolab, et l'Institut de Chimie Clinique à Lausanne).

En bactériologie médicale (technique des **antibiogrammes** ou du disque-diffusion) chaque souche est caractérisée par deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), établie selon la méthode de référence par dilution en milieu gélosé. La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne à l'œil nu (*Liassine, 2000*). Ces valeurs sont corrélées selon des courbes de concordance établies pour des souches d'une même espèce. La souche est alors classée comme sensible **S**, intermédiaire **I**, ou résistante **R** par comparaison avec des valeurs critiques expérimentales diffusées par le Comité Français de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (*Fauchère et Avril, 2002*).

Pour les cas de très faible activité, nous avons exprimé les résultats par le diamètre relevé (diamètres compris entre 0.6 et 0.8 cm). Dans ce cas la concentration en huiles essentielles n'a que peu ou pas d'effet sur l'inhibition, puisque la substance est inefficace.

COEFFICIENT D'ACTIVITE A :

Pour les diamètres plus élevés nous avons défini un coefficient d'activité A :

$$A = \frac{a}{q} \quad \text{avec} \quad a = \pi \frac{d^2}{4} \quad \text{Équation 1}$$

où :

- a est la surface d'inhibition bactéricide,
- q est la quantité de produits actifs (en μl pour les huiles essentielles et en μg pour les antibiotiques).
- d est le diamètre d'inhibition mesurable au pieds à coulisse, diamètre du disque imbibé inclus.

Pour exprimer les résultats selon le facteur d'efficacité A , nous avons vérifié la relation de proportionnalité entre l'activité (la surface d'inhibition bactéricide a) et la quantité d'agent antimicrobien (q) pour les huiles essentielles de Thym thymol, de Sarriette des montagnes, d'Origan compact et de Géranium odorant, ainsi que pour le Sanosil.

Des mesures ont été effectuées en parallèle pour des conditions expérimentales identiques pour chaque composé (Figure 15).

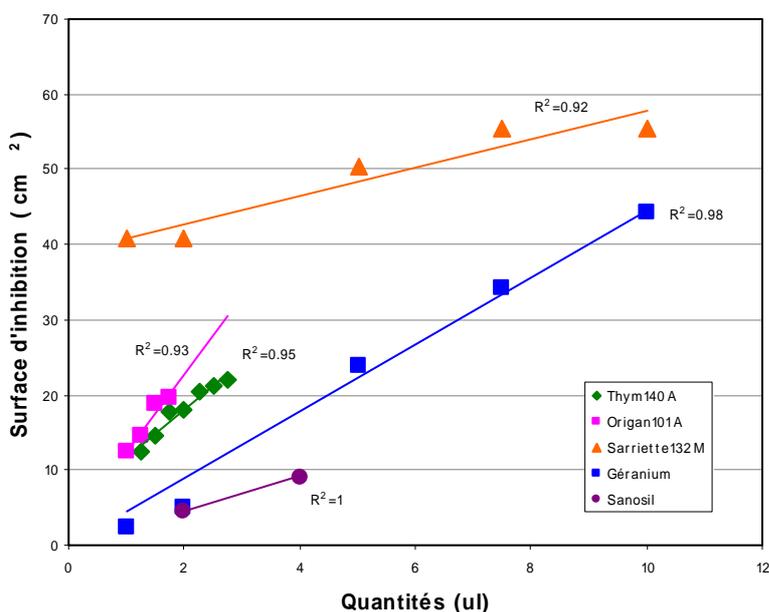


Figure 15 : Relations de proportionnalité entre l'activité inhibitrice et la quantité d'agent antimicrobien déposée sur les disques

2.4.1 Calculs d'erreurs

Pour les deux méthodes le résultat, à savoir le diamètre d'inhibition d_{in} , est entaché d'une erreur intrinsèque due aux mesures et que l'on peut qualifier d'aléatoire, dépendant a priori de trois grandeurs :

1. l'erreur sur le diamètre Δd mesuré au pied à coulisse
2. la variation Δd_0 du diamètre du disque de buvard
3. la variation Δq du volume d'huile essentielle déposée sur le buvard

Une variation supplémentaire du diamètre peut provenir des variations de composition des huiles essentielles, ce qui n'est pas considéré comme une erreur mais comme un résultat.

Toutes choses égales par ailleurs, nous avons constaté que l'aire d'inhibition (ou le carré du diamètre) est proportionnelle au volume de germicide déposé sur le disque de buvard :

$$d_{in}^2 = \alpha q \quad \text{ou} \quad d_{in} = \sqrt{\alpha q} \quad \text{Équation 2}$$

D'autre part, les variations du diamètre des disque du buvard sont négligeables vis à vis du diamètre d'inhibition et de son erreur de mesure. Cette source d'erreur sera donc négligée.

Dès lors, l'erreur de mesure totale peut être estimée par :

$$\varepsilon = \delta d_{in} + \frac{\partial d_{in}}{\partial q} \delta q = \delta d_{in} + \frac{\alpha}{2} \frac{\delta q}{d_{in}} \quad \text{Équation 3}$$

L'incertitude de lecture du diamètre est estimée à $\delta d_{in} \pm 0.1$ cm et l'incertitude sur la quantité de germicide déposée à $\delta q \pm 0.1$ μ l (micropipette digitale Calibra Socorex).

Tableau 10 : Erreurs de mesure pour les différents composés testés					
Huiles essentielles	Sanosil	Sarriette	Géranium	Thym	Origan
α [$\text{cm}^2/\mu\text{l}$]	2.29	1.89	4.45	8.88	11.85
d_{in}	3.4	5.5	4.76	6.1	5.7
$\frac{\alpha}{2} \frac{\delta q}{d_{in}}$	0.03	0.01	0.04	0.07	0.1
$\pm \varepsilon$	0.1+0.03	0.1+0.01	0.1+0.04	0.1+0.07	0.1+0.1

L'erreur de mesure totale ε peut être estimée par δd_{in} pour les petits coefficients α . En revanche pour l'Origan par exemple, elle est correspond à $2 \delta d_{in}$.

Ces valeurs sont légèrement supérieures dans le cas des microathmosphères car les disques sont parfois déformés, ce qui nécessite une approximation de lecture plus importante (Tableau 10).

B) ESSAIS AVEC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1. AROMATOGRAMMES EXPLORATOIRES

Les premières mesures se sont faites à la manière des tests de routine effectués dans les laboratoires médicaux qui testent l'activité de plusieurs agents conjointement. Nous avons imprégnés 6 à 7 disques de 2 µl d'huiles essentielles par boîte de Pétriensemencée avec *Staphylococcus aureus* (Tableau 11). Après 18 heures d'étuve, une seule boîte (IV) sur un total de 4 contenait encore quelques colonies sur le pourtour. Les autres boîtes (I-II-III) étaient stériles.

Tableau 11 : Tests de routine de recherche d'activité antimicrobienne

I	II	III	IV
Orange douce	Sarriette	Origan	Cannelle
Lavande Aspic	Sauge sclarée	Epinette noire	Palmarosa
Thym thymol	Rose	Palmarosa	Sauge sclarée
Clou de girofle	Orménie	Géranium	Lavande sauvage
Eucalyptus radié	Camomille all.	Ravintsara	Epinette noire
Cannelle	Epure ¹	Lavande Sauvage	Ravintsara

Nous avons effectué par la suite des essais comparatifs avec différents agents antimicrobiens (Photo 7). La boîte de gauche contient un antiseptique, un composé chimique et un désinfectant professionnel: Stérilium en I, Phénol dilué à 1/25 en II et Sanosil en III.

Celle de droite contient les huiles essentielles listées dans la colonne IV du Tableau 11. On voit nettement que les effets se limitent à des halos bien définis sur le tapis de bactéries de la boîte contenant des agents chimiques, alors que le tapis bactérien de la boîte contenant les huiles essentielles est bien moins dense et quasi inexistant dans certaines zones.

¹ **Epure** : mélange d'huiles essentielles de la société ARIES.



Photo 7 : Effets de divers agents antimicrobiens (synthétiques à gauche et huiles essentielles à droite) sur un tapis bactérien de *Staphylococcus aureus*.

Nous avons cherché à affiner ces résultats car les essais montrent que la concentration totale en huiles essentielles dans les boîtes de Pétri, entre 12 μl et 14 μl est probablement trop élevée pour permettre une comparaison des effets des huiles essentielles actives. Pour pouvoir différencier les huiles essentielles selon leur activité antimicrobienne, nous avons décidé de ne mettre qu'une seule huile essentielle par boîte, en quantité qui permette de comparer les effets de différentes huiles essentielles à l'intérieur du diamètre de la boîte de Pétri.

1.1 OPTIMISATION DE LA QUANTITE D'HUILES ESSENTIELLES

Pour déterminer la concentration optimale d'huile essentielle dans une boîte de Pétri nous avons sélectionné deux huiles essentielles, la Sarriette des Montagnes (Aries réf. n° 132) et le Géranium Odorant (Aries réf. n° 105). Pour un ensemencement, nous avons déposé les quantités suivantes de chaque huile essentielle sur les disques :

- 1 μl , 2 μl , 5 μl , 7,5 μl , 10 μl et 20 μl .

RESULTATS : aucune colonie n'est visible à partir de 7,5 μl pour les deux huiles essentielles ; les boîtes gélosées sont translucides. Entre 1 μl et 5 μl , des diamètres d'inhibition sont mesurables. Par exemple, pour 2 μl d'huile essentielle on obtient un diamètre d'inhibition de 2,5 cm pour le Géranium et de 7,2 cm pour la Sarriette. Ces diamètres sont raisonnablement compris dans les 8,4 cm de la boîte de Pétri. C'est donc la quantité minimale d'huile essentielle de 2 μl qui est choisie pour nos expériences.

1.2 NATURE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Les aromatoigrammes de l'expérience précédente sont remises à l'étuve pendant 18 h à 37 °C.

- Pour des quantités de 10 et 20 µl d'huile essentielle, aucune nouvelle colonie ne se développe. Les boîtes restent totalement translucides, même après plusieurs jours. Un prélèvement sur la surface de la gélose ne montre aucun développement lorsqu'il est repiqué. Nous en déduisons que la zone est stérile et que l'effet pour ces huiles essentielles est **bactéricide**. Ces mêmes boîtes, protégées de contaminations extérieures par une couche de Parafilm, maintenues dans la hotte à flux laminaire stérile, ne développent pas de microorganismes lorsqu'elles sont sorties de l'incubateur. Le facteur limitant l'observation est le dessèchement de la gélose qui intervient après plusieurs semaines.

- Quand bien même les disques translucides montrent une activité bactéricide des huiles essentielles, nous avons renoncé à utiliser le terme systématique de « **halos** ou **zones bactéricides** ». Le terme de halo d'inhibition couramment utilisé nous semble plus approprié, bien qu'il fasse référence à une activité biostatique, soit une inhibition momentanée de la croissance bactérienne. En effet, un repiquage des zones translucides n'a pas été effectué de manière systématique pour chaque huile essentielle testée.

- Toutes les boîtes dont la quantité d'huile essentielle est inférieures à 10 µl développent des zones de colonies résistantes disjointes autour du halo central. Les colonies sont relativement éparses proche de la zone d'inhibition et se densifient progressivement jusqu'à être aussi confluentes que le tapis bactérien des témoins. Ces boîtes de Pétri incubées une seconde fois ne développent pas de nouvelles colonies. En revanche les colonies existantes grossissent avec le temps. Les huiles essentielles semblent exercer une activité **bactériostatique** sur ces zones de colonies résistantes, puisque les colonies continuent à se développer lorsque la concentration de l'huile essentielle dans la boîte diminue. Nous avons appelé ces zones des « **couronnes de résistances** ».

1.3 CONSIDERATIONS GENERALES SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

La qualité des souches test est déterminante pour la valeur de l'essai, car celles-ci sont l'instrument de mesure dans la méthode de détermination de l'activité d'un produit antimicrobien (*Fleurette, Freney et al., 1995*). La préparation de l'inoculum commence à partir de l'échantillon de souche lyophilisé ou congelé. Le nombre de repiquages, la nature du milieu de culture, la température et la durée d'incubation doivent être précisément et absolument respectés si l'on veut obtenir une bonne reproductibilité

des essais (Farwell JA, Brown. The influence of inoculum's history on the response of microorganisms to inhibitory and destructive agents (*Hugo, 1971*) 703.-752).

Nous avons travaillé de manière la plus proche possible des consignes mentionnées ci-dessus. Cependant nous avons vite remarqué l'apparition de colonies blanches malgré toutes nos précautions pour éviter toute contamination. Après quelques examens au microscope et repiquage, cette souche s'est avéré être *Staphylococcus aureus*. L'apparition de colonies blanches est vraisemblablement un comportement typique des bactéries face au stress. En effet, dans ces conditions, seules les tâches vitales de survie sont maintenues et la pigmentation n'en fait pas partie.

Nous avons pu mettre en évidence de nombreuses couronnes de résistances qui comprennent ce type de colonies pour différents agents antimicrobiens. La littérature consultée ne mentionne pas ces colonies résistantes, et le Laboratoire de Chimie Clinique consulté n'a pas observé de phénomènes semblables. Nous expliquons cela par les quantités utilisées des huiles essentielles proches du seuil d'activité bactéricide/bactériostatique dans les boîtes de Pétri. Les aromatoigrammes médicaux standard s'effectuent en général avec des quantités de 10 µl.

2. RÉSULTATS

2.1 TEMOINS ET CONTROLES

Une anomalie dans les Sensi-Discs de Becton Dickinson neutres utilisés a été décelée grâce aux témoins des premiers aromatoigrammes. En effet, certains disques ont développé spontanément des halos d'inhibition de 7 mm, de manière non systématique, indépendante des différents lots utilisés. Ce phénomène, confirmé par des tests du laboratoire de microbiologie de Becton Dickinson en Allemagne, n'est observable que sur la souche de *Staphylococcus aureus* que nous utilisons. Si ce phénomène est négligeable pour des produits très actifs, il risque d'introduire une erreur dans les cas de sensibilités plus faibles.

Nous avons donc réservé ces disques pour l'utilisation en microatmosphères où ils n'ont aucune incidence, et utilisé les disques similaires fournis par Oxoid pour les aromatoigrammes.

2.1.1 Contrôle de l'activité de la souche

L'agent antimicrobien **Sanosil** a été utilisé pour le contrôle de l'activité de la souche de *Staphylococcus aureus*. Ce produit nous a servi de standard de référence pour l'évaluation de la sensibilité de la souche, s'assurer de l'état et de la conservation.

Plusieurs essais ont été réalisés en aromatoigrammes et en microatmosphère.

● Les résultats des **aromatogrammes** de 2 et 4 μl de Sanosil sont constants (Tableau 12). Les halos bactéricides sont nets et il n’y a pas de couronne de résistance autour. Le facteur de proportionnalité entre la quantité de Sanosil q et le diamètre bactéricide est de 1,4. Cela correspond une augmentation de la surface d’inhibition a d’un facteur 2 (Figure 15). Dans ce cas particulier, la variation relative de l’activité est égale à la variation relative de la quantité de produit utilisée.

Tableau 12 : Aromatogrammes, diamètres des halos d’inhibition pour 2 μl et 4 μl de Sanosil

N^{β}	SANOSIL 2 μl [cm]		SANOSIL 4 μl [cm]		
	Moyennes	<i>Ecart type</i>	N	Moyenne	<i>Ecart type</i>
4	2.43	0.22	7	3.41	0.46

* *Nombre d’expériences*

● Les valeurs obtenues en **microatmosphères** (Tableau 13) diffèrent peu des résultats des aromatogrammes. Il n’y a pas non plus de couronne de résistance.

Ces résultats confirment la constance de l’activité de la souche. Le Sanosil a les qualités requises d’un agent de contrôle pour cette souche.

Tableau 13 : Microatmosphères, diamètres des halos d’inhibition pour 4 μl de Sanosil

	SANOSIL 4 μl		
	N	Moyenne	<i>Ecart type</i>
Diamètre d’inhibition [cm]	6	3.40	0.20

Les résultats selon les deux méthodes ne sont pas significativement différents. La probabilité pour que la différence soit nulle est de 0.89 (valeur calculée selon la formule de la différence entre les moyennes de deux ensembles, Annexe B).

On peut en conclure d’une part que la méthode des aromatogrammes peut raisonnablement se substituer à celle des microatmosphères pour des essais avec l’agent de désinfection Sanosil, et d’autre part que la diffusion de l’agent de désinfection se fait essentiellement en phase gazeuse.

2.2 ANTIBIOTIQUES

Des antibiogrammes ont été réalisés pour des disques d’Imipenème (IPM 10), de Gentamicine (GM 10) et de Triméthoprime (TMP 10). Nous avons noté l’apparition dans certains cas, de couronnes de résistances. Les diamètres bactéricides et les diamètres d’activité totale (diamètres bactéricides et couronnes de résistances) ont été mesurés pour les trois antibiotiques choisis (Tableau 14).

Tableau 14 : Diamètres bactéricides et totaux pour différents antibiotiques

Antibiotiques	N	HALOS BACTERICIDES [cm]		ACTIVITE TOTALE [cm]	
		Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
TMP 5	6	2.40	0.60	4.28	0.39
GM 10	4	2.00	0.14	2.10	0
IPM 10	10	4.43	0.18	4.83	0.44

Staphylococcus aureus montre la plus grande sensibilité vis à vis de l'Imipénème. Dans ce cas, le diamètre bactéricide moyen observé est 4,3 cm (ce qui représente une surface bactéricide a de 15 cm²). Pour les deux autres antibiotiques, la Gentamicine et la Triméthoprime, les valeurs sont deux fois moins élevées.

Les valeurs des écarts types sur les moyennes des diamètres mesurés montrent que les valeurs sont peu dispersées autour de la moyenne. Les valeurs des moyennes sont donc des séries de résultats homogènes. Pour la comparaison de deux populations, on admet que la variation statistique contient l'erreur sur les mesures.

Dans le cas de l'Imipénème et de la Gentamicine, les couronnes de résistance sont très fines, environ de 0.2 cm en moyenne et n'apparaissent pas de manière systématique. Elles ne contiennent pas de colonies dénombrables à l'oeil nu, juste une différence de densité avec le tapis témoin.

En revanche ces colonies blanchâtres sont systématiques et dénombrables dans le cas de la Triméthoprime. On retrouve 55 UFC par boîte de Pétri en moyenne sur la totalité des 6 essais.

● Dans le cas des antibiotiques, il est évident que la technique des microatmosphères ne peut pas être appliquée, ceux-ci n'étant pas constitués de molécules volatiles.

2.3 HUILES ESSENTIELLES

Une quantité de 2 µl de différentes huiles essentielles et agents antimicrobiens a été testé selon la méthode des **aromatogrammes** (Tableau 15). Les résultats sont classés selon le diamètre des halos bactéricides.

A titre indicatif, les agents antimicrobiens suivant ont été inclus dans le tableau : le Stérilium, l'éthanol absolu, le phénol 1/25 (v/v éthanol), les antibiotiques et le thymol et le carvacrol à différents pourcentages.

Nous avons effectué une série d'aromatogrammes et de microatmosphères pour trois huiles essentielles différentes en variant les quantités déposées sur les disques de 2 μ l à 4 μ l (résultats Tableau 16).

Les *valeurs mesurées* sont les diamètres des halos d'inhibition et les diamètres extérieurs des couronnes de résistances. La zone des effets cumulés représente en quelque sorte l'activité maximale (bactéricide et bactériostase) de l'huile essentielle considérée.

Pour chaque essai, les valeurs calculées sont les surfaces d'inhibition pour les halos d'inhibition seuls et avec les couronnes de résistances, ainsi que les coefficients d'activité du halo d'inhibition et les coefficients d'activité des effets cumulés. Comme le coefficient d'activité est indépendant de la quantité d'huile essentielle, nous avons pris des moyennes des quantités de (résultats non présentés) pour les calculs.

RESULTATS

● En aromagrammes, si l'on considère les diamètre d'inhibition et les valeurs des surfaces qui leur sont proportionnels, alors **l'Origan** compact est l'huile essentielle la plus active avec une surface d'inhibition de 30 cm^2 devant celle du **Thym** à thymol de 26 cm^2 ($\text{Ø}=5.7\text{cm}$) et celle **Sarriette** des montagnes égale à 24 cm^2 ($\text{Ø}=5.7\text{cm}$).

Les coefficients d'activité ne suivent pas le même classement **Sarriette** des montagnes A= 9.9 ; **Origan** compact : A= 9.4, **Thym** à thymol A=6.5) car les valeurs sont des moyennes de résultats plus importants du au fait que les coefficients sont calculés pour 2 μ l et 4 μ l. Si l'on examine les valeurs des coefficients des effets cumulés, ils suivent le même ordre. Les valeurs des coefficients d'activité ayant été établis sur la base d'un nombre plus important d'expériences (N=13, 16 et 7) alors la Sarriette est l'huile essentielle la plus active, devant l'Origan et le Thym.

● En microatmosphères, **l'Origan** compact est l'huile essentielle la plus active avec une surface d'inhibition de 28 cm^2 ($\text{Ø}=6\text{cm}$) devant celle de la **Sarriette** des montagnes égale à 24 cm^2 ($\text{Ø}=5.5\text{cm}$) et celle du **Thym** à thymol de 22 cm^2 ($\text{Ø}=5.2\text{cm}$).

Dans ce cas, le classement des coefficients d'activité et d'activité des effets cumulés (Origan A=11, Sarriette A=8.5, Thym A=7) est identique.

Les résultats des aromagrammes sont très proches de ceux des microatmosphères pour les huiles essentielles de Sarriette des Montagnes, relativement proches pour les huiles essentielles d'Origan compact et de Thym à thymol. Les diamètres semblables s'expliquent par le fait que la diffusion des composés aromatiques de l'huile essentielle se fait essentiellement dans la phase gazeuse, ceci à cause de leur très faible solubilité. La diffusion en surface et dans le volume de la gélose étant alors beaucoup plus lente.

Tableau 15 : Aromatogrammes des différents agents antimicrobiens et huiles essentielles

HALOS D'INHIBITION [cm]					
Ø=0.6	Ø=0.7 à 1	Ø=1.1 à 1.5	Ø=1.6 à 2.5	Ø= 2.6 à 3.6	Ø > 3.6
Angélique	Bois d'Inde	Origan sauvage	Cannelle	Palmarosa	Thym thymol
<i>racine</i>	Bois de rose	Bois de rose	<i>écorce</i>	Serpolet	Origan compact
<i>semences</i>	Cataire	Lemongrass	Coriandre	<i>linalol+géraniol</i>	Sarriette
Basilic tropical	Cannelle	Thym <i>linalol</i>	Girofle	Géranium	Serpolet
Bois d'Inde	<i>rameaux</i>	Sapin blanc	Manuka	<i>odorant</i>	<i>thymol+carvacrol</i>
Cardamome	Coriandre	Bois d'Inde	Thym		
Citron	<i>semences</i>		<i>saturéoides</i>		
Cyprès	Clou de girofle				
Eucalyptus	Estragon	Carvacrol 5%	Thymol 10%	Carvacrol 10%	Thymol 15 %
<i>citriodora</i>	Eucalyptus				Thymol 30 %
<i>dives</i>	<i>polybractea</i>				Thymol 50 %
<i>globulus</i>	Géranium				
<i>radiata</i>	<i>bourbon</i>				Carvacrol 15 %
<i>smithii</i>	Lemongrass				Carvacrol 30 %
<i>staigeriana</i>	Limette				Carvacrol 50 %
Genévrier	Manuka				Carvacrol 70 %
Grapefruit	Marjolaine				
Hysope dec.	Menthe champs				
Laurier noble	Menthe				
Lavandes	Palmarosa				
<i>aspic</i>	Pelargonium			Triméthoprime	Imipénème
<i>cultivée</i>	Sapin blanc			Gentamicine	
<i>stoechas</i>	Sauge				
<i>vraie</i>	Tea-tree				
Lavandin	Thym				
Ledon	<i>linalol</i>				
Mandarines					
<i>rouge</i>					
<i>verte</i>					
Myrrhe	Phénol 1/25				
Niaouli	Ethanol 90%				
Orange douce					
Ormenis					
Petit grain big.	Thymol 5%				
Pins					
<i>Douglas</i>					
<i>laricio</i>					
<i>mugho</i>					
<i>sylvestre</i>					
Ravinsara					
Sassafras					
Thuya					
Thym thuyanol					
Ethanol absolu					
Sterilium					
Thymol 1%					

Tableau 16 : Résultats des aromatogrammes et microatmosphères de 2 µl et de 4 µl d'huiles essentielles de Sarriette, d'Origan et de Thym

SARRIETTE DES MONTAGNES	Aromatogrammes		Microatmosphères	
	Moyenne	<i>Ecart type</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>
	N=5 (4 µl)		N=10 (4 µl)	
Halo d'inhibition Ø [cm]	5.5	0.2	5.5	0.6
Surface [cm ²]	24.1	1.4	23.8	4.8
Couronne de résistance Ø [cm]	6.3	0.5	6.3	0.7
Surface d'effets cumulés* [cm ²]	31.7	4.6	31.7	6.8
	N=13 (2 µl et 4 µl)		N=10 (2 µl et 4 µl)	
Coefficient d'activité A	9.9	5.5	6.5	1.9
Coefficient d'effets cumulés*	14.7	8.7	8.5	1.6
<i>Valeurs calculées</i>				
ORIGAN COMPACT	Aromatogrammes		Microatmosphères	
	Moyenne	<i>Ecart type</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>
	N=7 (4 µl)		N=4 (4 µl)	
Halo d'inhibition Ø [cm]	6.1	0.4	6.0	0.2
Surface [cm ²]	29.6	4.1	27.9	1.8
Couronne de résistance Ø [cm]	7.2	0.9	6.7	0.5
Surface d'effets cumulés* [cm ²]	41.4	10.4	35.2	5.9
	N=16 (2 µl et 4 µl)		N=5 (2 µl et 4 µl)	
Coefficient d'activité A	9.4	4.1	8.3	2.5
Coefficient d'effets cumulés*	13.7	6.7	11.0	6.2
<i>Valeurs calculées</i>				
THYM A THYMOL	Aromatogrammes		Microatmosphères	
	Moyenne	<i>Ecart type</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>
	N=7 (4 µl)		N=7 (4 µl)	
Halo d'inhibition Ø [cm]	5.7	0.8	5.2	0.4
Surface [cm ²]	26.1	7.7	21.6	3.2
Couronne de résistance Ø [cm]	6.6	1.0	6.0	0.1
Surface d'effets cumulés* [cm ²]	35.0	10.6	28.2	1.4
	N=7 (4 µl)		N=7 (4 µl)	
Coefficient d'activité A	6.5	1.9	5.4	0.8
Coefficient d'effets cumulés*	8.7	2.6	7.0	0.3

*Les effets cumulés sont la somme des effets bactéricides et de résistance.

Un modèle mathématique combinant la diffusion en phase gazeuse, l'absorption et la diffusion en surface ainsi qu'une éventuelle diffusion en volume aurait pu être développée sur la base d'équations de Fick (Roulet, 1972). Ceci n'étant pas l'objectif de la thèse et le temps imparti ne suffisant pas à valider un tel modèle, nous n'avons pas estimé utile de le développer pour nos recherches. Cela reste une perspective intéressante pour une meilleure compréhension de la méthode.

Cependant la lecture des résultats des aromagrammes est généralement plus précise (halos plus nets) et les résultats proches de ceux des microatmosphères pour la grande majorité des huiles essentielles testées, c'est pourquoi le protocole des aromagrammes qui a été appliqué majoritairement pour la sélection qualitative des huiles essentielles les plus antibactériennes.

2.4 COMPOSES CHIMIQUES PURS ET LEURS ASSOCIATIONS SELON LEUR POURCENTAGE DANS LES HUILES ESSENTIELLES

Les essais avec les composés chimiques purs ont été réalisés selon la méthode des aromagrammes. Nous avons comparé les coefficients d'activité du thymol et du carvacrol seuls ou associés selon la concentration en thymol et carvacrol respective des huiles essentielles de Sarriette, Origan et Thym.

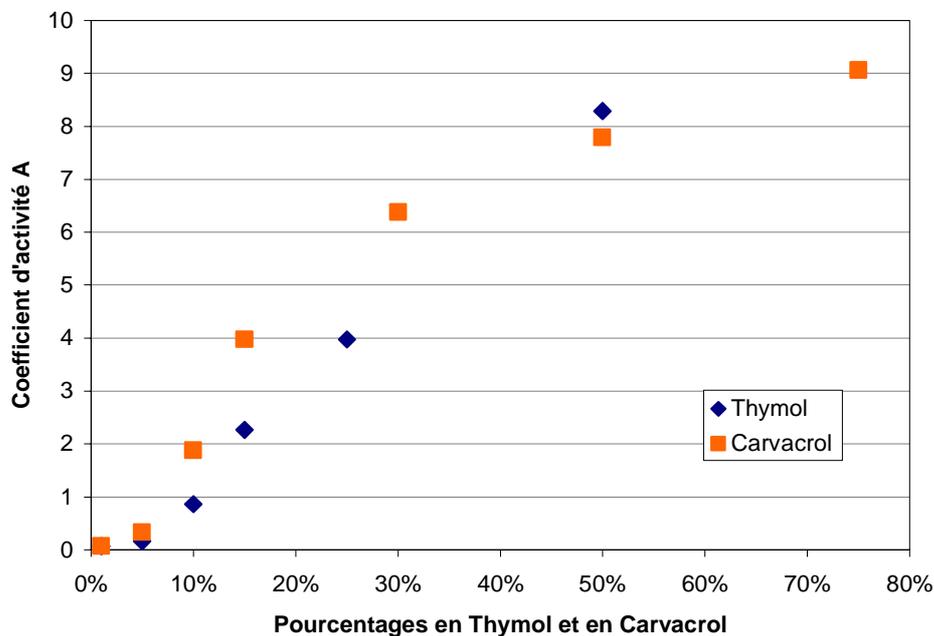


Figure 16 : Coefficients d'activité de différents pourcentages de thymol et carvacrol (dilution alcoolique) déposés sur les disques

Evalués séparément, le thymol et le carvacrol présentent une activité inhibitrice de même ordre (Figure 16) avec une tendance supérieure pour le carvacrol, dont le facteur d'efficacité est légèrement supérieur au thymol pour les pourcentages entre 10% et

40%. Pour les mélanges reconstitués dans les mêmes proportions que la Sarriette, l'Origan et le Thym les valeurs des coefficients d'activité des trois mélanges tournent autour de 6 (Tableau 17).

Les résultats sont liés à la somme des deux phénols qui représente approximativement de 50% environ pour les reconstitutions chimiques de Thym et de Sarriette et de 43 % pour la reconstitution d'huile essentielle d'Origan.

Les associations des deux phénols sont ont une activité inférieure aux composés purs puisque le coefficient du carvacrol 30% (A= 6.5), du carvacrol 50% (A= 7.8) et du thymol 50% (A= 8.2) sont supérieurs. Il n'y a donc pas d'effet synergique lors du mélange des deux phénols.

Tableau 17 : Coefficients d'activité pour diverses associations de thymol et carvacrol

Aromatogrammes N=7 (4 µl)	THYMOL	CARVACROL	Coefficient d'activité A	
			Moyenne	Ecart type
RECONSTITUTION SYNTHETIQUE				
SARRIETTE	1.5 %	47 %	5.85	0.76
ORIGAN	13 %	30 %	5.74	1.47
THYM	49 %	2.5 %	6.51	0.77

En comparant ces résultats avec ceux des huiles essentielles naturelles (Tableau 16) seules les valeurs de l'activité du Thym (synthétique et naturel) sont identiques. Le Thym utilisé est d'ailleurs composé presque exclusivement de thymol (49%). En ce qui concerne l'Origan et la Sarriette plus riches en carvacrol (Origan 30% et Sarriette 47%), l'activité des huiles essentielles naturelles est supérieure aux reconstitutions de synthèse, ce qui confirme la valeur des produits naturels dans leurs spécificités et leur complexité.

3. ANALYSE DES RÉSULTATS ET COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS PUBLIÉS

3.1 ANTIBIOTIQUES

La comparaison quantitative des résultats des huiles essentielles et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparables. Contrairement aux huiles essentielles, mélanges complexes de composés très volatils qui s'évaporent, mais aussi diffusent dans la gélose à des vitesses

différentes, les antibiotiques sont de grosses molécules non volatiles. Leur diffusion a lieu vraisemblablement en surface ou/et en volume dans la masse de la gélose.

On peut tout de même se risquer à une comparaison de globale de l'activité des antibiotiques avec celle des huiles essentielles par l'expression du **rapport de l'activité mesurée à la quantité de produit antimicrobien**.

Pour cela la densité des huiles essentielles est grossièrement approximée à 1 g/ ml (valeur mesurée pour la Sarriette 0.89 g/ ml).

Les valeurs moyennes de surface bactéricide par gramme d'antibiotique sont alors de :

- 1.54 cm²/ g d'Imipenème,
- 1.1 cm²/ g de Triméthoprime,
- 0.32 cm²/ g de Gentamicine,
- et comprises entre 0.1 cm²/ g et 27 cm²/ g selon les huiles essentielles.

Aux valeurs des antibiotiques ci-dessus correspondent des diamètres bactéricides de 0.7 à 1.4 cm mesurés pour les huiles essentielles, comme par exemple le Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*).

De nombreux auteurs ont travaillé sur l'activité bactéricide incontestée de cette huile essentielle (Carson et Riley, 1995 ; Hammer, Carson et al., 1999; Cox, Mann et al., 2000; Lis-Balchin, Hart et al., 2000; Mann, Cox et al., 2000; Cox, Mann et al., 2001; Hammer, Carson et al., 2003). Le Tea-tree est souvent prescrit en cas d'infections bactériennes. Il remplace avantageusement les antibiotiques et il est extrêmement bien toléré (ingestion¹ et application cutanée) par les patients de tous âges.

A titre indicatif, les surfaces bactéricides par gramme d'huiles essentielles d'Origan compact (coefficient d'activité maximal), de Sarriette, de Serpolet, et de Thym thymol sont environ 30 fois plus élevées que les valeurs des antibiotiques et du Tea-tree.

L'Origan compact est dermocaustique, comme toutes les huiles essentielles contenant des phénols. Celles-ci ne sont utilisées qu'en petites quantités (5 à 7 %) dans les préparations anti-infectieuses. Leur utilisation est proscrite chez l'enfant. Cela explique pourquoi ces huiles essentielles, pourtant antibactériennes majeures, ne sont pas plus populaires puisque jusqu'à maintenant, aucune application thérapeutique ne justifiait leur utilisation.

¹ Aux dosages et sous la forme habituellement prescrite.

3.2 HUILES ESSENTIELLES

Certains résultats obtenus semblent en contradiction avec certaines données de la littérature. Ainsi les huiles essentielles suivantes sont mentionnées (*Zimmermann, 1998*) comme :

- **antibactériennes**, avec pour certaines une mention particulière pour *Staphylococcus aureus* (Basilic Occimum, Coriandre semences, Clou de girofle, Estragon, Menthe des champs et poivrée, Piment, Eucalyptus globulus, smithii, radiata, citriodora, Laurier noble, Genévrier, Ravinsara, Sauge)
- **assainissantes atmosphériques** (Sapin baumier, Citronnelle, Mandarine, Pin).

Aucune d'entre elles n'a montré une quelconque activité antimicrobienne intéressante lors de nos essais.

C'est aussi le cas pour les différentes variétés de Pins (*Douglas, laricio, mugo et sylvestre*), certains Thyms (variétés à *thuyanol* et *linalol*) et Lavandes (*officinale* -vraie- et *aspic*). Nous attendions à une activité plus importante pour les Eucalyptus, les Romarins et le Tea-tree très réputé.

Nous n'avons pas testé pour satisfaire à nos conditions de départ (limites économiques) toutes les huiles répertoriées actives, comme par exemple la Rose, la Ciste, le Néroli, et l'Hysope (*Zimmermann, 1998*).

La faible activité de certaines huiles essentielles lors de nos essais est peut être due au fait que la quantité déposée sur les disques est nettement en dessous de la valeur initiale prévue pour les aromagrammes et des valeurs des essais de la littérature en générale.

La quantité d'huiles essentielle sur le disque varie selon les auteurs, excluant toute comparaison des valeurs des diamètres mesurés. Nous avons listé les différentes quantités mentionnées dans les études suivantes :

- 30 µl (*Carson et Riley, 1995*),
- 25 µl (*Smith-Palmer, Stewart et al., 1998*),
- 15 µl (*Dorman et Deans, 2000; Burt et Reinders, 2003*),
- 10 µl les laboratoires d'analyses médicales et
(*Belaiche, 1979; Deans et Ritchie, 1987 ; Lis-Balchin, Hart et al., 2000*)
- 5 µl (*Pattnaik, Subramanyam et al., 1996; Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996*),

- 4 µl (Kunle, Okogun et al., 2003). (Pibiri et Roulet, 2003),
- 3 µl (Faleiro, Miguel et al., 2003),
- 2 µl (Pibiri et Roulet, 2003).

A titre de comparaison, le diamètre mesuré¹ pour 15 µl d'*Origanum vulgare* est de 1.76 ± 0.05 cm et > 9 cm pour la même quantité de *Thymus vulgaris* (Dorman et Deans, 2000). En terme de coefficient d'activité ces résultats sont bien inférieurs à ceux que l'on obtient (Tableau 18).

Tableau 18: Diamètres, surfaces et coefficient d'activité de l'Origan compact et du Thym à thymol à 15 µl (Dorman et Deans, 2000).

AROMATOGRAMMES	Origan compact		Thym à thymol	
	(15µl)		(15µl)	
	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type
Halo Ø [cm]	1.76	-	9	-
Surface [cm ²]	2.43	-	63.62	-
Coefficient d'activité A	0.16	-	4.24	-

Cette étude ne mentionne pas la composition exacte en phénols des deux huiles essentielles, ce qui exclu :

1. toute comparaison avec d'autres résultats
2. toute conclusion générale sur les espèces de Thym ou d'Origan

Toutes les espèces de Thym par exemple ne sont pas actives sur *Staphylococcus aureus*. Des aromatoigrammes ont été réalisés avec différentes espèces endémiques de Thym portugais, dont les composés majoritaires sont le linalol et le 1,8-cinéol (Faleiro, Miguel et al., 2003). Les diamètres d'inhibition (pour 3 µl d'huiles essentielles) varient entre 0.6 cm (le diamètre du disque) et 1.5 cm pour l'espèce la plus active. Ces résultats montrent que la présence de phénols, thymol ou carvacrol, augmente drastiquement l'activité des huiles essentielle de même espèce pour une même souche.

¹ Il semblerait que les auteurs n'aient pas utilisés les boîtes de Pétri standard de 8,4 cm de diamètre.

● Ces constatations démontrent la difficulté de comparer les résultats publiés à l'heure actuelle.

Notre sélection d'huiles essentielles phénolées telle la Sarriette des montagnes, le Thym thymol et l'Origan Compact est en accord avec la littérature. *Origanum vulgare* et *Thymus vulgaris* montrent l'activité la plus large sur 25 souches testées, dont celle de *Staphylococcus aureus* (Dorman et Deans, 2000).

3.3 COMPOSES CHIMIQUES PURS

Les composés chimiques purs, les plus efficaces et les plus larges d'action sont le thymol, le carvacrol, devant les monoterpénols (terpinen-4-ol, linalol, géraniol...) et les monoterpènes (pinènes, limonènes...) (Dorman et Deans, 2000).

Notre choix de travailler uniquement avec le thymol et le carvacrol est en accord avec la littérature.

Alors que les coefficients d'activité bactéricide du thymol et du carvacrol évalués séparément sont élevés, ils sont inférieurs pour les mélanges des deux phénols. Ces résultats ne confirment pas l'effet synergique de l'association du thymol et du carvacrol relevé lors d'essais comparables aux nôtres (Didry, Dubreuil et al., 1993).

C) ESSAIS AVEC PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie qui forme des biofilms, c'est à dire qu'elle a une importante capacité de s'étendre et à coloniser le milieu sous forme de film visqueux. Les colonies verdâtres dégagent rapidement une odeur nauséabonde. Cette souche de bactéries s'est avérée difficile à manipuler. Nous avons du adapter les valeurs pour obtenir un tapis ni trop dense, ni trop visqueux.

1. RÉSULTATS

Le Tableau 19 donne le diamètre d'inhibition des huiles essentielles testées et de quelques agents antimicrobiens.

2. ANALYSE DES RÉSULTATS ET COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS PUBLIÉS

Pseudomonas aeruginosa a la réputation d'être très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. Cela est probablement dû à la capacité qu'a la bactérie à de former un biofilm. Un biofilm est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Ainsi toute la population bactérienne n'est pas exposée simultanément et identiquement au produit. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens (Fleurette, Freney et al., 1995).

Les résultats des **antibiotiques** sont en accord avec nos attentes. L'Imipénème est actif sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cet antibiotique à large spectre est généralement réservé pour les cas difficiles en milieu hospitalier. En effet, les infections à *Pseudomonas aeruginosa* entraînent souvent des échecs cliniques liés à la sélection de mutants résistants (mutants de perméabilité) par traitement à l'Imipénème (Liassine, 2000). La Gentamicine est moins active, et le Triméthoprim n'a montré aucune activité, il est plus actif sur les bactéries à Gram positif.

Le **désinfectant chimique** Sanosil a confirmé son activité sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En revanche, le Stérilium, l'éthanol absolu, l'éthanol à 90 %, le phénol 1/25 ne sont pas actifs sur la souche. Le formaldéhyde en revanche est le produit le plus actif testé sur cette souche. En effet, le diamètre d'inhibition est de $\varnothing=3$ cm.

En ce qui concerne les **huiles essentielles**, la sensibilité est aussi très faible (*Carson et Riley, 1995; Hammer, Carson et al., 1999*). Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière « hydrophilic permeability barrier » protège des agents toxiques. Composée de lipposaccharides, elle peut être franchie plus facilement en présence de certains composés polycationiques qui augmentent la perméabilité des bactéries Gram négatif (*Mann, Cox et al., 2000*).

Une large majorité des huiles essentielles sélectionnées n'a montré aucune ($\emptyset=0.6$ cm) ou une infime activité ($\emptyset=0.7-0.8$ cm). Nous n'avons pas constaté assez d'effets mesurables pour nous rendre compte d'une quelconque proportionnalité de l'effet vis-à-vis des concentrations d'huiles essentielles.

Notre choix très large d'huiles essentielles a été influencé par certains travaux :

1. (*Pattnaik, Subramanyam et al., 1996*) qui relève l'activité du Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) de l'Eucalyptus citriodora, de l'Orange, de la Citronnelle (*Cymbopogon winterianus*) et de la Menthe poivrée.
2. (*Maudsley et Kerr, 1999*) qui publie les résultats un abattement de concentration de *Pseudomonas aeruginosa* de 5 log en 2 heures en présence de Bergamote, 6 heures pour l'Ylang-ylang, alors que la mort des bactéries n'apparaît sans huiles essentielles qu'après 24 heures.
3. Des divers composés chimiques semblent aussi avoir leur effet ou non. L'huile essentielle de Tea-tree, *Melaleuca alternifolia*, comporte un unique composé actif sur le *Pseudomonas aeruginosa*, le terpin-4-ol (*Mann, Cox et al., 2000; Cox, Mann et al., 2001*). Le thymol n'a pas d'effets bactéricide sur cette souche et (*Sivropoulou, Papanikolaou et al., 1996*). (*Walsh, Maillard et al., 2003*). Les composés de la Cannelle responsables de son activité sont l'acide et l'aldéhyde cinnamiques (*Ibrahim et Ogunmodede, 1991*).

Des divers composés proposés, et de la multitude de ceux que nous avons testés, seule la Cannelle écorce semble exploitable. Cela tient vraisemblablement au fait qu'elle soit riche en aldéhydes, puisque le meilleur effet dans nos essais a été celui du formaldéhyde. Nous n'avons malheureusement pas testé l'aldéhyde cinnamique par manque de temps.

Tableau 19 : Diamètres d'inhibition de 2µl d'huiles essentielles et d'agents antimicrobiens

HALOS D'INHIBITION [cm]					
Ø=0.6	Ø=0.7	Ø= 0.75	Ø= 0.8	Ø= 1-2	Ø > 2
Cannelle	Citron	Eucalyptus	Lavande	Gentamicine	Cannelle
<i>rameaux</i>	Citronnelle	<i>polybractea</i>	<i>stoechas</i>		<i>écorce</i>
	Epicéa	<i>smithii</i>	Genévrier nain		<i>de Chine</i>
Bergamotte	Epinette noire	Genévrier ram.	Lemongrass		
Cajeput	Genévrier baies	Géranium			
	Laurier noble	Lavandes			Sanosil
Cyprès	Mandarines	<i>aspic</i>			Imipenem
Estragon	<i>rouge</i>	<i>sauvage</i>			
Eucalyptus	<i>verte</i>	Poivre noir			Formaldehyde
<i>citriodora</i>	Niaouli				
<i>dives</i>	Orange douce				Phénol pur
<i>radiata</i>	Palmarosa				
<i>staigeriana</i>	Pins				
Girofle	<i>laricio</i>				
<i>clous</i>	Romarins				
<i>feuilles</i>	AVB				
Grapefruit	<i>camphré</i>				
Kanuka	<i>cinéol</i>				
Lavandin	Sauge sclarée				
Ledon	Thym				
Litsée	<i>thuyanol</i>				
<i>Muscade</i>					
<i>Néroli</i>	Ethanol 90%				
<i>Orange amère</i>	Phenol 1/25				
Origan					
Petitgrain					
<i>bigarade</i>					
<i>cédrat</i>					
Pins					
<i>sylvestre</i>					
Ravinsara					
Sarriette					
Sauge off.					
Serpolet					
Tea-tree					
Thym					
<i>linalol</i>					
<i>terpényl</i>					
<i>thymol</i>					
Sterilium					
Trimethoprime					
Ethanol absolu					

CHAPITRE IV

ACTIVITE DE LA PHASE VOLATILE DES HUILES ESSENTIELLES SELON LA NORME AFNOR NF T72-281

BIOREACTEUR DE 7L

1. DESCRIPTION DU CHOIX DE LA MÉTHODE

Les expériences précédentes, lors des tests préliminaires et lors de la sélection des huiles essentielles, ont été réalisées avec des cultures bactériennes en boîtes de Pétri ; soit dans un volume approximatif de 10 ml. Ces conditions sont très différentes de celles des microorganismes dans les systèmes de ventilation. Dans ces systèmes, par exemple, le substrat y est en condition non-limitante et l'activité des agents antimicrobiens n'est pas favorisée par leur proximité des bactéries puisque les agents antimicrobiens ne sont pas en contact direct avec les bactéries.

Diverses méthodes d'évaluation des huiles essentielles en phase gazeuse sont décrites dans la littérature (*de Billerbeck, 2000; Inouye, Abe et al., 2003; Inouye, 2003a, 2003b*), mais comme avec les méthodes en culture gélosées, elles ne permettent que difficilement l'analyse comparative des résultats (*Pibiri, Seignez et al., 2003*).

Nous nous sommes inspirés des pratiques de désinfection des milieux hospitaliers. En effet dans les hôpitaux, l'utilisation d'agents antimicrobiens est rigoureusement protocolée selon diverses normes, CEN¹ pour l'Europe et AFNOR pour la France. En effectuant des recherches sur les pratiques de désinfections aériennes (DVA) nous avons trouvé une norme concernant la validation des désinfectants de surface par voie aérienne. Il s'agit de la norme Afnor NF T72-281, intitulée : **Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne** (AFNOR, 1986). La méthode décrite est parfaitement adaptée pour nos essais, bien qu'elle ne soit pas récente. A la date de sa publication et jusqu'à maintenant, il n'existe pas de mise à jour, ni de norme internationale correspondante.

¹ CEN : Comité européen de normalisation, CEN Management Centre : 36, rue de Stassart, 1050 Brussels.

Pour évaluer les effets de la phase gazeuse des huiles essentielles en laboratoire selon le protocole de la norme Afnor NF T72-281, nous avons choisi un bioréacteur d'un volume de 7 litres dans lequel la concentration d'huile essentielle peut-être déterminée en phase gazeuse.

2. PROTOCOLE

Cette méthode est dite de « portes germes » car les microorganismes sont immobilisés sur des supports inertes. Ces supports sont ensuite exposés par « immersion totale » aux vapeurs des agents de désinfection.

La norme Afnor NF T72-281 est une méthode générale destinée :

- à **rechercher l'activité** désinfectante, dans des conditions voisines de la pratique et après un temps recommandé, d'un procédé de désinfection **des surfaces par voie aérienne**,
- à **comparer** dans des conditions reproductibles, divers procédés entre eux.

Les essais sont basés sur la mesure de la proportion de destruction de microorganismes sélectionnés, dans des conditions précises.

STRUCTURE DU PROTOCOLE

La reproduction, même partielle, du protocole est interdite¹. Comme nous ne pouvons le publier, nous en donnerons au cours du chapitre une description assez précise pour permettre une bonne compréhension de la méthode.

Le protocole est divisé en trois parties: les essais préliminaires à réaliser, les essais proprement dits et la réalisation de témoins. Un schéma de principe du déroulement de chaque étape est inclus en Annexe C (Protocole 6°, Protocole 7 ; Protocole 8 ; Protocole 9).

Les **ESSAIS PRELIMINAIRES** servent à rechercher un quelconque effet inhibiteur rémanent du désinfectant lors de la récupération des bactéries sur les supports. En effet, l'agent désinfectant qui adhère sur les supports pendant la phase de contact est dissout dans le liquide de récupération lorsque les supports y sont plongés pour la remise en solution des bactéries fixées afin de les dénombrer.

¹ La norme NF T72-281 s'achète sur le site de l'Afnor (www.boutique.afnor.fr).

Lors de ces essais les supports non contaminés sont exposés aux vapeurs d'huiles essentielles, puis ils sont plongés dans 100 ml du liquide de récupération à la fin du temps d'exposition.

Dans des boîtes de Pétri on dépose, sans qu'ils soient en contact, 1 ml de ce liquide de récupération et 1 ml de différentes dilutions de bactéries. Après inclusion des deux solutions dans la gélose en surfusion, les boîtes sont incubées et les colonies dénombrées. Si les huiles essentielles ont un effet rémanent dans le liquide de récupération, alors le nombre de bactéries est inférieur à celui des témoins (c'est-à-dire des dilutions de bactéries seules).

De cette manière on s'assure que les bactéries dénombrées auront bien été tuées dans le bioréacteur par la phase gazeuse des huiles essentielles et non dans le liquide de récupération par les résidus adsorbés sur les supports puis désorbés dans le liquide.

L' **ESSAI PROPREMENT DIT** décrit en détail les différentes conditions qui doivent être respectées pour effectuer correctement la manipulation ainsi que la méthodologie détaillée. Celle-ci comporte les étapes suivantes :

1. Dépôt des bactéries sur les supports inertes, puis maintien de l'ensemble dans des conditions définies en contact avec le produit diffusé.
2. Récupération des bactéries par grattage et agitation des supports dans un liquide de récupération.
3. Dilutions et ensemencement dans la gélose d'une partie du liquide de récupération. Incubation et dénombrement des colonies développées.

L'activité bactéricide est mesurée en fonction de la capacité du produit à réduire le nombre de cellules bactériennes viables.

La réalisation de **TEMOINS** est à effectuer en même temps que l'essai proprement dit. Dans ce cas les supports ne sont pas exposés aux agents antimicrobiens, cependant ils sont soumis à un temps de latence identique au temps de contact des essais, et dans des conditions de température et d'humidité relative identiques. Il est précisé d'autre part que les résultats du dénombrement des colonies développées sur les supports ne doivent pas être en dessous de 10^6 microorganismes/ ml, pour s'assurer d'une bonne visibilité de la réduction escomptée de 5 décades.

3. MATÉRIEL

3.1 SOUCHES MICROBIENNES

Le protocole de la norme Afnor NF T72-281 (AFNOR, 1986) propose les souches de référence suivantes :

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP A 22
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53 145
<i>Streptococcus faecium</i>	CIP 58 55
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 52 62
<i>Candida albicans</i>	CIP 1180-79
<i>Penicillium verrucosum var. cyclopium</i>	CIP 1186-79

Par souci de continuité du travail et par commodité, nous avons repris les deux souches de la norme européenne EN 1040 (CEN, 1997) détaillées au Chapitre III - 2.2 : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les milieux de culture, la conservation et l'entretien restent identiques.

Cependant pour rester dans l'esprit de la norme il aurait fallu effectuer nos essais avec toutes les souches proposées, ce qui pourrait être l'objet de travaux complémentaires.

Les expériences qui suivent ont été réalisées avec des cultures de *Staphylococcus aureus* seulement car nous avons montré au chapitre précédent que *Pseudomonas aeruginosa* est peu sensible aux huiles essentielles. De plus, il ne se conserve que quelques semaines dans le congélateur à -20°C et le dénombrement sur géloses est difficile à cause de sa capacité à former des colonies qui s'étendent très rapidement.

Des tests complémentaires pourront être réalisés avec d'autres souches, notamment des microorganismes communément rencontrés dans les systèmes de ventilation.

3.2 BIOREACTEUR

1. Le bioréacteur (Photo 8) est un container de transport à fermeture étanche en polycarbonate d'un volume de 7 litres (VWR PolyLabo Dietikon-CH). Il est autoclavable 20 minutes à 121°C et compatible avec l'utilisation des huiles essentielles.

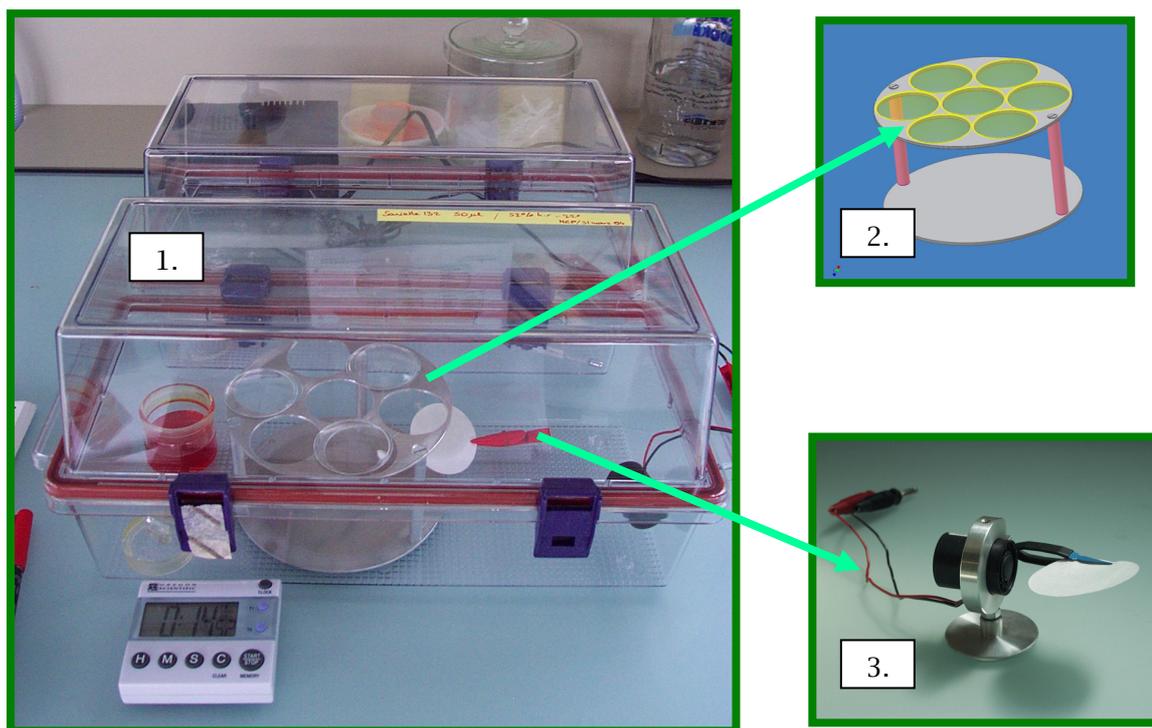


Photo 8 : Bioréacteur utilisé pour les essais de DVA et son contenu: le support des portes germes et le dispositif de maintien du buvard imprégné d'huile essentielle.

2. Le dispositif destiné à maintenir les supports des bactéries ou « porte germes » dans le bioréacteur a été fabriqué sur mesure. Il s'agit d'un support en aluminium, constitué d'une plaque circulaire perforée de 6 trous de diamètre légèrement inférieur à celui des supports, monté sur pieds et stabilisé à sa base par une seconde plaque. Les verres de montres y sont déposés face en bas comme l'exige la norme Afnor NF T72-281. Les supports sont des verres de montre de 40 mm de diamètre lavés, dégraissés et débarrassés de substances protéiques, rincés et séchés. Ils doivent être stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 121°C avant leur utilisation.

3. La quantité d'agent antimicrobien est déposée sur un papier filtre de 5 cm de diamètre, pincé dans un petit dispositif qui le maintient devant un petit ventilateur de 6V destiné à créer un flux d'air, et à homogénéiser la concentration d'huiles essentielles dans le réacteur. Après la phase de contact dans le réacteur, les verres de montres sont transférés dans des récipients de 150 ml en polystyrène stériles (Sterilin, VDC Verrerie de Carouge Genève-CH) remplis du liquide de récupération.

3.3 SUSPENSIONS ET MILIEUX UTILISES

EAU PHYSIOLOGIQUE

L'eau utilisée pour la confection de l'eau physiologique est de l'eau osmosée d'un système Elix3 (Millipore). Elle sert à toutes les solutions des bactéries : les suspensions bactériennes, le liquide de récupération et les dilutions en série pour le dénombrement. La concentration de NaCl est de 8.5 g/litre, et la solution est stérilisée à l'autoclave 20 minutes à 121°C.

LAIT RECONSTITUE

Lait en poudre écrémé (Oxoid LP 0031B) garanti sans antibiotique ni additif. Il est reconstitué à raison de 100 g/litre d'eau osmosée puis stérilisé à l'autoclave 5 minutes à 121°C.

LIQUIDE DE RECUPERATION

Le liquide de récupération des bactéries immobilisées sur les verres de montre est de l'eau physiologique.

SUSPENSION BACTERIENNES

La suspension bactérienne dans de l'eau physiologique se fait par dilution d'une petite quantité de bactéries de la souche concernée, repiquée à partir d'une culture fraîche deux à trois fois. Le titre de cette suspension est déterminé en fonction de la méthode d'essai et du critère d'activité (taux de réduction) qu'elle implique. Ce protocole, comme la plupart des méthodes actuelles a, comme critère d'activité bactéricide, une réduction de 5 logarithmes décimaux du nombre initial de bactéries. Pour que le dénombrement des survivants soit suffisamment précis, un inoculum de 10⁹ cellules par millilitres au minimum doit être utilisé. Ce qui correspond à une absorbance de départ entre 0.15 et 0.25 pour la longueur d'onde de 620 nm.

A cette solution, est ajoutée le lait reconstitué précité à raison de 1/20 (v/v). Cette solution constitue l'inoculum de travail. Un prélèvement de 50 µl de cet inoculum est déposé sur les verres de montre, qui sont mis à sécher 45 minutes à 37°C.

GÉLOSE NEUTRALISANTE

L'utilisation de gélose neutralisante d'une éventuelle activité rémanente des huiles essentielles est mentionnée dans le protocole pour les dénombrements des essais proprement dits. Nous avons utilisé la gélose neutralisante Trypticase Soja Agar avec Lécithine et Polysorbate 80 (Annexe C).

3.4 AGENTS ANTIMICROBIENS

Huiles essentielles :

● Thym thymol	<i>Thymus vulgaris</i>	Aries réf. n° 141
● Sarriette des montagnes	<i>Satureja montana</i>	Aries réf. n° 132
● Origan compact	<i>Origanum compactum</i>	Aries réf. n° 101

Agent de désinfection :

● Formol	Formaldéhyde	Solution à 40 %
----------	--------------	-----------------

NORME AFNOR NF T 72-218: EXPERIENCES ET RESULTATS

4. VÉRIFICATIONS PRÉLIMINAIRES

Avant de commencer les expériences de la norme à proprement parler, nous avons effectué les vérifications suivantes.

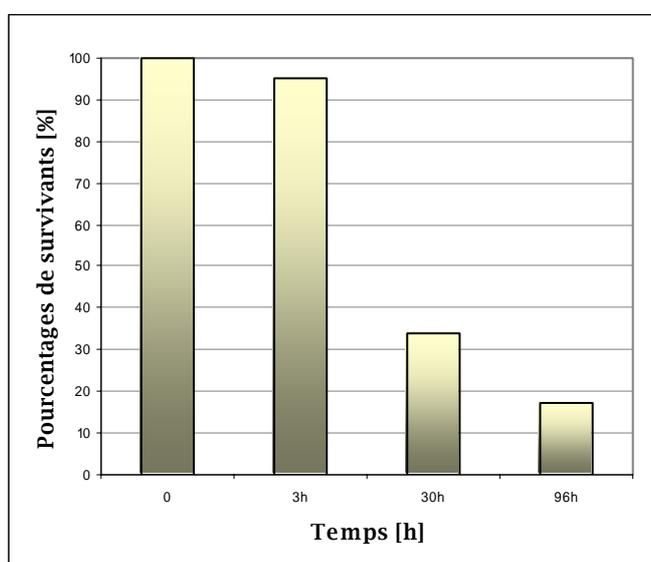


Figure 17 : Mortalité de bactéries *Staphylococcus aureus* sur les supports en fonction du temps

4.1 TEMPS DE VIE DES BACTERIES SUR LES SUPPORTS

Selon le protocole, 50 µl d'inoculum est déposé sur chaque support et mis ensuite à sécher 45 minutes, à l'étuve à 37°C. Le lait rajouté à la suspension bactérienne sert d'agent de protection contre la dessiccation qui s'opère dans l'étuve. Nous avons cherché à connaître le temps de survie des bactéries immobilisées sur les verres de montres à partir de leur sortie de l'étuve (Figure 17). Après 3 heures, 95 % des bactéries sont dénombrables. Après 30 heures, les bactéries vivantes ne représentent plus que 34 %, et moins de 20 % après 96 heures.

Le **temps de survie** de *Staphylococcus aureus* sur les supports est **supérieur** à la durée des expériences de 4 heures (240 minutes), ce qui permet de vérifier la mort des bactéries et bien due à l'activité létale des agents antimicrobiens testés.

4.2 ÉVAPORATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LE REACTEUR

Le temps d'évaporation de 50 μl de l'huile essentielle de Sarriette ($N=3$) a été mesuré afin de vérifier quelle quantité d'huile essentielle peut s'évaporer évaporée pendant la durés des expériences (Figure 18).

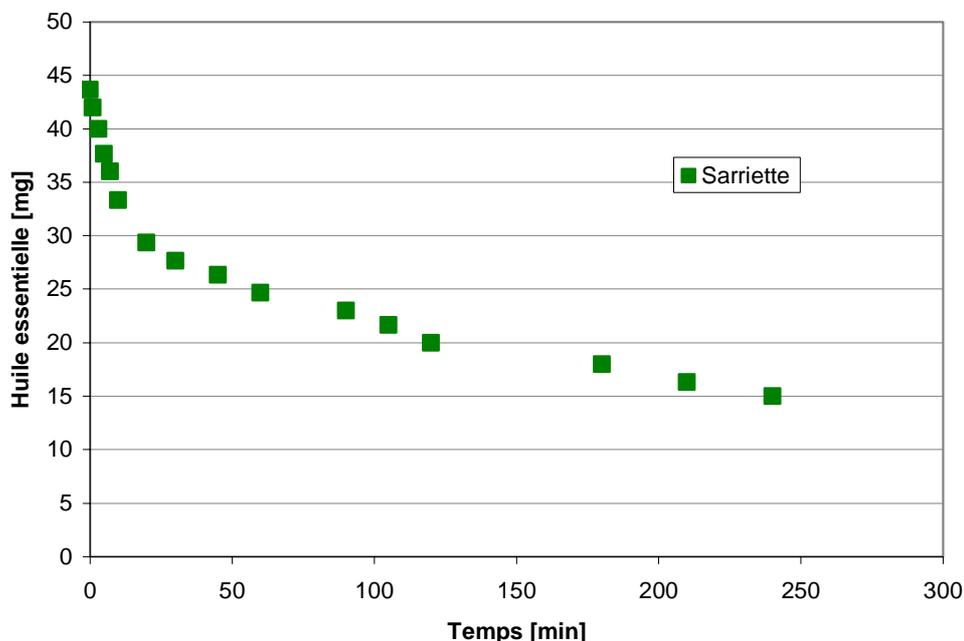


Figure 18: Temps d'évaporation de 50 μl d'huile essentielle de Sarriette déterminé par pesées successives

Pour cela nous avons déposé 50 μl d'huile essentielle sur un papier filtre maintenu par le dispositif conçu pour le bioréacteur, lui-même posé sur une balance de précision tarée. Nous avons suivi la masse du dispositif en fonction du temps jusqu'à évaporation totale des constituants volatils dans les conditions ambiantes contrôlées de température et d'humidité du laboratoire climatisé ($21^{\circ}\text{C} \pm 50\% \text{ HR}$). Le filtre étant à l'abri des courants d'air, et l'évaporation n'était pas forcée. Donc le cas d'une évaporation forcée, il est probable que débit d'évaporation soit plus important.

Nous avons effectué les essais avec et sans le système de ventilation. Ainsi la quantité d'huile essentielle de Sarriette qui s'évapore en l'espace des 240 minutes de l'expérience est de 30 mg en moyenne (soit 33 μl)¹. Ceci montre que les composés aromatiques évaporés dans cet intervalle de temps sont responsables de l'effet

¹ La densité de la Sarriette Aries réf. n° 132 est de 0.89 g /cm³.

bactéricide des huiles essentielles. Concentration en agents antimicrobiens dans le réacteur.

Les essais préliminaires et les essais proprement dits ont été réalisés avec une quantité d'agents antimicrobiens constante de 50 μ l. Les concentrations dans le bioréacteur sont calculées selon les équations ci-dessous.

EXPRESSION DES CONCENTRATIONS EN PHASE VAPEUR

La masse m d'un composant correspond à n moles:

$$m = n M$$

où M est la masse molaire du composant.

En admettant que le composant en phase vapeur se comporte comme un gaz parfait, on a:

$$pV_c = nRT = \frac{m}{M} RT \quad \text{Equation des gaz parfaits} \quad \text{Équation 4}$$

où:

V est le volume occupé par la phase vapeur,

R est la constante des gaz parfaits (8.31696 J/mole K),

p est la pression atmosphérique (101300 Pa au niveau de la mer),

T est la température absolue (°K) de l'air.

Une mole de gaz parfait à température et pression données occupant toujours le même volume, la concentration molaire est égale à la concentration volumique C_v , qui est liée à la masse de composé dans un volume d'air V_a par :

$$C_v = \frac{m}{M V_a p_a} = \frac{\rho V_l}{M V_a p_a} \quad \text{Équation 5}$$

si :

ρ est la masse volumique,

V_l est le volume de liquide qui a été évaporé.

4.3 UTILISATION DE GELOSE NEUTRALISANTE POUR LES DENOMBREMENTS

L'utilisation de gélose neutralisante Trypticase Soja Agar avec lécithine et polysorbate 80 (Twenn 80) est mentionnée dans le protocole pour les dénombrements des bactéries en contact avec les huiles essentielles. Nous avons cherché une éventuelle différence avec la gélose habituellement utilisée, Trypticase Soja Agar ou TSA. Les essais comparatifs n'ont pas mis en évidence de différence significative (Tableau 20).

Tableau 20 DENOMBREMENTS COMPARATIFS AVEC GELOSE NEUTRALISANTE ET TSA

TSA						TSA + TWEEN 80					
Témoins [UFC/ml]			Essai préliminaire ^a [UFC/ml]			Témoins [UFC/ml]			Essai préliminaire [UFC/ml]		
N	Valeur A	Valeur B	N	Valeur A	Valeur B	N	Valeur A	Valeur B	N	Valeur A	Valeur B
2	88	103	2	91	103	2	124	95	2	104	108

^adénombrement en présence de 1ml de solution de récupération

L'utilisation de gélose neutralisante n'est pas nécessaire. Nous avons utilisé le TSA pour tous les dénombrements.

4.4 EFFETS QUALITATIFS DES HUILES ESSENTIELLES EN PHASE GAZEUSE

4.4.1 Microatmosphères dans le bioréacteur

Les expériences réalisées selon la méthode des aromagrammes et des microatmosphères (chapitre III, Sélection des huiles essentielles) montrent l'activité bactéricide des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Nous avons cherché à reproduire des conditions expérimentales similaires dans le bioréacteur afin de déterminer si les huiles essentielles sont efficaces pour de plus grands volumes.

Pour ce faire la manipulation suivante a été réalisée. Deux boîtes de Pétriensemencées avec des quantités identiques de bactéries, une dans la masse et l'autre sur la surface de la gélose, ont été déposées ouvertes dans le bioréacteur. Une quantité de 20 µl de Sarriette a été déposée sur un papier filtre de 5 cm maintenu par une pince devant un petit ventilateur juste avant de fermer l'enceinte. La totalité de l'huile essentielle s'évapore, ce qui représente une concentration de 427 ppm dans le réacteur.

De la même manière, deux autres boîtes similaires aux précédentes ont été utilisées comme témoins, à l'intérieur d'un bioréacteur sans huile essentielle.

Les bioréacteurs ont été mis dans l'incubateur à 37°C pendant 18 heures.

A leur sortie, les 4 géloses ont été comparées. Le témoin ensemencé en surface a développé un tapis de colonies confluentes et le témoin ensemencé dans la masse, plus de 10 000 UFC.

Les boîtes en contact avec les huiles essentielles **ne présentent aucune colonie visible** à l'œil nu. Ces boîtes conservées quelques jours fermées à température ambiante, n'ont développé **aucune nouvelle** colonie. Pour confirmer l'effet bactéricide, il aurait fallu effectuer une subculture de ces boîtes.

Cette manipulation a aussi été réalisée à température ambiante, 21°C pendant 18 heures, avec un résultat identique.

Ces essais qualitatifs montrent l'effet bactéricide de l'huile essentielle de Sarriette, selon un temps de contact de 18 heures à 37°C et à 21 °C.

Ces expériences nous ont permis de vérifier les points suivants :

- les huiles essentielles par voie gazeuse ont un **effet léthal** sur des bactéries immobilisées sur un milieu gélosé et à l'intérieur de celui-ci après 18 heures de contact :
 1. à une température de 37°C, pour reproduire la méthode des microatmosphère dans un volume supérieur,
 2. à température ambiante, pour des conditions d'application.
- la quantité d'huile essentielle de **20 µl est suffisante** pour obtenir un effet sur les bactéries dans l'enceinte.

Sur base de ces résultats, nous avons repris le protocole de la norme Afnor NF T72-281 et remplacé les verres de montres par des boîtes gélosées.

4.4.2 DVA avec des boîtes de Pétri gélosées comme « porte germes »

Les essais proprement dits de la norme Afnor de DVA NF T72-281 ont été effectués avec des boîtes de Pétri comme « porte germes ».

Deux boîtes de Pétri ensemencées avec des concentrations identiques de bactéries (suspensions bactériennes d'une densité optique de 0.17 en moyenne, ce qui représente une concentration de 10⁶ bactéries/ml), une par inclusion dans la masse et l'autre par étalement sur la surface de la gélose ont été déposées ouvertes dans le bioréacteur.

Puis 50 µl de Sarriette a été déposé sur le papier filtre juste avant de fermer l'enceinte (1068 ppm). De la même manière, deux autres boîtes similaires aux précédentes ont

été utilisées comme témoins, à l'intérieur d'un bioréacteur sans huile essentielle. Après 4 heures de temps de contact dans l'enceinte, les boîtes de Pétri ont été sorties puis refermées.

La même expérience a été réalisée avec une quantité de 15 μl de Sarriette (320 ppm) et un temps de contact de 2h30 (

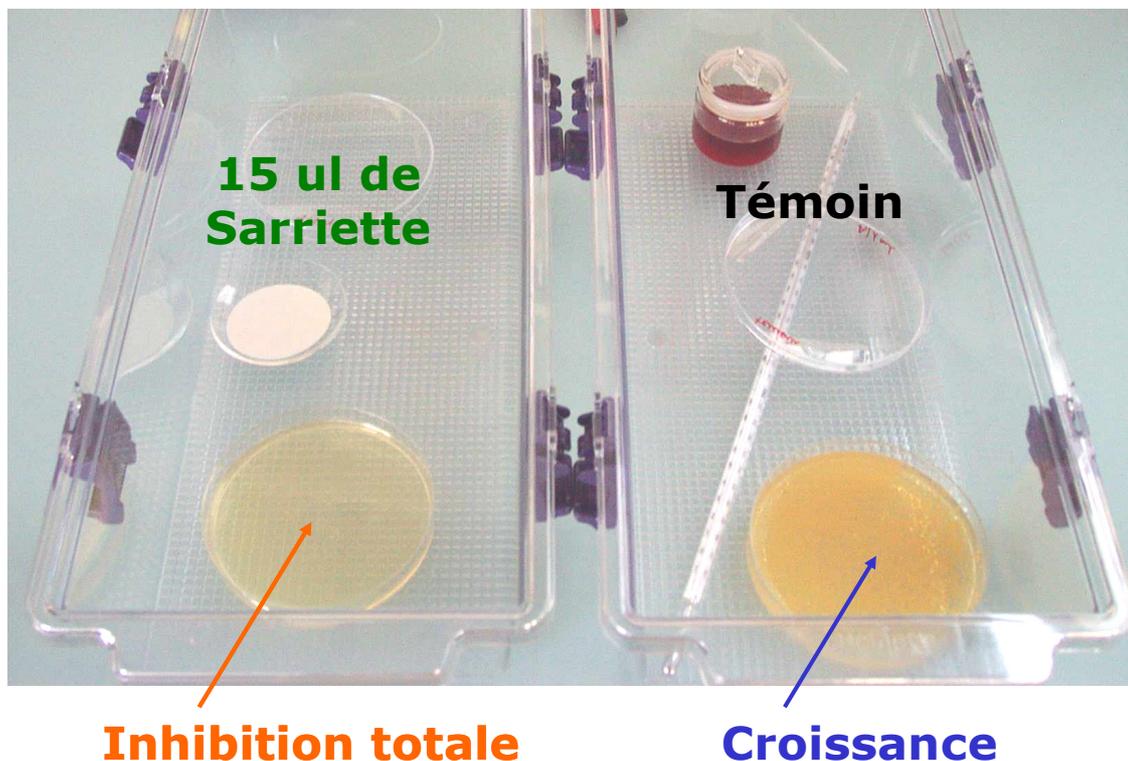


Photo 9).

Photo 9 : Inhibition de *S. aureus* en présence de 15 μl de Sarriette après 2h30 d'exposition aux composés volatils des huiles essentielles

La concentration maximale d'huile essentielle testée en phase gazeuse varie entre 360 et 1200 ppm¹ selon la quantité déposée dans le bioréacteur.

On observe un effet tout ou rien même lors de la diminution de la concentration en huiles essentielles dans le réacteur. A la sortie des bioréacteurs, les géloses des deux expériences ont été comparées à des témoins (Tableau 21).

¹ 1 μl d'huile essentielle évaporé correspond approximativement à 24 ppm dans le bioréacteur selon la formule des gaz parfaits.

Tableau 21 EFFET BACTERICIDE DE LA SARRIETTE EN MILIEUX GELOSES PAR DVA

SARRIETTE		50 µl / 4 heures		15 µl / 2 h30		
		[UFC]		[UFC]		
Ensemencement	N	Témoin	Essais proprement dits	N	Témoin	Essais proprement dits
Etalement	1	≥ 10 ⁶	-*	1	≥ 10 ⁶	-*
Inclusion	1	≥ 10 ⁶	-*	1	≥ 10 ⁶	-*

*aucune croissance décelable à l'œil nu

Les témoins des deux expériences sont identiques. Les deux boîtes ensemencées en surface sont recouvertes d'un tapis de colonies confluentes, issues des 10⁶ bactéries inoculées. Un nombre non dénombrable de colonies s'est développés dans la gélose des boîtes de Pétri ensemencées dans la masse.

Les 4 boîtes exposées à l'huile essentielle ne présentent aucune croissance à l'œil nu lors de leur sortie de l'enceinte. En effet, aucune colonie ne s'est développée dans les deux conditions d'expériences : ni pour 50 µl pendant 4 heures, ni pour 15 µl pendant 2h30. Pour confirmer l'effet bactéricide fortement présumé, il aurait cependant fallu effectuer des subcultures des boîtes sans colonies visibles.

Ces essais montrent que des bactéries immobilisées en milieu gélosé sont sensibles aux effet des composés volatils des huiles essentielles, et ce jusqu'au conditions minimales testées de 320 ppm d'huile essentielle de Sarriette et 2h30 de contact.

5. NORME NF T72-281

5.1 EXPRESSION DES RESULTATS

Selon le procès verbal d'essai de la norme (Annexe C), les résultats concernant les effets des agents de désinfection sont exprimés par la valeur **d**, le **taux de réduction logarithmique** dont la formule est :

$$d = \lg T - \lg(n_1' + n_2') \quad \text{Équation 6}$$

avec :

T , le nombre moyen de colonies dénombrées récupérées sur les supports témoins par ml de liquide de récupération,

n'_1 , la concentration moyenne de bactéries retrouvées dans le liquide de récupération,

n'_2 , la quantité moyenne de bactéries restant sur les supports, et dénombrées après inclusion du support dans la gélose.

La difficulté de déterminer n'_2 étant considérable, nous n'avons pas pu intégrer cette valeur dans nos calculs. En effet, lorsque le support est déposé dans la boîte de Pétri et que la gélose fondue est coulée dessus, il est extrêmement peu pratique d'homogénéiser la gélose afin que les colonies après incubations soient distinctes et dénombrables. Nous avons effectué plusieurs essais sans pouvoir compter de colonies ou chiffrer les amas et traînées de bactéries qui se forment autour du verre de montre. A défaut de cette détermination, nous avons porté une attention particulière au grattage des verres de montre afin de récupérer le maximum de bactéries, réduisant au maximum la valeur de n'_2 .

5.2 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les conditions selon le protocole de la norme sont les suivantes :

- Température du local d'essai : $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Humidité relative : $60\% \pm 10\%$

REALISATION DE CES CONDITIONS

● Les essais ont été effectués à la température de consigne de 21°C du laboratoire de microbiologie climatisé, stores baissés.

Les premières expériences ont été réalisées avec la présence d'un thermomètre dans le bioréacteur témoin et d'un autre à l'extérieur. La température est demeurée constante et identique à l'intérieur et à l'extérieur pendant la durée des expériences.

● L'humidité relative pendant la durée de l'expérience est celle générée par la climatisation de la salle affichée et réglée en amont à $50\% \pm 10\%$.

En ce qui concerne l'humidité relative à l'intérieur du bioréacteur, nous nous sommes inspirés d'expériences similaires (*de Billerbeck, 2000*) réalisés avec une humidité relative maintenue constante grâce à l'adjonction de solutions saturées de sels. Nous avons choisi du bichromate de sodium ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dont une solution saturée garanti une humidité relative de 52 %. La solution s'est dénaturée au contact des huiles essentielles pendant la durée de l'expérience dans le bioréacteur. D'une couleur orange

vif elle est devenue brun foncé et les cristaux non dissous ont été solubilisés. Les témoins sans huile essentielle sont restés stables, ce qui indique la dénaturation de la solution est due au contact des huiles essentielles, et probablement à la réaction de réduction du Cr^{IV} puissant oxydant, en présence des phénols. Nous avons donc renoncé à mettre ces solutions dans nos réacteurs à cause de leur évolution pendant l'expérience.

Les expériences ont été réalisées en parallèle pour les différents agents antimicrobiens et les témoins. L'utilisation de 5 bioréacteurs tous équipés de manière identique nous a permis de faire varier le temps de contact dans les enceintes sans avoir à les ouvrir pour sortir des supports et modifier ainsi la concentration des agents antimicrobiens à l'intérieur.

Nous avons varié les temps de contact dans le bioréacteur de 45 minutes à 4 heures. Tous les essais ont été réalisés avec une **quantité constante de 50 µl d'agent antimicrobien** déposé sur le papier filtre, que cela soit l'huile essentielle de Sarriette des montagnes (Aries réf. n°132) ou le Formol, solution de formaldéhyde à 40 % vendue en pharmacie.

5.3 VALIDITE DES ESSAIS PRELIMINAIRES

Pour valider les essais préliminaires, il est nécessaire de vérifier si d'éventuels résidus d'agents antimicrobiens adsorbés à la surface des « portes germes » n'ont pas d'activité inhibitrice rémanente sur les bactéries, dans le liquide de récupération. Pour cela, un verre de montre sans bactérie est laissé dans le bioréacteur pendant l'essai avec les agents prévus pour la désinfection. Le verre de montre est ensuite plongé dans le liquide de récupération. Cette solution est la solution de récupération S (Protocole 8 en Annexe).

Dans une boîte de Pétri, 1 ml des dilutions 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ de la suspension bactérienne initiale des essais est déposé avec 1 ml de la solution de récupération S, en veillant bien à ce que les deux liquides ne soient pas en contact avant l'inclusion dans la gélose.

La concentration de colonies obtenues **n₁** en présence de la solution de récupération S est à comparer avec celle obtenue par dénombrement des dilutions équivalentes **N₁**, sans solution de récupération S. (Tableau 22).

Tableau 22 RESULTATS DES ESSAIS PRELIMINAIRES POUR DIFFERENTES HUILES ESSENTIELLES ET DIFFERENTS TEMPS DE CONTACT

Huile essentielle		N_1 (sans S) [UFC/ml]			n_1 (avec S) [UFC/ml]			d
Temps de contact	N	Moyenne	Ecart type	N	Moyenne*	Ecart type*		
Sarriette	1h	1	2,14.10 ⁸	-	4	1,9.10 ⁸	3.10 ⁷	0.05
Sarriette	2h	4	1,06.10 ⁸	4.10 ⁶	4	1,02.10 ⁸	6.10 ⁶	0.02
Sarriette	4h	3	1,5.10 ⁸	2.10 ⁷	8	1,5.10 ⁸	1.10 ⁷	0
Origan	4h	3	1,5.10 ⁸	2.10 ⁷	4	1,47.10 ⁸	3.10 ⁶	0
Thym	4h	3	1,5.10 ⁸	2.10 ⁷	4	1,47.10 ⁸	5.10 ⁶	0

*pour les cas ou $N=2$, les deux valeurs sont indiquées

Pour la Sarriette, après 1 heure de temps de contact, n_1 représente 86 % des bactéries initiales, après 2 heures 96 % et après 4 heures, n_1 représente la quasi totalité, soit plus de 99 % des bactéries initiales. Dans les deux cas, le taux de réduction d est quasi nul.

Pour le Thym, et l'Origan, et après 4 heures de contact, n_1 représente pratiquement le 100 % des bactéries initiales, ce qui correspond à un taux de réduction $d = 0$.

On observe un effet antibactérien quasi nul de la solution S pour les différents temps de contact, entre 1 et 4 heures. Cet effet est négligeable par rapport à l'efficacité attendue de la désinfection.

Les essais préliminaires sont validés pour l'utilisation des huiles essentielles comme agent de désinfection selon la norme Afnor NF T72-281, et les expériences des essais proprement dits peuvent être effectués.

5.4 ESSAIS PROPREMENT DITS

Nous avons réalisés 17 séries d'expériences. Afin de montrer la reproductibilité des résultats, chaque essai a été doublé et certains d'entre eux ont été réalisés par deux opérateurs différents.

Les essais proprement dits avec les huiles essentielles représentent 57 essais sur verre de montre, soit :

- 35 verres de montre pour la Sarriette,
- 8 pour l'Origan,
- 8 pour le Thym.

Malgré ce nombre d'essais indépendants, nous n'avons pas pu obtenir de reproductibilité. Les résultats obtenus ont montré des variations extrêmes : de comparables au témoin et donc ne montrant aucun effet à un effet bactéricide.

Le manque de reproductibilité évident des expériences nous a incité à passer en revue les différentes manipulations du protocole. L'explication que nous avons retenue est l'adjonction de lait écrémé 1/20 (v/v) dans l'inoculum de départ. Cette étape est importante puisque le lait joue un rôle dans la protection des bactéries sur les supports.

Nous avons cherché à définir si l'adjonction du lait n'influence pas l'activité antimicrobienne. Nous avons constaté à plusieurs reprises que l'aspect de l'inoculum sur les verres de montre variait après la phase de séchage dans l'incubateur : il était plus ou moins épais, et plus ou moins translucide.

Bien que les flacons soient conservés au réfrigérateur, le lait a tendance à se dégrader relativement rapidement une fois ouvert au contact de l'air. La stérilisation à l'autoclave de petites quantités augmente les réactions de Maillard du lait qui brunit sensiblement. La qualité du lait n'a probablement pas été constante durant nos expériences, ce qui pourrait avoir une influence sur l'état de protection des bactéries lors des essais proprement dits.

Afin de vérifier l'hypothèse concernant l'influence du lait sur la variabilité de nos résultats, nous avons effectué des essais comparatifs avec des laits de différentes provenances, à savoir :

- lait en brique du marché : - M-Drink à 2,7 % de matières grasses (Migros),
- Slimline 0 % (Coop).
- lait écrémé de qualité microbiologie (skin milk Oxoid) stérilisé :
 - par filtration (0.2 µm),
 - par autoclave 5 minutes et 20 minutes à 121 °C.

5.4.1 Influences des différents laits

L'influence de différents laits ajoutés à l'inoculum sur les effets bactéricides ou bactériostatiques de huiles essentielles a été mesurée après un temps de contact de 4 heures avec la Sarriette (Tableau 23).

Tableau 23 EFFETS BACTERICIDES DE LA SARRIETTE POUR DIFFERENTS TYPES DE LAITS

TYPES DE LAITS	TEMOINS			ESSAIS PROPREMENT DITS*			
		[UFC/ml]			[UFC/ml]		
	<i>N</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>	<i>N</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>	<i>d</i>
Oxoid filtré	4	6,9.10 ⁴	3.10 ³	4	1,4.10 ⁴	3.10 ³	0.7
Oxoid autoclavé 5 min.	4	4,8.10 ⁴	7.10 ³	4	2,3.10 ⁴	5.10 ³	0.3
Oxoid autoclavé 20 min.	4	5,4.10 ⁴	2,5.10 ³	4	2,4.10 ⁴	2.10 ³	0.3
M-Drink 2.7 %, filtré	4	5,3.10 ⁴	9.10 ³	1	9,1.10 ⁴	-	0.8
Slimline 0 %, filtré	4	5,9.10 ⁴	1.10 ³	4	1,84.10 ⁴	0,8.10 ²	0.5

*Sarriette réf: 132 Aries : 50µl /4h

Les taux de réduction ***d*** pour ces essais sont tous inférieurs à 1, ce qui indique que l'effet bactéricide de la Sarriette est très faible.

On note tout de même que les laits autoclavés 5 et 20 minutes (Oxoid) ont des taux de réduction ***d*** inférieurs aux 3 laits stérilisés par filtration à 0.2 µm (Oxoid, M-Drink et Slimline). L'effet du M-Drink 2,7% est comparable à celui du lait Oxoid filtré.

Les essais sont répétés en présence de Formol pour vérifier l'influence du procédé de stérilisation du lait, car le formaldéhyde est un agent de désinfection selon ce protocole.

Les verres de montres inoculés au lait écrémé Oxoid 1/20 (v/v) stérilisé soit par filtration, soit dans l'autoclave 5 min. à 121 °C sont exposés à la Sarriette et au Formol pendant 4 heures (Tableau 24). En ce qui concerne la Sarriette, les taux de réduction ***d*** sont pratiquement nuls : ***d***=0.01 pour le lait stérilisé par filtration et ***d*** =0.02 pour le lait stérilisé à l'autoclave. Les résultats exprimés en % de bactéries tuées par rapport au témoin sont faibles.

Le procédé de stérilisation, filtration ou autoclave ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de l'huile essentielle. La Sarriette n'est pas active sur les bactéries des portes germes protégées avec du lait.

Tableau 24 EFFETS BACTERICIDES DE LA SARRIETTE ET DU FORMOL SELON DEUX PROCEDES DE STERILISATION DU LAIT

Oxoid	TEMOINS			ESSAIS PROPREMENT DITS					ESSAIS PROPREMENT DITS				
				Sarriette					Formol				
	N	Moy.	E. type	N	Moy.	E. type	<i>d</i>	% ^{***}	N [*]	(1)	(2)	<i>d</i>	% ^{***}
Filtré	4	4,3.10 ⁴	2.10 ³	4	4,20.10 ³	5.10 ²	0.01	2,4	2	82	78	2.7	99,8
Autoclavé**	4	4,2.10 ⁴	5.10 ³	4	4,0.10 ⁴	4.10 ³	0.02	4,6	2	1180	1420	1,5	96,9

* pour les cas ou N= 2 les deux valeurs (1) et (2) sont indiquées

**5 minutes à 121°C

***pourcentage de bactéries tuées par rapport au témoin

Pour le formaldéhyde, le taux de réduction *d* est plus élevé dans le cas du lait stérilisé par filtration (*d* =2.7) que dans celui du lait autoclavé 5 min. à 121°C (*d* =1.5). Toutefois, dans les deux cas, ce sont pratiquement la totalité (99,8 % pour le lait filtré et 96,9 % pour le lait autoclavé) des bactéries qui sont tuées par rapport au témoin.

5.5 VERIFICATIONS COMPLEMENTAIRES

Les huiles essentielles ne semblent pas être efficace en phase gazeuse sur un inoculum de *Staphylococcus aureus* selon le protocole de la norme Afnor NF T72-281.

Nous avons identifié certains points qui semblent avoir une influence sur les résultats de cette méthode de « portes germes » :

1. La survie des bactéries dans l'inoculum pendant le séchage à l'étuve des verres de montre.
2. La récupération quantitative des bactéries après le temps de l'essai, soit après le contact avec l'agent antimicrobien, soit les témoins.
3. L'effet protecteur du lait ajouté à l'inoculum bactérien.

5.5.1 Séchage des verres de montres

Selon le protocole, les supports doivent être contaminés par un dépôt de 50 µl de suspension bactérienne au lait 1/20 (v/v) dans des boîtes de Pétri stériles. Il est conseillé de transporter les supports à l'étuve avec précaution afin de ne pas étaler la goutte. Les supports doivent sécher 45 minutes très précisément à 37 ±1 °C dans les boîtes de Pétri, couvercles enlevés. Le protocole précise que des supports non secs après ce traitement ne peuvent servir aux essais.

Le séchage des inoculums sur les verres de montre est une opération délicate. Il est difficile de dire avec certitude si l'aspect de la croûte blanchâtre formée par la

suspension bactérienne opacifiée par sa teneur en lait est la preuve que l'inoculum est sec. Pendant le transport la goutte de suspension bactérienne peut s'étaler, et alors l'aspect de l'inoculum est encore différent.

Nous avons juste constaté ces différences, sans en déterminer avec précision les conséquences. Cependant nous nous sommes penchés sur le rôle protecteur du lait et son influence sur les essais.

5.5.2 Présence de lait dans l'inoculum

Il semblerait que la qualité du lait et la manière dont il est stérilisé avant son emploi, influencent les résultats des essais proprement dits en présence d'huile essentielle.

COMPOSITION

Le lait¹ est un mélange complexe constitué à 90% d'eau, de pH compris entre 6.6 et 6.8, constitué :

- d'une solution vraie composée de sucre (lactose) + protéines solubles + minéraux + vitamines hydrosolubles
- d'une solution colloïdale de protéines (les caséines en particulier)
- d'une émulsion de matières grasses

UTILISATIONS DU LAIT EN MICROBIOLOGIE

Cette méthode de « portes germes » semble la seule référence qui mentionne l'utilisation de lait écrémé en poudre dans l'inoculum afin de protéger les bactéries de la dessiccation.

En microbiologie on utilise généralement le lait dans la formulation de géloses spécifiques. Comme le sang, le sérum, l'extrait de levure, le lait est aussi utilisé afin de mieux standardiser certaines conditions expérimentales (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

Alors que le lait semble protéger les bactéries aussi des effets des huiles essentielles, il a en fait une influence sur l'activité de l'agent antimicrobien lui-même.

L'interférence de matières organiques (les protéines en particulier) avec un agent antimicrobien conduit :

¹ (<http://www.vet-lyon.fr/ens/nut/webBromato/cours/cmlait/compolai.html>).

- soit à une véritable réaction chimique, selon la nature de la matière
- soit à des phénomènes d'adsorption de surface qui réduisent la disponibilité de l'agent antimicrobien

Les oxydants (*hypochlorites, iode,...*) et les produits réactifs (*phénols, acides, etc.*) sont particulièrement inhibés par la présence de protéines (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

La présence de lait et par conséquent l'adjonction de protéines correspond à l'introduction d'une « substance interférente » pour les essais avec des huiles essentielles. En effet, un certain nombre d'entre elles contiennent des phénols, surtout parmi les huiles essentielles antimicrobiennes.

Dans des résultats non publiés, le Professeur A. Crémieux a montré qu'un essai en suspension réalisé avec une forte charge en protéines selon un temps d'exposition de 5 minutes aboutit à des concentrations de bactéries survivantes plus élevées que celles déterminées par un essai en 15 minutes sur des « portes germes » où une faible quantité de lait protège l'inoculum lors du séchage (*Fleurette, Freney et al., 1995*). Ceci confirme la supposition que les protéines du lait interfèrent avec l'agent antimicrobien.

Si le lait protège les bactéries de la dessiccation, il les « protège » aussi des huiles essentielles, plus particulièrement des huiles essentielles phénolées. En revanche, l'effet protecteur du lait vis-à-vis des bactéries ne semble pas interférer avec un composé chimique comme le formaldéhyde. D'ailleurs cette norme de validation des désinfectants de surface par voie aérienne a été établie principalement pour ce genre de composé chimique.

6. OPTIMISATION DU PROTOCOLE AUX HUILES ESSENTIELLES

Le protocole de la norme NF T72-281 ne permet pas de montrer une activité antimicrobienne des huiles essentielles. Nos résultats montrent que le lait interfère au niveau de leur action antimicrobienne. En effet, de nombreux principes actifs sont très fortement dépendants du milieu (teneur en protéines, pH) pour lequel sont établis les résultats (*Fleurette, Freney et al., 1995*). Cela semble être le cas des huiles essentielles qui contiennent des phénols.

Nous avons recherché comment contourner cet effet protecteur pour permettre aux huiles essentielles sélectionnées lors du Chapitre III d'agir sur les bactéries immobilisées sur les « portes germes ».

Le produit de remplacement doit remplir la condition suivante :

● sa composition ne doit pas interférer avec l'activité antimicrobiennes des huiles essentielles, ni avec celle des autres agents antimicrobiens, le formaldéhyde en particulier.

Nous avons effectué plusieurs essais de remplacement du lait dans l'inoculum bactérien.

6.1 EFFET PROTECTEUR DU LAIT

En premier lieu, nous avons fait des essais en présence et en absence de lait Oxoid dans l'inoculum en utilisant la même suspension bactérienne dans l'eau physiologique.

Les résultats des dénombrements des bactéries sur les verres de montre (Figure 19) montrent qu'en absence de lait, 95 % des bactéries ne survivent pas pendant les 45 minutes de séchage à l'étuve. Ce pourcentage augmente ensuite avec le temps, tandis qu'en présence de lait, 100 % des bactéries sont encore cultivables après séchage (45 minutes après le dépôt de l'inoculum, $t = -0.75h$).

Un effet protecteur contre la dessiccation des bactéries est indispensable.

Nous proposons de substituer le lait par d'autres composés tels que l'agar pur et le milieu de culture liquide Tryptone Soja Broth (TSB).

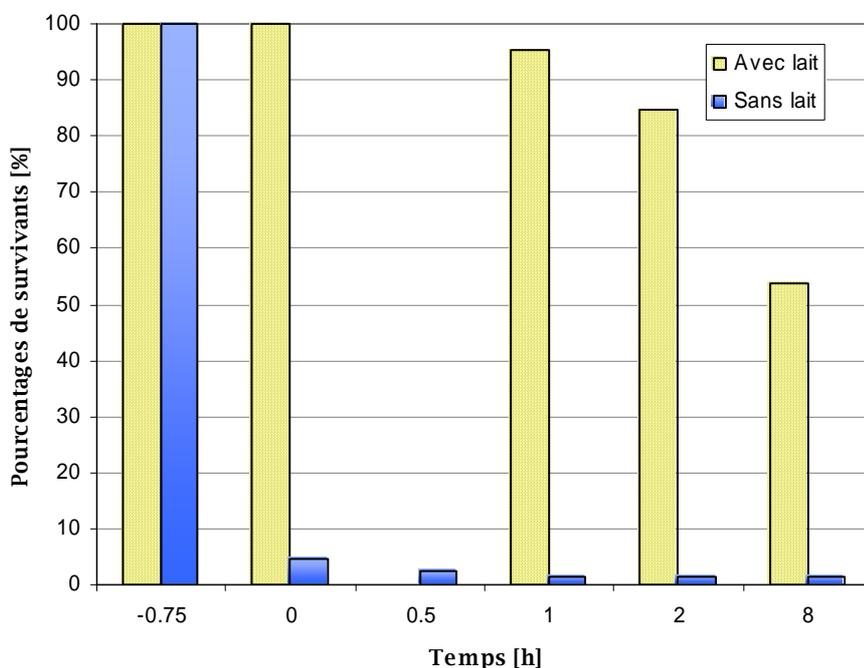


Figure 19 : Influence de la présence de lait dans l'inoculum sur la viabilité des bactéries sur les « portes germes » avant ($t = -0.75$) et après ($t = 0$) séchage

6.2 SUBSTITUTION DU LAIT PAR UN MILIEU DE CULTURE

Pour offrir des conditions identiques de protection aux bactéries contre la dessiccation, nous avons testé des substituts au lait, pouvant garantir un nombre de bactéries identique sur les verres de montres.

Une possibilité est d'ajouter 1/10 d'agar provenant d'une solution à 0.1 % (v/v) dans l'inoculum. Aucune protection des cellules n'a été obtenue avec ce substitut.

Une autre possibilité est de substituer le lait par un substrat. En effet les bactéries survivent dans les ventilations que si elles ont accès à une quelconque nourriture. Donc par analogie, des concentrations de 1/5, 1/10 et 1/20 (v/v) de Tryptone Soja Broth (TSB, substrat utilisé dans le laboratoire) ont été ajoutées à l'inoculum bactérien de départ. Des verres de montres ont été ensuite inoculés avec les différentes suspensions. Les concentrations bactériennes viables sur les verres de montre sont mesurées à $t=0$ et après 8 h, soit le double du temps de nos essais initiaux. Les résultats exprimés en termes de taux de réduction logarithmique d montrent la diminution du nombre des bactéries sur les supports après 8 heures, pour des inoculums à l'eau physiologique, au lait et au TSB (Tableau 25).

Tableau 25 TAUX DE REDUCTION DES BACTERIES SUR LES SUPPORTS APRES 8 H							
Inoculums	t=0h			t=8h			<i>d</i>
	[UFC/ml]			[UFC/ml]			
	<i>N</i>	Valeur 1	Valeur 2	<i>N</i>	Valeur 1	Valeur 2*	
Eau physio.	2	5,70.10 ³	5,23.10 ³	4	2,52.10 ³	1,02.10 ²	1,7
Lait 1/20 (v/v)	2	1,92.10 ⁸	2,14.10 ⁸	2	6,40.10 ⁴	5,55.10 ⁴	3,5
TSB 1/20 (v/v)	2	2,59.10 ⁸	3,04.10 ⁸	2	5,90.10 ³	5,50.10 ³	4,7
TSB 1/10 (v/v)	2	2,83.10 ⁸	2,68.10 ⁸	2	2,64.10 ⁴	2,95.10 ⁴	4
TSB 1/5 (v/v)	2	1,72.10 ⁸	2,10.10 ⁸	2	4,34.10 ⁴	4,80.10 ⁴	3,6

**Ecart type dans le cas ou N=4*

Le taux de réduction logarithmique obtenu pour l'eau physiologique est le plus élevé $d=1,7$. Cela laisse penser qu'après 8 heures l'eau permet la meilleure survie des bactéries sur les supports. Or, le coefficient d dans ce cas est calculé selon la valeur initiale de 5,70.10³ UFC/ml à $t=0$. En imaginant que les bactéries aient été protégées de la dessiccation par l'eau physiologique et en prenant la valeur moyenne à $t=0$ de 2.10⁸ UFC/ml, alors $d = 6,3$. Le taux de réduction calculé ainsi est alors bien supérieur au

précédent. L'eau physiologique seule ne remplace en aucun cas la présence d'un agent de protection.

Les résultats avec le **TSB 1/5** (v/v) sont comparables aux résultats des inoculums au **lait**. En effet, avec des concentrations initiales proches de 2.10^8 UFC/ml, le coefficient **d** est identique pour le **lait** et pour le **TSB 1/5**. Après 8 h, **d** =3.5 pour le **lait** et **d** =3.6 pour le **TSB 1/5**. Pour les deux autres concentrations de TSB 1/20 et 1/10, les bactéries n'ont pas été suffisamment protégées dans l'incubateur, car le coefficient de réduction logarithmique est plus élevé (**d** entre 4 et 5).

7. RÉSULTATS SELON LE PROTOCOLE OPTIMISÉ

La présence de lait dans l'inoculum bactérien, garant d'un effet protecteur contre le dessiccation lors du séchage des verres de montres dans l'incubateur, a été remplacé par l'adjonction d'un substrat dans la suspension bactérienne sous forme de TSB 1/5 (v/v). Nous avons vérifié si cette préparation était adaptée à la recherche d'un effet antibactérien des huiles essentielles en phase gazeuse, selon le protocole de la norme Afnor NF T72-281.

7.1 RESULTATS AVEC LE MILIEU NUTRITIF

Une série d'essais comparatifs (Tableau 26) réalisés en présence de lait et le milieu nutritif TSB pour un temps de contact identique de 4 heures montre que :

Tableau 26 VALIDATION DES ESSAIS PROPREMENT DITS POUR LE TSB

4h	TEMOINS			Sarriette				Formol			
	[UFC/ml]			[UFC/ml]				[UFC/ml]			
	<i>N</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>	<i>N</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>	d	<i>N</i>	Moyenne	<i>Ecart type</i>	d
Oxoid filtré	2	43'700	4'170	2	6'150	212	0,8	2	5	0	3,9
TSB 1/5	4	47'500	1'160	4	5	2	4	4	88	24	2,7

pour les cas ou N= 2, les deux valeurs sont indiquées

Dans le cas du formaldéhyde, le taux de désinfection **d** =3.94 de l'inoculum contenant du lait Oxoid filtré est supérieur à celui de l'inoculum au TSB **d** =2.73.

Pour les deux agents de protection l'effet bactéricide est important. On note un facteur 100 entre la concentration en bactéries avec le lait Oxoid stérilisé par filtration (5 ± 0 UFC /ml) et la concentration obtenue avec le TSB (88 ± 24 UFC /ml).

Le TSB ne minimise pas l'activité des phénols de l'huile essentielle de Sarriette. En effet, l'activité bactéricide en présence de TSB est élevée, le coefficient de réduction bactéricide $d=4$. Il est quasi nul en revanche avec le lait Oxoid filtré ($d=0.85$).

Si l'on considère l'abattement des concentrations de bactéries, alors il y a un réel écart entre les valeurs obtenues avec la Sarriette en présence de lait : $6'150 \pm 212$ UFC /ml et les valeurs de obtenues avec le TSB, très nettement inférieures : 5 ± 2 UFC /ml.

7.2 VARIATION DU TEMPS DE CONTACT

Sur la base des résultats concluants de remplaçant du lait dans l'inoculum, nous avons continué les expériences en utilisant le TSB 1/5 (v/v) exclusivement pour la préparation des suspensions bactériennes.

Nous avons cherché à savoir si nous pouvions diminuer de moitié le temps de contact

TSB 1/5	TEMOINS			Sarriette				Formol			
	[UFC/ml]			[UFC/ml]				[UFC/ml]			
Contact	N	Moyenne	Ecart type	N	Moyenne	Ecart type	d	N	Moyenne	Ecart type	d
2 heures	2	42'500	1'130	2	94	10	4,6	2	0	-	≥ 4
4 heures	4	44'600	1'910	4	0,5	0,7	5,3	4	0	-	≥ 4

de 4 heures passablement contraignant (Tableau 27).

Le Formol a une action bactéricide totale, que le temps de contact soit de 2 ou de 4 heures.

Les taux de réduction sont relativement élevés pour la Sarriette et la désinfection est quasi totale après 4 heures de contact, $d = 5.25$. En revanche, après 2 h de temps de contact, $d = 4.63$ et la concentration de bactéries est environ 100 fois plus élevée. Ce temps ne semble pas être suffisant.

7.3 CONCENTRATIONS ACTIVES

Les résultats de la concentration de l'huile essentielle de Sarriette et de Formol sont exprimés en ppm pour l'enceinte du bioréacteur (Tableau 28).

- Quelque soit l'agent protecteur : le lait ou le TSB, le formaldéhyde a un effet bactéricide. La désinfection obtenue avec **1900 ppm est totale** pour des temps de contact de **2 et 4 heures**.

Tableau 28 CONCENTRATION DES AGENTS ANTIMICROBIENS DANS LE BIOREACTEUR

	MM [g/mole]	Densité [g/cm ³]	Volume liquide [μl]	Volume gaz [l]	Concentration [ppm]
Formaldéhyde 100 %	30	0.81	50	7	4749
Formaldéhyde 40 % *	30	0.81	20	7	1900
Sarriette déposée	145.7	0.89	50	7	1200
Sarriette évaporée	145.7	0.89	33	7	790

* *Formol*

- L'huile essentielle de Sarriette a un effet bactéricide sur les bactéries immobilisées sur des verres de montre protégées par du TSB. Le temps de désinfection totale pour l'huile essentielle de Sarriette est de **4 heures**, pour une concentration bactéricide de **1200 ppm** dans le bioréacteur.

7.4 COMPARAISON AVEC LES RESULTATS DE LA LITTERATURE

Un chercheur japonais travaille sur l'activité des huiles essentielles en phase gazeuse (*Inouye, 2003a, 2003b*). Sa méthode est comparable à la notre, puisqu'il utilise un bioréacteur de 1,3 litres dans lequel il dépose des boîtes de Pétri et des buvards imbibés d'huiles essentielles.

Selon leurs conditions expérimentales, le valeur de la dose gazeuse minimale inhibitrice (MID) d'une huile essentielle de Thym à 80 % de carvacrol en phase gazeuse et de **12.5 μg/ cm³** ou **ml d'air** pour *Staphylococcus aureus*.

La concentration active de Thym pour ces expériences est de **2000 ppm** environ. Le temps d'expérience n'est pas mentionné.

CONCLUSION

1. RÉCAPITULATIF

1.1 CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les systèmes de traitement d'air des bâtiments abritent de nombreux germes, bactéries et champignons qui sont ensuite véhiculés dans toute l'enceinte ventilée.

Parmi les différents moyens existant pour empêcher un développement microbien inopportun, on peut citer les huiles essentielles. Ces extraits de végétaux sont l'objet de nombreuses recherches scientifiques dans le domaine médical, elles ont démontré leur efficacité pour le traitement de nombreuses pathologies. De plus, ces substances odorantes à la base de thérapies ancestrales sont bien tolérées et ne sont pas toxiques, au contraire de la grande majorité des agents antimicrobiens utilisés pour la désinfection de l'air dans des conditions d'utilisation bien définies.

1.2 CHAPITRE II : ESSAIS PRELIMINAIRES

Des prélèvements microbiens sur milieux gélosés nous ont permis de voir la diversité des microorganismes présents dans divers lieux tels qu'une salle de cours, un bureau et des installations de ventilation. En mettant en contact ces microorganismes et une huile essentielle réputée antibactérienne, nous avons noté un effet d'inhibition total de la croissance des microorganismes sur chaque différent prélèvement effectué.

Pour pouvoir travailler en laboratoire, et comparer les résultats obtenus avec d'autres études, nous avons décidé de travailler avec des souches test recommandées par la norme EN 1040 d'activité bactéricide de base de désinfectants : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

1.3 CHAPITRE III : SELECTION DES HUILES ESSENTIELLES

Deux méthodes facilement réalisables, peu coûteuses et fréquemment utilisées en médecine aromatique ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne d'huiles essentielles réputées actives : aromatogrammes et microatmosphères

Comme la nature de la souche a une influence sur les résultats des mesures d'activité antibactérienne nous avons choisi des souches référencées.

Quelques microlitres de certaines huiles essentielles déposés sur un disque de papier poreux créent des halos d'inhibition bactéricides dans des cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité des huiles essentielles selon les deux méthodes est due à un phénomène de diffusion prédominante des composés dans la phase gazeuse, ceci à cause de leur très faible solubilité et donc de leur mauvaise diffusion dans la gélose. Pour des conditions équivalentes, nous avons montré que le diamètre de ces halos ne diffère pas significativement si on place le buvard sur la gélose ou sur le couvercle de la boîte, sans contact direct avec l'agar.

L'aire d'inhibition est proportionnelle à la quantité de germicide déposée sur le disque de papier. De ce fait nous avons proposé d'exprimer les résultats en terme de surfaces bactéricides, spécifiques à l'huile essentielle ou à l'agent antibactérien utilisé. Ces valeurs remplacent avantageusement celles des diamètres d'inhibition et permettent une comparaison entre les résultats de différentes études.

En admettant que l'aire d'inhibition est un bon indicateur de l'activité bactéricide, nous avons ainsi pu effectuer selon notre protocole d'expérience la sélection des huiles essentielles suivantes :

<i>Staphylococcus aureus</i>	Sarriette des Montagnes	(<i>Satureja montana</i>)
	Thym à thymol	(<i>Thymus vulgaris</i>)
	Origan vulgaire	(<i>Origanum marjorana</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cannelle écorce	(<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).

Alors que les trois premières huiles essentielles riches en phénols sont connues pour leur activité sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas particulièrement sensible aux huiles essentielles phénolées. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* est sensible à la Cannelle écorce, huile essentielle riche en aldéhyde cinnamique.

1.4 CHAPITRE IV : ACTIVITE DE LA PHASE VOLATILE DES HUILES ESSENTIELLES SELON LA NORME AFNOR NF T72-281

Le protocole de la norme Afnor NF T72-281 de désinfection par voie aérienne a été sélectionné car il permet de démontrer l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens utilisés en phase gazeuse.

Nous l'avons appliqué à un composé chimique couramment utilisé dans les milieux hospitaliers, le formaldéhyde et des huiles essentielles antibactériennes, riches en phénols.

● Le protocole permet de quantifier **l'action bactéricide des vapeurs de Formol**, solution à 40 % de formaldéhyde. Le taux de réduction logarithmique *d* de *Staphylococcus aureus* est supérieur ou égale à 5, ce qui en fait un agent de désinfection sur cette souche bactérienne à une concentration de **1900 ppm**, soit environ 10 fois la dose létale.

Nous avons constaté que la présence de lait n'était pas compatible avec l'utilisation des huiles essentielles phénolées. Le protocole a du être adapté à l'usage de ces huiles essentielles en particulier.

Les protéines du lait, utilisé comme agent protecteur des bactéries, sont aussi des substances dites « interférentes » susceptibles de diminuer l'activité de certaines catégories d'agents antimicrobiens, en particulier les phénols. Nous avons montré que l'adjonction de milieu nutritif TSB 1/5 (v/v) dans l'inoculum protège les bactéries de la dessiccation de manière comparable à celle du lait, et permet l'action bactéricide des huiles essentielles. Cette modification n'a pas de conséquences sur l'activité du formaldéhyde.

● Le protocole ainsi modifié permet de quantifier **l'action bactéricide des vapeurs de l'huile essentielle de Sarriette des montagnes**. Nous avons montré, selon nos conditions d'expériences, que **790 ppm** d'huile essentielle de Sarriette ont un effet bactéricide sur *Staphylococcus aureus*.

2. PERSPECTIVES

● La détermination d'une valeur de **concentration bactéricide minimale** est la prochaine étape du travail. En effet, cette valeur, ainsi que la détermination d'un temps de contact minimal sont nécessaires pour optimiser des **essais en situation réelle**. Le LESO-PB possède une chambre climatique avec une petite installation de ventilation mécanique qui permet des essais à plus grande échelle.

● Des tests complémentaires seraient nécessaires sur d'autres bactéries, tel que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou *Legionella pneumophila* entre autres, ainsi que des moisissures comme *Aspergillus niger* par exemple

● Les bactéries directement issues d'une culture in vitro ont peu de similitudes physiologiques avec des bactéries végétant sur une surface naturellement contaminée. C'est pour cela qu'une **vérification** de l'activité bactéricide des huiles essentielles sur d'autres souches et surtout sur des bactéries et des champignons microscopiques présent dans les systèmes de ventilation est une prochaine étape du travail.

● Il serait intéressant de réaliser les essais avec des **phénols synthétiques**, thymol et carvacrol, et comparer leurs activités avec celles des huiles essentielles, comme nous l'avons fait pour les aromagrammes. Nous pourrions déterminer si l'utilisation des huiles essentielles se justifie par une activité bactéricide plus importante que les produits synthétiques évaporés.

● Notre **méthode d'évaporation** forcée par un ventilateur peut aussi être améliorée. L'utilisation d'aérosol pour la dispersion des huiles essentielles dans l'air peut être plus efficace. Une gouttelette de 5 à 15 µl reste suspendue longtemps dans l'air, en équilibre entre la force gravitationnelle et la force ascensionnelle. De plus par sa charge électrostatique, le nombre de collisions efficaces avec des bioaérosols est favorisé. Ce procédé serait donc intéressant à mettre en place dans la salle climatique.

● Une étude approfondie sur les **effets psychophysiologiques** des huiles essentielles, telle qu'elle a été prévue dans le plan initial du travail, permettrait de déterminer si l'utilisation d'huiles essentielles en diffusion atmosphérique améliore le confort olfactif et favorise la sensation de bien-être d'une population type. Une diffusion préventive et agréable d'huiles essentielles peut être investiguée pour de nombreuses applications dans les lieux naturellement contaminés: les milieux hospitaliers, les homes de personnes âgées, les écoles et les crèches, les lieux publics, les transports communs, et ... les bureaux ventilés mécaniquement !

3. SYNTHÈSE PERSONNELLE

Ce travail se conclue sur la preuve irréfutable de l'activité antimicrobienne de la phase gazeuse des huiles essentielles.

L'application de protocoles standardisés aux huiles essentielles est innovatrice¹. Il est important que le respect et le rayonnement dont bénéficient ces normes puissent servir à l'acceptation des huiles essentielles, dont les propriétés ne sont pas encore reconnues à leur juste valeur dans les milieux scientifiques et médicaux.

Le grand intérêt de l'utilisation des huiles essentielles réside dans une réponse efficace et « naturelle » aux attentes des gens vis à vis des lieux publics:

- la **sécurité** « microbiologique » au niveau collectif
- la **protection** de la santé individuelle

« Mens sana in locum sanum »

Dans un bâtiment, une diffusion contrôlée d'huiles essentielles phénolées, rigoureusement sélectionnées contribuerait valablement :

- au **confort des occupants** en améliorant la perception de l'air ambiant,
- à la **prévention des contaminations microbiennes** indésirables,
- à l'**assainissement microbiologique** de l'air et des systèmes de ventilation.

Je souhaite sincèrement que ce travail contribue à l'essor de ces fabuleuses substances naturelles, en particulier les huiles essentielles phénolées qui trouveraient en diffusion aérienne dans les bâtiments une application appropriée à leur formidable activité antimicrobienne, sous réserve d'essais complémentaires de tolérance en présence humaine.

¹ L'idée est judicieuse puisqu'une publication scientifique parue quelques mois avant la fin de la rédaction de ce mémoire de thèse se base sur la norme EN 1499 pour démontrer l'activité antiseptique d'une formulation composée d'huile essentielle de Tea-tree **Messenger, S., K. A. Hammer, et al.** (2005). "Effectiveness of hand-cleansing formulations containing tea tree oil assessed ex vivo on human skin and in vivo with volunteers using European standard EN 1499" Journal of Hospital Infection 59- 3: (220-228).

ANNEXES

A) COMPLEMENTS

1. LES AGENTS ANTIMICROBIENS

Un agent antimicrobien ou de désinfection est défini par son pouvoir de tuer des populations microbiennes. On attend d'un agent désinfectant généralement une action à large spectre et plus rarement une action ciblée sur un germe en particulier (désinfection sélective).

Pour une action bactéricide globale sur les bactéries on doit s'assurer de l'activité bactéricide de l'agent antimicrobien aussi bien sur les espèces à Gram positif que négatif, sans exclure le groupe CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*). Ces trois groupes de bactéries se distinguent par la composition et la structure de leur paroi cellulaire dont dépend la perméabilité aux agents antimicrobiens.

1.1 MECANISMES D'ACTION

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autres que les antibiotiques restent encore généralement peu et mal connus. Pour certains d'entre eux, des travaux récents mettent en œuvre des techniques sophistiquées et ont permis de déterminer avec précision une ou plusieurs cibles d'action qui seront décrites et illustrées plus loin (*Hugo, 1971; Fleurette, Freney et al., 1995*).

Les agents chimiques antimicrobiens se classent en deux catégories selon leur effet. Le premier est létal, c'est à dire qu'il entraîne la mort de l'individu. On le nomme par le suffixe **-CIDE** : virucide, bactéricide, fongicide, insecticide. Le second correspond à une inhibition de croissance en présence du produit actif. On le nomme avec le suffixe **-STATIQUE** : bactériostatique, fongistatique.

Parmi les produits **BIOCIDES**, on distingue :

- les composés chimiquement **très réactifs** qui se caractérisent par une action brutale, rapide et temporaire et souvent non spécifique. Exemples : les oxydants et l'eau oxygénée, les halogénés (chlore et iode) et l'oxyde d'éthylène, les acides et les bases fortes, les aldéhydes et les phénols.
- les composés chimiquement **stables** à actions plus spécifiques comme les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques autres que le phénol, la chlorohexidine parmi d'autres.

Les inhibiteurs de croissance avec un effet **BIOSTATIQUE** comprennent essentiellement les métaux (mercuriels et dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent,...) et les colorants.

Selon leur nature et la concentration utilisée, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles. Dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois chimique et physique.

M.R.J. Salton en 1968 a décrit cinq étapes dans l'action des agents antimicrobiens (*Fleurette, Freney et al., 1995*) :

1. **Adsorption** sur la cellule suivie de la **pénétration** dans la paroi.
2. Réactions complexes avec la **membrane cytoplasmique**¹ conduisant à sa **désorganisation**.
3. **Echappement** des composants de faible poids moléculaire du **cytoplasme**.
4. **Dégradation** des protéines et des acides nucléiques.
5. **Lyse** de la paroi causée par les enzymes autolytiques

1.2 QUELQUES AGENTS SPECIFIQUES

ALCOOLS : Le plus courant est l'alcool éthylique (éthanol) qui dénature les protéines et dissout la membrane lipidique, seulement en présence d'eau. Bactéricide, fongicide en dilution optimum de 70 %. Ils ne sont ni sporicide, ni viricide. (*Fleurette, Freney et al., 1995*).

FORMALDEHYDE : Le formaldéhyde ou Formol s'il est en solution (à 40 %), agit très lentement sur la cellule. Les effets létaux sont liés à des réactions chimiques avec les acides nucléiques. Ses vapeurs et ses résidus sont toxiques² et ses propriétés cancérogènes potentielles en limitent les applications. Le formaldéhyde est sporicide et bactéricide. (*Fleurette, Freney et al., 1995*), (*Gupta, Ulsamer et al., 1981*).

PHENOL : Les composés phénoliques peuvent inactiver les bactéries, soit en créant des lésions au niveau de la membrane, soit par dénaturation des protéines, soit par

¹ La **membrane cytoplasmique** assure le métabolisme énergétique de la cellule, elle est responsable du transport et du maintien des métabolites à l'intérieur de la cellule. Elle est le principale site d'action des antiseptiques et désinfectants.

² **Toxicité aigue** : l'ingestion de 20 ml de Formol est mortelle, est irritante pour la peau à partir de 1 ppm (1,25 mg/m³). Valeur limite d'exposition : 2 ppm (France).

inactivation enzymatique. Les phénols à forte concentration sont responsables d'une action bactéricide rapide : ils traversent la paroi bactérienne et dénaturent les protéines bactériennes. A faible concentration ils sont bactériostatiques (*Hugo, 1971*).

DERIVES CHLORES : L'effet létal des dérivés chlorés comme l'eau de Javel : (hypochlorite de sodium) est le résultat de l'action directe du chlore sur certains constituants de la cellule (cytoplasme et système enzymatique). Bactéricide et fongicide, le chlore est aussi sporicide. Il endommage les parois sporales et empêche le processus de germination (*Fleurette, Freney et al., 1995*). Bactéricide et fongicide, il agit aussi sur les virus, les algues, et les protozoaires.

AMMONIUMS QUATERNAIRES : composés bipolaires capables de s'adsorber sur la surface des cellules qu'ils neutralisent en entraînant des changements de perméabilité et des lésions membranaires irréversibles, si la concentration est suffisante. Leur activité dépend beaucoup du pH. Ils sont bactéricides, antiviraux controversés, fongistatiques mais peu fongicides, antiparasitaires et anti-algues (*Fleurette, Freney et al., 1995*). Le chlorure de benzéthonium par exemple est utilisé dans l'industrie alimentaire. C'est aussi le composé responsable de l'activité antimicrobienne de certains extraits de pépin de pamplemousse trafiqués (*Terreaux et Hostettmann, 1991*).

1.3 ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des substances destinées à agir sur les microorganismes indésirables principalement chez les humains. Alors que les premières formules étaient basées sur l'inhibition de micro-organismes envers d'autres (pénicilline issue de moisissures du genre *Penicillium*, Flemming 1928), la majorité des antibiotiques actuels sont de nature synthétique ou semi synthétique.

Actuellement on compte environ 250 antibiotiques disponibles (*Guillemot, 2005*). Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (Figure 20), c'est à dire de l'effet destructeur désiré (*Ros, 1999*). On les classe d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne :

1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la **PAROI BACTERIENNE**
2. Antibiotiques inhibant la synthèse de la **MEMBRANE CYTOPLASMIQUE**
3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse **PROTEIQUE**
4. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des **ACIDES NUCLEIQUES** et de la synthèse de **L'ADN**
5. Antibiotiques agissant par **INHIBITION COMPETITIVE** (exemple d'autres mécanismes).

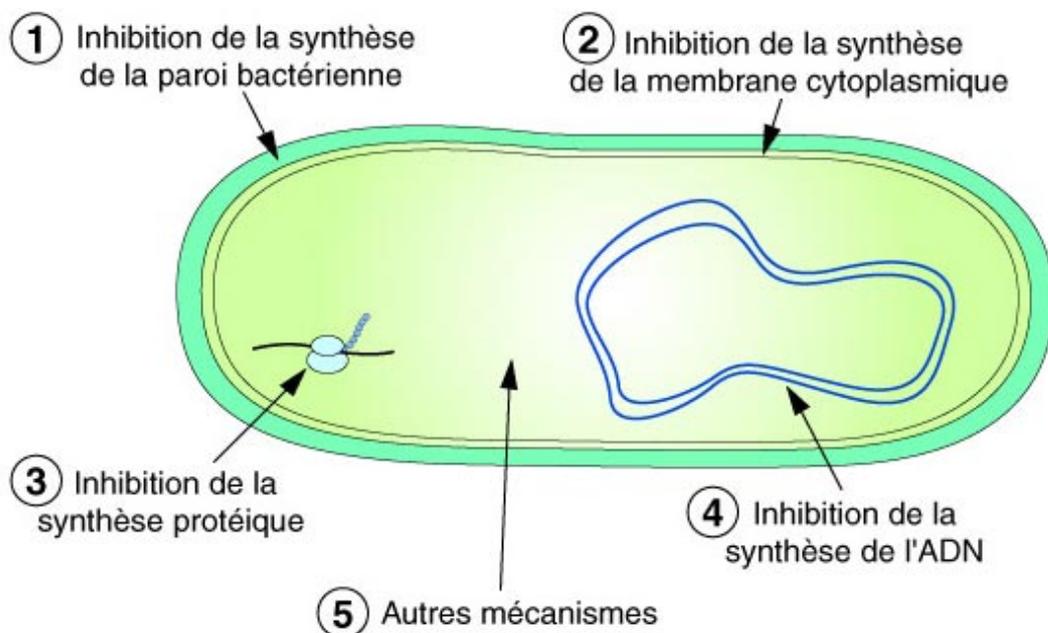


Figure 20 : Cibles de l'action des antibiotiques (www.123bio.net/cours/bacterio)

1.4 PROBLEMATIQUE DES RESISTANCES BACTERIENNES

« Malgré l'essor prodigieux des sciences médicales et l'arrivée des antibiotiques, on meurt presque autant d'infection qu'avant » ((Isoard, Faure et al., 1991).

Bien qu'ils aient permis l'un des progrès les plus spectaculaires de la médecine du XX^e siècle, les antibiotiques qualifiés de médicaments miracles perdent leur efficacité à un rythme inquiétant (Ros, 1999). La lutte contre les maladies infectieuses n'est plus une question de choix de molécule, de stratégies vaccinales et d'allocation de ressources comme le laissait croire la période faste des années 1960, riche en développements et en mises sur le marché de médicaments anti-infectieux dans les pays industrialisés. Ce phénomène n'est pas homogène dans le monde. A côté d'une surconsommation et de mauvais usages, une multiplicité de facteurs interviennent.

La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes. En effet, toutes les cellules réagissent aux perturbations extérieures de manière à préserver les aspects fondamentaux de leurs identités (Margulis et Sagan, 1989). La confrontation à un antibiotique représente, du point de vue des bactéries, un formidable stimulus d'évolution (Hamilton-Miller, 2004).

Il existe plusieurs types de résistances (*Decoster et Lemahieu, 2004*). La résistance **naturelle** est une caractéristique de tous les individus bactériens, elle est programmée dans leur génome. Cette résistance est fixe et constante et, à ce titre, constitue un critère d'identification.

Les résistance **acquises** consécutives à des modifications de l'équipement génétique (chromosomiques ou plasmidiques) sont l'expression d'un ou de plusieurs gènes de résistance. Elle constitue un marqueur épidémiologique¹ car les résistances acquises modifient la sensibilité d'une souche. Elles peuvent être de nature **mutationnelle**. Dans le cas d'une population bactérienne comme *E. coli*, le taux de mutation est de 0.0000001, soit 1 sur 10^7 pour un temps de génération de 20 à 30 minutes. Cette résistance par mutation est peu répandue en clinique et ne représente que 20% des résistances acquises. La parade consiste à associer les antibiotiques (*Decoster et Lemahieu, 2004*). Les résistances de nature **extra-chromosomique** (le 80% des résistances acquises) concernent la plupart des antibiotiques et toutes les espèces bactériennes y sont sujettes. Elles peuvent concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques, entraînant une poly résistance. On dit d'une bactérie résistante à au moins 3 familles différentes d'antibiotiques qu'elle est multirésistante (*Ros, 1999*).

Les bactéries multirésistantes ne sont pas plus virulentes que leurs congénères. Elles bénéficient d'un avantage sélectif par rapport aux bactéries sensibles qui leur permettent de persister et d'évoluer dans l'environnement hospitalier. L'hôpital est un écosystème idéal pour ce type de bactéries : les antibiotiques y sont utilisés massivement - environ 15 à 20 % des patients hospitalisés sont en permanence sous antibiotiques (*Régnier, 2005*). Si ceux-ci préviennent les infections nosocomiales, ils augmentent par leur utilisation le risque d'émergence des bactéries résistantes.

La prévalence de bactéries multirésistantes est un facteur de risque d'infections nosocomiales, car les individus porteurs de bactéries de ce type ne sont pas protégés par les antibiothérapies. En cas d'infections, il faut avoir recours à l'utilisation des antibiotiques les plus actifs, souvent les plus récents et les plus coûteux, et prendre le risque incontournable de l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance (*Régnier, 2005*).

¹ **Epidémiologie** : discipline médicale qui étudie les facteurs intervenant dans l'apparition des maladies et des différents phénomènes morbides ainsi que leur fréquence, leur distribution géographique et socio-économique et leur évolution (Larousse).

Cette situation est inquiétante, particulièrement dans les pays industrialisés. Aujourd'hui, quasiment aucune nouvelle famille d'antibiotiques n'est susceptible d'être introduite en thérapeutique humaine dans les prochaines années. La conjonction de l'absence de nouveaux antibiotiques et de la progression de la multirésistance risque de conduire à une augmentation du nombre d'infections bactériennes posant des difficultés thérapeutiques (Guillemot, 2005). Pour contenir ce phénomène de résistance, il est nécessaire de réduire l'utilisation d'antibiotiques et d'envisager des alternatives comme par exemple :

- l'immunothérapie,
- la thérapie par les bactériophages,
- la bactériothérapie par l'ingestion de probiotiques,
- l'investigation des mécanismes de virulence,
- le développement de la capacité qu'ont les bactéries de provoquer leur mécanisme de mort cellulaire (apoptose),
- l'utilisation de thérapies complémentaires et alternatives.

Les thérapies complémentaires sont utilisées par une partie croissante de la population et le marché mondial en est estimé à 60 Milliard US\$ (Hamilton-Miller, 2004). Ces thérapies sont maintenant reconnues par l'OMS qui a lancé en 2002 la première stratégie globale en matière de CAM¹

“Quand les antibiotiques, ce qui semble inévitable, n'offriront plus de protection efficace contre les agents responsables des maladies infectieuses, je reste confiant que d'autres alternatives auront été développées, résultant de l'ingénuité humaine » J.M.T. Hamilton-Miller

¹ CAM: Complementary and Alternative Medicines.

2. LE SYSTÈME OLFACTIF

2.1 MECHANISME DU SYSTEME OLFACTIF

Apparemment, notre perception olfactive fait bien pâle figure à côté de celle de nos amis du règne animal. Et ce n'est pas la différence de taille de la muqueuse olfactive d'un humain (5 cm²) et d'un félin (jusqu'à 170 cm²) qui le contredira ! En effet, ce sens « primitif » n'est plus indispensable à notre survie. Il ne contribue plus à la pérennité de l'espèce et ne régit plus nos comportements comme ce fut le cas pendant une longue période de notre histoire. Et pourtant nous sommes capables :

- de **distinguer** environ **10 000 odeurs** différentes à des concentrations de quelques ppm ou même ppb,
- d'en **reconnaître 2000**,
- d'en **mémoriser 200 à 400** (gamme de travail d'un parfumeur).

Même si nous en sommes la plupart du temps inconscients, certaines odeurs peuvent déclencher des stimulations hormonales qui contrôlent l'appétit, le désir sexuel, la température du corps et aussi certaines fonctions supérieures du cerveau, le comportement émotionnel, la pensée, les souvenirs.

Le nez ne nous sert pas qu'à sentir. C'est aussi et surtout l'unité de traitement d'air du corps qui garantit un air propre et exempt de germes dans notre espace ventilé, les poumons. Poussières, bactéries et autres polluants sont projetés sur la muqueuse olfactive. Ils sont ensuite refoulés vers le fond de la gorge sous l'effet de l'ondulation d'un tapis de cellules ciliées avant d'être dénaturés par l'acide gastrique lorsque le mucus est avalé.

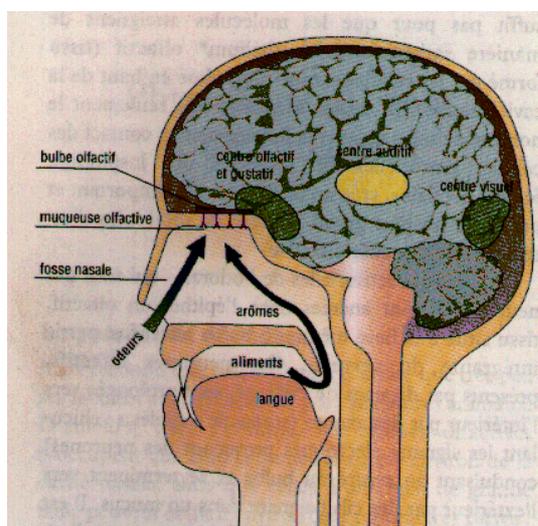


Figure 21 : la perception des odeurs (A. Gullino, Odeurs et Saveurs)

EN DETAIL (Figure 21): L'air que nous respirons au débit moyen de 250 [ml/sec] pénètre dans l'appareil olfactif par son appendice visible, le nez et les cavités formées par les narines ou fosses nasales. Une odeur est d'abord détectée sur la **muqueuse olfactive** (épithélium olfactif) située au sommet de chaque fosse nasale par un tapis de récepteurs en forme de « cils ». Ces récepteurs au nombre de 50 millions sont connectés à des **fibres nerveuses** attachées aux **bulbes olfactifs** situés à la surface du cerveau. Ces fibres sont les seules cellules nerveuses du corps en contact avec l'air. Contrairement aux autres neurones, elles se renouvellent continuellement. Le sens de l'odorat dépend de trois phénomènes intimement liés : la **réception**, la **transmission** et la **perception** d'un signal. Le message olfactif est directement transmis des récepteurs au **système limbique**, cette partie subconsciente du cerveau qui renferme la mémoire et les émotions.

2.2 LES ODEURS

Les odeurs sont des mélanges chimiques complexes et bien-sûr **volatils**. Généralement ce sont des composés polaires susceptibles d'interagir avec la membrane olfactive. Leur masse moléculaire dépasse rarement 300 u.m.a. Certaines structures chimiques sont systématiquement odorantes, comme certains composés benzéniques appelés « aromatiques ». Mais les odeurs sont bien trop nombreuses et trop diversifiées pour être répertoriées selon leur seule structure chimique. Deux professions, la parfumerie et l'œnologie utilisent une classification très précise, mais exclusivement descriptive.

Les odeurs se distinguent des autres sensations par les **réactions** à caractère **hédoniste** et **émotionnel** qu'elles provoquent. Une odeur plaisante sera souvent associée à quelque chose de positif et de confortable. En revanche une odeur déplaisante sera qualifiée de « mauvaise » odeur et sera susceptible d'avoir, au delà de la notion d'inconfort, un effet négatif sur la santé. La limite de bonnes ou mauvaises odeurs n'est pas si simple. En effet, certaines substances toxiques dégagent une odeur très forte (sulfure d'hydrogène), certaines sont indécélables et d'autres sont tout à fait supportables et même agréables. Pour la majorité des composés organiques volatils (COV) le seuil de toxicité est 10 à 10⁶ fois plus élevé que le seuil de détection. Le nez fait office du meilleur signal de détresse. Cependant ceci n'est pas valable pour certains composés comme l'ammoniaque dont le seuil de toxicité est de 25 ppm alors que le seuil de détection est proche du double, soit 46 ppm.

“The use of scents is not practised in modern physics but might be carried out with advantage, seeing that some smells are so depressing and other so inspiring and reviving” Sir William Temple, Essay on Health and Long Life, 1690.

B) TEST STATISTIQUE : EVALUATION DE LA DIFFERENCE ENTRE LES MOYENNES DE DEUX ENSEMBLES¹

La moyenne d'une caractéristique x d'un ensemble d'objets, dans la mesure où cette caractéristique a une distribution normale, est estimée à partir d'un échantillon contenant N de ces objets par:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x_i \quad \text{Équation 7}$$

L'écart type de cette population s'estime par:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{Équation 8}$$

Soient deux échantillons de deux ensembles caractérisés par leurs moyennes \bar{x} et \bar{y} , leurs écarts-type s_x et s_y et leurs nombres N_x et N_y .

Une estimation de l'écart type de la différence $d = \bar{x} - \bar{y}$ se calcule par:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_x^2}{N_x} + \frac{s_y^2}{N_y}} \quad \text{Équation 9}$$

La probabilité pour que la différence d soit nulle est:

$$P\{d = 0\} = T\left(\frac{|d|}{s_d}; \nu\right) \quad \text{Équation 10}$$

Où T est la distribution de Student pour ν degrés de liberté, ν valant:

$$\nu = \left(\frac{k^2}{N_x - 1} + \frac{1 - k^2}{N_y - 1} \right)^{-1} \quad \text{avec} \quad k = \frac{N_y s_x^2}{N_y s_x^2 + N_x s_y^2} \quad \text{Équation 11}$$

Dans la littérature, il est souvent admis qu'une différence est significative si $P (d=0) < 0.05$.

¹ Méthode tirée de Diem and Lentner, Ed. Scientific Tables. J.R. Geigy, Basle, 1970.

C) PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Protocole 1 : AROMATOGRAMMES ET MICROATHMOSPHÈRES

Inoculum

L'inoculum doit être de 10^6 bactéries/ml afin d'obtenir des colonies justes confluentes. Il est obtenu à partir d'un premier ou d'un second repiquage de la mise en culture des souches issues de la décongélation.

Prélever quelques colonies du germe en phase de croissance et les émulsionner dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique (NaCl 8,5 g/litre) et dans lequel est déposé une couche de 0,5 cm de billes de verre de 2 mm de diamètre.

Centrifuger 3 minutes à 2500 tr/minutes avant de vérifier la densité optique. Celle ci doit être environ 0,125 à 620 nm pour garantir la concentration en bactéries de l'homogénéité du tapis.

Diluer l'inoculum de manière suivante selon le type de bactérie :

Staphylocoque aureus : 40 μ l par ml d'eau physiologique

Pseudomonas aeruginosa : 10 μ l par ml d'eau physiologique

Tapis bactérien

Inonder les boîtes avec 1 ml de l'inoculum, et laisser évaporer l'excédent d'eau sous la hotte jusqu'à ce que la gélose soit sèche (15-20 minutes).

Application des disques

Aromatogrammes: Appliquer délicatement le disque préalablement tempéré au centre de la gélose, et y déposer 2 ou 4 μ l de l'huile essentielle ou tout autre produit à tester.

Microathmosphères: Idem, le disque est déposé au centre du couvercle, et la boîte est refermée sur celui-ci gélose en haut. On évite ainsi au disque de tomber et de se coller sur la surfaceensemencée.

Incubation

Incubation à 37°C entre 16 et 18 heures.

Résultats

La lecture de la zone translucide d'inhibition et relativement circulaire s'effectue aisément avec un pied à coulisse.

Noter l'éventuelle présence d'un second halo de diamètre supérieur non stérile. Des colonies peuvent apparaître dans cette couronne de résistance, à dénombrer si leur nombre est raisonnable.

Noter aussi l'aspect du tapis bactérien :

Identique au témoin : +++

Clair : ++

Translucide : +

Stérile : 0

**Protocole 2 : PRÉPARATION DE SOUCHES POUR UNE
CONGÉLATION À -80 ° C**

Inoculum : culture à 10 % en milieu liquide Nutrient Broth ou autre milieu riche.

Centrifuger l'échantillon : 4 min à 4000 tr/mn.

Reprendre le culot dans un mélange du milieu liquide choisi et y ajouter 15 % glycérol.
(NB : les deux composants doivent être stérilisés séparément pour éviter des réactions de Maillard).

Disperser dans 10 à 15 cryotubes.

Congeler entre -60°C et -80°C.

Cette manière de conserver les souches garantie leur stabilité dans le temps. Les souches ainsi congelées se conservent indéfiniment.

Le *Pseudomonas aeruginosa*, ne se conservant pas plus d'un mois à -20°C, il est donc conseillé de le conserver à -80°C exclusivement.

**Protocole 3 & 4 : PRÉPARATION ET COMPOSITION DES
MILIEUX NUTRITIFS**

TRYPTONE-SOJA-AGAR TSA (OXOID CM0131B)

Milieu d'usage courant adapté à la culture de germes exigeants.

COMPOSITION	(g/l)
Tryptone	15
Peptone de soja	5
Chlorure de Sodium	5
Agar	15

PREPARATION

Verser 40 g de poudre par litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

TRYPTICASE™ SOJA AGAR avec Lécithine et Polysorbate 80 (11764 - BD BBL™)

Base servant à la détermination de la qualité sanitaire des surfaces.

COMPOSITION	(g/l)
Digestion pancréatique de caséine	15
Digestion papaïque de semoule de soja	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Lecithin	0.7
Polysorbat 80	5

PREPARATION

Verser 45.7 g de poudre par litre d'eau distillée et répartir. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

Protocole 5 : PRÉPARATION ET COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE LIQUIDE

TRYPTONE-SOJA-BROTH TSB (OXOID CM0129B)

Milieu d'usage courant adapté à la culture de germes exigeants.

COMPOSITION	(g/l)
Hydrolat trypsique de caséine	17
Peptone de soja	3
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2.5
Glucose	2.5

PREPARATION

Verser 30 g de poudre par litre d'eau distillée et répartir. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

Protocole 6 : NORME AFNOR NF T72-280: PROCÈS VERBAL D'ESSAI

Boutique AFNOR pour : EPFL - ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE LAUSANNE le 20/12/2004 - 16:59

- 13 -

NFT 72-281

14 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit faire référence à la présente norme.

Il doit indiquer les éléments d'information et les résultats obtenus sous la forme suivante :

- la concentration bactéricide fongicide ou sporicide déterminée pour le produit selon la norme NFT 72-150 ou 151, NF T 72-200 ou 201, NF T 72-230 ou 231 est de (facultative).
- Procédé : destiné à la désinfection des surfaces dans des enceintes de capacité de à m³.
- Produit :
 . composition centésimale exacte :
 . temps de diffusion :
 . quantité utilisée :
- Appareil :
- Nature des membranes utilisées :
- Utilisation d'un vibreur ultrasonique : description
- Local d'essais:
 . Volume (dimensions m × m X m)(soit en m³)
 . Température (début °C fin °C)
 . Humidité relative (début % fin %)
 . Description (revêtements des murs, des sols, du plafond)
 . Rapport $\frac{\text{surface totale (murs, mobilier, ...)}}{\text{volume (volume total moins volume des différents objets dans le local)}}$
- Supports : ; distance par rapport à la source : m
- Temps d'exposition des supports essais (depuis la fin de la diffusion jusqu'à leur retrait du local) : h
- Validité de l'essai préliminaire :
 . Validation sur membrane : $n_2 = \dots\dots\dots N_2 = \dots\dots\dots$
 . Validation du liquide de recueil dans la gélose : $n_1 = \dots\dots\dots N_1 = \dots\dots\dots$
 . Validation du support dans la gélose : $n_3 = \dots\dots\dots N_1 = \dots\dots\dots$
- Dans le cas d'un dispersat dirigé :
 . Nature des supports :
 . Distance entre le point d'émission et les porte-germes :
 . Temps d'émission du dispersat :
 . Temps d'action du dispersat :
 . Quantité de dispersat émise par support :
- Taux de réduction = activité désinfectante d (si supports lisses) :
 . *Pseudomonas aeruginosa* CIP A 22 = d₁
 . *Staphylococcus aureus* CIP 53 154 = d₂
 . *Streptococcus faecium* CIP 58 55 = d₃
 . Spores de *Bacillus subtilis* CIP 52 62 = d₄
 . *Candida albicans* CIP 11 80-79 = d₅
 . *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* CIP 11 86-79 = d₆
 . Autres souches = d₇, d₈, d₉,...

Protocole 7 : NORME AFNOR NF T72-280: TÉMOINS

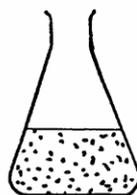
Boutique AFNOR pour : EPFL - ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE LAUSANNE le 20/12/2004 - 16:59

- 15 -

NFT 72-281

TÉMOINS

1 Préparation des suspensions et dénombrements de ces suspensions



Suspensions mère + lait reconstitué 1/20.
 10^7 à 10^9 bactéries, levures,
 moisissures ou spores par millilitre

Dilutions 1/10 ou
 1/100 et mesure de
 l'absorbance (avant
 adjonction de lait)



Dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et/ou 10^{-7} N_1 N_2
 inclusions et dénombrements

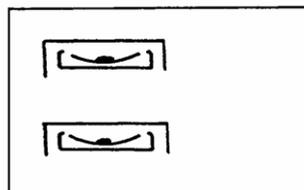
0,05 ml = 50 μ l par support
 (à faire en double)

II Ensemencement des supports



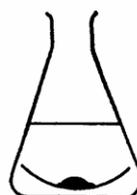
Séchage 45 min à 37 °C boîte
 ouverte, en étuve ventilée

III Séjour au laboratoire



Séjour au laboratoire,
 pendant toute la durée de
 l'essai, boîte fermée,
 sans contact avec le désinfectant

IV Récupération des microorganismes viables



100 ml de liquide de récupération
 agitation, grattage + ultrasons éventuels

Dilutions 0, 10^{-1} , 10^{-2} et/ou 10^{-3}
 inclusions et dénombrements

T = Nombre de bactéries, de levures, de
 moisissures ou de spores par support témoin

Protocole 8 : NORME AFNOR NF T72-280 : ESSAI PRÉLIMINAIRE

Boutique AFNOR pour : EPFL - ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE LAUSANNE le 20/12/2004 - 16:59

NFT 72-281

- 16 -

**ESSAI PRÉLIMINAIRE
SALLE D'ESSAIS**

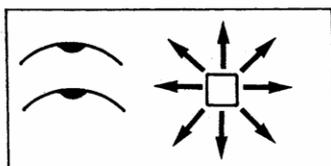
I Préparation des supports



0,05 ml de lait 1 / 20 dans l'eau distillée stérile (à faire en double exemplaire)

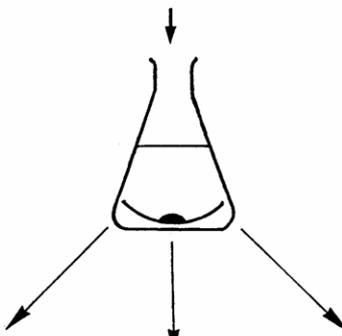
Séchage 45 min à 37 °C

II Exposition des supports au désinfectant



Exposition au gaz, ou au dispersat désinfectant dans des conditions semblables à celles de l'essai proprement dit. (Dépôt du désinfectant sur les supports)

III Récupération du désinfectant déposé sur le support



Récupération des supports et mise en solution des restes de désinfectant dans 100 ml de diluant (solution S)

Effet inhibiteur en gélose

Effet inhibiteur sur membrane filtrante

Effet inhibiteur dû au support dans la gélose

IV Recherche d'un éventuel effet inhibiteur



1 ml 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7}
+ 1 ml solution S
+ milieu gélosé

n_1



Filtration 98 ml solution S
+ 3 x 50 ml eau distillée stérile
+ 1 ml 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7}

n_2



1 ml 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7}
+ support exposé lavé
+ milieu gélosé

n_3

V Numérations témoins



1 ml 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7}
+ milieu gélosé

N_1 inclusion



1 ml 10^{-5} , 10^{-6} ou 10^{-7}
filtré sur membrane

N_2 Filtration

Comparer n_1 , n_2 , n_3 et N_1 , N_2

Protocole 9 : NORME AFNOR NF T72-280 : ESSAI PROPREMENT DIT

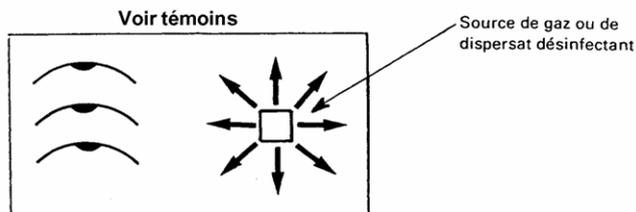
Boutique AFNOR pour : EPFL - ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE LAUSANNE le 20/12/2004 - 16:59

- 17 -

NFT 72-281

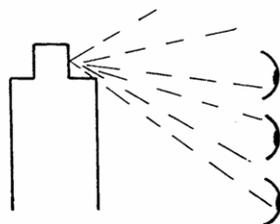
ESSAI PROPREMENT DIT SALLE D'ESSAIS

- I Préparation des suspensions, ensemencement des supports



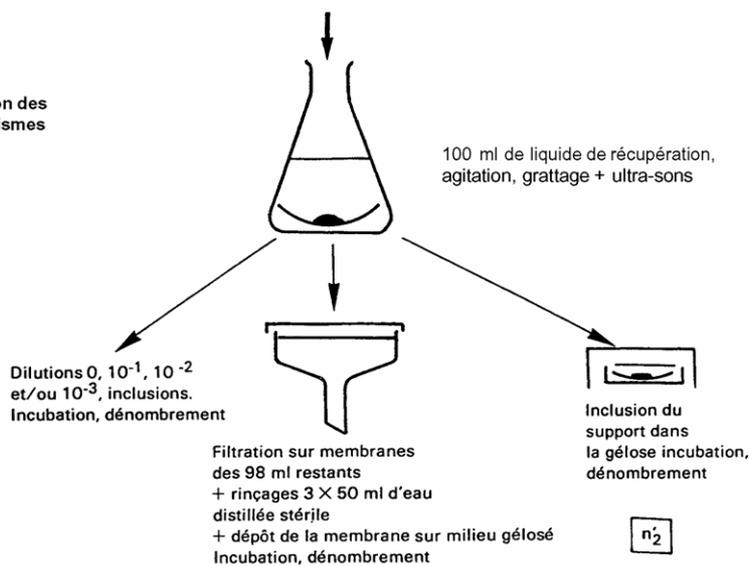
- II Exposition au désinfectant

Exposition de 3 supports à une distance définie du générateur, inoculum vers le bas, puis émission du gaz ou du dispersat désinfectant - Temps de contact ≤ 12 h



Pour les dispersats dirigés, les supports sont tenus verticalement

- III Récupération des microorganismes viables



n_1

Nombre de microorganismes retrouvés viables rapporté à 100 ml, ou numération sur membrane

n_2

D) LISTE DES HUILES ESSENTIELLES TESTEES

Tableau 29 : Présentation des huiles essentielles testées sur les souches bactériennes

ESPECE BOTANIQUE	NOM	FAMILLE	N°REF. (ARIES)	LOT
<i>Abies alba</i>	Sapin blanc	Pinacées	1	18-209
<i>Angelica archangelica</i>	Angélique racine	Apiacées	10	12-012
<i>Angelica archangelica</i>	Angélique semences	Apiacées	11	11-104
<i>Aniba rosaeodora</i>	Bois de rose	Lauracées	12	20-212
<i>Artemisia dracunculus</i>	Estragon	Asteracées	14	21-112
<i>Cinnamomum zelicatum</i>	Cannelle écorce	Lauracées	26	20-112
<i>Cinnamomum zelicatum</i>	Cannelle rameaux	Lauracées	27	20-012
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limette	Rutacées	29	11-203
<i>Citrus limonum</i>	Citron	Rutacées	34	11-210
<i>Citrus paradisi</i>	Grapefruit	Rutacées	36	11-209
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarine rouge	Rutacées	37	20-210
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarine verte	Rutacées	38	15-903
<i>Citrus sinensis</i>	Orange douce	Rutacées	39	20-120
<i>Commiphora myrrha</i>	Myrrhe	Burseracées	40	21-202
<i>Coriandrum sativa</i>	Coriandre herbe	Apiacées	42	11-012
<i>Coriandrum sativa</i>	Coriandre semences	Apiacées	43	11-202
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	Poacées	46	11-205
<i>Cymbopogon Martinii</i>	Palmarosa	Poacées	47	21-112
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamome	Zingiberacées	50	20-007
<i>Eucalyptus citriodora</i>	E. citriodora	Myrtacées	52	21-012
<i>Eucalyptus dives</i>	E. dives	Myrtacées	53	34-108
<i>Eucalyptus globulus</i>	E. globulus	Myrtacées	54	15-106
<i>Eucalyptus radiata</i>	E. radiata	Myrtacées	56	11-212
<i>Eucalyptus smithii</i>	E. smithii	Myrtacées	57	34-012
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	E. staigeriana	Myrtacées	58	11-903
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Girofle clous	Myrtacées	59	11-203
<i>Pelargonium asperum</i>	Géranium Bourbon	Géraniacées	104	11-301
<i>Hysopus montana decub.</i>	Hysope decubens	Lamiacées	68	17-101
<i>Juniperus communis</i>	Genévrier	Cupressacées	70	18-004
<i>Laurus nobilis</i>	Laurier noble	Lauracées	76	15-106
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavande vraie	Lamiacées	77	17-110
<i>Lavandula hybrida super</i>	Lavandin	Lamiacées	78	14-012
<i>Lavandula latifolia</i>	Lavande aspic	Lamiacées	79	17-209
<i>Lavandula stoechas</i>	Lavande stoechas	Lamiacées	80	11-009
<i>Leptospermum scoparium</i>	Manuka	Myrtacées	83	21-211

ESPECE BOTANIQUE	NOM	FAMILLE	N°REF. (ARIES)	LOT
<i>Malaleuca alternifolia</i>	Tea-tree	Myrtacées	86	20-210
<i>Malaleuca quinquenervia</i>	Niaouli	Myrtacées	88	11-111
<i>Mentha arvensis</i>	Menthe des champs	Lamiacées	90	24-108
<i>Nepeta cataria</i>	Cataire	Lamiacées	99	11-012
<i>Occimum basilicum</i>	Basilic tropical	Lamiacées	100	11-203
<i>Origanum compactum</i>	Origan compact	Lamiacées	101	21-202
<i>Origanum compactum</i>	Origan compact	Lamiacées	101	21-305
<i>Origanum majorana</i>	Marjolaine	Lamiacées	102	11-110
<i>Pelargonium x asperum</i>	Géranium bourbon	Geraniacées	104	11-209
<i>Pimenta racemosa</i>	Bay St Thomas	Myrtacées	107	21-202
<i>Pinus laricio</i>	Pin laricio	Pinacées	110	20-007
<i>Pinus mugo mughus</i>	Pin mugho	Pinacées	111	20-009
<i>Pinus sylvestris</i>	Pin sylvestre	Pinacées	114	17-208
<i>Piper nigrum</i>	Poivre noir	Piperacées	115	11-109
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Pin Douglas	Abiétacées	118	12-012
<i>Cinnamomum camphora</i>	Ravintsara	Lauracées	119	11-209
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin 1,8-cineol	Lamiacées	123	17-108
<i>Salvia officinalis</i>	Sauge officinale	Lamiacées	127	17-108
<i>Sassafras albidum</i>	Sassafras	Lauracées	131	21-112
<i>Satureja montana</i>	Sariette	Lauracées	132	17-209
<i>Thuja occidentalis</i>	Thuya	Cupressacées	135	21-108
<i>Thymus serpyllum</i>	Serpolet	Lamiacées	137	12-109
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym linalol	Lamiacées	138	17-108
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym thuyanol	Lamiacées	139	11-109
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym thymol	Lamiacées	140	17-208
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym thymol	Lamiacées	140	17-308

E) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS D'ORIGANUM COMPACTUM

TABLEAU DE RESULTATS : ORIGANUM COMPACTUM

Lot 21305 - Septembre 2003

Pics	Temps de rétention	Constituants	%	FONCTION
1	14.9	α -PINENE	0.85	T
2	15.1	α -THUYENE	0.80	T
3	20.7	β -PINENE	0.21	T
4	23.8	β -CARENE	0.16	T
5	24.8	β -MYRCENE	1.92	T
6	25.1	α -PHELLANDRENE	0.32	T
7	26.2	α -TERPINENE	2.38	T
8	27.7	LIMONENE	0.57	T
9	28.4	1,8-CINEOLE	0.18	O
10	28.6	β -PHELLANDRENE	0.36	T
11	31.5	γ -TERPINENE	15.28	T
12	31.7	Trans- β -LIMONENE	0.16	T
13	31.9	3-OCTANONE	0.43	CA
14	35.5	p-CYME	21.43	T
15	34.3	TERPINOLENE	0.25	T
16	46.1	1-OCTEN-3-OL + α ,p-DIMETHYLSTYRENE	0.71	OLA+T
17	47.4	Trans-THUYANOL	0.22	OLT
18	52.1	CAMPHRE	0.10	CT
19	53.0	LINALOL	3.48	OLA
20	53.4	Cis-THUYANOL	0.10	OLT
21	54.5	Trans-p-MENTH-2-EN-1-OL	0.08	OLT
22	57.4	TERPINENE-4-OL	1.18	OLT
23	57.6	β -CARYOPHYLLENE	3.16	S
24	58.3	Cis-DIHYDROCARYONE	0.10	CT
25	62.5	α -HUMULENE	0.16	S
26	62.9	NERAL	0.19	ALD
27	63.5	δ -TERPINEOL	0.35	OLT
28	64.0	BORNEOL	0.27	OLT
29	66.0	GERANIAL	0.05	ALD
30	67.8	δ -CADINENE	0.26	S
31	72.4	GERANIOL	0.20	OLA
32	72.8	p-CYME-8-OL	0.19	PH
33	81.8	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0.24	O
34	90.2	THYMOL ISOMERE	0.26	PH
35	91.2	THYMOL	13.19	PH
36	92.2	CARVACROL ISOMERE	0.19	PH
37	92.8	CARVACROL	30.20	PH
		TOTAL	99.99	

TABLEAU RECAPITULATIF DES FONCTIONS

ORIGANUM COMPACTUM

TERPENE	T	44.84 %
SESQUITERPENE	S	3.58 %
ALCOOL ALIPHATIQUE	OLA	4.05 %
ALCOOL TERPENIQUE	OLT	2.20 %
CETONE ALIPHATIQUE	CA	0.43 %
CETONE TERPENIQUE	CT	0.20 %
PHENOL	PH	44.03 %
ALDEHYDE	ALD	0.24 %
OXYDE	O	0.42 %

Daniel DANTIN
La ginsiste - 11340 BELVIS
Tél : 04 68 20 71 13
Fax : 04 68 20 76 56
Mail : ddantin@club-internet.fr

4 sept.-03



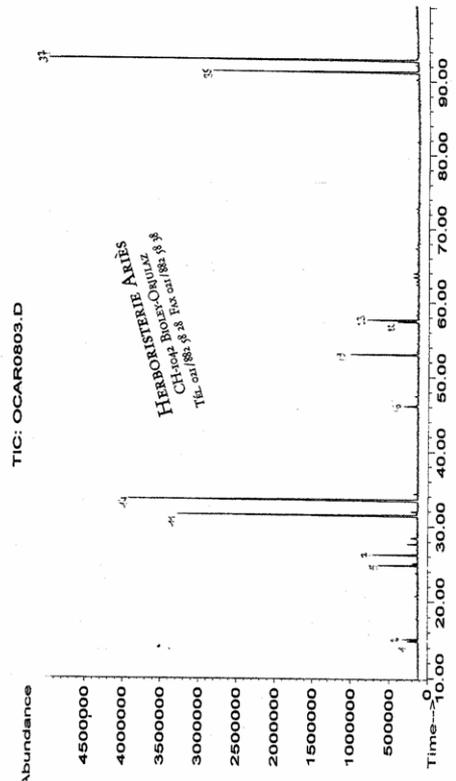
FICHE D'ANALYSE

Nom botanique : --- ORIGANUM COMPACTUM
Nom commun : ----- ORIGAN COMPACTÉS
Numéro du lot : ---- 21 305 - SEPTEMBRE 2003
Origine : ----- HERBORISTERIE ARIES - MAROC
Partie de la plante : SOMMÉTÉ FLEURIE

Caractéristiques d'analyse :

CPG : 5890 - SM : 5970 HEWLETT PACKARD
Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m x 0.25 mm x 0.5 μ m
Programmation de température : 6 mm à 50 °C - 2 °C/mm -> 250°C - 20mm à 250 °C.
Gaz vecteur He : 22 psi. Echantillon : 1 μ l de 5% de solution dans l'Hexane.
Gamme de masse : 30 to 350. Les composés des huiles sont identifiés par une recherche combinée des temps de rétention (notre propre bibliothèque) et des spectres de masse (bibliothèque NKS 75 000 spectres).
Les % sont calculés à partir des surfaces de pics sans l'utilisation de facteur de correction.

Profil CHROMATOGRAPHIQUE



F) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS DE THYMUS THYMOL

TABLEAU DE RESULTATS 1 : THYMUS THYMOL

Lot 17308 - Septembre 2003

Pics	Temps de rétention	Constituants	%	FUNCTION
1	14,2	2-METHYLBUTYRATE DE METHYLE	0,31	EA
2	14,9	α -PINENE	1,11	T
3	15,1	α -THUYENE	1,28	T
4	17,9	CAMPHENE	0,99	T
5	20,8	β -PINENE	0,34	T
6	21,8	SABINENE	0,16	T
7	22,5	PINADIENE	0,11	T
8	23,8	Δ^3 -CARENE	0,12	T
9	24,8	β -MYRCENE	1,52	T
10	25,1	α -PHELLANDRENE	0,20	T
11	26,2	α -TERPINENE	1,50	T
12	27,7	LIMONENE	0,80	T
13	28,4	1,8-CINEOLE	1,54	O
14	28,6	β -PHELLANDRENE	0,30	T
15	31,5	γ -TERPINENE	12,57	T
16	33,5	p-CYMENE	16,72	T
17	34,3	TERPINOLENE	0,14	T
18	38,5	PRENYLE ESTER	0,11	EA
19	46,1	1-OCTEN-3-OL + α ,p-DIMETHYLSTYRENE	1,12	OLA+T
20	47,4	Trans-THUYANOL	1,29	OLT
21	52,2	CAMPHRE	0,72	CT
22	53,0	LINALOL	2,03	OLA
23	53,4	Cis-THUYANOL	0,39	OLT
24	54,5	Trans-p-MENTH-2-EN-1-OL	0,99	OLT
25	56,2	ACETATE DE BORNYLE	0,50	ET
26	57,4	TERPINENE-4-OL	0,88	OLT
27	57,6	β -CARYOPHYLLENE	3,77	S
28	58,3	Cis-DIHYDROCARVONE	0,27	CT
29	58,9	Cis-p-MENTH-2-EN-1-OL	0,17	OLT
30	59,7	Trans-DIHYDROCARVONE	0,16	CT
31	61,9	δ -TERPINEOL	0,19	OLT
32	62,5	α -HUMULENE	0,22	S
33	62,8	NERAL	0,15	ALD
34	63,5	α -TERPINEOL	0,40	OLT
35	64,0	BORNEOL	2,06	OLT
36	65,0	GERMACRENE D	0,27	S
37	66,0	GERANIAL	0,18	ALD
38	66,6	BICYCLOGERMACRENE	0,56	S
39	67,8	δ -CADINENE	0,20	S
40	68,2	γ -CADINENE	0,14	S

TABLEAU DE RESULTATS 2 : THYMUS THYMOL

Lot 17308 - septembre 2003

Pics	Temps de rétention	Constituants	%	FUNCTION
41	69,6	CUMINAL	0,21	ALD
42	70,9	PROPIONATE DE GERANYLE	0,17	EA
43	72,4	GERANIOL	0,13	OLA
44	72,8	p-CYMENE-8-OL	0,39	PH
45	74,6	ACETATE DE CARVACRYLE	0,36	EAR
46	78,1	METHYL CARVACROL ETHER ISOMERE	0,25	E
47	81,8	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	1,33	O
48	87,3	p-ISOPROPYLPHENOL	0,24	PH
49	88,8	SPATHULENOL	0,47	SOLT
50	90,2	THYMOL ISOMERE	0,18	PH
51	91,2	THYMOL	11,38	PH
52	92,2	CARVACROL ISOMERE	0,15	PH
53	92,8	CARVACROL	29,36	PH
		TOTAL	100,00	

TABLEAU RECAPITULATIF DES FONCTIONS
THYMUS THYMOL

	T	%
TERPENE	T	38,22 %
SESQUITERPENE	S	5,16 %
ALCOOL ALIPHATIQUE	OLA	2,72 %
ALCOOL TERPENIQUE	OLT	5,47 %
CETONE TERPENIQUE	CT	1,15 %
ESTER ALIPHATIQUE	EA	0,59 %
ESTER TERPENIQUE	ET	0,50 %
ESTER AROMATIQUE	EAR	0,36 %
PHENOL	PH	41,70 %
ALDEHYDE	ALD	0,54 %
OXYDE	O	2,87 %
ETHER	E	0,25 %
SESQUITERPENOL TERPENIQUE	SOLT	0,47 %



Daniel DANTIN
La gineste – 11340 BELVIS
Tél : 04 68 20 71 13
Fax : 04 68 20 76 56
Mail : ddantin@club-internet.fr

4 sept.-03

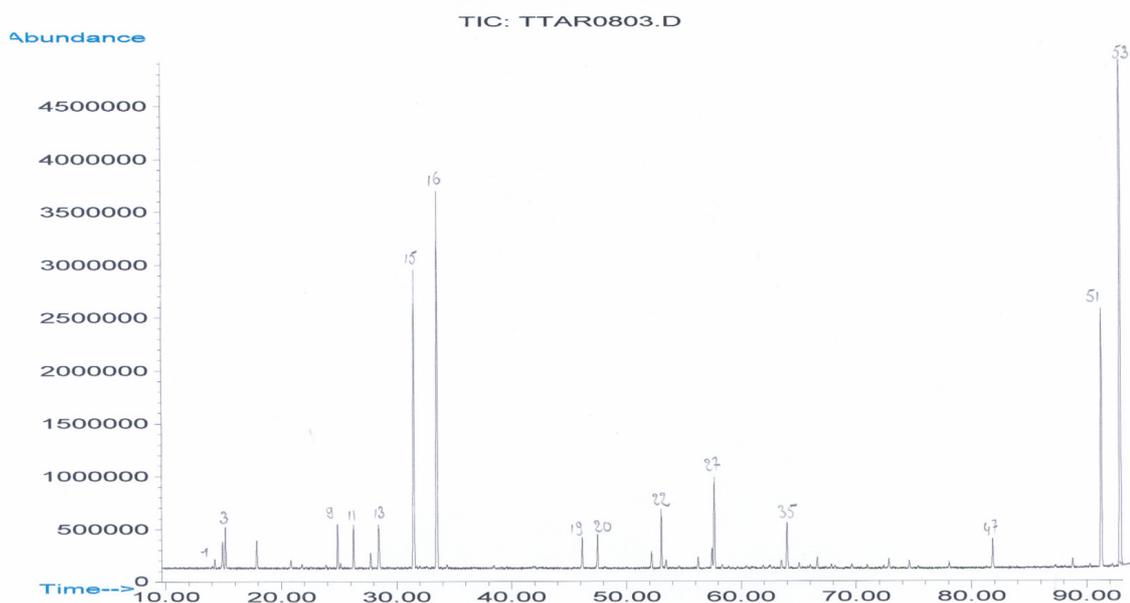
FICHE D'ANALYSE

Nom botanique : --- THYMUS VULGARIS
Nom commun : ---- THYM THYMOL
Numéro du lot : ---- 17 308 - SEPTEMBRE 2003
Origine : ----- HERBORISTERIE ARIES – HAUTE PROVENCE
Partie de la plante : SOMMITÉ FLEURIE

Caractéristiques d'analyse :

CPG : 5890 - SM : 5970 HEWLETT PACKARD
Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m × 0,25 mm × 0,5 µm
Programmation de température : 6 mn à 50 °C -2 °C/mn → 250°C - 20mn à 250 °C.
Gaz vecteur He : 22 psi. Echantillon : 1 µl de 5% de solution dans l'Hexane.
Gamme de masse : 30 to 350. Les composés des huiles sont identifiés par une recherche combinée des temps de rétention (notre propre bibliothèque) et des spectres de masse (bibliothèque NKS 75 000 spectres).
Les % sont calculés à partir des surfaces de pics sans l'utilisation de facteur de correction.

Profil CHROMATOGRAPHIQUE



G) PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE ET CONSTITUANTS DE SATUREJA MONTANA

TABLEAU DE RESULTATS 1 : SATUREJA MONTANA
Lot 17209 - Septembre 2003

Pics	Temps de rétention	Constituants	%	FONCTION
1	14,9	α -PINENE C ₁₀ H ₁₆ 136	1,12	T
2	15,1	α -THUYENE	1,28	T
3	17,9	CAMPHENE	0,51	T
4	20,8	β -PINENE C ₁₀ H ₁₆ 136	0,25	T
5	22,5	PINADIENE	0,19	T
6	23,8	Δ^3 -CARENE	0,18	T
7	24,8	β -MYRCENE	1,88	T
8	26,2	α -TERPINENE	1,74	T
9	27,7	LIMONENE C ₁₀ H ₁₆ 136	1,11	T
10	28,4	1,8-CINEOLE	0,58	O
11	28,6	β -PHELLANDRENE	0,29	T
12	30,2	Cis- β -OCIMENE	0,22	T
13	31,3	γ -TERPINENE C ₁₀ H ₁₆ 136	10,05	T
14	31,5	Trans- β -OCIMENE	0,18	T
15	33,3	β -CYMENE C ₁₀ H ₁₄ 134	13,32	T
16	34,2	TERPINOLENE	0,23	T
17	46,0	1-OCTEN-3-OL	1,30	OLA
18	47,3	Trans-THUYANOL	0,98	OLT
19	51,9	β -BOURBONENE	0,12	S
20	52,9	LINALOL	1,34	OLA
21	53,3	Cis-THUYANOL	0,36	OLT
22	53,8	ACETATE DE LINALYLE	0,31	EA
23	57,3	TERPINE DE LINALYLE	0,98	OLT
24	57,5	β -CARYOPHYLLENE	3,03	S
25	58,2	AROMADENDRENE	0,27	S
26	61,2	E- β -FARNESENE	0,07	S
27	62,4	α -HUMULENE	0,13	S
28	63,4	α -TERPINEOL	0,63	OLT
29	63,9	BORNEOL	1,89	OLT
30	64,9	GERMACRENE D	0,38	S
31	65,2	MUJROLENE ISOMERE	0,26	S
32	65,5	β -BISBOLENE	2,53	S
33	66,5	CARVONE	0,57	CT
34	67,0	ACETATE DE GERANYLE	0,11	EA
35	67,7	δ -CADINENE	0,44	S
36	68,0	γ -CADINENE	0,21	S
37	72,7	ρ -CYMENE-8-OL	0,39	PH
38	74,5	ACETATE DE CARVACRYLE	0,25	EAR
39	77,9	METHYL CARVACROL ETHER ISOMERE	0,20	E
40	81,7	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,88	O

TABLEAU DE RESULTATS 2 : SATUREJA MONTANA
Lot 17209 - Septembre 2003

Pics	Temps de rétention	Constituants	%	FONCTION
41	88,6	SPATHULENOL	0,37	SOLT
42	90,1	THYMOL ISOMERE	0,18	PH
43	91,1	THYMOL C ₁₀ H ₁₄ O ISO	1,46	PH
44	92,1	CARVACROL ISOMERE	0,12	PH
45	92,8	CARVACROL C ₁₀ H ₁₄ O ISO	47,05	PH
46	96,6	DÉRIVÉ PHENOLIQUE	0,09	PH
		TOTAL	99,99	

TABLEAU RECAPITULATIF DES FONCTIONS
SATUREJA MONTANA

TERPENE	T	32,51 %
SESQUITERPENE	S	7,44 %
ALCOOL ALIPHATIQUE	OLA	2,84 %
ALCOOL TERPENIQUE	OLT	4,84 %
CETONE TERPENIQUE	CT	0,57 %
ESTER ALIPHATIQUE	EA	0,42 %
ESTER AROMATIQUE	EAR	0,25 %
PHENOL	PH	49,29 %
OXYDE	O	1,46 %
ETHER	E	0,20 %
SESQUITERPENOL TERPENIQUE	SOLT	0,37 %



Daniel DANTIN
La gineste - 11340 BELVIS
Tél : 04 68 20 71 13
Fax : 04 68 20 76 56
Mail : ddantin@club-internet.fr

4 sept.-03

FICHE D'ANALYSE

Nom botanique : --- SATUREJA MONTANA
Nom commun : ---- SARRIETTE DES MONTAGNES
Numéro du lot : ---- 17 209 - SEPTEMBRE 2003
Origine : ----- HERBORISTERIE ARIES - FRANCE
Partie de la plante : SOMMITÉ FLEURIE

Caractéristiques d'analyse :

CPG : 5890 - SM : 5970 HEWLETT PACKARD

Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m x 0,25 mm x 0,5 µm

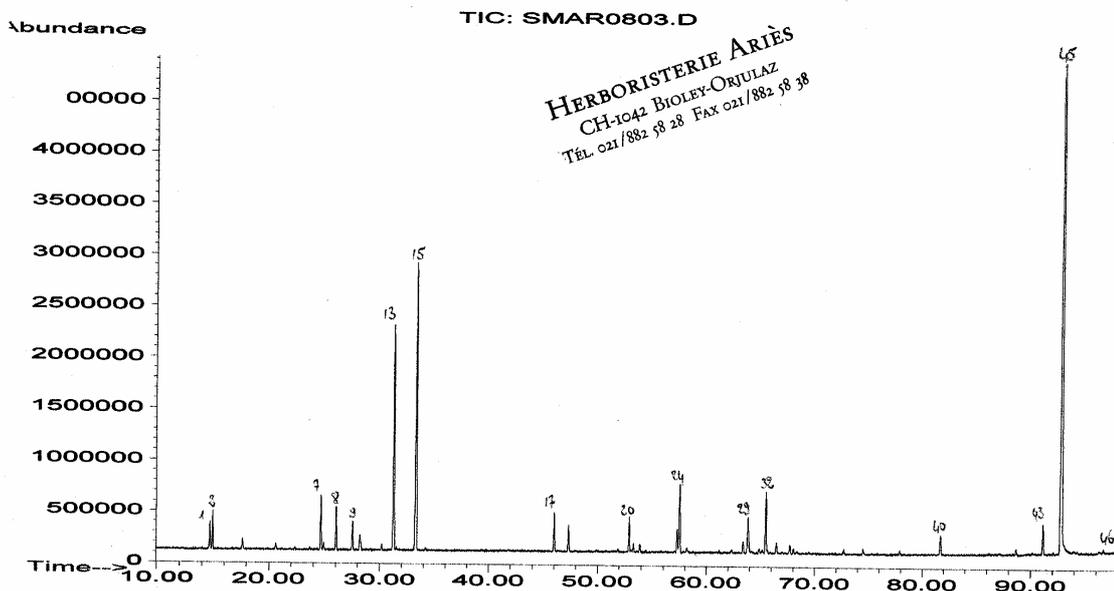
Programmation de température : 6 mn à 50 °C -2 °C/mn → 250°C - 20mn à 250 °C.

Gaz vecteur He : 22 psi. Echantillon : 1 µl de 5% de solution dans l'Hexane.

Gamme de masse : 30 to 350. Les composés des huiles sont identifiés par une recherche combinée des temps de rétention (notre propre bibliothèque) et des spectres de masse (bibliothèque NKS 75 000 spectres).

Les % sont calculés à partir des surfaces de pics sans l'utilisation de facteur de correction.

Profil CHROMATOGRAPHIQUE



BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR** (1986). "NF T 72-281 Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne", AFNOR. Paris.
- Ancelet, E.** (2001). "Pour en finir avec Pasteur" *Collection Résurgence*, Editions Marco Pietteur Embourg (BE), (268).
- ASHRAE** (1989). "ASHRAE Standard 62-1989R: Ventilation for Acceptable Indoor Air Quality", ASHRAE. Atlanta.
- Auriol, J.** (1990). "Tests in vitro d'activité antimicrobienne en aromathérapie" *Faculté de Pharmacie*, Université de Montpellier 1 (79).
- Bardana, E. J. et M. J. Anthony** (1996). "Indoor air pollution and health" *Clinical allergy and immunology*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data New York, Basel, Hong Kong, (506).
- Baron, P. A. et K. Willeke**, Eds. (1993). "Aerosol measurement: Principles, Techniques and Applications". New York, Van Nostrand Reinhold.
- Baudoux, D.** (2000). "L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles" *Douce Alternative*, Dominique Baudoux Biarritz, (221).
- Belaiche, P.** (1979). "L'aromatogramme". *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. M. S. A. Editeur. Paris. tome 1- (204).
- Bennis, S., F. S. Chami, et al.** (2004). "Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol" *Letters in Applied Microbiology* 38- (454-458).
- Björkroth, M., B. Müller, et al.** (2000). "Pollution from Ducts: What is The Reason, How to Measure it And How to Prevent it ?" *Healthy Buildings*, Espoo (SF), SIY Indoor Air Information Oy.
- Blanc-Mouchet, J.**, Ed. (1987). "Odeurs. L'essence d'un sens." *Autrement*. Paris.
- Bluyssen, P. M., C. Cox, et al.** (2003). "European Project HOPE (Health Optimisation Protocol For Energy-Efficient Buildings)". *Healthy Buildings*, Singapore.
- Bluyssen, P. M., C. Cox, et al.** (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).
- Bluyssen, P. M., C. Cox, et al.** (2000). "Pollution from filters: what is the reason, how to measure and to prevent it?" *Healthy Buildings*, Espoo (SF).
- Bluyssen, P. M., E. De Oliveira Fernandes, et al.** (1995a). "European Audit Study in 56 Office Buildings: Conclusions and Recommendations". *Healthy Buildings '95*, Milano.
- Bluyssen, P. M., M. Björkroth, et al.**, Eds. (2000). "Why, when and how do HVAC-systems pollute? Characterisation of HVAC systems related pollution,". *Healthy Buildings 2000*. Espoo (SF), SIY Indoor Air Information Oy, Finland.
- Bonadio, G. R.**, Ed. (1995). "Air pollution of humans with bacteria, fungus and molds in homes, offices & hospitals: index of new information with authors and subjects". Washington, D.C., ABBE Publishers Association cop.
- Borrel, T.** (2000). "Les infections nosocomiales, cours Maladie", L'homme et son environnement. Université Lumière Lyon II.

- Bosson, L. et G. Dietz** (2004). "L'aromathérapie énergétique: guérir avec l'âme des plantes" Bruxelles.
- Bruneton, J.** (1999). "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales" Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales (1120).
- Burge, H. A.** (1995a). "Biological contamination of buildings in temperate climates". *Healthy Buildings'95*, Milano.
- Burge, H. A., Ed.** (1995b). "Bioaerosols". *Indoor Air Research Series* Lewis Publisher.
- Burt, S. A. et R. D. Reinders** (2003). "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7" *Letters in Applied Microbiology* 36- 3: (162-167).
- Buttner, M. P., P. Cruz-Perez, et al.** (1999). "Dispersal of fungal spores from three types of air handling system duct material" *Aerobiologia* 15- (1-8).
- Carson, C. F. et T. V. Riley** (1995). "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*" *Journal of Applied Bacteriology* 78- (264-269).
- CEN** (1997). "Norme EN 1040 - Antiseptiques et désinfectants chimiques - Activité bactéricide de base - Méthode d'essai et prescriptions (phase 1)", CEN et AFNOR. Brussel et Paris. 27).
- CEN** (1998). "CR 1752, Ventilation for Buildings: Design Criteria for the Indoor Environment", CEN. Brussels.
- CEN** (2003). "EN 14788 Ventilation for buildings - design and dimensioning of residential ventilation systems." CEN. Brussels.
- Chesnais, E. et M-F. Corre** (2004). "Désodorisants d'intérieur, polluants d'ambiance" *Que Choisir ?* 421- (56-61).
- Clements-Croome, D. et L. Baizhan** (2000). "Productivity and indoor environment". *Healthy Buildings 2000*, Espoo Finland, SIY Indoor Air Information Oy, Helsinki.
- Collectif** (2001). "Légionellose, l'épidémie que l'on nous cache" 47-64).
- Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail** (1995). "Guide technique pour l'évaluation de la qualité de l'air dans les immeubles à bureaux", Santé Canada. Canada. 51-63).
- Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air, Ed.** (2000). "Cleaning the air, asthma and indoor air exposure". Washington D.C., Institute of Medicine.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, et al.** (1999). "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils" *Lett Appl Microbiol* 29- 2: (130-135).
- Cox, C. S.** (1987). "The aerobiological pathway of microorganisms" John Wiley & Sons Ltd. (293).
- Cox, S. D., C. M. Mann, et al.** (2001). "Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*" *Journal of Applied Microbiology* 91- 3: (492-497).
- Cox, S. D., C. M. Mann, et al.** (2000). "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)" *Journal of Applied Microbiology* 88- 1: (170-175).
- de Billerbeck, G.** (2000). "Activité fongique de l'huile essentielle de *cymbopogon nardus* sur l'*aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des sciences pharmaceutiques*, Institut national polytechnique de Toulouse (236).
- de Billerbeck, G.** (2005). "Huiles essentielles et maladies nosocomiales" *La Phytothérapie Européenne* Mai-Juin 2005: (17-20).

- Deans, S. G. et G. Ritchie** (1987). "Antibacterial properties of plant essential oils" *International Journal of Food Microbiology* 5- (162-180).
- Decoster, A. et J.-C. Lemahieu** (2004). "Cours de bactériologie sur le WEB".
- Didry, N., L. Dubreuil, et al.** (1993). "Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés." *Pharmacize* 48- H4: (301-304).
- Dorman, H. J. D. et S. G. Deans** (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils" *Journal of Applied Microbiology* 88- 2: (308-316).
- Ducel, G., G.-A. Thaler, et al.** (1998). "En salle d'opération les tables d'instruments sont-elles stériles ?" *Techniques Hospitalières* 623- Janvier-Février 1998: (16-10).
- EPA et sponsors** (1998). "Indoor air pollution. An introduction for health professionals", United States Environmental Protection Agency 2001: (
- Faleiro, M. L., M. G. Miguel, et al.** (2003). "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*" *Lett Appl Microbiol* 36-1: (35-40).
- Fanger, P. O.** (1988). "Introduction of the olf and decipol units to quantify air pollution perceived by human indoors and outdoors. ." *Energy and Buildings* 12- (1-6).
- Fauchère, J.-L. et J.-L. Avril** (2002). "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris, (365).
- Fleurette, J., J. Freney, et al.** (1995). "Antiseptie et désinfection".
- Flückiger, B.** (1999). "Beurteilung der mikrobiellen Exposition in Wohnungen und Lüftungsanlagen" *Naturwissenschaft, Eidgenössischen Technischen Hochschule* (117).
- Franchomme, P., D. Pénoël, et al.** (1990). "Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 2- (73-227).
- Franchomme, P., D. Pénoël, et al.** (1990). "Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 1- (1-69).
- Franchomme, P., D. Pénoël, et al.** (1990). "Matière médicale aromatique fondamentale". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 4- (317-446).
- Franchomme, P., D. Pénoël, et al.** (1990). "Thérapeutique. Eléments de médecine aromatique". *L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.* 3- (230-316).
- Gravesen, S.** "Microbiology of indoor air".
- Griffin, S. G., S. G. Wyllie, et al.** (1999). "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity." *Flavour and Fragrance Journal* 14- (322-332).
- Guillemot, D.** (2005). "Consommation d'antibiotiques et résistance des bactéries" *Pour la science* 331- mai 2005: (82-87).
- Gumowski, P. I., F. Grange, et al.** (1987). "Asthmes intrinsèques et réactivité aspécifique aux moisissures" *Médecine et Hygiène* 45- (153-157).
- Gupta, K. C., A. G. Ulsamer, et al.** (1981). "Formaldehyde in indoor air: sources and toxicity". *International symposium on indoor air pollution, health and energy conservation*, Amherst, Massachusetts, Pergamon Press.
- Hamilton-Miller, J. M. T.** (2004). "Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe" *International Journal of Antimicrobial Agents* 23- 3: (209-212).

- Hammer, K. A., C. F. Carson, et al.** (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts" *Journal of Applied Microbiology* 86- 6: (985-990).
- Hammer, K. A., C. F. Carson, et al.** (1999). "Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro" *Journal of Applied Microbiology* 86- 3: (446-452).
- Hammer, K. A., C. F. Carson, et al.** (2003). "Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil" *Journal of Applied Microbiology* 95- 4: (853-860).
- Haxhe, J. J. et M. Zumofen** (1999). "Notions d'hygiène hospitalière", Faculté de Médecine, Université Catholique de Louvain.
- Helander, I. M., H. L. Alakomi, et al.** (1998). "Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria" *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46- (3590-3595).
- Hermal, C.** (1993). "Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles." *Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I* (87).
- Higgins, S., L. Gaunt, et al.** (2004). "The antibacterial effects of ionized vapours emitted from candles". *IEJ-ESA Joint Symposium on Electrostatics*, Tokyo, Japan.
- Hugo, W. B., Ed.** (1971). "Inhibition and destruction of the microbial cell". London, Academic Press.
- Hulak, I.** (1999). "Protection contre la dégradation et la prolifération des microorganismes". *XXIF Journée Technologique. Les polymères à usage médical*, Le Mans.
- Hurst, C. J., et al., Ed.** (1997). "Manuel of environmental microbiology". *Aerobiology*. Washington, D.C., ASM PRESS.
- Ibrahim, Y. K. E. et M. S. Ogunmodede** (1991). "Growth and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in some aromatic waters" *Pharm. Acta Helv.* 66- 9-11: (286-288).
- Inouye, S.** (2003a). "Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1)" *International Journal of Aromatherapy* 13- 2-3: (95-107).
- Inouye, S.** (2003b). "Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2)" *International Journal of Aromatherapy* 13- 4: (173-184).
- Inouye, S., S. Abe, et al.** (2003). "Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts" *International Journal of Aromatherapy* 13- 1: (33-41).
- Isoard, P., J. Calop, et al.** (1982). "La contamination microbiologique des atmosphères closes. Origines, méthode d'études." *J. Chir (Paris)* 119- n°8-9: (503-512).
- Isoard, P., L. P. Faure, et al.** (1991). "Infection hospitalière: Niveau de cohérence et Assurance qualité" *CVC Juin-Juillet 1991-* (19-22).
- Jensen, P. A. et M. P. Schafer** (1998). "Sampling and characterization of bioaerosols", *NIOSH Manual of Analytical Methods 2002:* (
- Kunle, O., J. Okogun, et al.** (2003). "Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract" *Phytomedicine* 10- (59-61).
- Lahlou, M.** (2004). "Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils." *Phytotherapy Research* 18- (435-448).
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, et al.** (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol" *Journal of Applied Microbiology* 91- 3: (453-462).

- Liassine, N.** (2000). "Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier" *Schweiz. Med. Wochenschr.* 130- (1930-6).
- Lis-Balchin, M., S. L. Hart, et al.** (2000). "Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand" *Phytotherapy Research* 14- (623-629).
- Macher, J. M.** (2000). "Air sampling methods for biological contaminants", Andersen Instruments Inc.2001: (
- Mailhebiau, P.** (1994). "La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs" Lausanne, (635).
- Manley, C. H.** (1993). "Psychophysiological effect of odor" *Critical reviews in food science and nutrition* 33- (57-62).
- Mann, C. M., S. D. Cox, et al.** (2000). "The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)" *Lett Appl Microbiol* 30- 4: (294-297).
- Mann, C. M. et J. L. Markham** (1998). "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils" *Journal of Applied Microbiology* 84- 4: (538-544).
- Margulis, L. et D. Sagan** (1989). "L'univers bactériel" *Collection Points, Série Sciences*, Albin Michel (339).
- Maroni, M., B. Seifert, et al.** (1995). "Indoor Air Quality - A Comprehensive Reference Book" *Air Quality Monographs*, Elsevier Amsterdam, (1050).
- Maudsley, F. et K. Kerr** (1999). "Microbiological safety of essential oils used in complementary therapies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens" *Support Care Cancer* 7- (100-102).
- Messenger, S., K. A. Hammer, et al.** (2005). "Effectiveness of hand-cleansing formulations containing tea tree oil assessed ex vivo on human skin and in vivo with volunteers using European standard EN 1499" *Journal of Hospital Infection* 59- 3: (220-228).
- Moffat, D. W.** (1997). "Handbook of indoor air quality management" Prentice Hall (500).
- Morawska, L.** (2005). "Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection?" *Indoor Air 2005*, Beijing.
- Möritz, M.** (1996). "Verhalten von Mikroorganismen auf Luftfiltern in Raumluftechnischen Anlagen in Abhängigkeit von der klimatischen Bedingungen der Lufttemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit." *Verfahrenstechnik, Umwelttechnik, Werkstoffwissenschaften*, Technischen Universität Berlin (204).
- Morris, G., M. H. Kokki, et al.** (2000). "Sampling of aspergillus spores in the air", *The Hospital Infection Society*2001: (20).
- Müller, B., K. Fitzner, et al.** (2000). "Pollution from humidifiers: what is the reason; how to measure and to prevent it." *Healthy Buildings 2000*.
- Nakagaki, M., E. M., et al.** (1996). "Questionnaire surveys and subjective experiments regarding physiological and psychological effects of HVAC with fragrance control systems on occupants". *Indoor Air'96*, Nagoya, Japan.
- Parat, S. et A. Perdrix** (1999). "Climatisation et santé" *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 16-778-A-10- Toxicologie-Pathologie professionnelle: (6p.).
- Pasanen, P.** (1998). "Emissions from filters and hygiene of air ducts in the ventilation systems of office buildings" *Department of Environmental Sciences*, University of Kuopio (78).

- Pasquarella, C., O. Pitzurra, et al.** (2000). "The index of microbial air contamination" *Journal of Hospital Infection* 46- (241-256).
- Pattnaik, S., V. R. Subramanyam, et al.** (1996). "Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro" *Microbios* 86- (237-246).
- Pejtersen, J.** (1996). "Sensory air pollution caused by rotary heat exchangers", Nagoya, Japan.
- Pibiri, M.-C. et C.-A. Roulet** (2003). "Study of the effect of essential oils on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa." *Healthy Buildings 2003*, Singapore.
- Pibiri, M.-C., C.-A. Roulet, et al.** (2002). "Effect of Chemical Composition on VOC Transfer Through Rotating Heat Exchangers" *Energy and Buildings* 34- 8: (799-807).
- Pibiri, M.-C., C. Seigniez, et al.** (2003). "Methods to study effects of essential oils on microbes present in ventilation systems". *CISBAT 2003*, Lausanne.
- Pibiri, M.-C., C. Seigniez, et al.** (2001). "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants". *CISBAT 2001*, Lausanne, LESO, EPFL.
- Porcher-Pimpard** (1942). "Contribution à l'étude du pouvoir antiseptique des essences végétales" *Faculté de Médecine et de Pharmacie*, Université de Toulouse (95).
- Portnoy, J. M., S. Flappan, et al.** (2001). "A procedure for evaluation of the indoor air environment" *Aerobiologia* 17- (43-48).
- Poudevigne, M.** (1991). "Activité antifongique d'émulsions de 11 huiles essentielles" *Faculté de Pharmacie*, Université de Montpellier 1 (104).
- Régnier, B.** (2005). "Les infections à l'hôpital" *Pour la science* 331- mai 2005: (74-80).
- Robine, E.** (1999). "Fixation et survie des aerosols bactériens sur les surfaces" *Sciences de la vie et de la santé*, Université de Paris XII (190).
- Ros, A.** (1999). "La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques", Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHU de Saint-Etienne. 3).
- Roulet, C.-A.** (1972). "Solution de l'équation de Fick avec source appliquée à la diffusion d'adatoms d'argent sur le cuivre" *Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik* 23- 3.
- Roulet, C.-A.** (2004). "Qualité de l'environnement intérieur et santé dans les bâtiments" *Collection gérer l'environnement*, PPUR Lausanne, (368).
- Ruud, S. et T. Carlsson** (1996). "Transfer of pollutants in rotary air-to-air heat exchangers - A state of the art investigation". *Indoor Air 96*, Nagoya, Japan.
- Rylander, R.** (1998). "Microbial cell wall constituents in Indoor Air and their relation to diseases" *Indoor Air Supplement* 4/1998- (59-65).
- Salthammer, T., Ed.** (1999). "Organic indoor air pollutants: occurrence - measurement - evaluation" Wiley-VCH.
- Sarbach, R.** (1962). "Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères" *Faculté de Pharmacie*, Université de Rennes (181).
- Schnaubelt, K.** (1998). "Advanced aromatherapy, the science of essential oil therapy" *Healing Arts Press*, Inner Traditions International Rochester, Vermont, (136).
- Schnaubelt, K.** (1999). "Medical aromatherapy; healing with essential oils" Frog, Ltd. Berkeley, California, (296).
- Schön, M. et R. Hübner** (1996). "Geruch" Vogel Verlag und Druck Würzburg, (237).

- Schreiber, F. W. et K. Fitzner** (2000). "Investigation of the perceived air". *Healthy Buildings 2000*, Espoo Finland, SIY Indoor Air Information Oy, Helsinki.
- Sekhar, S. C., K. W. Tham, et al.** (1998). "Integrated Indoor Air Quality and Energy Audits and Targets of Commercial Air-Conditioned Buildings in Singapore", School of Design and Environment, National University of Singapore. Singapore.
- Sherertz, P.** (1993). "Bioaerosols", Virginia Departement of Health. Richemond, Virginie. 3).
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, et al.** (1996). "Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils" *Journal of Food Chemistry* 44- (1202-1205).
- Smith, M. D. et P. L. Navilliat** (1997). "A new protocol for antimicrobial testing of oils" *Journal of Microbiological Methods* 28- 1: (21-24).
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, et al.** (1998). "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens" *Lett Appl Microbiol* 26- 2: (118-122).
- SUVA (2001). "Valeurs limites d'exposition aux postes de travail 2001", Caisse nationale suisse d'assurance en cas d'accident. Lucerne.
- Terreaux, C. et K. Hostettmann** (1991). "L'extrait de pépins de pamplemousse, un antibiotique naturel ?" *Schweizer Apothekezeitung* 24- (823-825).
- Tisserand, R.** (1988). "Aromatherapy for everyone" Penguin Books London.
- Tisserand, R.** (1988). "Essential oils as psychotherapeutic agents". *Perfumery, the psychology and biology of fragrance*. London, New York, Chapman and Hall. 1- (167-181).
- Torkki, A. et S. O.** (1996). "Olfactory and chemical emissions of ventilation ducts". *Indoor Air'96*, Nagoya, Japan.
- Troillet, N., P. Francioli, et al.** (2001). "La fréquence des infections nosocomiales comme indicateur de la qualité des soins" *Swiss-NOSO* 8- 1: (7).
- Valnet, J.** (1964). "L'aromathérapie" *Santé*, Paris, (640).
- von Kempfski, D.** (1997). "The impact on perceived air quality of adding natural olfactory stimulants". *Healthy Buildings / IAQ'97*, Washington DC.
- von Kempfski, D.** (1998). "Olfactory comfort - A new approach to improving IAQ." *IAQ and Energy 98. A. K. Persily*. Atlanta, ASHRAE (39-46).
- Walsh, S. E., J.-Y. Maillard, et al.** (2003). "Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria" *Journal of Applied Microbiology* 94- 2: (240-247).
- Wanner, H.-U., A. Verhoef, et al.** (1993). "Biological Particles in Indoor Environments", CEC81).
- Wargocki, P., D. P. Wyon, et al.** (2000). "Productivity is affected by the air quality in offices". *Healthy Buildings 2000*, Espoo Finland, SIY Indoor Air Information Oy, Helsinki.
- WHO (2000). "Air Quality Guidelines for Europe" WHO Regional Publications, European Series Copenhagen, (273).
- Zaika, L. L.** (1988). "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination" *Journal of Food Safety* 9- 2: (97-118).
- Zimmermann, E.** (1998). "Aromatherapie für Pflege-und Heilberufe: ein Kursbuch zur Aromapraxis" Stuttgart, (251).

Chemin du Signal 18
1304 Cossonay
Tél. (privé) : 021 861 01 70
Tél. (portable) : 076 396 47 74
e-mail: marie-cecile.pibiri@epfl.ch

Marie-Cécile Pibiri
Ingénieure chimiste EPF
Dr ès sciences



Français langue maternelle
Anglais parlé et écrit courant
Allemand parlé et écrit
Italien-Espagnol bonnes notions

Née le 25.05.1970
Mariée, un enfant
Suisse et française

Formation

- 2002-2005 **Thèse de doctorat à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) Faculté de l'Environnement Naturel, Architectural et Construit (ENAC)**
"Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles"
- 1996 **Certificat en Communication et Management** (ESM, Genève)
- 1995 **Diplôme d'ingénieure chimiste** (EPFL)
- 1989 **Double Maturité fédérale**, sciences et langues (Rousseau, Genève)

Parcours professionnel et réalisations

- 2002-2006 **Doctorante au Laboratoire d'Énergie Solaire et de Physique du Bâtiment**
Gestion scientifique et pratique du projet "huiles essentielles", séminaires, conférences, cours et encadrement de deux stagiaires.
J'ai été chargée de la création du laboratoire de microbiologie destiné à accueillir les expériences du projet de thèse pour lequel le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (FNS) m'a octroyé une bourse d'encouragement aux carrières académiques féminines.
- 1999-2001 **Ingénieure chimiste, assistante du Prof Claude-Alain Roulet (EPFL)**
Collaboration à deux projets européens sur la qualité de l'air intérieur : Indoor Air Quality Audit et AIRLESS, responsable des polluants chimiques.
J'ai été chargée de mesurer et de caractériser les polluants chimiques dans les bâtiments, et en particulier leur transfert par les échangeurs de chaleurs des systèmes de ventilations.
- 1996-1997 **Collaboratrice du Département Personal Care, Créations Aromatiques SA**
Évaluatrice de parfums, chargée des présentations clients.
Pour un important client suisse, j'ai développé et géré un panel de 400 consommateurs pour des tests de parfumerie fine ; il a effectué un choix parmi les fragrances proposées en accord avec le marché.
- 1989-1993 **Stagiaire**
Contrôle qualité chez Givaudan Genève ; Institut de Génie Chimique et Institut de Chimie Physique à l'EPFL ; Travail de diplôme en Enzymologie au département de Biosciences du Centre de Recherche Nestlé.

Divers et intérêts

Confort olfactif : Passionnée par le sens de l'odorat, les **huiles essentielles** : commissaire d'une exposition olfactive de 400m² dans un centre commercial genevois.

Développement durable et commerce équitable : administratrice de Bonne Saveur, Bonne Humeur SA (2001-2005)

Outils de développement personnel : analyse transactionnelle, communication non violente.