

**Etude et compréhension de la dynamique de colonisation
microbienne des supports : vers l'élaboration de nouveaux
traitements préventifs adaptés aux environnements intérieurs.**

**Study and comprehension of dynamics of surfaces microbial
colonization to develop new preventive treatments suited to indoor
environments**

Programme **PRIMEQUAL**
Rapport final

Stéphane Moularat, Marjorie Draghi, Isabelle Lacaze, Marina Moletta-Denat,

Faisl Boust, Geneviève Oriol, Enric Robine

Coordonnées du laboratoire du responsable du projet de recherche
CSTB

84, Avenue Jean Jaurès-Champs-sur-Marne
77447 Marne-la-Vallée Cedex 2

Date : 30/04/2013

N° de contrat : Q.5-2100082987

Date du contrat : 10/06/2010

Sommaire

.....	1
1 Résumé court	8
2 Abstract	9
3 Introduction.....	10
4 Etat de l'art.....	12
4.1 Colonisation des supports par les moisissures.....	12
4.1.1 Phases du développement fongique	12
4.1.2 Facteurs d'influence	12
4.2 Mécanismes de biodétérioration des matériaux.....	14
4.2.1 Dégradation de la cellulose	14
4.2.2 Dégradation de la lignine	16
4.2.3 Dégradation des matériaux inorganiques :	16
4.3 Nature des matériaux vulnérables vis à vis des micromycètes dans les logements et sites patrimoniaux.....	17
4.3.1 Contaminations des logements.....	17
4.3.2 Contaminations des sites patrimoniaux.....	20
4.4 Traitements antifongiques :	21
4.4.1 Traitements physiques.....	21
4.4.2 Traitements chimiques	22
4.4.3 Traitements biocides alternatifs.....	27
5 Matériels et méthodes	32
5.1 Choix des matériaux d'essai	33
5.2 Dispositifs expérimentaux	35
5.2.1 Campagne 1 : Contamination naturelle des supports	35
5.2.2 Campagne 2 : Impaction des microorganismes de l'air sur les supports	37
5.2.3 Collecte de la microflore aéroportée	38
5.2.4 Fréquence de prélèvement des éprouvettes	39
5.3 Traitements antifongiques	40
5.3.1 Protocoles de préparation des traitements biocides.....	40
5.3.2 Procédures d'application des traitements sur les matériaux.....	41
5.4 Techniques analytiques.....	41
5.4.1 Microscopie électronique à balayage	41
5.4.2 Caractérisation de la microflore par la méthode culturale	41
5.4.3 Dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC).....	42
5.4.4 Caractérisation quantitative de la microflore par la biologie moléculaire	42
5.4.5 Capillary Electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP)	45
5.4.6 Analyse métagénomique ciblée.....	46
6 Résultats.....	47
6.1 Campagne 1	47
6.1.1 Conditions environnementales de température et d'humidité relative.....	47
6.1.2 Observations macroscopiques	48
6.1.3 Observations au Microscope Electronique à Balayage	50
6.1.4 Caractérisation de la microflore colonisant les supports.....	53
6.2 Campagne 2 : Etude de la dynamique de colonisation des supports	67
6.3 Diversité microbienne par approche moléculaire	71
6.4 Séquençage	75
6.4.1 Quantification des matrices ADN	75

6.4.2	Bilan des Séquences analysées.....	76
6.4.3	Caractérisation de la diversité bactérienne.....	77
6.4.4	Caractérisation de la diversité eucaryote.....	84
6.5	Discussion sur la dynamique microbienne (campagne 2).....	92
6.6	Etude de l'effet de trois traitements préventifs sur la croissance microbienne	100
6.6.1	Détermination de la capacité d'absorption des matériaux d'essai	101
6.6.2	Dénombrement de la flore microbienne cultivable	102
7	Conclusions.....	105
8	Références bibliographiques	108

Table des illustrations

Figures

Figure 1: Cycle de vie asexuel d' <i>Aspergillus nidulans</i> (Oshero et May, 2001).....	12
Figure 2: Mode d'action des différentes cellulases (Kleywegt <i>et al.</i> , 1997).....	15
Figure 3: Schéma d'oxydation de la lignine (Palmer 1983).	16
Figure 4: Production de l'ajoéne à partir de l'allicine (Higdon, 2007).	27
Figure 5 : Structure de la paroi bactérienne Gram+ (d'après (Lavigne, 2007)).	30
Figure 6 : Structure de la paroi bactérienne Gram- (d'après (Lavigne, 2007)).	30
Figure 7 : Principe schématisé du dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC)	42
Figure 8: Représentation des 3 étapes d'une réaction de PCR (dénaturation, hybridation et élongation) (www.medecine.univ-paris7.fr.)	44
Figure 9: Représentation d'une amplification par PCR temps réel d'un fragment d'ADN.....	45
Figure 10 : Evolution de la température et de l'Humidité Relative (HR) dans la salle test durant les 23 jours de l'essai (les phases de séchage en continu, fenêtre fermée sans renouvellement d'eau, sont encadrées en rouge).....	48
Figure 11 : Dénombrement des bactéries en UFC/cm ² présentes à la surface des matériaux à T2, T7, T16, et T23.	54
Figure 12 : Dénombrement de la flore fongique présente à la surface des matériaux à T2, T7, T16, et T23 (UFC/cm ²).	55
Figure 13 : Dénombrement de la flore fongique en UFC/cm ² présents à la surface de la plaque de plâtre, du papier peint, de la toile de verre, de la dalle de plafond et du lin à T2, T7, T16, et T23.	55
Figure 14 : Evolution de la concentration moyenne d'Eucaryotes dans l'air au cours du temps.	59
Figure 15 : Evolution de la concentration moyenne de bactéries dans l'air au cours du temps.	60
Figure 16 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur toile de verre au cours du temps.	60
Figure 17: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur papier peint au cours du temps.	61
Figure 18: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur dalle de plafond au cours du temps.	61
Figure 19 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur lin au cours du temps.	62
Figure 20: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur bois au cours du temps.	62
Figure 21 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur plaque de plâtre au cours du temps.	63
Figure 22 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur toile de verre au cours du temps.	64
Figure 23 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur papier-peint au cours du temps.	64
Figure 24 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur bois au cours du temps.	65

Figure 25 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur plaque de plâtre au cours du temps.	65
Figure 26 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur lin au cours du temps. ..	66
Figure 27 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur dalle de plafond au cours du temps.	66
Figure 28 : Evolution de la concentration en eucaryotes sur toile de verre au cours du temps.	68
Figure 29 : Evolution de la concentration en eucaryotes sur bois au cours du temps.....	68
Figure 30 : Evolution de la concentration en bactéries sur toile de verre au cours du temps ..	69
Figure 31 : Evolution de la concentration en bactéries sur bois au cours du temps.....	70
Figure 32 : Profils CE-SSCP Eucaryotes à 16 jours de colonisation (BO-bois ; DP-dalle de plafond ; FIL-air ; LI-lin ; PA-papier peint ; PL-plaque de plâtre ; Tv-toile de verre)	71
Figure 33 : Profils CE-SSCP Bactéries à 23 jours de colonisation (BO-bois ; DP-dalle de plafond ; FIL-air ; LI-lin ; PA-papier peint ; PL-plaque de plâtre ; Tv-toile de verre)	71
Figure 34 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP eucaryotes.	72
Figure 35 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP bactéries.	73
Figure 36: Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP eucaryotes.	74
Figure 37 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP bactéries.	75
Figure 38 : Abondance des phyla retrouvés sur les coupons de toile de verre et de bois à 7 et 23 jours.....	78
Figure 39 : Abondance des genres bactériens retrouvés sur les coupons de Toile de verre et de Bois à 7 jours et 23 jours de colonisation.....	80
Figure 40 : Abondance des phyla (bactéries) retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois à trois temps d'exposition	81
Figure 41 : Abondance des genres retrouvés sur les coupons de Toile de verre et de Bois aux trois temps considérés	83
Figure 42 : Abondance des phyla (eucaryotes) retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois après 7 et 23 jours d'exposition.....	84
Figure 43 : Abondance des genres eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et du bois à 7 et 23 jours.....	86
Figure 44 : Abondance des phyla eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois après 4, 7 et 23 jours d'incubation	87
Figure 45 : Abondance des eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois à 4, 7 et 11 jours.....	88
Figure 46 : Représentation des 111 variables actives (microorganismes) dans le plan des facteurs 1 et 2 (les bactéries sont représentées en noir, les champignons en vert et les autres eucaryotes en bleu).....	94
Figure 47 : Plan principal de l'ACP sur 111 microorganismes et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)	95

Figure 48 : Représentation des 18 variables actives (genres fongiques) dans le plan des facteurs 1 et 2.	96
Figure 49 : Plan principal de l'ACP sur 18 genres fongiques et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)	97
Figure 50 : Représentation des 88 variables actives (genres bactériens) dans le plan des facteurs 1 et 2	98
Figure 51 : Plan principal de l'ACP sur 88 genres bactériens et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)	99

Photographies

Photographie 1 : Cas de contaminations fongiques, situées dans des logements ou des sites patrimoniaux, isolés sur des matériaux de diverses natures	34
Photographie 2 : Supports de croissance étudiés	35
Photographie 3 : Dispositif expérimental dédié à la biocontamination des supports (de gauche à droite sont disposés les éprouvettes de : dalle acoustique, toile de verre, plaque de plâtre, bois et lin).....	36
Photographie 4 : Photographie des supports déposés sur billes de verre	36
Photographie 5: Plateau contenant de la toile de verre en phase d'humidification (à droite) et de séchage (à gauche).....	37
Photographie 6 : Montage de l'impacteur et disposition des coupons de matériaux à contaminer	37
Photographie 7 : Eprouvettes disposées dans les dessiccateurs	38
Photographie 8 : Système de collecte de la microflore aéroportée	38
Photographie 9 : Supports contaminés (de gauche à droite) à 0, 2, 7, 16 et 23 jours	50
Photographie 10 : Images réalisées au MEB des supports de l'étude après 23 jours (T23) d'exposition.....	53
Photographie 11 : Illustrations des bactéries isolées à partir des différentes éprouvettes.....	56
Photographie 12 : Illustrations de la flore fongique isolée à partir des différentes éprouvettes	57
Photographie 13 : Développement microbien observé sur les coupons de toile de verre (de haut en bas et de gauche à droite) : exempts de traitement (témoins), traités à l'extrait d'ail, à l'huile essentielle de menthe et à l'huile essentielle de thym.....	102
Photographie 14 : Développement microbien observé après 7 jours d'incubation sur les coupons de bois (de gauche à droite) : témoins et traités en huile essentielle de menthe poivrée	103
Photographie 15 : Flore fongique observée sur MEA + Chloramphénicol à partir du matériel biologique extrait de coupons de bois après 7 jours d'incubation (de gauche à droite) témoins, traités à l'extrait d'ail et traités à l'huile essentielle de menthe poivrée	104
Photographie 16 : Flore fongique observée sur MEA + Chloramphénicol à partir du matériel biologique extrait de coupons de toile de verre après 7 jours d'incubation (de gauche à droite) témoins, traités à l'extrait d'ail et traités à l'huile essentielle de menthe poivrée. En bas : toile de verre traitée à l'huile essentielle de thym	104

Tableaux

Tableau 1 : Espèces fongiques isolées de divers matériaux (Botton <i>et al.</i> , 1985; Beguin et Nolard, 1994; SAMSON <i>et al.</i> , 1994; Samson et Hoekstra, 1994; Beguin, 1995).....	18
Tableau 2 : Produits utilisés dans les traitements du bois et leur toxicité (INRS, 2006)	22
Tableau 3 : (adapté de (Sequeira <i>et al.</i> , 2012)) : Principaux agents antifongiques utilisés pour le papier	24
Tableau 4 : Cycles d'humidification/séchage réalisés au cours de l'essai	36
Tableau 5 : Fréquence de prélèvement des éprouvettes et techniques d'analyse appliquées (BM : Biologie moléculaire, C : méthode culturale, MEB : microscopie électronique à balayage)	39
Tableau 6 : Organisation des prélèvements de la campagne 2.....	40
Tableau 7 : Détails des amorces et sondes utilisée pour les analyses moléculaire (PCRq)	45
Tableau 8 : Détails des amorces utilisée pour les analyses moléculaire (PCR-SSCP)	46
Tableau 9 : Coupons analysés par séquençage haut débit (16S rDNA et 18S rDNA).....	47
Tableau 10 : Identification des bactéries isolées à partir des éprouvettes.....	58
Tableau 11 : Identification des champignons isolés à partir des éprouvettes	58
Tableau 12 : Concentrations moyennes eucaryotes maximales atteintes sur chaque support pendant 23 jours	63
Tableau 13 : Concentrations moyenne maximales en bactéries atteintes sur chaque support .	66
Tableau 14 : Récapitulatif des concentrations moyennes maximales de chaque population...	67
Tableau 15 : Concentrations maximales atteintes lors de chaque essai (exprimé en GE/cm ²).70	
Tableau 16 : Quantification des matrices ADN	76
Tableau 17 : Bilan du nombre de séquences obtenues après séquençage des coupons de la Campagne 1	76
Tableau 18 : Bilan des séquençages de la Campagne 2	76
Tableau 19 : Core-species bactérie de la campagne 1.....	89
Tableau 20 : Core-species bactérie de la campagne 2.....	90
Tableau 21 : Core-species eucaryote de la campagne 1	91
Tableau 22 : Core-species eucaryote de la campagne 2.....	91
Tableau 23 : Poids des facteurs défini par l'ACP	93
Tableau 24 : Poids des facteurs défini par l'ACP	96
Tableau 25 : Poids des facteurs défini par l'ACP	98
Tableau 26 : Capacité d'absorption des coupons de toile de verre	101
Tableau 27 : Capacité d'absorption des coupons de bois.....	101
Tableau 28 : Flores bactérienne et fongique évaluées par méthode culturale sur les différents matériaux testés après diverses durées d'incubation (ND : Non Dénombrable).....	103
Tableau 29 : Genres fongiques identifiés par méthode culturale sur la toile de verre et le chêne selon la nature du traitement appliqué après différentes durées d'incubation	105

1 Résumé court

Les moisissures sont des biocontaminants courants des environnements intérieurs mis en cause dans la biodégradation des matériaux qu'ils colonisent et dans la survenue de diverses pathologies, notamment respiratoires.

Actuellement, les connaissances sur les espèces microbiennes mises en jeu et les étapes de colonisation conduisant à une contamination fongique visible dans des environnements intérieurs sont réduites.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier et de comprendre la dynamique de colonisation microbienne des supports afin d'élaborer de nouveaux traitements préventifs adaptés aux environnements intérieurs.

Pour cela, un banc et des protocoles d'essai ont été développés afin d'assurer le suivi des contaminations fongiques et bactériennes sur différents matériaux, dans deux configurations. Ainsi, une contamination dans des conditions réelles d'exposition a été réalisée sur six supports. Des analyses en microscopie, culture et biologie moléculaire ont alors été effectuées sur une période de 23 jours.

Ces analyses ont montré une croissance microbienne sur l'ensemble des matériaux testés avec une augmentation des charges bactérienne et fongique durant l'essai.

Cette campagne a également permis d'identifier la toile de verre et le bois comme les matériaux les plus vulnérables vis-à-vis de la prolifération fongique.

Ces deux produits ont été utilisés pour l'étude de la dynamique de colonisation et pour éprouver l'efficacité de traitements à base d'ail et d'huiles essentielles.

La diversité bactérienne et eucaryote présente sur des coupons de bois et de toile de verre a été caractérisée par séquençage haut débit. Les résultats ont montré une diversité caractérisée par un écosystème dynamique complexe composé de bactéries et d'eucaryotes.

Concernant les traitements préventifs du développement fongique testés, des différences d'efficacité ont été constatées entre les deux supports. Ainsi, si aucun effet n'a été constaté sur la toile de verre, deux des trois traitements testés semblaient efficaces sur le bois. Compte tenu de l'efficacité, *a priori* ciblée, des solutions traitantes testées et de la grande diversité microbienne, le recours à un traitement à spectre d'action large apparaît indispensable pour prévenir le développement fongique. L'étude des mécanismes de croissance fongique pourrait également constituer une approche pertinente pour affiner le choix des traitements préventifs.

2 Abstract

Fungi are common indoor environments biocontaminants implicated in the biodegradation of materials and also in the occurrence of various diseases, especially respiratory. Currently, knowledge about microbial species implicated and the stages of colonization leading to visible fungal contamination in indoor environments are rare.

In this context, the aim of this research is to study and understand the dynamics of microbial colonization of the media to develop new preventive treatments suited to indoor environments.

For this, a bench and test protocols have been developed to monitor fungal and bacterial contamination of different materials in two different contamination scenarios. Thus, contamination in real exposure was performed on six materials. Microscopy, culture and molecular biology analysis were then carried out over a period of 23 days.

These analyses showed a microbial growth on all tested materials with increased bacterial and fungal load during the test. This campaign has also identified the glass cloth and oak materials as the most vulnerable towards the fungal growth.

These two products have been used to study the dynamics of microbial colonization and to test the effectiveness of treatments based on garlic and essential oils.

Bacterial and eukaryotic diversity present on oak and glass cloth was characterized by high-throughput sequencing. The results showed a diversity of the ecosystem characterized by a dynamic complex of bacteria and eukaryotes.

Concerning antifungal preventive treatments tested, differences in efficiency were observed between the two media. Thus no effect was observed on the glass cloth while two of the three tested treatments seemed effective on oak. Taking into account the efficiency, a priori targeted, of treatment solutions tested and high microbial diversity, the use of a broad-spectrum treatment appears essential to prevent fungal growth.

The study of the mechanisms of fungal growth could also be a relevant approach to refine the choice of preventive treatments.

3 Introduction

Depuis les années 70, la politique d'économie d'énergie mise en œuvre, notamment en France, a entraîné un confinement des habitations avec, entre autres, l'isolation accrue des bâtiments. Cette politique, associée à la généralisation des équipements ménagers générateurs de vapeur (lave-linge, sèche-linge...), a eu pour conséquence une augmentation de l'humidité propice à la prolifération des microorganismes tels que les moisissures. De fait, l'OQAI a mis en évidence, lors de la campagne nationale logements, que 15 % des foyers présentaient des contaminations fongiques visibles (Moularat *et al.*, 2008), microorganismes susceptibles d'induire chez les occupants diverses pathologies notamment respiratoires telles que des allergies, des infections ou des toxi-infections (Kuhn *et al.*, 1995; Cornet *et al.*, 2002; Halewyn *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2004; Blumenthal, 2004).

La contamination fongique est donc un problème majeur et récurrent qui ne touche pas seulement les habitations mais également les établissements patrimoniaux et les œuvres d'art (Roquebert et Oriol, 2002; Oriol et Bousta, 2005) avec une variété très large d'espèces fongiques incriminées selon les pays, sujet largement traité dans la littérature scientifique.

A *contrario*, il existe peu d'études relatives aux associations microbiennes. L'étude d'Andersson, en 1997, est ainsi la première consacrée à la mise en évidence d'espèces bactériennes et fongiques présentes sur divers matériaux de construction dans une crèche. Une grande diversité d'espèces bactériennes a ainsi été identifiée sur des panneaux de plâtre avec une prédominance des bactéries mésophiles et de *Mycobacterium komossense* (Anderson *et al.*, 1997).

D'autres études portent sur la recherche de microorganismes spécifiques. Ainsi, *Streptomyces* spp., *Actinomyces* spp. ou *Mycobacterium* spp. ont été retrouvés en association avec la flore fongique (Stranger-Johannessen, 1991; Anderson *et al.*, 1997; Rintala *et al.*, 2002; Torvinen *et al.*, 2006). Récemment, la présence et la survie de protozoaires (amibes et diverses ciliées...) ont également été montrées sur des matériaux contaminés dans les environnements intérieurs (Yli-Pirila *et al.*, 2004a; 2009a).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est :

- d'étudier et de comprendre la dynamique de colonisation microbienne des supports
- de proposer, à la lumière des résultats obtenus, une stratégie destinée à protéger les matériaux de la prolifération fongique avec la mise en œuvre d'un traitement adapté à la problématique des matériaux de construction et de décoration isolés dans des logements et/ou des sites patrimoniaux.

Ce rapport consistera en un état de l'art sur les mécanismes de colonisation et de dégradation des médias par les moisissures, la nature des matériaux vulnérables vis à vis des microorganismes dans les logements et sites patrimoniaux et ainsi que les modes d'action des traitements antifongiques. Un focus sera enfin fait sur les huiles essentielles.

Le dispositif expérimental utilisé et les différentes techniques d'analyse employées seront ensuite décrits. En effet, à travers la littérature, les analyses réalisées pour rendre compte de la diversité microbienne présente sur les produits de constructions, dans l'air ou dans les poussières, utilisent des techniques moléculaires (PCR, PCR-DGGE, qPCR, séquençage), des techniques culturales et des techniques d'observation directes. Les techniques par culture ne permettant de détecter que 0,1 à 1 % des espèces présentes, les techniques moléculaires ont donc leur place, puisqu'elles permettent de rendre compte des microflores non cultivables. L'ensemble de ces techniques d'analyse apporteront des informations complémentaires quant à la diversité des microflores présentes. Il paraît indispensable de les utiliser en parallèle, de

manière complémentaire, pour décrire objectivement les écosystèmes microbiens des environnements intérieurs.

Les résultats concernant la dynamique de colonisation des supports seront ensuite présentés et une étude de l'effet de trois traitements préventifs sur la croissance microbienne sera ensuite proposée.

4 Etat de l'art

4.1 COLONISATION DES SUPPORTS PAR LES MOISSISSURES

Elle consiste en trois étapes successives :

- L'adhésion qui résulte de forces de diverses natures telles que forces de van der Waals, ou électrostatiques,
- le développement fongique qui se traduit par la colonisation proprement dite du support et sa biodétérioration,
- la dissémination durant laquelle les spores ou conidies produites par les structures conidiogènes du microorganisme sont dispersées et peuvent infester d'autres supports de leur environnement

4.1.1 PHASES DU DEVELOPPEMENT FONGIQUE

Trois phases interviennent lors du développement des moisissures : la germination, la croissance et la sporulation. En 2001, Oshero et May étudient et décrivent les différentes phases du cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Figure 1) (Oshero et May, 2001). Les conidies sont produites par une structure spécialisée, le conidiophore. Après dispersion et contact avec un milieu adéquat, les conidies germent et donnent naissance à un hyphe.

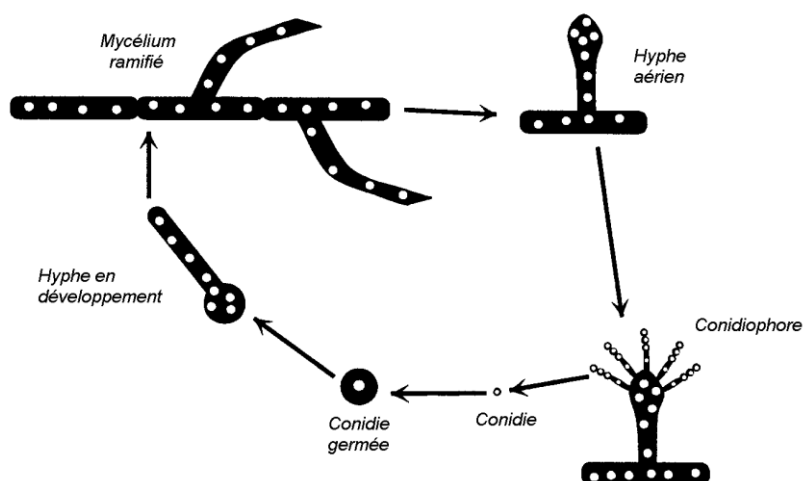


Figure 1: Cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Oshero et May, 2001)

La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification de cet hyphe dont l'accroissement s'effectue par le sommet (apex). Les parties terminales constituent les zones actives où se produit l'essentiel des activités de synthèse et de dégradation nécessaires à la croissance et à la reproduction. Ces zones sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèse de la matière cellulaire (Lemaitre C., 1998).

4.1.2 FACTEURS D'INFLUENCE

La colonisation et le degré de biodétérioration qui en résulte éventuellement dépendent de divers facteurs liés au support (nature, propriétés physico-chimique, état de surface, teneur en eau, pH), au microorganisme et aux conditions environnementales (humidité relative, température). La présence de nutriments, une quantité d'eau suffisante et une température

appropriée [température optimale de croissance généralement comprise entre 22 et 35°C pour les espèces fongiques des environnements intérieurs (Ayerst, 1966; Panasenko, 1967)] constituent les principaux paramètres de germination et de développement des spores fongiques.

Besoins nutritionnels

Microorganismes généralement aérobies, les moisissures sont susceptibles de se développer partout où de la matière organique est disponible. Les micromycètes sont capables de sécréter un fluide exocellulaire contenant des enzymes hydrolytiques qui décomposent les substrats (polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lignine, lipides...) en monomères facilement assimilables par le microorganisme (Griffin, 1994).

Les besoins nutritionnels requis sont divisés en deux catégories :

- les nutriments constitutifs, parmi lesquels figurent le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore, le potassium, l'azote, le soufre et le magnésium, sont nécessaires à des concentrations d'environ 10^{-3} mol/l. Le carbone, combiné à l'hydrogène, l'oxygène et l'azote, est l'élément structural majeur de l'organisme (Griffin, 1994). L'hydrogène provient de l'eau contenue dans le support, l'oxygène est puisé dans l'ambiance (Janinska, 2000).
- les oligonutriments, parmi lesquels figurent le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène sont nécessaires à des concentrations de 10^{-6} mol/l au maximum (10^{-6} mol/l pour le fer à 10^{-9} mol/l pour le molybdène) dont certains sont des cofacteurs essentiels au bon fonctionnement enzymatique de la cellule.

Des vitamines, telles que la thiamine (B1), la biotine (B7), l'inositol ($C_{16}H_{12}O_6$) (Griffin, 1994), sont également requises par ces microorganismes.

Les substrats de l'environnement contiennent rarement les différents nutriments dans les proportions idéales : l'azote directement assimilable est souvent le facteur limitant du développement fongique. Les composés carbonés, généralement présents en excès, sont stockés dans les cellules fongiques sous forme de glycogène, polyols et polysaccharides. Par la suite, ces réserves pourront être utilisées comme source d'énergie. Le tarissement de l'un des nutriments stoppera sa croissance, ce phénomène affectant tout ou partie du mycélium selon le nutriment épuisé, et conduisant généralement à la sporulation des microorganismes.

Besoins en eau

Les moisissures, comme tous les organismes ont besoin d'eau comme solvant en concentrations élevées. Les substrats et les enzymes sont tous en solution ou en suspension colloïdale, et aucune activité enzymatique n'existe en absence d'eau. Le mouvement de l'eau, au travers des parois semi perméables des cellules et des hyphes, se fait par osmose. Parmi les différents termes utilisés pour décrire les forces impliquées dans ce phénomène figurent l'activité de l'eau (a_w) qui est généralement assimilée à l'humidité relative, exprimée en pourcentage, lorsque l'équilibre entre le substrat et l'air adjacent est atteint.

La quantité d'eau disponible pour le microorganisme influence chaque phase du développement fongique.

Les limites théoriques du développement fongique correspondent, pour la valeur supérieure à une a_w égale à 1 et pour la valeur inférieure à une a_w égale à 0,55, où l'ADN est probablement dénaturé (distorsion de la structure hélicoïdale de la molécule). Toutefois à ce jour, aucun développement fongique n'a été constaté pour des valeurs d' a_w inférieures à 0,62

(germination d'*Eurotium echinulatum*) (Scott, 1957). Les spores fongiques pourront néanmoins rester viables sous ces valeurs sur de longues périodes (ACGIH, 1999).

La nature de la flore fongique varie selon la teneur en eau du support et donc de son hygroscopie. Une humidité croissante du substrat entraîne l'apparition successive de genres fongiques dits de première (*Aspergillus*, *Penicillium*), deuxième (*Cladosporium*, *Ulocladium*) et de troisième colonisation (*Stachybotrys*) (Grant *et al.*, 1989).

4.2 MECANISMES DE BIODÉTERIORATION DES MATÉRIAUX

La détérioration d'un matériau par les moisissures résulte de deux modes d'action :

- Action physique qui est liée au développement des hyphes au niveau des « faiblesses » du support telles que les fissures, les micros capillarités naturelles des matériaux, induisant la rupture de leur structure.
- Action chimique qui est imputable à la production de divers métabolites qui agissent par assimilation ou dissimilation.
L'assimilation implique l'action des enzymes produites par le microorganisme pour dégrader les matériaux organiques complexes en des composés plus simples et assimilables (Jerzy Karys, 2007).
La dissimilation, quant à elle, résulte de la modification du support par les divers métabolites acides sécrétés lors de la croissance fongique.

Toute substance nutritive doit pénétrer dans la cellule en traversant les parois et les éventuelles enveloppes qui en assurent la protection vis-à-vis de l'extérieur.

Or, si les petites molécules pénètrent soit par perméabilité, soit par l'intermédiaire de transporteurs dans la cellule, les molécules de poids moléculaire élevés doivent subir des transformations afin de réduire leur taille. Pour ce faire, les moisissures devront posséder un arsenal d'enzymes extracellulaires (ou exo-enzymes) capables de casser les fonctions chimiques du polymère. Les moisissures sécrètent souvent naturellement des exo-enzymes, (protéases, estérases...) qui sont capables d'agir sur un type donné de liaison chimique sans grande spécificité ce qui leur permet de catalyser la rupture d'une large gamme de polymères. Parmi les matériaux couramment retrouvés dans les environnements intérieurs, on distingue les matériaux organiques tels que les produits à base de bois, dégradés par assimilation, et les inorganiques (béton, acier, plâtre,...), dégradés par dissimilation des métabolites fongiques. Nous présentons ainsi les principaux mécanismes de dégradation mis en jeu par les moisissures selon la nature du support en se concentrant sur la cellulose, dont les mécanismes sont largement renseignés en raison de leur intérêt industriel.

4.2.1 DÉGRADATION DE LA CELLULOSE

Constituant majeur du bois, la cellulose entre dans la composition de tous les matériaux à base de bois (carton, papier peint, placoplâtre, tapis, cartons ondulés...). Elle est également utilisée comme isolant thermique sous forme de ouate de cellulose.

La cellulose est composée de monomères de glucose liés par des liaisons bêta 1-4, conduisant à des polymères linéaires. Ces polymères s'associent par des liaisons intermoléculaires de type liaison hydrogène, conférant une structure fibrillaire à la cellulose. L'agencement plus ou moins ordonné des fibres ainsi formées se traduit par des régions à cristallinité variable :

- régions cristallines aux molécules hautement ordonnées
- régions amorphes aux molécules non ordonnées

La dégradation de la cellulose par les moisissures cellulolytiques, telles qu'*Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, est assurée par des enzymes extracellulaires : les cellulases. Celles-ci sont constituées de trois types d'enzymes aux activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Coutinho R. M. et & Henrissat, 1999) :

- l'**endoglucanases (EG)** ou **1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase** (EC 3.2.1.4) qui coupe la cellulose aléatoirement au niveau de ses zones amorphes générant de nouvelles extrémités de chaînes,
- la **cellobiohydrolase (CBH)**, ou **exoglucanase**, qui agit de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose. Cette enzyme coupe par récurrence et libère du cellobiose soit à partir de l'extrémité réductrice (Cellobiohydrolase II) soit à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne (Cellobiohydrolase I). Elle est capable de dégrader les deux formes de cellulose : cristalline et amorphe.
- La **β-glucosidase (BGL)** ou **β-glucoside glucohydrolase** (EC 3.2.1.21) qui hydrolyse le cellobiose en glucose. D'après Clarke, chez *Trichoderma reesei* la BGL est présente sous deux formes aux rôles distincts. La première, extracellulaire, catalyse la dégradation de la cellobiose en deux molécules de glucose; la seconde, associée à la membrane, catalyse la réaction de transglycosylation qui sera détaillée par la suite (Clarke, 1996).

La Figure 2 présente le mode d'action des cellulases selon leur nature.

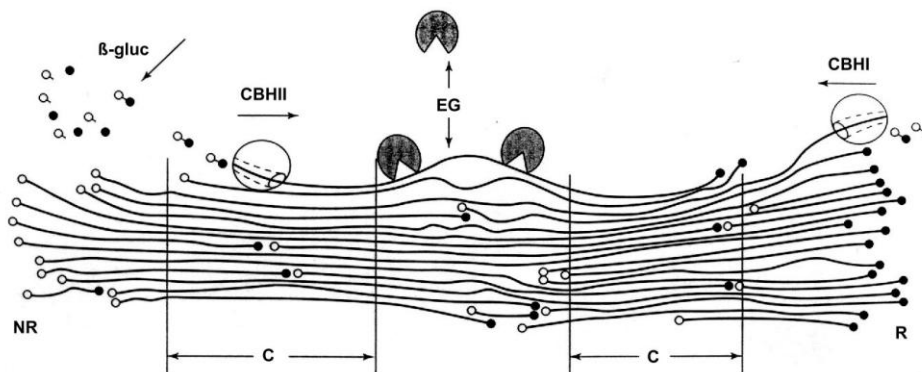


Figure 2: Mode d'action des différentes cellulases (Kleywegt *et al.*, 1997)

D'un point de vue génétique, les gènes codants pour les cellulases sont répartis aléatoirement dans le génome, chaque gène possédant ses propres éléments de régulation. Les promoteurs des gènes *cbh1*, *cbh2*, *eg1* et *eg2*, qui codent pour les enzymes CBHI, CBH2, EGI, EGII ont, par contre, des sites de fixation à des protéines régulatrices identiques, activées par des mécanismes d'induction (Ballerini, 2006).

Ainsi chez *Trichoderma reesei*, l'auteur a mis en évidence la présence constitutive de cellulases dans la paroi conidiale (Kleywegt *et al.*, 1997).

En présence de cellulose dans le milieu, celle-ci va être initialement hydrolysée par les cellulases membranaires libérant les produits de dégradation (cellodextrine et cellobiose). Ces derniers vont induire la synthèse de facteurs de transcription (ACEI et ACEII) qui se lie à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes de cellulases conduisant à leur transcription.

En absence de cellulose, les gènes *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, et *egl5* sont réprimés au niveau transcriptionnel par la protéine CreA, produite constitutivement.

4.2.2 DEGRADATION DE LA LIGNINE

Constituant du bois, la lignine est caractérisée par son nombre élevé de noyaux aromatiques et la présence d'éther, impliqué dans les liaisons de polymérisation, qui lui confèrent une grande résistance à la biodégradation notamment vis à vis de l'hydrolyse alcaline.

Les champignons produisent plusieurs types d'enzymes oxydatives dont les laccases et les peroxydases (Marcheix *et al.*, 2005).

Les laccases utilisent directement l'oxygène moléculaire,

Les peroxydases, quant à eux, utilisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , présent éventuellement dans le milieu.

Les peroxydases appartiennent à deux groupes :

- peroxydases Mn-dépendantes
- lignine peroxydases (généralement Fe-dépendantes).

Les ions Fe et Mn servent de récepteur d'électrons. Les réactions de dégradation (Figure 3) conduisent à une dépolymérisation au moins partielle de la lignine et consistent, dans un premier temps, à une oxydation des noyaux aromatiques les plus accessibles.

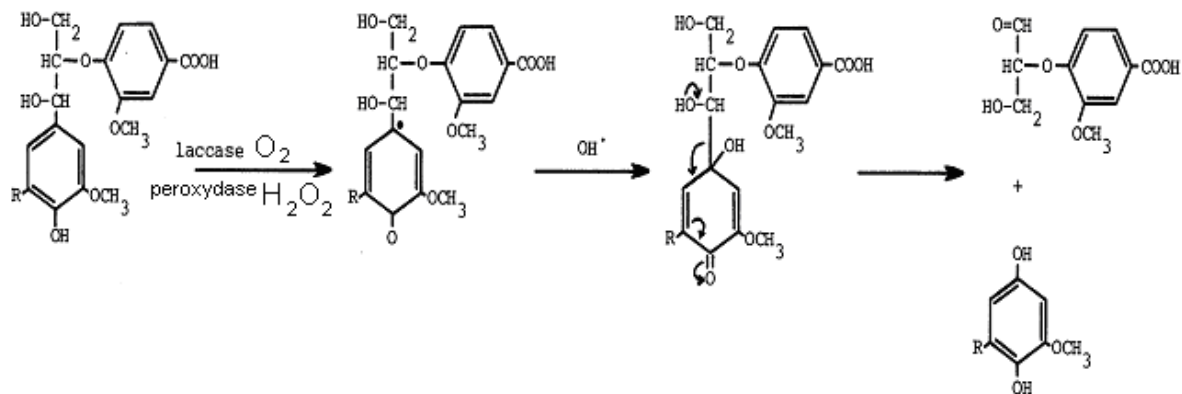


Figure 3: Schéma d'oxydation de la lignine (Palmer 1983).

Ces mécanismes d'oxydation sont également mis en jeu par les moisissures dans la biodétérioration de la plupart des polymères synthétiques retrouvés dans les environnements intérieurs (le nylon, le polystyrène, le polyuréthane, alcool polyvinylique, peinture, isolation thermique et acoustique, revêtements de sols...)

4.2.3 DEGRADATION DES MATERIAUX INORGANIQUES :

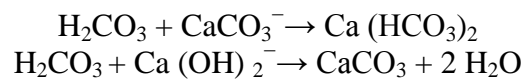
Dans les bâtiments, les matériaux de structure sont essentiellement de nature inorganique (béton, acier, plâtre,...) sur lesquels les exoenzymes fongiques n'ont aucun effet et qui, bien que ne constituant pas une source de carbone pour les microorganismes, sont dégradés par dissimilation des métabolites fongiques.

La sécrétion des acides et des substances chélatantes par les moisissures cause une dégradation extensive, en solubilisant les minéraux comme le mica et le feldspath.

Les principaux acteurs de cette dégradation sont :

- **les acides organiques**, dont la production peut être exacerbée en présence d'un excès ou d'un déficit de l'un des nutriments essentiels, peuvent réagir avec les matériaux soit par action des protons soit par chélation des ions métalliques (Sand et Wolfgang, 1997).

- **les acides inorganiques** dont le seul issu de la croissance fongique résulte de la combinaison entre CO₂ et H₂O accumulés dans les micropores des matériaux pour former l'acide carbonique (H₂CO₃)
Cet acide est le principal responsable de la dégradation des constituants des bétons, céramique, mortier par sa réaction avec le carbonate de calcium, les hydrates aluminocalciques, silicate de calcium et hydroxyde de calcium selon les réactions suivantes :



- **les sels** : Les anions, parmi les produits finaux du métabolisme, réagissent avec les composés cationiques pour former des sels dont l'hydratation conduit à la fragilité des supports (Sand et Wolfgang, 1997).
- **les agents chélateurs** dont les molécules peuvent former plusieurs liaisons avec un seul ion métallique, induisent, de fait, l'élimination de ces ions. Ainsi, l'élimination de cations polarisants conduit à une augmentation de la solubilité du matériau et à la dissolution de tous ses composés minéraux même ceux reconnus comme *a priori* « insolubles » (Sand et Wolfgang, 1997)

4.3 NATURE DES MATERIAUX VULNERABLES VIS A VIS DES MICROMYCETES DANS LES LOGEMENTS ET SITES PATRIMONIAUX

4.3.1 CONTAMINATIONS DES LOGEMENTS

Dans l'air des environnements intérieurs, les espèces fongiques les plus couramment isolées appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, et *Cladosporium* (Hunter *et al.*, 1988; Pasanen *et al.*, 1992).

Les moisissures sont capables de coloniser la plupart des matériaux dès l'instant où le microorganisme dispose d'une quantité d'eau suffisante (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces fongiques isolées de divers matériaux (Botton *et al.*, 1985; Beguin et Nolard, 1994; SAMSON *et al.*, 1994; Samson et Hoekstra, 1994; Beguin, 1995)

Matériaux colonisés		Espèces fongiques isolées
MURS ET REVÊTEMENTS MURAUX	Murs	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Eurotium herboriorum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium glabrum</i>
	Peintures	<i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i>
	Papier peint	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> ,
	Bois	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	Colle	<i>Aspergillus versicolor</i>
	Caoutchouc des cadres de fenêtre	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
PRODUITS DE DÉCORATION	Textiles	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. sphaerospermum</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Eurotium herboriorum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Wallemia sebi</i> ,
	Tapis	<i>Emericella nidulans</i> , <i>Eurotium herboriorum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
	Cuir	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. penicillioides</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>
	Archives	<i>Eurotium herboriorum</i>
	Matériaux cellulosiques	<i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
	Caoutchouc vulcanisé	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i>
	Produits céramiques	<i>Aspergillus versicolor</i>
	Papier	<i>Penicillium glabrum</i> , <i>Wallemia sebi</i>
	Plastiques	<i>Penicillium glabrum</i>
	Polyuréthane, tapisserie renfermant de l'arsenic	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>
SYSTEMES DE TRAITEMENT D'AIR	Filtres et conduits	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Réservoir d'eau, humidificateur	<i>Exophiala jeanselmei</i>

En 2002, Hyvärinen définit et quantifie les genres fongiques isolés au sein de 1140 échantillons de matériaux de construction récupérés *in situ*. L'auteur répartit ces matériaux dans 8 catégories : papier, produits céramiques, matériaux d'isolation d'origine minérale, peintures, colle, plastiques, bois, et panneaux de construction en gypse (Hyvärinen *et al.*, 2002).

Parmi les genres observés au sein de ces produits, *Penicillium* est le genre le plus fréquemment isolé. Papiers et isolants minéraux apparaissent favorables à la croissance de *Cladosporium* tandis que *Stachybotrys* est observé le plus souvent dans les panneaux en gypse. *Aspergillus* et *Acremonium* ne semblent, quant à eux, pas spécifiques d'un substrat et sont identifiés sur des produits en céramique, peinture, colle ou encore produits à base de bois.

Les mécanismes mis en œuvre dans la détérioration des supports sont de deux types :

- Action physique liée au développement des hyphes dans le matériau conduisant à la rupture de sa structure.
- Action chimique imputable à la production de divers métabolites qui agissent par assimilation ou dissimulation.

Lors des processus d'assimilation, les constituants du matériau sont utilisés comme nutriments après avoir été réduits par diverses enzymes extracellulaires qui facilitent la pénétration des hyphes dans le matériau.

Les processus de dissimilation sont liés à la production d'acides organiques et de pigments. Les acides organiques sont capables de réagir avec le substrat par dissolution des cations ou par chélation des ions métalliques présents dans les peintures, par exemple. Cette dernière réaction peut conduire à la formation de sels. Ainsi, l'acide oxalique réagissant avec le calcium donne naissance à des oxalates de calcium.

Le dioxyde de carbone produit par tous les organismes aérobies et notamment les moisissures lors de la respiration jouent également un rôle dans la dégradation des supports. En effet, à partir d'un certain taux d'humidité, ce gaz peut se transformer en acide carbonique, capable de dissoudre le calcium et le magnésium pour former des bicarbonates de calcium et de magnésium hydrosolubles.

Outre l'action directe de ces acides, leur production favorise la croissance d'espèces fongiques acidophiles qui pourront poursuivre la dégradation du support (Singh, 1994; Garg *et al.*, 1995; Sand, 1997).

D'après une étude réalisée sur les poussières, la diversité fongique de part le monde est significativement plus élevée en zone tempérée qu'en zone tropicale (Amend, 2010). L'amplification des ITS et de la LSU de l'ADNr indique que les espèces fongiques majoritaires appartiennent à la classe des *dothideomycetes* comme le montre également les études réalisées à l'aide de méthode par culture. Le séquençage permet de détecter la présence d'une grande diversité d'espèces fongiques non détectées au préalable. Cependant, les genres cosmopolites appartenant aux classes des *dothideomycetes* (*Alternaria*, *Cladosporium*), *Eurotiomycetes* (*Aspergillus*, *Penicillium*), *Sordariomycetes* (*Fusarium*, *Stachybotrys*) et *Zygomycota* (*Mucorales*) sont comme en culture, les espèces les plus représentées.

Une autre étude, réalisée en Finlande, dans deux maisons de retraite dont une ayant subi un dégât des eaux, indique une différence majeure selon les techniques de détection utilisées. En effet, l'amplification des ITS suivi du séquençage, ne permet pas de mettre en évidence la présence des genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans la poussière (Pitkäranta *et al.*, 2008). Ces mêmes analyses ont également montrées la présence de nombreux *Basidiomycetes*, parmi les clones. D'autre part, 55% de la diversité fongique présente est constituée de séquences ITS non identifiées, dont certaines d'entre elles appartiennent probablement à de nouvelles espèces. Le séquençage, la qPCR et la culture semblent être des méthodes complémentaires, générant une image la plus réaliste de la flore fongique en présence dans les poussières (Pitkäranta *et al.* 2008).

Une étude sur des poussières présentes dans des bâtiments ayant subi un dégât des eaux, toujours en Finlande, a mis en évidence que la flore fongique était représentée par 52% d'*Ascomycètes* appartenant aux classes des *dothideomycetes*, *eurotiomycetes* et *leotiomycetes*, 44% de *Basidiomycetes* (principalement des *agaricomycetes*) mais également de séquences affiliées aux espèces yeast-like et lichen forming (Pitkäranta *et al.*, 2011).

L'équipe d'Andersen *et al.* (2011) a travaillé sur plus de 5300 produits de construction (plâtre, béton, bois, papier peint, plaque de plâtre, fibre de verre, laine minérale, contre-plaqué, brique, carton et linoléum) ayant subi un dégât des eaux ou un problème d'humidité, et sur lesquels une croissance fongique était visible. L'identification des espèces fongiques a été réalisée après culture. Les souches appartenant au genre *Penicillium* (majoritairement *P. chrysogenum*, puis *P. brevicompactum* et *P. corylophylum*) et l'espèce *Aspergillus versicolor* étaient les plus isolées. D'autre part, les espèces appartenant aux genres *Chaetomium*,

Acremonium, *Ulocladium* et *Cladosporium* étaient également fréquemment rencontrées sur les matériaux ayant subi un dégât des eaux. Les analyses ACP ont mis en évidence des associations entre les espèces fongiques et les produits de construction. Ainsi, les espèces *Acremonium spp*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys spp* et *Ulocladium spp*, sont associées aux produits tels que le plâtre et le papier peint. *Arthrinium phaeospermum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma spp* et les levures sont plutôt retrouvées sur différents types de bois et le contre-plaqué. *Aspergillus spp*, *Chaetomium spp* et *Mucor spp* sont souvent isolés sur les sols ou sur le ciment (Andersen *et al.*, 2011).

4.3.2 CONTAMINATIONS DES SITES PATRIMONIAUX

Les biens culturels, tout comme les environnements intérieurs, sont soumis à de nombreux facteurs d'altération, parmi lesquels la biodétérioration qui occupe une place non négligeable.

Les œuvres d'art, telles que les peintures ou fresques sont composées d'un matériau support (cellulose papier, toile, bois, soie tissée...) mais également de colle, glues, émulsifiants ou épaississants qui sont autant de composés biodégradables par les micro-organismes (Ciferri 1999). La croissance des microflore et les produits de leur métabolisme peuvent causer sur les œuvres des dommages esthétiques, tel que la pigmentation. Les cyanobactéries et les algues sont capables de prospérer sur des fresques et les façades des bâtiments exposés à la lumière. Sur les fresques murales, les primo-colonisateurs sont des bactéries nitrifiantes et des bactéries appartenant au cycle du soufre, elles jouent un rôle important dans la détérioration des pierres et des maçonneries (*Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*). Les genres suivant sont toujours représentés : *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*. La flore fongique est principalement constituée d'espèces appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium* et *Alternaria*. *Cladosporium sphaerospermum* étant l'agent principal de la dégradation des fresques. Les espèces *Aureobasidium* et *Pseudomonas* sont simultanément présentes lors de dégradation des peintures sur bois. Sur les reproductions de peintures on note la présence fréquente de *Bacillus Pumilus* et *Penicillium chrysogenum*. La succession des espèces colonisatrices sur les œuvres dépend de la nature chimique du substrat (Ciferri, 1999).

Ce type de dégradation correspond à toutes les modifications physiques ou chimiques que peut subir un matériau sous l'action d'organismes vivants tels que les bactéries, champignons, algues, lichens. Face à des développements biologiques, les responsables des collections ou des monuments ne savent pas toujours quelle attitude adopter.

Le développement des microorganismes dépend de nombreux facteurs parmi lesquels l'eau est certainement le plus important à considérer. En effet, un apport d'eau accidentel, comme une inondation ou une fuite, peut être à l'origine de l'apparition d'une multitude de ces petits filaments, duvets et autres organismes qui viennent fleurir sur les œuvres d'art sensibles telles que le bois, les livres, les textiles, les objets en cuir (Oriol et Bousta, 2005).

Les microorganismes sont capables de se développer sur un support, en association ou en concurrence avec de nombreux autres organismes (Durrieu, 1993).

L'origine de ces microorganismes peut être exogène, une partie provenant des sols, de l'eau et de l'air extérieur ou encore endogène, notamment en ce qui concerne les bactéries, d'origine humaine, animale ou végétale et les champignons comme *Aspergillus sp.* ou *Penicillium sp.*, isolés fréquemment dans des prélèvements d'air et de surface réalisés en environnements intérieur et qui peuvent se développer sur les matériaux de construction ou les revêtements (Parat et Perdrix, 2002).

Quel que soit le matériau inerte ou vivant, sa colonisation par les microorganismes constitue un phénomène contre lequel l'Homme n'a cessé de lutter. De fait, depuis l'usage dans l'Égypte ancienne du thymol pour embaumer les corps jusqu'aux substances biocides répertoriées dans les Annexes I et IA de la directive 98/8/CE, les techniques et molécules visant à améliorer la résistance des produits et organismes face à la prolifération bactérienne et fongique se sont multipliées.

Compte tenu de la problématique de la présente étude qui vise les environnements intérieurs pour lesquels les microorganismes les plus redoutés en termes de dégradation des supports et d'impact sanitaire sont les mycètes, la suite du document se focalisera sur les traitements antifongiques. Seront ainsi présentées quelques substances utilisées pour la préservation du bois et du papier largement documentées, leur mode d'action. Un focus sera ensuite fait sur l'usage des huiles essentielles et le mode d'action de ces substances qui connaissent depuis quelques années un regain d'intérêt.

4.4 TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES :

Les substances antifongiques ont deux origines principales

- produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes,
- produits chimiques de synthèse.

Ces substances sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux : en thérapie humaine et vétérinaire, dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des matériaux.

Concernant ce dernier domaine, la plupart des traitements développés jusqu'à présent sont des traitements pour les matériaux à base de bois, qu'il s'agisse du bois d'œuvre ou du papier, du fait de leur grande vulnérabilité vis-à-vis des mycètes et de l'importance économique de ces matériaux.

Ces produits sont généralement traités par des méthodes physiques ou chimiques avec notamment le recours à des substances biocides. La suite du document se focalisera sur les traitements du bois et sur la préservation du papier. Un focus sur les pistes les plus prometteuses au regard de notre problématique sera également fait.

4.4.1 TRAITEMENTS PHYSIQUES

Ils consistent en des méthodes qui ne requièrent l'application d'aucun composé chimique. Ils ne laissent aucun résidu, ce qui peut constituer un avantage. Cependant, cette caractéristique induit également que leur efficacité est temporaire.

Bois

Il consiste à exposer le bois à une température de 180°C à 280°C. Si les effets de ce traitement sont similaires à ceux obtenus par le traitement chimique décrit ci-dessus. Cependant, cette méthode n'est pas pérenne, en effet, en conditions normales d'utilisation le bois ainsi traité se révèle aussi vulnérable vis-à-vis des champignons qu'un bois non traité (Hakko et al, 2006).

Papiers

Parmi les méthodes physiques traditionnellement utilisées pour traiter ce type de supports figurent la déshydratation, l'irradiation par rayonnement gamma, l'application d'un courant haute fréquence, l'usage d'environnements pauvres en oxygène, les radiations UV, ou encore les températures extrêmes (Sequeira *et al.*, 2012).

4.4.2 TRAITEMENTS CHIMIQUES

Bois

La modification chimique a pour but de changer partiellement la structure chimique du bois afin d'en modifier les propriétés.

Cette modification se fait par la fixation de motifs chimiques essentiellement par des réactions avec les groupes hydroxyles du bois telles qu'estérification, acétylation, alkylation. Ces réactions se traduisent par la formation de liaisons covalentes stables qui renforcent le caractère hydrophobe du support et limitent la reconnaissance enzymatique (Rowell, 2005).

Cependant ce type de modifications s'accompagne quelquefois d'effets indésirables comme l'altération des propriétés mécaniques du matériau.

L'incorporation de composés chimiques doués de propriétés fongicides constitue une autre voie de traitement chimique.

Le mécanisme de toxicité de ces produits de préservation sur les champignons est très varié.

Il inclut, entre autres, l'inhibition de la synthèse ou la dénaturation des protéines de ces microorganismes, la destruction de leurs membranes augmentant la perméabilité et la pénétration de composés toxiques (Ibach *et al*, 2005).

Plusieurs types de biocides ont été utilisés pour traiter et préserver le bois.

Parmi ces produits chimiques on distingue : les produits organiques, les sels métalliques, les goudrons, les huiles ...

L'efficacité des biocides en général a été associée à de sérieux problèmes dus à leur toxicité (Tableau 2) et à leur persistance dans l'environnement.

Tableau 2 : Produits utilisés dans les traitements du bois et leur toxicité (INRS, 2006)

Nom du produit	Type d'efficacité	Toxicité
Oxyde de tributiline (TBTO)	Fongicide	Effets tératogènes et immunotoxiques
Les CCA : cuivre, chrome, arsenic	Cu : fongicide, Cr : fixateur qui protège, les produits des UV, As : fongicide et insecticide. Association de composés résistante au lessivage	Toxique : Cancérigène (As, Cr)
Les CCB : cuivre, chrome, bore	Fongicide	Toxique : Cancérigène (Cr) mais moins toxique que les CCA
Les sels d'ammonium quaternaire, ACQ (combinaison de cuivre, d'ammonium quaternaire et d'azole de cuivre AC	Fongicide	Toxicité faible
Les créosotes	Préventif contre les champignons	Très toxique et cancérigène
Le pentachlorophénol (PCP)	Préventif contre les champignons	Très toxique
Azoles (tébuconazole, Azaconazole, etc...)	Fongicides	Non toxique

Dans ce contexte, le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne ont établi un cadre réglementaire au travers de la directive 98/8/CE du 16 février 1998, plus communément connue sous le nom de directive Biocides. Entrée en vigueur en 2004, elle fait actuellement l'objet d'une révision. Par ailleurs, au-delà de la seule nature du biocide utilisé, le choix du procédé d'application avec les applications en surface par pulvérisation ou trempage court ou encore l'imprégnation dans la masse à l'aide d'autoclaves est également soumis aux normes en vigueur. A noter que le choix d'un biocide est orienté par la classe d'emploi du produit à traiter définie par la norme EN335-2 (2007).

En alternative des biocides de première et deuxième génération, sont apparues de nouvelles techniques plus respectueuses de l'environnement telles :

- les biocides de troisième génération sans métaux et utilisant des quantités limitées de biocides organiques,
- l'acétylation qui consiste en la réaction de l'anhydride acétique sur les constituants du bois
- le traitement du bois par les anhydres mixtes acétiques/aliphatiques lors d'une réaction d'hydrophobation
- la furfurylation basée sur l'utilisation de l'alcool furfurylique qui se greffe aux unités guaiacyles des lignines, modification chimique de la paroi cellulaire qui empêche la reconnaissance du substrat par les enzymes fongiques
- les silanes, les silicones et les silicates inorganiques
- les résines notamment celles dérivées des N-méthylols
- l'oléothermie qui est un procédé d'imprégnation avec des formulations à base d'huiles végétales (lin, arachide...) développé par la société Oléobois.

Ces techniques sont décrites par Pignolet en 2008 (<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001191/01/pignolet.pdf>).

Il existe d'autres traitements du bois comme les composés à base de borate, incluant les formulations préparées à partir de tétraborate de sodium, de pentaborate de sodium, d'acide borique ou encore de disodium octaborate tétrahydrate (DOT). Ces substances, du fait de leur solubilité dans l'eau qui facilite leur diffusion dans le bois, n'offre, cependant, de par leur caractère lessivable, qu'une protection de courte durée.

Papier

La majorité des substances biocides peuvent être caractérisées par leurs mécanismes d'action. Ainsi sont distinguées les substances actives vis-à-vis de la membrane cellulaire telles les alcools (éthanol, isopropanol et butanol étant les plus utilisés), les phénols, les acides, les salicylanilides ou encore les sels d'ammonium quaternaires, et celles actives du fait de leur électrophilie telles les aldéhydes ou les composés organométalliques ((Sequeira *et al.*, 2012)). Le Tableau 3, synthétise les principales caractéristiques des substances aux propriétés antifongiques utilisées pour préserver les papiers.

Concernant les traitements destinés à la conservation des matériaux de **nature autre que le bois ou ses dérivés**, les études sont plus rares. Elles concernent par exemple la détermination des performances de différents agents biocides vis-à-vis de divers microorganismes sur du phosphogypse (Shirakawa *et al.*, 2002; Do *et al.*, 2005; Urzì et Leo, 2007), des filtres à air fibreux (Foarde *et al.*, 2000), des mortiers (Do *et al.*, 2005; Urzì et Leo, 2007) ou encore les propriétés antimicrobiennes qui peuvent être conférées aux polymères synthétiques (Muñoz-Bonilla et Fernández-García, 2012)

Tableau 3 : (adapté de (Sequeira *et al.*, 2012)) : Principaux agents antifongiques utilisés pour le papier

Composé	Avantages	Inconvénients	Effets sur le papier	Année de première utilisation	Restrictions	Dose létale 50 pour les rats par ingestion (mg/kg)
Ethanol (Alcool le plus utilisé)	S'évapore sans laisser de résidus toxiques	Peut agir comme activateur des conidies Fongistatique mais non fongicide	Perte du brillant, augmentation de l'opacité et légère déformation (notamment sur les papiers transparents) Possibilité de dissoudre les colles et joints	1880	UE : Usage restreint USA : ND	10 470
AGENTS ALKYLANTS						
Oxyde d'éthylène	Efficacité antimicrobienne importante Grand pouvoir de pénétration Peut être utilisé pour les traitements dans la masse	Augmente la sensibilité des objets aux attaques microbiennes postérieures Classé comme carcinogène pour l'Homme	Réduction des propriétés mécaniques et du degré de polymérisation Oxydation Jaunissement	1928 1933 pour les matériaux du patrimoine	UE : Usage restreint USA : Usage restreint	330
Formaldéhyde	Possède également un effet sporicide Peut être utilisé pour traitements dans la masse	Polymérisé à faible humidité relative précipitant sur les matériaux Faible pouvoir de pénétration Carcinogène Irritant pour les muqueuses et la peau	Réticulation de la cellulose Perte de flexibilité Provoque la corrosion de l'encre ferro-gallique	1889	UE : Usage restreint USA : Usage restreint	460
AZOLES : exemple Thiabendazole	Utilisable pour désinfection aérienne	Fongistatique plus que fongicide	Thiabendazole : légère altération de la brillance	1944	Restrictions différentes selon chaque composé	Valeurs différentes selon le composé par exemple > 2000 pour Thiabendazole
HUILES ESSENTIELLES exemple le Linalool	Faible toxicité	Fongistatique plus que fongicide Peut attirer les insectes Concernant le Linalool : production	Réduction du pH Possibilité de causer une oxydation du fait des hydroperoxydes formés	ND	Restrictions différentes selon chaque huile essentielle	Valeurs différentes selon le composé par exemple 2790 pour le Linalool

		d'hydroperoxydes lors de son autoxydation				
DERIVES DU PHENOL						
Dichlorophène	Peut être utilisé en solution alcaline Très efficace contre les champignons	Irritant pour la peau et les yeux	Augmentation de la vitesse de détérioration Altération de la blancheur Effets nocifs sur les encres	1929	UE : Usage restreint USA : ND	1250
2- phénylphénol	Large spectre d'action Efficace à faible concentration Peut être utilisé à des pH basiques Peut être utilisé pour traitements dans la masse	Fongistatique mains non fongicide Peut dégager une odeur très irritante et suffocante dans l'air	Changement de couleur Dépolymérisation des colles Accélération du vieillissement	ND	UE : ND USA : ND	2733
Pentachlorophénol		Carcinogène Hautement toxique	Hydrolyse acide	1936	EU : Usage sévèrement restreint USA : Usage sévèrement restreint	80
Thymol	Peut être utilisé pour traitements dans la masse	Fongistatique mains non fongicide Risque génotoxique pour l'Homme	Réduction des propriétés mécaniques Jaunissement Détérioration des encres ferro- galliques Dissolution des encres	Depuis l'Egypte ancienne	UE : ND USA : ND	980
PHOTOCATALYSEUR Dioxyde de titane	Empêcherait la formation de biofilms	Fongistatique plutôt que fongicide Nécessite rayonnement UV pour agir Classé comme carcinogène probable pour l'Homme	Dégradation chimique de la cellulose mineure Accélération de la décoloration des colorants organiques	1985	UE : ND USA : ND	> 5000
COMPOSES D'AMMONIUM QUATERNAIRE						
Bromure de benzyl dodécyl diméthyl ammonium (Ammonium quaternaire)		Désinfectant de faible efficacité sans activité sporicide	Réduction des propriétés physiques, pH, blancheur et teneur en alpha cellulose	1986 sur les matériaux du patrimoine	UE : Usage restreint USA : Usage restreint	ND

Bromure de carboxyméthyl diméthyl dodécyl ammonium (Ammonium quaternaire)	Peut être utilisé pour traitements dans la masse	S'acidifie au cours du temps Irritant pour les muqueuses	Assombrissement mineur et acidification du papier Dépolymérisation de la cellulose Réduction de l'adhésion des encres au papier	1968	UE : Usage restreint USA : Usage restreint	ND
SELS ET ESTERS D'ACIDES						
Esters d'acide p-hydroxybenzoïque	Toxicité faible Gamme de pH d'action	Principalement fongistatique et bactériostatique	Augmentation mineure du jaunissement Légère réduction de la résistance à la traction Augmentation importante du pH Légère augmentation du pourcentage de déformation	Années 1920 1990 pour les matériaux du patrimoine	UE : ND USA : ND	De 2100 à 8000
Propionate de calcium	Possède également des propriétés de désacidification (acide faible)	Fongistatique mais non fongicide	Augmentation du pH Augmentation du degré de polymérisation Légère augmentation de la clarté et de la teinte jaune	Années 1930 1980 pour le traitement des matériaux du patrimoine	UE : ND USA : ND	3920

4.4.3 TRAITEMENTS BIOCIDES ALTERNATIFS

A travers la recherche bibliographique menée, plusieurs composés naturels, utilisés dans divers domaines (agroalimentaire, thérapeutique...) en raison de leurs propriétés antifongiques, ont été identifiés.

En se basant sur certains critères de sélection (efficacité du traitement, impacts sanitaire et environnemental, facilité d'utilisation et d'incorporation), deux traitements potentiellement applicables à notre problématique, à savoir la préservation des produits de construction et de décoration des environnements intérieurs, ont été jugés intéressants tels l'extrait des plantes du genre « allium » ou encore les huiles essentielles.

4.4.3.1 Extrait des plantes du genre « allium »

Leur l'efficacité antifongique a été découverte par Tsao en 2001 (Tsao et Yin, 2001). Cet effet est dû généralement aux composés sulfurés caractéristiques de ce genre de plantes. Ces composés sont répartis en deux classes :

- Les γ -glutamyl-cystéines
- les sulfoxides cystéines parmi lesquels l'allylcysteine sulfoxide appelé communément allinine qui représente 80% des cystéines sulfoxides contenus dans un bulbe d'ail. L'écrasement ou le hachage de l'ail libère des enzymes appelées « allinase » qui sont stockées séparément et qui vont catalyser la formation de l'acide sulfonique. La réaction spontanée de ces molécules entre elles conduit à la formation d'un composé instable : l'allicine (Higdon, 2007).

La formation de ce composé est rapide. Elle peut être complète entre 10 à 60 secondes après le hachage du bulbe. L'allicine peut être ensuite décomposée (Figure 4) pour former une variété de composés organosulfurés incluant les diallyl sulfides (DAS), des diallyl disulfides (DADS), des diallyl trisulfides (DATS)

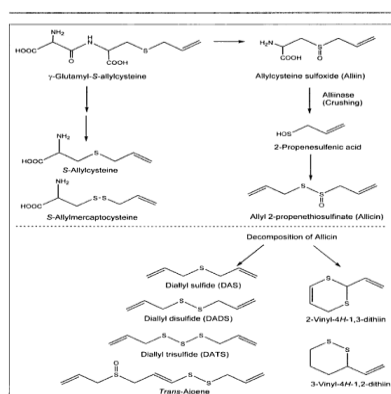


Figure 4: Production de l'ajoène à partir de l'allicine (Higdon, 2007).

4.4.3.2 Les huiles essentielles (H.E.)

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires visant notamment à les protéger contre les prédateurs et agents pathogènes microbiens ou encore à favoriser leur interaction avec d'autres organismes telle l'attraction des pollinisateurs (Rosenthal, 1991; Schafer et Wink, 2009). Parmi ces métabolites secondaires figurent les huiles essentielles dont environ 300, soit moins de 10% des H.E connues à ce jour, sont commercialement importantes et utilisées par les industries agroalimentaires et cosmétiques (van de Braak, 1999) mais également plus récemment dans le domaine médical.

La première référence sur les usages des H.E. à visée thérapeutique a été trouvée dans le papyrus Ebers. Ce document détaille plus de 800 remèdes et traitements à base d'H.E., montrant notamment que la myrrhe était un ingrédient largement utilisé, souvent mélangé avec du miel et d'autres herbes, en raison de sa capacité à inhiber la croissance bactérienne. La première expérience bactéricide aurait été réalisée par de la Croix en 1881 (Boyle, 1955).

Les huiles essentielles, également connues sous le nom d'huiles volatiles, sont des mélanges complexes de constituants volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (ex : carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (ex : linalol), aldéhydes (ex : cinnamaldéhyde), cétone (ex : menthone), esters (ex : acétate de linalyle) et éthers.

La plupart de ces composés est dotée de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cynamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym)... (Delaquis *et al.*, 2002; Burt, 2004; Caillet et Lacroix, 2007; Koroch *et al.*, 2007). La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également (Caillet et Lacroix, 2007).

Activité antibactérienne

Les activités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXe siècle pour que les scientifiques s'y intéressent et découvrent le rôle joué par les H.E de ces végétaux (Bouaoun *et al.*, 2007; Caillet et Lacroix, 2007).

Bactéricide et bactériostase

À la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des H.E. sur les microorganismes: une activité létale (bactéricide et fongicide) (Carson et Riley, 1995) et une inhibition de la croissance (bactériostatique) (Freeman et Carel, 2006).

Dorman et Deans (2000) ont démontré que l'activité bactéricide des H.E. vis-à-vis des cellules bactériennes pourrait résulter d'une dénaturation des protéines du fait des propriétés solvantes et déshydratantes des huiles (Dorman et Deans, 2000).

Une étude réalisée par Cosentino *et al* (1999) pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) de 4 variétés de Thym (***Thymus vulgaris***) sur 14 souches bactériennes (dont ***Staphylococcus aureus***) ont montré que dans la majorité des cas, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Les mêmes auteurs ont conclu que les H.E. testées dans cette étude sont bactéricides (Cosentino et Tuberoso, 1999).

D'autre part, certaines études ont été réalisées par Billerberck dans le but d'illustrer les dommages provoqués par certaines H.E. sur des cibles bactériennes à travers des images de haute résolution en utilisant la microscopie électronique (Billerbeck, 2007).

Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries aux antibiotiques, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des H.E. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée « *in vitro* » et « *in vivo* » (Carel, 2006).

De nombreux chercheurs de l'université de Manchester (Royaume-Uni) ont montré que ces produits sont actifs contre des germes pathogènes résistants aux antibiotiques tels que *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline, *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine, *Candida albicans* résistant à l'azolé et *Herpes simplex* résistant à l'acyclovir. Ceci est dû au mécanisme original des H.E. (Avertit, 2004; Bouaoun *et al.*, 2007). Selon Inouye et Abe (2007), l'efficacité des antibiotiques dépend de la dose et du temps de contact (Inouye et Abe, 2007). Des expérimentations sur des animaux de laboratoire a permis de savoir que l'efficacité des antibiotiques reste toujours limitée. Les H.E., contrairement aux antibiotiques, sont constituées de si nombreuses molécules que les bactéries ne peuvent y résister en mutant (Enrico *et al.*, 2004).

Concernant leur activité antibactérienne, les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés (Hammer *et al.*, 1999; Dorman et Deans, 2000; Bagamboula *et al.*, 2004). Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles soit lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram positif et Gram négatif.

Rayour (2003) a examiné le mécanisme d'action des H.E. des Clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis*, utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux H.E. tout comme leurs deux composants ont induit une lyse cellulaire, action démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les H.E. attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires (Rayour, 2003).

Burt (2004) a montré que le pouvoir antimicrobien des H.E résultait de leur interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à leur hydrophobicité, entraînant une perturbation de la perméabilité cellulaire et la perte des constituants de la cellule (Burt, 2004).

Mahmoud et al. ont, quant à eux, mis en évidence que cette réaction variait en fonction de la nature de la bicouche lipidique, expliquant la résistance des bactéries Gram- (Mahboubi et Haghi, 2008) et complétant ainsi les résultats de Dabbah et al. qui, en 1970, avaient mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- et aux champignons.

Pour expliquer l'effet antimicrobien des H.E., diverses hypothèses sont avancées telle la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent à la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux pour Gordon et al., 1973 et Mahmoud et al., 2004 ; l'inactivation et la destruction du matériel génétique pour Guesmi et Boudabous (2006) ou encore l'interruption de la multiplication des bactéries, de leur sporulation et de la synthèse de leurs toxines pour Caillet et Lacroix (2007) (Gordon *et al.*, 1973; Guesmi et Boudabous, 2006; Caillet et Lacroix, 2007).

D'après ces derniers auteurs, l'action antimicrobienne des H.E. se déroulerait en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E., provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire;
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;

- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (Berche, 2003).

La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (Berche, 2003).

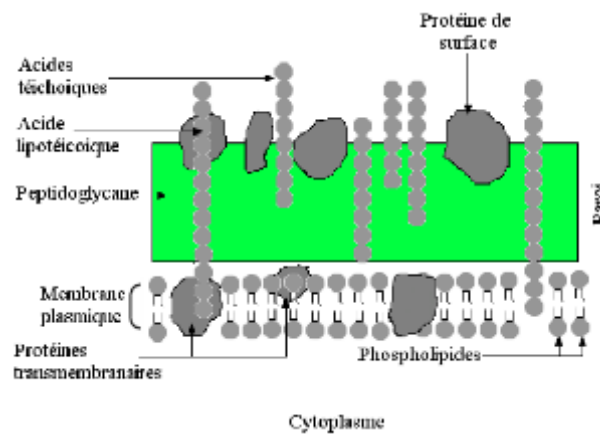


Figure 5 : Structure de la paroi bactérienne Gram+ (d'après (Lavigne, 2007)).

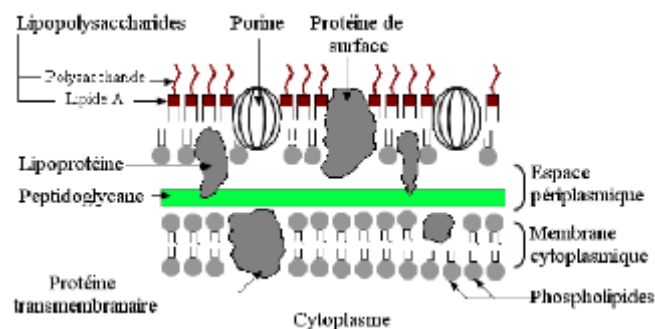


Figure 6 : Structure de la paroi bactérienne Gram- (d'après (Lavigne, 2007)).

Activité antifongique

Freeman et Carel (2006), ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les H.E. des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux (Freeman et Carel, 2006).

Rasooli et al., 2006 se sont intéressés aux effets antifongiques de l' H.E. de thym, et plus particulièrement sur les conséquences de cette huile sur l'ultrastructure du champignon *Aspergillus niger* (Rasooli et al., 2006). Cette étude a notamment permis de montrer que l' H.E. provoquait des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon exposé (Barral et al., 2007). Alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Caillet et Lacroix, 2007).

L'action fongicide des H.E. des clous de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les H.E. d'origan et de clous de girofle était significativement endommagée (Chami, 2005).

L'huile de la Menthe pouliot (*Mentha pulegium*) dont le composé majoritaire est la R (+) pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* (Belghazi et al., 2002).

Une étude a évalué l'activité antifongique de l'huile des clous de girofle sur toute une variété de champignons pathogènes, incluant ceux responsables d'infections urogénitales (Ahmad et al., 2005). Selon Chami (2005), l'huile des clous de girofle a démontré une puissante activité antifongique contre des champignons pathogènes opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.

En 2006 Giordani et Kaloustian (2006) répertorie les principales espèces botaniques productrices d'H.E. dotées d'un pouvoir inhibiteur de la croissance des levures : *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé), diverses espèces de *Cinnamomum* (cannelier), *Sassafras albidum* (sassafras), *Laurus nobilis* (laurier-sauce), *Aniba rosaeodora* - *Artemisia absinthium* (armoise amère ou absinthe), nombreuses espèces de *Thymus* (thym), diverses espèces d'*Origanum* (origan) ou encore diverses espèces de *Mentha* (menthe) (Giordani et Kaloustian, 2006).

Le carvacrol et le thymol, deux composés rencontrés dans la majorité des espèces botaniques possèdent une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes (Schwammler et al., 2001).

Outre leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, les H.E. posséderaient des activités antivirales (Inouye et Abe, 2007) et antioxydantes (Helme et al., 2004; Bel Hadj et al., 2006; Djenane et al., 2006; Ghedira, 2006) (Schwammler et al., 2001).

4.4.3.3 Combinaison entre les huiles essentielles

Certaines études ont montré que l'activité biologique des H.E. est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Les composés purs, le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de Thymus. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (Lahlou, 2004).

Les effets antimicrobiens des associations d'H.E., comme pour les associations d'antibiotiques, sont définis selon quatre interactions possibles:

- **Indifférence:** l'activité d'une H.E. n'est pas affectée par l'autre: (A + B) = effet A ou effet B.

- **Addition:** l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque H.E. étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association: (A + B) = effet A + effet B.

- **Synergie**: l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque H.E. étudiée isolément, à la même concentration: $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$.

- **Antagonisme**: l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des H.E. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque H.E. prise séparément: $(A + B) < \text{effet A} + \text{effet B}$.

Cependant, une étude réalisée par Skandami *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'H.E. mais les autres composés minoritaires ont pour effet de diminuer l'effet des principaux composés actifs phénolés .

Dans une étude réalisée par Pibiri (2005), il a été observé que des associations d'H.E. de cannelle et de thym sont synergiques vis-à-vis de *S. aureus*. En revanche, elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus*; par contre sur *P.aeruginosa* et *E. coli* (Gram-) de telles associations ne sont pas plus efficaces et sont souvent indifférentes. En revanche la cannelle testée individuellement est plus efficace que celle de thym, contrairement aux cas de présence de bactéries à Gram+ (Pibiri, 2005).

4.4.3.4 Activité liée à la composition chimique

Selon Bouaoun *et al.* (2007), la plupart des composés chimiques des H.E. sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes (voir tableau II): carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cynamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym) (Bouaoun *et al.*, 2007).

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

Les phénols sont responsables des altérations irréversibles au niveau de la membrane bactérienne. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (Bennis et Chami, 2004) et bactéricide des H.E. qui en contiennent (Cox *et al.*, 2000). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *E. coli* et *S. aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium (K^+). En revanche elle n'est pas active sur *P. aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2003). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les H.E. sont efficaces (Cosentino et Tuberoso, 1999).

5 Matériels et méthodes

Dans cette partie, seront décrits :

- les supports étudiés,
- les dispositifs expérimentaux ainsi que les conditions d'essai,
- les techniques d'analyse employées,
- la procédure de préparation des traitements antifongiques et leur mode d'application sur les produits de construction et/ou de décoration.

5.1 CHOIX DES MATERIAUX D'ESSAI

Des études antérieures, menées par le CSTB et le LRMH, ont conduit à la sélection de six supports vulnérables vis-à-vis d'une contamination microbienne. Ces supports, détaillés ci-après, sont en lien avec la thématique « environnements intérieurs » pour la toile de verre et le papier peint, et avec la thématique « patrimoine » pour le lin et le bois, ou encore communs à ces deux problématiques pour la plaque de plâtre et la dalle de plafond acoustique (Photographie 2)

- Toile de verre à peindre (Tess). Il s'agit d'un revêtement mural, dérivé du verre, commercialisé sous la forme de rouleaux. Souvent employé dans le domaine de la rénovation, ce revêtement s'emploie également pour revêtir des murs et/ou des plafonds neufs. Lors d'études réalisées au CSTB, sur 5 matériaux de décoration rencontrés dans l'habitat, ce matériau a été classé vulnérable vis-à-vis des développements fongiques (Boissier, 2003; Moularat, 2005). Le classement d'un matériau dit « vulnérable » implique une croissance fongique sur le produit propre (sans ajout d'éléments nutritionnels).
- Papier peint (Leroy Merlin). Il s'agit d'un papier peint à encoller lessivable de grammage 110. Lors d'études réalisées au CSTB, d'autres papiers peints avaient été classés vulnérables vis-à-vis des développements fongiques (Boissier, 2003; Moularat, 2005).
- Lin sous forme de morceau de tissu (Socotex). L'utilisation de cette matière comme textile devient fréquente dès le début du Moyen-Âge, ainsi, de nombreux vêtements et tissus de décoration liés au patrimoine en sont constitués.
- Bois (chêne) (scierie de Tournan en Brie). Essence de bois feuillu utilisée dans les œuvres (lambris, parquets, cadre de tableau, charpente par exemple) susceptibles d'être dégradée par des basidiomycètes et/ou des deutéromycètes.
- Dalle de plafond acoustique (Eurocoustique). Panneau rigide autoportant en laine de roche revêtu d'un voile de verre décoratif blanc sur la face apparente. Lors d'études réalisées au CSTB, ce matériau a été classé vulnérable vis-à-vis des développements fongiques (Boissier, 2003; Moularat, 2005).
- Plaque de plâtre (Placoplatre). Il s'agit d'un matériau de construction industrialisé couramment utilisé pour la finition des murs et des plafonds intérieurs. Il est constitué de plâtre moulé entre deux couches de carton. Lors d'études réalisées au CSTB, ce matériau a été classé vulnérable vis-à-vis des développements fongiques (Boissier, 2003; Moularat, 2005).

A titre d'exemples, la Photographie 1 présente quelques contaminations fongiques prises *in situ* sur ces types de support.

Contamination sur toile de verre (salle de classe - école)



Contamination sur papier peint (cuisine)



Contamination sur lin (tapisserie de l'histoire de Jacob, tenture (XVIIe siècle) - Cathédrale Notre-Dame de la ville de LAON Aisne (Picardie))



Contamination sur chêne (Plancher vue de dessous. Ancien couvent des Ursulines XVIIe siècle. Ancenis (Loire Atlantique))



Contamination sur dalle de plafond acoustique (bureau)



Contamination sur plâtre (chambre)

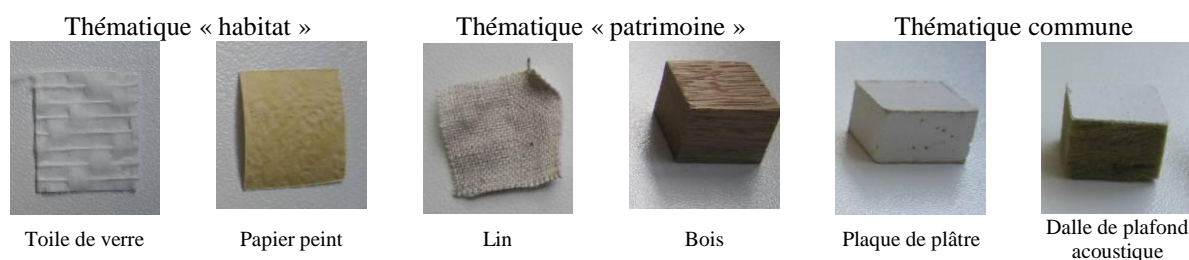


Photographie 1 : Cas de contaminations fongiques, situées dans des logements ou des sites patrimoniaux, isolés sur des matériaux de diverses natures

Les éprouvettes utilisées lors de cette étude sont conditionnées :

- en carrés de 2 cm de côté pour la toile de verre, le lin et le papier peint,
- en cubes de 2 cm de côté pour le bois, la plaque de plâtre et la dalle de plafond (Photographie 2).

Ces matériaux sont ensuite stérilisés par exposition à un rayonnement UVC à 25°C durant 1 h 30 min.



Photographie 2 : Supports de croissance étudiés

5.2 DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

Deux campagnes d'essais ont été réalisées :

- La première campagne a eu pour but d'observer, dans des conditions réalistes, le déroulement d'une contamination des supports par de l'air « tout venant ». Cette campagne a ainsi permis d'identifier les deux supports les plus vulnérables vis-à-vis d'une contamination fongique et de les sélectionner pour la campagne 2.
- La seconde campagne visait à étudier précisément la dynamique de colonisation microbienne des deux supports retenus à l'issue de la Campagne 1. Le processus de colonisation a ici été accéléré en forçant la contamination, toujours par de l'air « tout venant ». Contrairement à la première campagne, cette contamination est réalisée en une fois afin de s'affranchir des variations de la composition microbienne de l'air durant l'essai.

Aussi, avons-nous élaboré un dispositif pour chaque campagne.

Afin de s'approcher des conditions réelles de contamination des supports, notamment en ce qui concerne la diversité microbienne présente d'un point de vue qualitatif et quantitatif, il a été choisi de réaliser ces deux campagnes à partir d'air réel. En revanche, ce mode de contamination réaliste n'est pas reproductible.

Deux modes de contamination et conditions d'incubation associée ont alors été testés :

- Une contamination naturelle durant laquelle les conditions hydriques des matériaux variaient. Cette procédure visait à simuler des cas de contamination sur de longues durées avec une source d'eau discontinue telle celle pouvant résulter de phénomènes de condensations ou encore de défauts d'étanchéité.
- Une unique contamination forcée réalisée en début d'essai avec une humidité des matériaux contaminés maintenue à saturation durant tout l'essai. Cette approche s'apparente à des cas de contamination avec une source en eau continue (fuite, infiltrations...).

Dans les deux cas, afin de n'étudier que la contamination issue de l'air, l'eau utilisée est filtrée et stérilisée.

5.2.1 Campagne 1 : Contamination naturelle des supports

Il s'agit de simuler un dégât des eaux au niveau de supports exposés à l'air ambiant. A noter que les supports ont été identifiés antérieurement comme vulnérables vis-à-vis des moisissures.

Pour ce faire, un dispositif expérimental est placé dans un laboratoire de 16 m² (3,70 x 3,60 x 2,70 m). Plusieurs utilisateurs occupent cet espace durant la journée avec pour seule consigne de ne pas toucher les supports.

Le dispositif se compose de six plateaux horizontaux chacun dédié à l'un des six matériaux retenus. Chaque plateau comporte 35 éprouvettes (Photographie 3).



Photographie 3 : Dispositif expérimental dédié à la biocontamination des supports (de gauche à droite sont disposés les éprouvettes de : dalle acoustique, toile de verre, plaque de plâtre, bois et lin).

Les plateaux (Plaque BD inox 325 x 265 x 20 mm, de Buyer) sont déposés en dessous d'une fenêtre maintenue ouverte de 9 h à 16 h durant les jours ouvrés. Chaque plateau est rempli avec 2 kg de billes de verre de 6 mm de diamètre (Belleville).

Après dépose des éprouvettes sur les billes de verre, celles-ci sont immergées avec 480 mL d'eau déionisée stérile (Photographie 4). Chaque jour ouvré, l'immersion des billes est maintenue par rajout d'eau déionisée stérile et l'humidification du matériau est réalisée par pulvérisation.



Photographie 4 : Photographie des supports déposés sur billes de verre

Des cycles alternant « Humidification / séchage journalier » et « Séchage en continu » sont réalisés durant l'essai (Tableau 4). A noter que la phase de séchage journalière est effectuée entre 16 h et 9 h (fenêtre fermée). Le séchage en continu, quant à lui, résulte de l'évaporation de l'eau à température ambiante (Photographie 5).

Ces cycles permettent de simuler des problèmes d'humidité, pour lesquels l'apport en eau n'est tel que la condensation ou encore la capillarité.

Tableau 4 : Cycles d'humidification/séchage réalisés au cours de l'essai

Nature de « l'événement »	Humidification / séchage journalier	Séchage en continu	Humidification / séchage journalier	Séchage en continu	Humidification / séchage journalier	Séchage en continu	Humidification / séchage journalier	Séchage en continu
Durée de « l'événement » (en jour)	3	4	5	3	4	2	3	2



Photographie 5: Plateau contenant de la toile de verre en phase d'humidification (à droite) et de séchage (à gauche)

5.2.2 Campagne 2 : Impaction des microorganismes de l'air sur les supports

Dans un premier temps, les supports, préalablement préparés, sont contaminés de manière forcée par l'intermédiaire d'un impacteur Andersen muni d'un crible correspondant à l'étage numéro 6 permettant la collecte à la fois des particules fongiques et bactériennes. Le débit d'aspiration de 28,9 L/min, conforme à l'utilisation classique d'un impacteur Andersen, est assuré par une pompe. Les supports à contaminer sont disposés sous le crible (Photographie 6). Les coupons de toile de verre sont placés sur un support afin que la distance entre le crible et la surface des deux types de matériau retenus, à savoir bois et toile de verre, soit identique.



Photographie 6 : Montage de l'impacteur et disposition des coupons de matériaux à contaminer

La contamination des supports est réalisée durant une heure à l'extérieur puis pendant une heure dans un bureau occupé.

Trois essais simultanés sont réalisés avec ces supports afin de vérifier les scénarios de contamination communs.

Au terme des deux heures d'impaction, les supports sont placés dans des dessiccateurs saturés en humidité pour incubation. Les éprouvettes de bois et de toile de verre sont disposées dans des incubateurs différents, comme présenté sur la Photographie 7. Un témoin qui n'a pas subi d'impaction, ainsi qu'un T0 ayant été contaminé, sont analysés extemporanément.

Les dessiccateurs sont placés à l'étuve à 25°C et à l'abri de la lumière. A chaque temps de prélèvement Ti, un échantillon de chaque matériau est récupéré puis analysé.



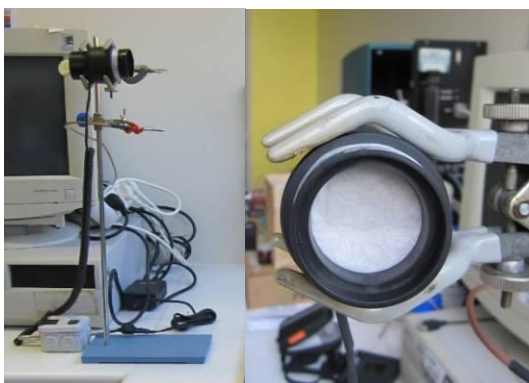
Photographie 7 : Eprouvettes disposées dans les dessiccateurs

5.2.3 Collecte de la microflore aéroportée

Sur toute la durée de la **Campagne 1**, la température et l'humidité relative de l'air sont mesurées avec un thermohygromètre (Hygrolog-D, Rotronic) muni d'une sonde (Hygroclip-SC05, Rotronic).

Ces paramètres sont enregistrés durant les 23 jours de l'essai sur un pas de temps de 10 minutes.

La microflore aéroportée est collectée en continu durant l'essai. Pour cela, un système de prélèvement a été mis au point au CSTB. Il est muni d'un ventilateur (Inline Blower C012, Micronel) et d'un média filtrant synthétique de type F5 (F300, Camfil Farr) selon la norme EN 779-2002 (Photographie 8).



Photographie 8 : Système de collecte de la microflore aéroportée

Le filtre est renouvelé lors de chaque prélèvement d'éprouvettes puis analysé par technique biomoléculaire.

Concernant la Campagne 2, la microflore aéroportée présente au moment des prélèvements atmosphériques est déterminée par observation de milieux de cultures contaminés par le « tout venant » extemporanément à la contamination des matériaux. En pratique des milieux TCS pour l'identification des bactéries et MEA + Chloramphénicol pour les moisissures sont disposés dans deux impacteurs munis chacun du crible n°6. La contamination est réalisée durant 10 min en environnement extérieur et 10 min en intérieur. Les boîtes de Pétri ainsi contaminées sont placées en incubation à 25°C pour les moisissures et 30°C pour la flore bactérienne.

5.2.4 FREQUENCE DE PRELEVEMENT DES EPROUVETTES

5.2.4.1 Campagne 1

Les prélèvements ont été effectués entre le 30 mai et le 24 juin 2011 (Tableau 5)

Tableau 5 : Fréquence de prélèvement des échantillons et techniques d'analyse appliquées (BM : Biologie moléculaire, C : méthode culturale, MEB : microscopie électronique à balayage)

Désignation	Date de collecte	Durée d'exposition (jours)	Nombre d'échantillons (technique d'analyse appliquée)
T0	30/05/2011	0	3 pour chacun des 6 matériaux (BM) 1 filtre (BM)
T2	01/06/2011	2	3 pour chacun des 6 matériaux (BM) 3 pour chacun des 6 matériaux (C) 1 pour chacun des 6 matériaux (MEB) 1 filtre (BM)
T7	06/06/2011	7	3 pour chacun des 6 matériaux (BM) 3 pour chacun des 6 matériaux (C) 1 pour chacun des 6 matériaux (MEB) 1 filtre (BM)
T16	15/06/2011	16	3 pour chacun des 6 matériaux (BM) 3 pour chacun des 6 matériaux (C) 1 pour chacun des 6 matériaux (MEB) 1 filtre (BM)
T23	24/06/2011	23	3 pour chacun des 6 matériaux (BM) 3 pour chacun des 6 matériaux (C) 1 pour chacun des 6 matériaux (MEB) 1 filtre (BM)

Pour cette étude, 5 filtres ont été analysés par BM et 168 échantillons ont été analysés au total selon la répartition suivante :

- 24 échantillons dédiés aux observations Microscopie Electronique à Balayage (MEB)
- 54 pour la caractérisation de la microflore par la méthode culturale
- 90 pour la caractérisation de la microflore par biologie moléculaire

5.2.4.2 Campagne 2

Cette campagne a consisté en trois essais dont le déroulement des prélèvements est présenté dans le Tableau 6. Cette campagne d'essais a été réalisée courant mars et avril 2012.

Tableau 6 : Organisation des prélèvements de la campagne 2

Essai 1		
Date de collecte	Désignation	Durée d'incubation (jours)
12/03/12	Témoïn	0
12/03/12	T0	0
13/03/12	T1	1
14/03/12	T2	2
15/03/12	T3	3
16/03/12	T4	4
19/03/12	T7	7
21/03/12	T9	9

Essai 2		
Date de collecte	Désignation	Durée d'incubation (jours)
26/03/12	Témoïn	0
26/03/12	T0	0
27/03/12	T1	1
28/03/12	T2	2
29/03/12	T3	3
30/03/12	T4	4
02/04/12	T7	7
04/04/12	T9	9
06/04/12	T11	11

Essai 3		
Date de collecte	Désignation	Durée d'incubation (jours)
16/04/12	Témoïn	0
16/04/12	T0	0
17/04/12	T1	1
18/04/12	T2	2
19/04/12	T3	3
20/04/12	T4	4
23/04/12	T7	7
25/04/12	T9	9
27/04/12	T11	11

Les échantillons de chaque support ont été analysés par biologie moléculaire. Il y avait donc 16 échantillons pour l'essai 1 et 18 pour les essais 2 et 3, soit 52 échantillons.

5.3 TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES

La revue bibliographique consacrée aux traitements antifongiques nous a permis d'identifier, deux types de traitements alternatifs aux biocides conventionnels: les huiles essentielles et l'extrait d'ail. Parmi les huiles essentielles, deux essences ont été testées : le thym et le menthol.

5.3.1 PROTOCOLES DE PREPARATION DES TRAITEMENTS BIOCIDES

5.3.1.1 Traitement à base d'extrait d'ail

Un extrait d'ail à 30% a été élaboré à partir de gousses issues de l'agriculture biologique. L'extrait ainsi obtenu a été filtré au travers d'un média poreux (diamètre des pores : 0,45 μm). Le filtrat limpide ainsi obtenu et dilué au dixième constitue le traitement qui sera mis en œuvre.

5.3.1.2 Traitement à base d'huiles essentielles

En première approche, nous nous sommes basés sur la littérature pour définir la dilution des huiles essentielles à tester (El Ajjouri *et al.*, 2008; Amarti *et al.*, 2010). Ainsi des suspensions de dilution égale à 1/500 ont été préparées.

Pour ce faire, un volume de 100 μL d'huile essentielle a été ajouté à 50 mL d'eau déionisée et filtrée.

5.3.2 PROCEDURES D'APPLICATION DES TRAITEMENTS SUR LES MATERIAUX

L'application des différents traitements sur les matériaux a consisté à l'immersion individuelle de chaque coupon dans chacune des suspensions. Les coupons sont à saturation en solution traitante, néanmoins la quantité est variable selon la nature du matériau et notamment sa capacité d'absorption.

Les coupons sont ensuite positionnés dans les impacteurs afin d'être contaminés selon la procédure mise en œuvre pour la Campagne 2 et décrite en §5.2.2.

5.4 TECHNIQUES ANALYTIQUES

5.4.1 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Après métallisation au platine de l'éprouvette (20 s à 30 mA) (métalliseur Jeol JFC-1300 auto fine coater, *JEOL*), l'observation au Microscope Electronique à Balayage est réalisée sur un appareil de marque JEOL 5600 LV (Low Vacuum). Cet outil permet l'observation des échantillons à un grossissement allant de 50 à 300 000 fois.

5.4.2 CARACTERISATION DE LA MICROFLORE PAR LA METHODE CULTURALE

L'évaluation quantitative des microorganismes présents sur ou dans un support peut être abordée par des méthodes classiques de numération et d'identification (Roquebert et Oriol, 2002) qui ne permettent néanmoins de comptabiliser que les germes viables qui vont se développer en donnant des colonies visibles sur un milieu solide gélosé.

L'identification des espèces va apporter un complément utile à la numération. Cette identification repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques, physiologiques) des souches à étudier.

Pour les bactéries l'identification se base sur la comparaison des caractères biochimiques et physiologiques des espèces à étudier vis-à-vis de souches de référence (Busse, 1996). L'automatisation de ces méthodes d'identification, utilisant des galeries comme le système API, a l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés et par la suite d'améliorer la reproductibilité des résultats. Cette gamme propose 16 produits d'identification qui couvre la quasi-totalité des groupes bactériens et plus de 550 espèces différentes et permet d'avoir la meilleure réponse concernant les espèces présentes. L'identification est réalisée après isolement des colonies bactériennes sur milieu nutritif.

En ce qui concerne les champignons, leur culture est faite sur un milieu adapté qui doit répondre à un certain nombre de qualités (Pitt et Hocking, 1999.) :

- inhiber la croissance des bactéries (adjonction d'antibiotiques),
- être suffisamment nutritif pour permettre la croissance des champignons à croissance difficile,
- limiter ou supprimer la croissance des espèces à développement envahissant,
- ralentir la croissance radiale des colonies pour éviter leur chevauchement.

Les milieux de culture gélosés les plus couramment utilisés (Malt Agar, Potato Dextrose Agar) ont des teneurs en eau élevées et favorisent incontestablement les espèces hygrophiles. Dans cette étude, le milieu à l'extrait de malt a été utilisé pour caractériser la flore fongique.

L'identification des champignons se fait par l'analyse microscopique de la morphologie, et peut éventuellement être complétée par une caractérisation moléculaire afin de prendre en compte la variabilité intra-spécifique des espèces dominantes.

5.4.3 DENOMBREMENT DES UNITES FORMANT COLONIES (UFC)

Cette technique est couramment utilisée en microbiologie pour dénombrer toutes sortes de micro-organismes (bactéries, champignons, levures...) présents dans un milieu liquide ou solide. Elle est basée sur le fait de considérer qu'au moins une unité viable (spores, bactéries...) va former une colonie sur un milieu de culture. La numération est alors exprimée en Unités Formant Colonies (UFC) par gramme de matière ou par surface du matériau analysée.

Le principe est de remettre en suspension, à partir de l'éprouvette, la flore microbienne à analyser dans un volume connu d'eau distillée stérile, et de procéder ensuite à une série de dilutions en cascade qui permet d'obtenir des concentrations décroissantes en particules biologiques (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...). On prélève ensuite un volume défini de chaque dilution, que l'on ensemence sur une surface gélosée neuve en boîte de pétri. On laisse incuber en étuve à 25°C le temps nécessaire de croissance pour chaque genre (une dizaine de jours pour les champignons et 48 à 72 heures pour les bactéries). Après incubation les colonies formées sur toutes les boîtes ensemencées sont dénombrées. Pour que le comptage soit valable, il faut que le nombre de colonies soit compris entre 30 et 300. Les résultats sont alors statistiquement exploitables. On retient ensuite le nombre de colonies compris dans cette gamme à la plus grande dilution, et on multiplie ensuite ce résultat par la dilution choisie. On obtient alors un nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) par mL de solution mère. La Figure 7 schématise le principe de la méthode.

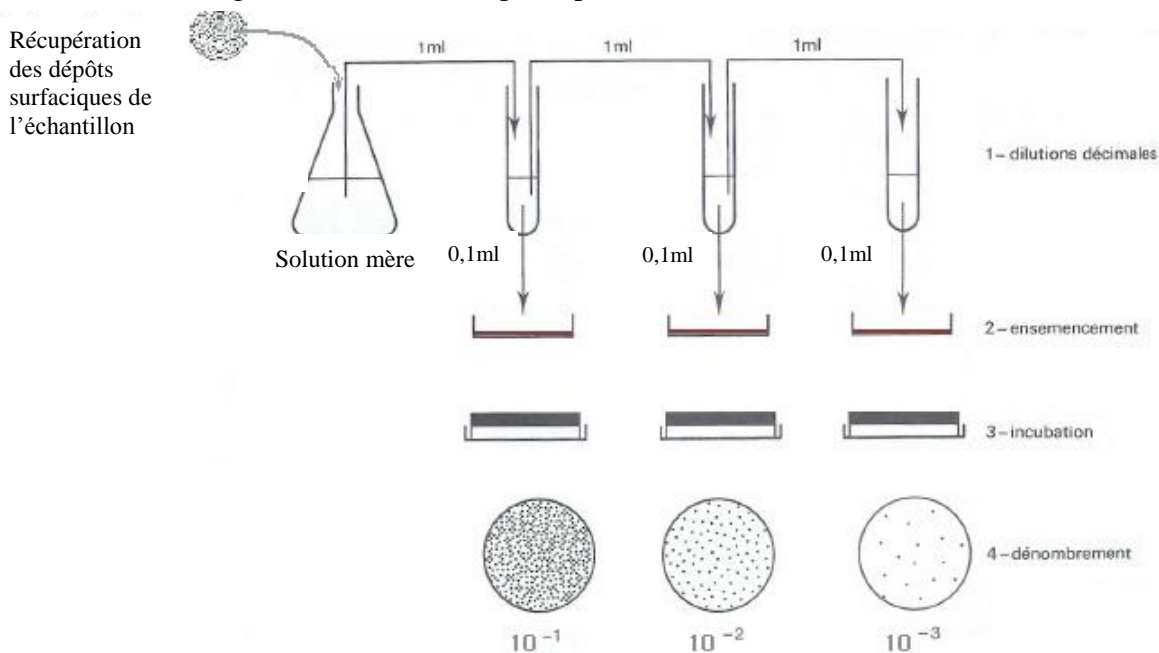


Figure 7 : Principe schématisé du dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC)

5.4.4 CARACTERISATION QUANTITATIVE DE LA MICROFLORE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Cette caractérisation est réalisée en 4 étapes à savoir :

- Extraction du matériel biologique à partir des éprouvettes
- Conditionnement des échantillons
- Extraction des acides nucléiques
- Quantification par PCR en temps réel

L'ensemble des protocoles utilisés en biologie moléculaire est détaillé dans l'étude de Gaüzère (Gaüzère, 2012; Gaüzère *et al.*, 2013).

5.4.4.1 Protocoles d'extraction du matériel biologique

Deux protocoles ont été développés selon la nature des matériaux :

- **Pour les échantillons de bois, plâtre et dalle de plafond :**

Chaque coupon est placé dans une boîte de pétri et mouillé avec 2 mL d'eau de qualité biologie moléculaire (BM). L'ensemble est gratté avec un scalpel ou une mini-brosse stérile. Une fois le décrochage terminé, la suspension est prélevée à l'aide d'une seringue, placée dans un tube type falcon stérile de 50 mL puis vortexée 10 s. Le matériau et la boîte sont ensuite rincés avec 2 mL d'eau supplémentaire. Le volume est récupéré et ajouté à celui déjà présent dans le tube.

- **Pour les échantillons de papier peint, toile de verre, lin, filtre :**

Ils sont placés dans une seringue de 5 mL avec laquelle sont ensuite également prélevés 4 mL d'eau BM. Le matériau est essoré par vidange de la seringue, le liquide étant récupéré dans un tube type falcon de 50 mL, cette même suspension est réutilisée pour réaliser 4 cycles successifs aspiration/vidange supplémentaires.

5.4.4.2 Conditionnement des échantillons

Le volume final de 4 mL est réparti dans 2 tubes à vis de 2 mL. Les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 13 000 rpm¹. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 400 µL de Guanidine thiocyanate et vortexé 30 s. 120 µL de N-LS 10% sont ensuite ajoutés dans le tube qui est à nouveau vortexé 30 s. L'ensemble des prélèvements est conservé à -80°C avant extraction.

5.4.4.3 Extraction des acides nucléiques

L'extraction d'ADN a été effectuée selon le protocole décrit par (Godon *et al.*, 1997). La lyse cellulaire se fait par chauffage à 70°C pendant 1h puis par action mécanique de micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur pendant 10 min. Les inhibiteurs de PCR (notamment les acides humiques) sont éliminés par ajout de Poly-Vinyl-Poly-Pyrrolidone (PVPP). L'ADN est précipité par de l'isopropanol, puis purifié sur une micro-colonne du Kit miniQIAamp (Qiagen). L'ADN ainsi extrait est conservé à -80°C.

5.4.4.4 Quantification par PCR en temps réel

La PCR est utilisée pour amplifier, *in vitro*, une région spécifique d'ADN donné, afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Cette amplification PCR consiste en 3 étapes :

- séparation des deux brins complémentaires de l'ADN (dénaturation),
- reconnaissance de la séquence cible et fixation des amorces spécifiques (hybridation),
- réalisation la réaction de polymérisation du brin complémentaire (élongation).

La Figure 8 illustre les 3 étapes constituant un cycle de PCR.

¹rpm : rotations par minute

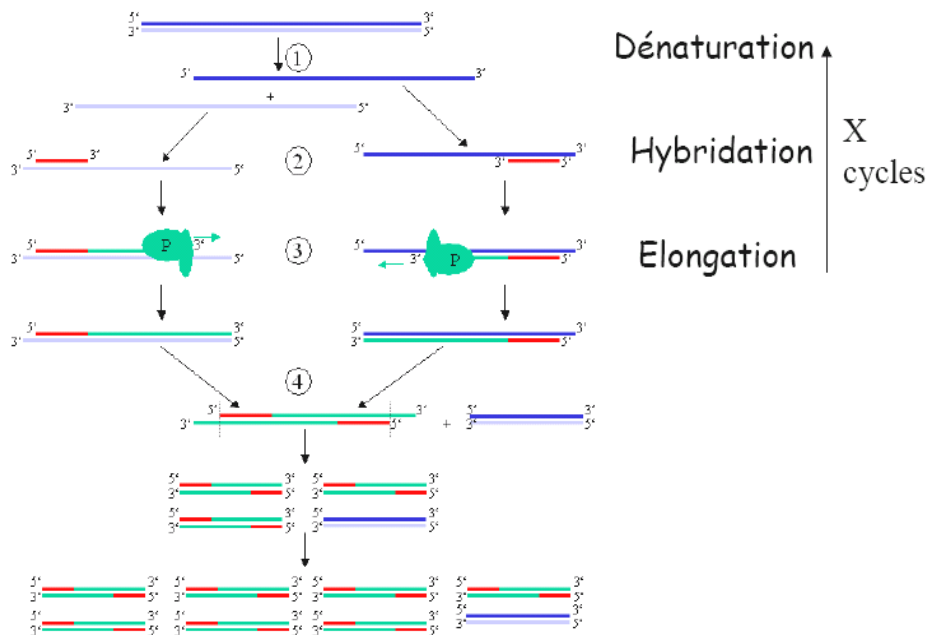


Figure 8: Représentation des 3 étapes d'une réaction de PCR (dénaturation, hybridation et élongation) (www.medecine.univ-paris7.fr)

- l'étape de **dénaturation**, est réalisée à 95°C, pour une dissociation complète des deux brins complémentaire d'ADN.
- l'étape d'**hybridation** se fait à une température qui sera définie selon les séquences des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.
- l'étape d'**élongation** est réalisée à 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être adaptée à chaque système d'amorces PCR utilisé.

L'ADN néoformé (amplicon) à la fin d'un cycle sert de matrice au suivant. Ainsi, l'alternance de température une quarantaine de fois permet d'obtenir 2^{40} soit 10^{12} copies de la seule séquence cible présente initialement dans la matrice.

La PCR quantitative en temps réel (PCRq) permet de suivre instantanément la production d'amplicons d'ADN en fonction du nombre de cycles effectués, et ainsi de définir la phase exponentielle d'amplification de l'ADN, qui correspond à la période durant laquelle le nombre de molécules d'ADN amplifiées est proportionnel au nombre initial de molécules cibles de la matrice. Lors de la PCR en temps réel, les étapes d'amplification sont les mêmes que lors de la PCR classique, c'est à dire, dénaturation, hybridation et élongation.

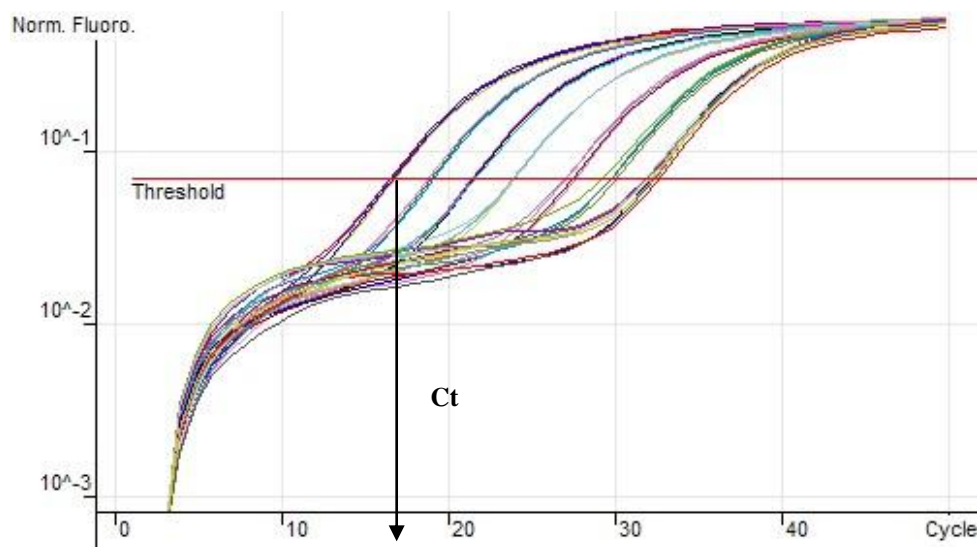
Le développement des appareils de détection de la fluorescence en ligne rend possible la mesure, en temps réel, de la quantité d'ADN produite à chaque cycle. Le principe de la quantification repose sur le fait que le nombre de copies de la séquence est directement lié à la quantité initiale de matériel génétique, au nombre de cycle et au rendement de la PCR.

Deux méthodes permettent de détecter les amplicons lors de la PCR en temps réel. Elles se distinguent par la nature du fluorophore et la présence ou non d'une sonde (Sybr Green I ou Système TaqMan) utilisé pour marquer les amplicons. Les amorces et sondes employées sont présentées Tableau 7.

Tableau 7 : Détails des amorces et sondes utilisée pour les analyses moléculaire (PCRq)

Names	Types	Target	Sequences	Positions	References
B01	Primer	Bacteria	5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'	F331-349	Horz et al. (2005)
B02	Primer	Bacteria	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'	R772-797	Horz et al. (2005)
B14	Probe	Bacteria	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	506-528	Horz et al. (2005)
E07	Primer	Fungi	5'-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3'	F817	Borneman and Hartin (2000)
E08	Primer	Fungi	5'-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3'	R1196	Borneman and Hartin (2000)

L'analyse PCRq d'un standard dilué en cascade de raison 5 permet d'obtenir une gamme d'étalonnage, et d'évaluer ainsi la quantité d'unités génomiques présentes dans l'échantillon initial (Figure 9).

**Figure 9: Représentation d'une amplification par PCR temps réel d'un fragment d'ADN**

L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles et l'axe des ordonnées à l'augmentation du signal de fluorescence, directement proportionnelle à la quantité du produit amplifié.

L'intersection de chaque courbe d'amplification et de la ligne de seuil, placée automatiquement par le logiciel d'analyse Rotorgene, au-dessus du bruit de fond et au niveau de la phase exponentielle, indique, par projection sur l'axe des abscisses, un cycle seuil (Ct, Threshold Cycle). Le Ct est inversement proportionnel au nombre de cibles amplifiées initialement présentes dans le milieu réactionnel. Ainsi, deux échantillons ayant un nombre de copies différents auront deux Ct différents.

5.4.5 CAPILLARY ELECTROPHORESIS SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (CE-SSCP)

La CE-SSCP est une technique d'empreinte moléculaire permettant de comparer la structure des communautés microbiennes et d'évaluer leur diversité. Pour cela, la région V3 ou V7 de l'ADN ribosomique 16S ou 18S est amplifiée à partir d'ADN. Les volumes réactionnels ainsi que les programmes de PCR sont donnés par les publications de Godon et al, (1997) et Zumstein et al, (2000). Dans notre étude, 30 cycles de PCR sont effectués. Le produit de PCR obtenu est dénaturé à chaud (95°C) puis renaturé rapidement par immersion des tubes dans un bain d'eau glacée. Les brins prennent alors des conformations secondaires stables. Les brins d'ADN marqués lors de la PCR par un fluorophore, sont séparés par électrophorèse capillaire sur séquenceur d'ADN ABI 3130 (Applied Biosystems). Le signal fluorescent est détecté par une caméra Tri CCD Laser. On

obtient alors des profils plus ou moins complexes où chaque pic représente une séquence d'ADN 16S ou 18S et donc une « espèce ». Un standard de taille interne permet la comparaison des profils entre eux. Les profils bruts obtenus sont ensuite analysés avec le logiciel StatFingerprints version 1.2 (Loisel *et al.*, 2006; Vanpeteghem *et al.*, 2008; Michelland *et al.*, 2009), qui permet l'exploitation des résultats. Le nombre de pics de l'électrophoregramme est inférieur ou égal à la richesse c'est-à-dire au nombre d'espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. Les amorces employées sont présentées Tableau 8.

Tableau 8 : Détails des amorces utilisées pour les analyses moléculaire (PCR-SSCP)

Names	Types	Target	Sequences	Positions	References
B22	Primer	Bacteria	5'-ACGGTCCAGACTCTACGGG-3'	F329-348	Zumstein et al. (2000)
B23	Probe	Bacteria	5'-TTACCGCGCTGCTGGCAC-3'	R515-533	Zumstein et al. (2000)
E04	Primer	Eukaryotes	5'-CTTAATTGACTCAACACGG-3'	F955	Godon et al. (1997)
E12	Probe	Eukaryotes	5'-GGGCATCACAGACCTGTT-3'	R1195	Godon (2004)

5.4.6 ANALYSE METAGENOMIQUE CIBLEE

5.4.6.1 Séquençage haut-débit : technologie 454

La technique de pyroséquençage 454 permet d'accéder à une grande quantité de séquences sans étape de clonage préalable. Elle peut être appliquée directement à la matrice ADN ou sur un produit de PCR. A partir d'un produit de PCR ciblant la séquence de l'ARN ribosomique 16S pour les bactéries et 18S pour les eucaryotes. Les barcodes, les primers et les séquences dont la longueur est inférieure à 200 paires de bases (pb), ou celles présentant des homopolymères supérieures à 6 pb, ainsi que les chimères ont été retirés des fichiers de séquences. Les séquences présentant au moins 97% d'homologie entre elles, ont été regroupées en OTU (Operational Taxonomic Unit).

Les analyses bioinformatiques permettent d'identifier les microorganismes présents à différents niveaux taxonomiques pouvant aller jusqu'à l'espèce pour les séquences présentant 97% d'homologie et plus avec une espèce cultivée. Le pyroséquençage a été réalisé sur un séquenceur GS-FLX® à lame Titanium® (Roche Diagnostics). L'analyse bioinformatique permettant l'affiliation phylogénétique jusqu'au niveau genre a été réalisée à l'aide des outils bioinformatiques pour le traitement des grandes quantités de données de séquences (Mothur). L'identification au niveau espèce a été réalisée par analyse BLASTn à partir d'une base de données regroupant les séquences des espèces bactériennes et eucaryotes cultivées (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/> ; <http://www.arb-silva.de/>).

5.4.6.2 Plan d'expérience

La caractérisation de la diversité bactérienne et eucaryote sur bois et toile de verre a été réalisée lors de deux campagnes d'analyses avec des protocoles de contaminations différents. Pour rappel, la Campagne 1 a consisté en la colonisation naturelle des supports et le suivi de ceux-ci durant 23 jours, alors que lors de la Campagne 2, une contamination forcée a été appliquée et le suivi n'a duré que 11 jours. Les coupons analysés sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Coupons analysés par séquençage haut débit (16S rDNA et 18S rDNA)

Campagne 1

Nom de l'échantillon	Temps de colonisation	Matériau	Nom de la matrice ADN
T7	7 jours	Toile de verre	T7-TV C1
	7 jours	Bois (Chêne)	T7-BO C1
T23	23 jours	Toile de verre	T4-TV C1
	23 jours	Bois (Chêne)	T4-BO C1

Campagne 2

T4	4 jours	Toile de verre	T4-TV C2
	4 jours	Bois (Chêne)	T4-BO C2
T7	7 jours	Toile de verre	T7-TV C2
	7 jours	Bois (Chêne)	T7-BO C2
T11	11 jours	Toile de verre	T11-TV C2
	11 jours	Bois (Chêne)	T11-BO C2

6 Résultats

Il s'agit dans ce paragraphe d'identifier et de caractériser les microorganismes colonisant successivement les supports selon deux cas de figure :

- La campagne 1 pour laquelle la contamination de 6 matériaux a été réalisée naturellement sur une période de 23 jours.
- La campagne 2 dont la contamination des deux matériaux retenus à l'issue de la campagne 1, a été réalisée par impaction forcée sur une durée de deux heures.

Ce paragraphe sera consacré dans une troisième partie à l'impact de trois traitements aux supposées propriétés antifongiques vis-à-vis d'une contamination biologique « tout-venant ».

6.1 CAMPAGNE 1

Dans cette première campagne, et d'après les données de la littérature, il a été émis l'hypothèse que les produits de construction et de décoration se contaminent *via* la flore microbienne présente dans l'air, ce mode de contamination sera désigné « air tout venant ».

Dans ce chapitre seront exposés :

- les conditions thermo hydriques de l'ambiance du local dans lequel sont exposés les coupons des matériaux
- les observations macroscopiques et au microscope électronique à balayage des supports contaminés
- la caractérisation des microorganismes par méthode culturale et par une approche biomoléculaire

6.1.1 CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES DE TEMPERATURE ET D'HUMIDITE RELATIVE

La température et l'humidité étant des facteurs conditionnant le développement microbien, la mesure de ces deux paramètres a été réalisée lors de l'essai à proximité des supports (Figure 10).

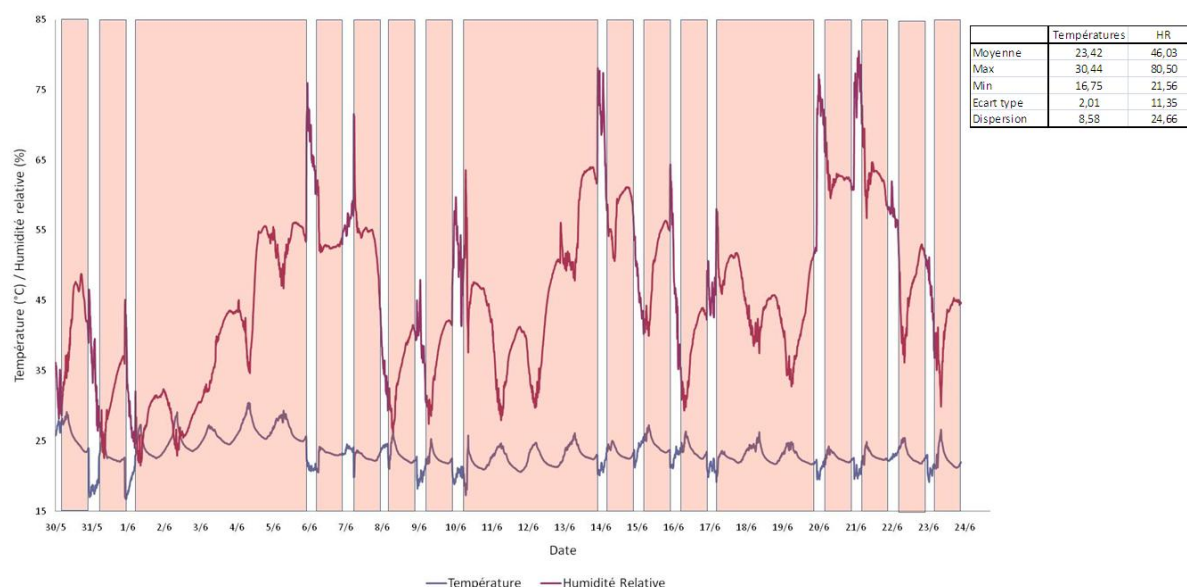


Figure 10 : Evolution de la température et de l'Humidité Relative (HR) dans la salle test durant les 23 jours de l'essai (les phases de séchage en continu, fenêtre fermée sans renouvellement d'eau, sont encadrées en rouge)

Les cycles jours/nuit et les phases d'ouverture/fermeture de la fenêtre entraînent une dispersion de 9 % de la température et de 25 % de l'humidité relative (HR).

Ainsi, l'ouverture de la fenêtre s'accompagne d'une baisse de la température. Avec une température moyenne de 23°C et comprise entre 16 et 31°C, ces conditions sont proches de celles retrouvées dans les environnements intérieurs et sites patrimoniaux.

La campagne nationale logement menée par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur en 2001 a montré qu'une majorité de logements avait une HR moyenne comprise entre 40 et 60 % (Moularat *et al.*, 2008). Les valeurs mesurées dans cette étude sont en accord avec ces valeurs de référence puisque 87 % des mesures sont inférieures à 60 %.

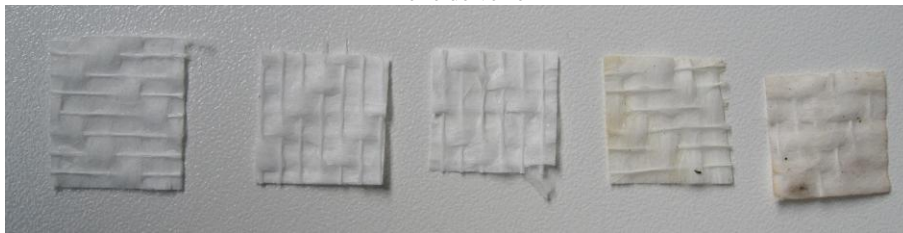
Afin de simuler des problèmes d'humidité (dégât des eaux, infiltration, inondation, condensation...) les supports sont maintenus en conditions hydriques favorables à la croissance fongique.

6.1.2 OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES

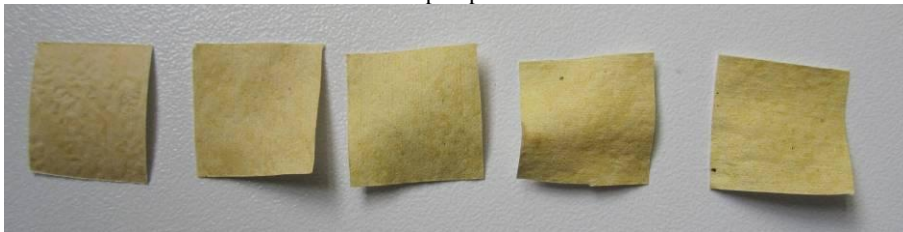
Durant l'essai, les observations macroscopiques réalisées à T0, T2, T7, T16 et T23, ont montré que quatre supports (toile de verre, papier peint, bois et plaque de plâtre) présentaient des tâches s'apparentant à une croissance de microorganismes. Cette détection a été réalisée par examens macroscopiques et microscopiques à l'aide d'une loupe binoculaire. Sur les deux autres supports (lin et Dalle de plafond acoustique) seule une coloration, respectivement beige et rose, sur les contours a été constatée (Photographie 9).

0 jour 2 jours 7 jours 16 jours 23 jours

Toile de verre



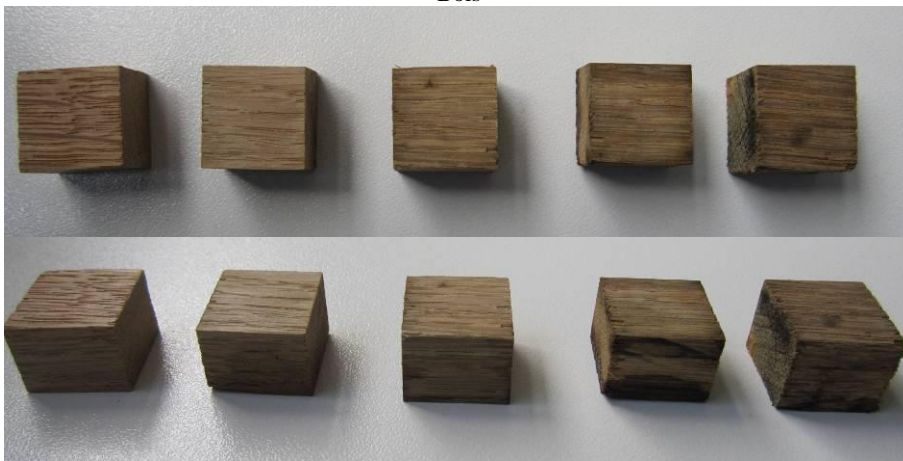
Papier peint

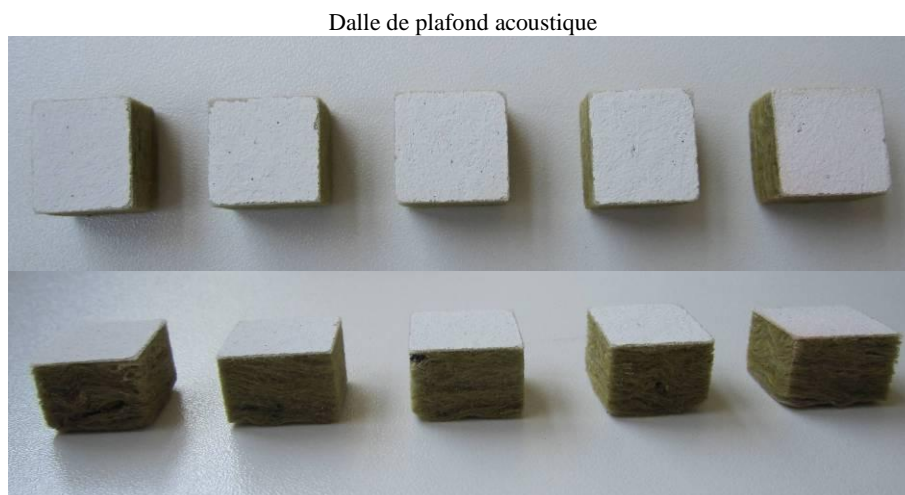
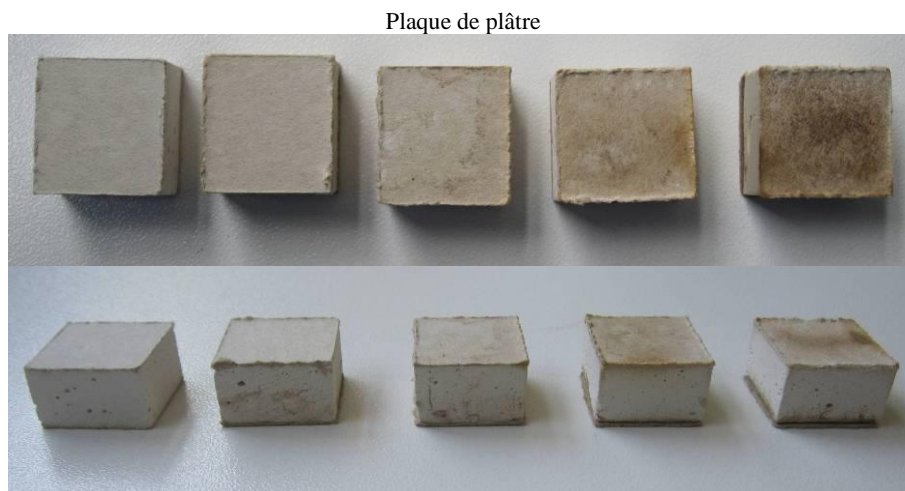


Lin



Bois





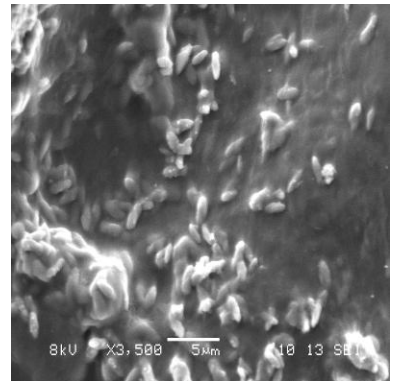
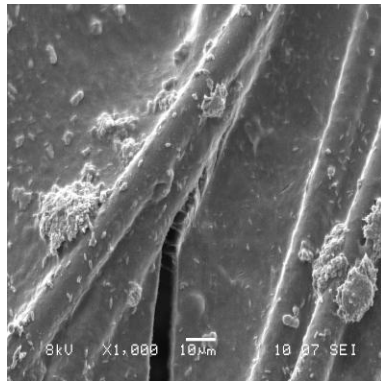
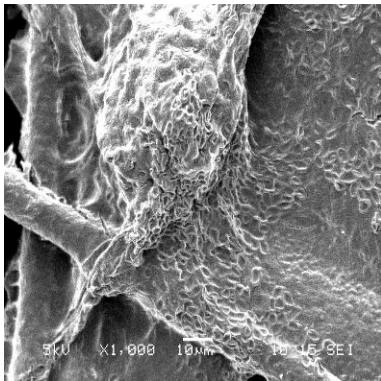
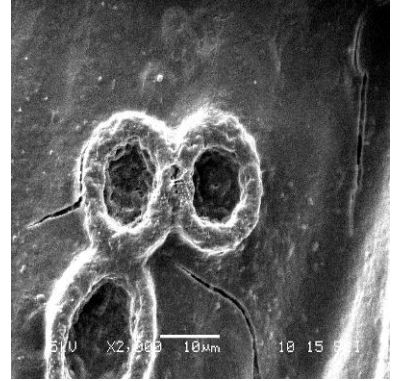
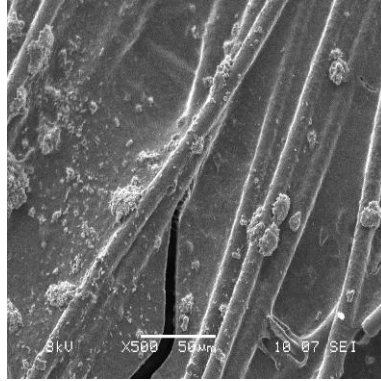
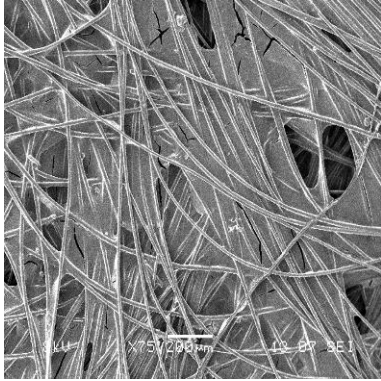
Photographie 9 : Supports contaminés (de gauche à droite) à 0, 2, 7, 16 et 23 jours

Les taches observées sur toile de verre, papier peint, bois et plaque de plâtre apparaissent dès 7 jours d'exposition (T7). En ce qui concerne les colorations observées sur le lin et la dalle de plafond acoustique, elles apparaissent respectivement à 2 (T2) et 16 jours (T16) d'exposition.

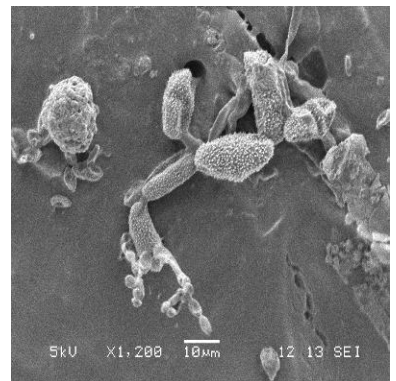
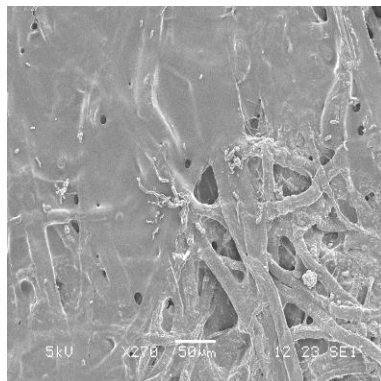
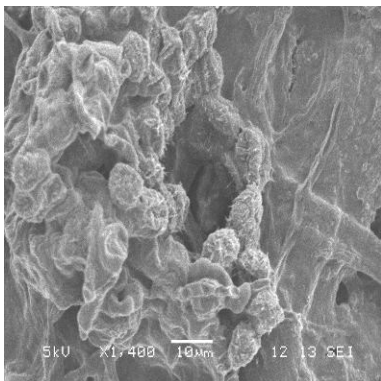
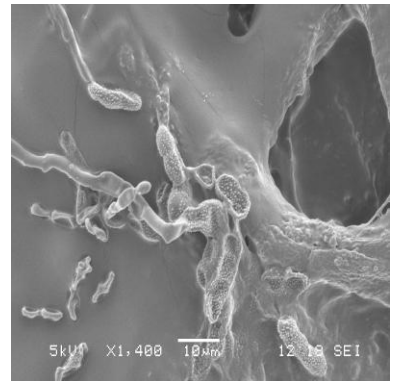
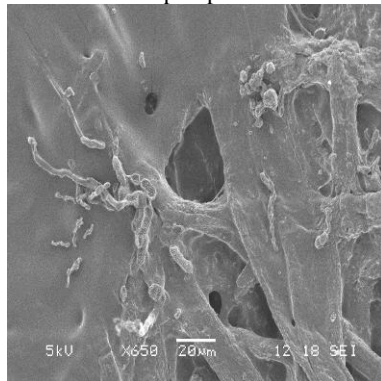
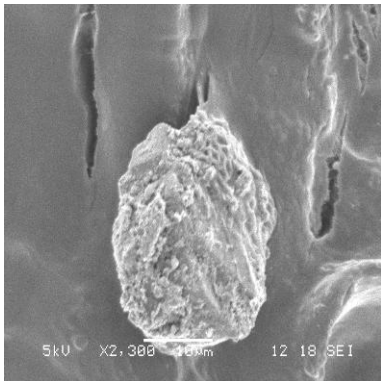
6.1.3 OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Afin de vérifier si les taches observées correspondent *a priori* à des développements microbiens, des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont été réalisées pour les six supports après 23 jours d'exposition (Photographie 10).

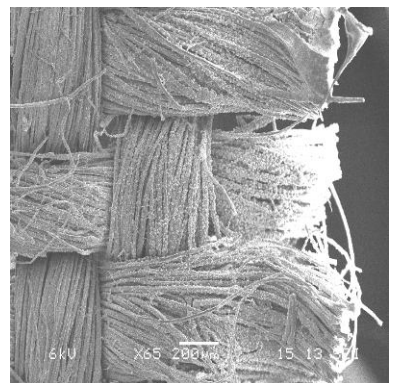
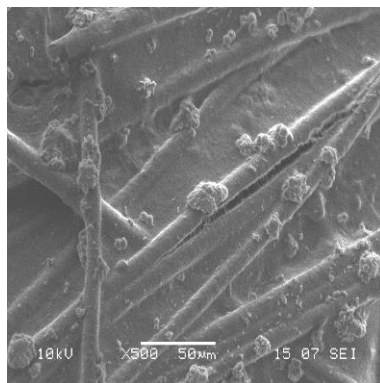
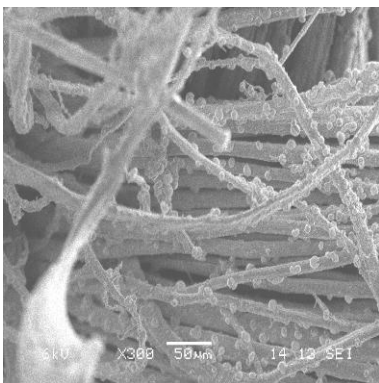
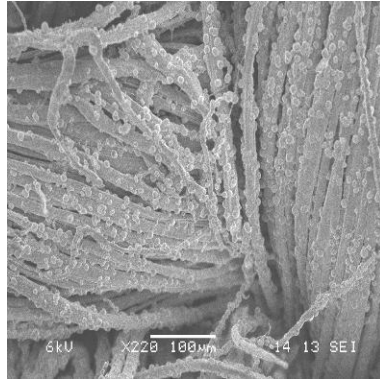
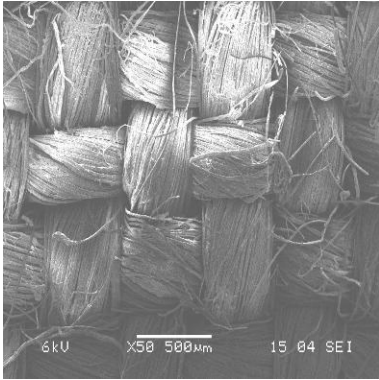
Toile de verre



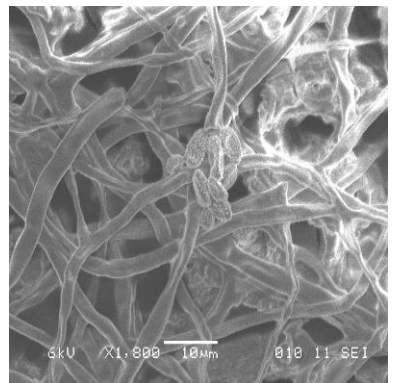
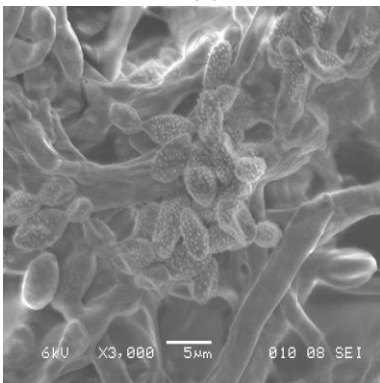
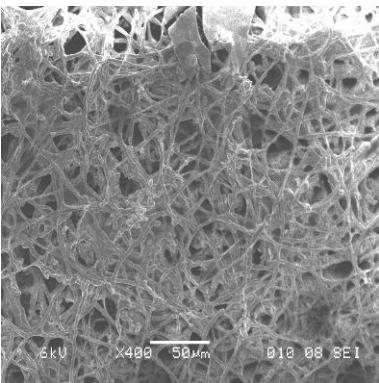
Papier peint



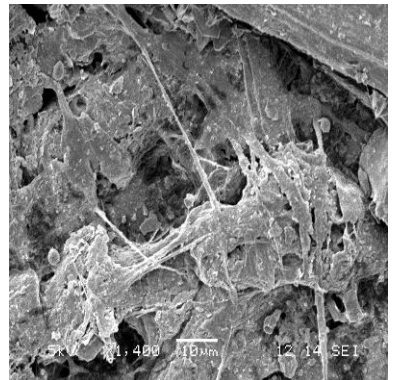
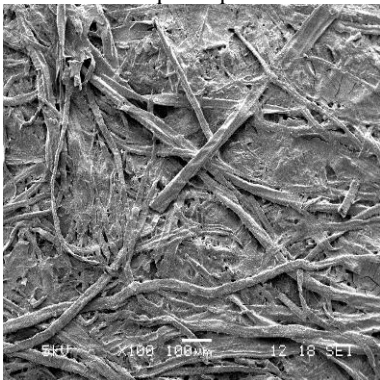
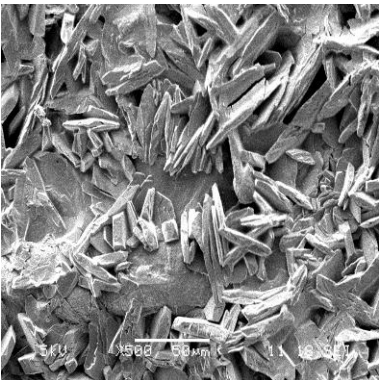
Lin

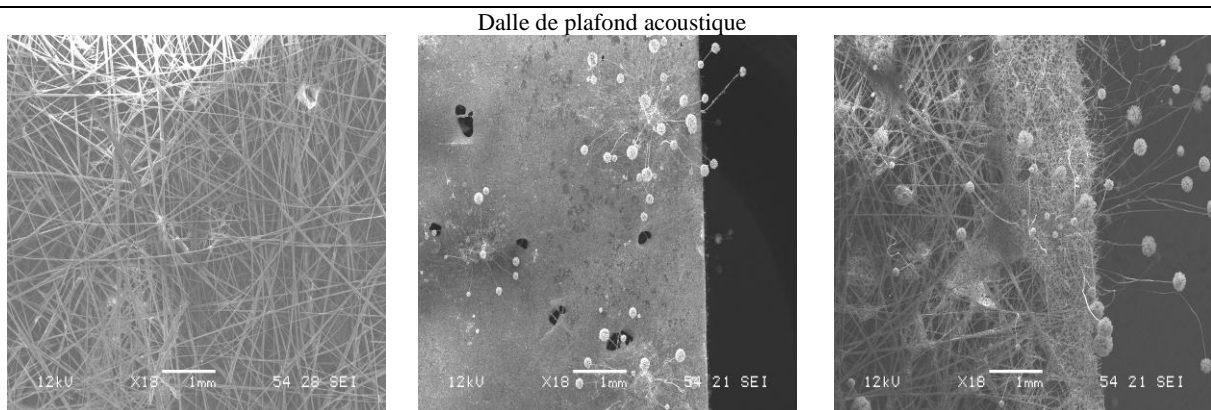


Bois



Plaque de plâtre





Photographie 10 : Images réalisées au MEB des supports de l'étude après 23 jours (T23) d'exposition

Les observations au MEB révèlent un développement sur la surface des six matériaux testés. Les développements observés sont de nature fongique (mycélium, spores et conidiophores) et bactérienne principalement sous forme de biofilm. Les analyses par culture et biologie moléculaire permettront l'identification des espèces observées.

6.1.4 CARACTERISATION DE LA MICROFLORE COLONISANT LES SUPPORTS

Ce chapitre présente la flore microbienne identifiée par méthode culturale et techniques de biologie moléculaire.

6.1.4.1 Caractérisation de la microflore par méthode culturale

Dénombrement des microorganismes

La Figure 11 représente le dénombrement des UFC/cm² de matériau pour les bactéries récupérées à la surface des six supports à T2, T7, T16, et T23.

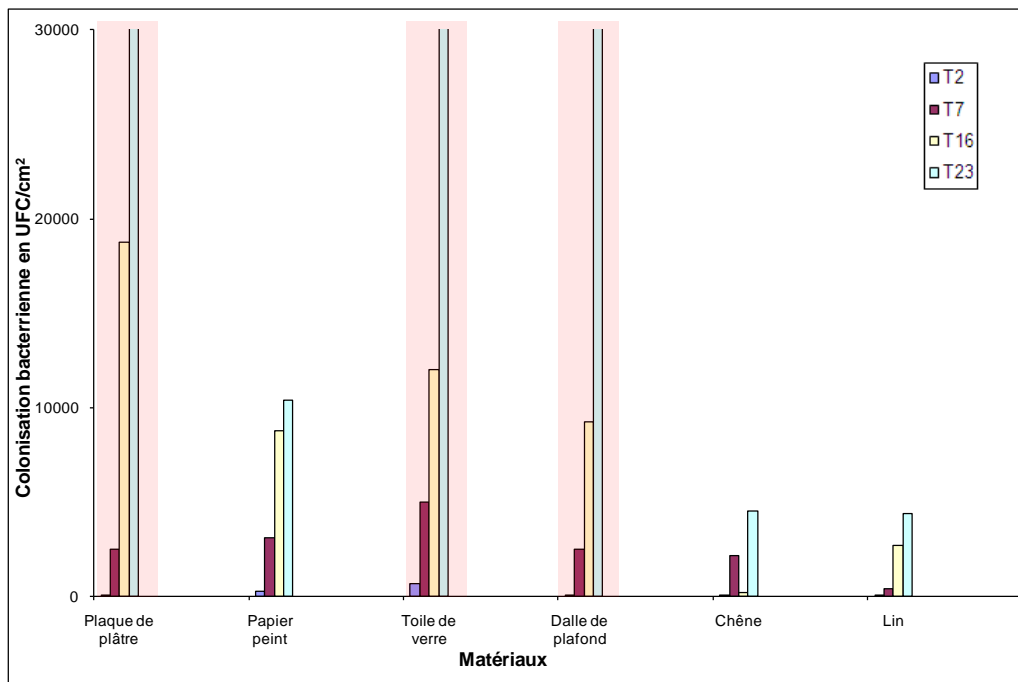


Figure 11 : Dénombrement des bactéries en UFC/cm² présentes à la surface des matériaux à T2, T7, T16, et T23.

La Figure 11 montre que, quel que soit le matériau considéré, la charge bactérienne augmente au cours du temps.

A la fin de l'expérimentation, les matériaux se divisent en deux groupes :

- Le groupe 1 (en rouge sur la figure), constitué de 3 matériaux (dalle de plafond, plaque de plâtre et toile de verre), présente une biomasse bactérienne très élevée à T23 (de $8 \cdot 10^4$ à supérieure à $3 \cdot 10^5$ UFC/cm²).
- Le groupe 2 composé du lin, du bois et du papier peint a une charge bactérienne plus faible (entre $4 \cdot 10^3$ et 10^4 UFC/cm²).

Après un mois d'exposition, l'augmentation de bactéries hétérotrophes (passant de $6 \cdot 10^2$ à plus de $3 \cdot 10^5$ UFC.cm²) a été constatée pour la toile de verre par exemple. Alors que pour le lin, matériau visiblement moins vulnérable, la charge bactérienne est passée de 30 à $4 \cdot 10^3$ UFC/cm².

La Figure 12 représente le dénombrement des UFC/cm² pour la flore fongique récupérée à la surface des différents matériaux à T2, T7, T16, et T23.

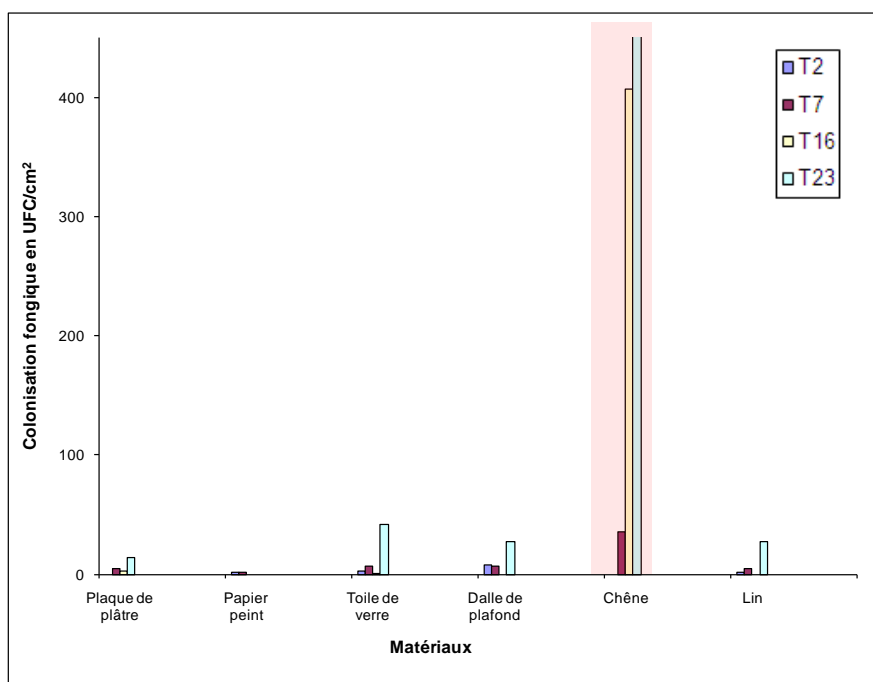


Figure 12 : Dénombrement de la flore fongique présente à la surface des matériaux à T2, T7, T16, et T23 (UFC/cm²).

Quel que soit le temps d'exposition, le nombre de spores viables récupéré à la surface du bois est élevé par rapport aux autres matériaux. En effet, à T23, le bois compte 2.10^3 UFC/cm² contre 0 à 40 UFC/cm² pour les autres matériaux. Afin de mieux visualiser la biomasse fongique présente à la surface de ces derniers, la Figure 13 reprend ces données en excluant le bois.

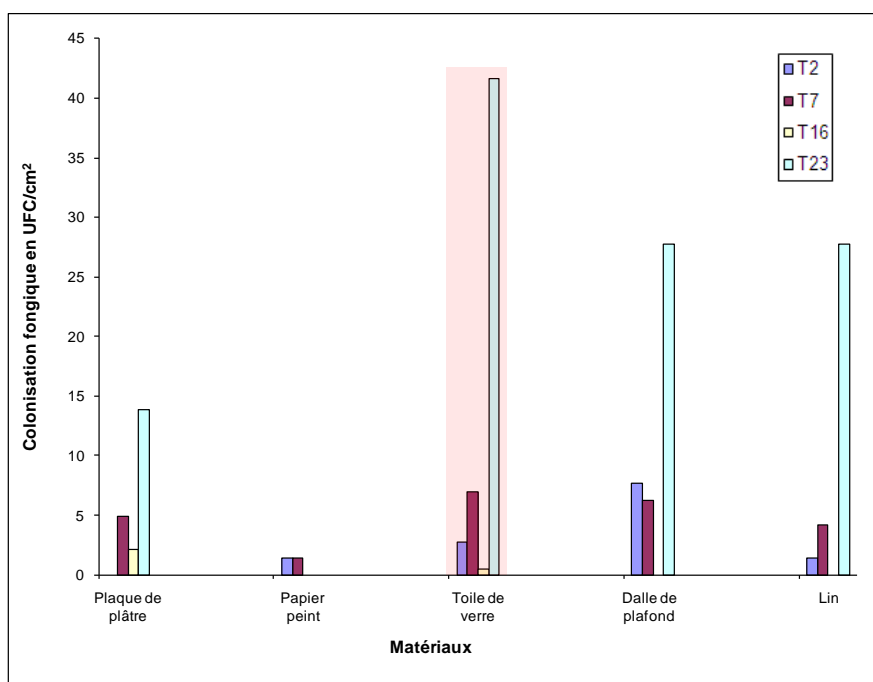

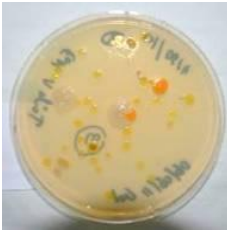
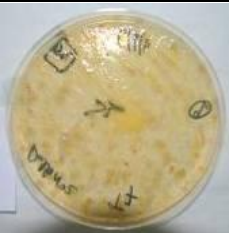
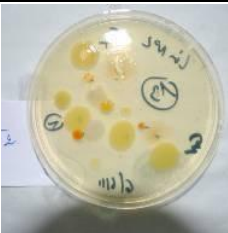





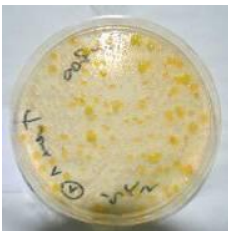


Figure 13 : Dénombrement de la flore fongique en UFC/cm² présents à la surface de la plaque de plâtre, du papier peint, de la toile de verre, de la dalle de plafond et du lin à T2, T7, T16, et T23.


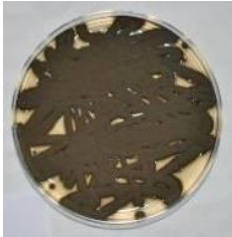

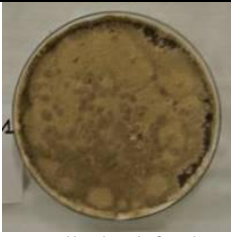




Hormis le papier peint, tous les matériaux sont colonisés, à des niveaux différents, par des moisissures. Après le bois, la toile de verre présente la plus forte contamination à T23 (42 UFC/cm²).

A ce stade, il est difficile, de déterminer un lien entre les contaminations fongiques et bactériennes. On peut tout de même noter que, sur l'ensemble des matériaux les concentrations fongiques sont plus faibles que celles des bactéries. On peut également signaler que certains matériaux (plaque de plâtre, toile de verre et dalle de plafond) permettent préférentiellement l'implantation des bactéries alors que le bois favorise le développement des moisissures.

Les Photographie 11 et Photographie 12 illustrent quelques exemples de microorganismes isolés à partir des échantillons.

Durée d'exposition	Bactéries isolées sur milieu nutritif		
T2	 <p data-bbox="715 920 751 947">Lin</p>	 <p data-bbox="1155 920 1289 947">Toile de verre</p>	
T7	 <p data-bbox="568 1178 734 1211">Dalle de plafond</p>	 <p data-bbox="959 1178 995 1211">Lin</p>	 <p data-bbox="1238 1178 1372 1211">Toile de verre</p>
T16	 <p data-bbox="651 1442 817 1476">Dalle de plafond</p>	 <p data-bbox="1155 1442 1289 1476">Toile de verre</p>	
T23	 <p data-bbox="632 1706 670 1738">Bois</p>	 <p data-bbox="959 1706 995 1738">Lin</p>	 <p data-bbox="1238 1706 1372 1738">Toile de verre</p>

Photographie 11 : Illustrations des bactéries isolées à partir des différentes éprouvettes

Durée d'exposition	Champignons isolés sur milieu à l'extrait de malt		
T2			
T7			
T16			
T23			

Photographie 12 : Illustrations de la flore fongique isolée à partir des différentes éprouvettes

Identification des microorganismes hétérotrophes

Les identifications des microorganismes présents sur les éprouvettes, ont été réalisées soit par le biais de galeries API pour les bactéries, soit par observations microscopiques pour les moisissures, sont regroupées dans les Tableau 10 et Tableau 11.

Tableau 10 : Identification des bactéries isolées à partir des éprouvettes

	Bactéries			
	T2	T7	T16	T23
Plaque de plâtre	<i>Micrococcaceae</i> (80%) <i>Bacillus sp.</i> (10%) BNI* (10%)	<i>Bacillus spp.</i> (60%) <i>Brevundimonas vesicularis</i> (40%)	<i>Bacillus sp.</i> (100%)	<i>Bacillus spp.</i> (100 %)
Papier peint	<i>Bacillus spp.</i> (60%) BNI* (40%)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (40%) <i>Bacillus sp.</i> (10%) BNI* (50%)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (60%) <i>Micrococcaceae</i> (40%)	<i>Bacillus sp.</i> (60%) <i>Micrococcaceae</i> (40%)
Toile de verre	<i>Bacillus spp.</i> (70%) <i>Micrococcaceae</i> (10%) BNI* (20%)	<i>Bacillus spp.</i> (70%) BNI* (30%)	<i>Bacillus spp.</i> (50%) BNI* (50%)	<i>Bacillus spp.</i> (100%)
Dalle de plafond	Indéterminé	<i>Bacillus spp.</i> (100%)	<i>Bacillus sp.</i> (20%) <i>Pseudomonas oryzae</i> (20%) BNI* (60%)	<i>Bacillus sp.</i> (10%) <i>Brevundimonas vesicularis</i> (50%) <i>Pseudomonas sp.</i> (40%)
Bois	Indéterminé	<i>Bacillus spp.</i> (50%) <i>Brevundimonas vesicularis</i> (20%) <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (30%)	<i>Bacillus sp.</i> (33%) BNI* (67%)	<i>Bacillus sp.</i> (100%)
Lin	<i>Bacillus sp.</i> (70%) BNI* (30%)	<i>Bacillus spp.</i> (50%) BNI* (50%)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (70%) <i>Chryseobacterium sp.</i> (20%) BNI* (10%)	<i>Bacillus sp.</i> (70%) BNI* (30%)

BNI* : Bactérie non identifiée

Tableau 11 : Identification des champignons isolés à partir des éprouvettes

	Moisissures			
	T2	T7	T16	T23
Plaque de plâtre	0	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
Papier peint	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i> Souche blanche : indéterminée	0	0
Toile de verre	<i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Ulocladium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i> Souche noire : indéterminée	<i>Cladosporium sp.</i>	Souche noire : indéterminée
Dalle de plafond	<i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>	0	<i>Cladosporium sp.</i>
Bois	0	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Aurebasidium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>	<i>Aurebasidium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>
Lin	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i> Souche blanche : indéterminée	0	<i>Cladosporium sp.</i>

La diversité des espèces bactériennes et eucaryotes isolées des différents matériaux demeure faible, néanmoins le genre *Cladosporium sp.* pour les champignons et l'espèce *Bacillus spp.* pour les bactéries sont dominants.

La diversité microbienne des espèces procaryotes et eucaryotes évolue au cours du temps. Les genres et espèces identifiés sont fréquemment rencontrés dans l'environnement (air, sols...).

6.1.4.2 Caractérisation de la microflore par méthodes moléculaires

Lors de cette campagne, six supports différents ont été exposés à l'air « tout venant » pendant 23 jours. Les analyses par PCR temps réel ont permis une vision quantitative de la contamination

microbienne de ces supports. Afin d'évaluer la charge microbienne présente dans l'air, des prélèvements atmosphériques sur filtre ont été réalisés et analysés par PCRq.

Etude de la microflore de l'air

La première étape a consisté à quantifier les microorganismes présents dans l'air durant l'essai. Ainsi, des mesures intégrées ont été réalisées sur 23 jours. La Figure 14 montre l'évolution de la quantité d'eucaryotes au cours du temps.

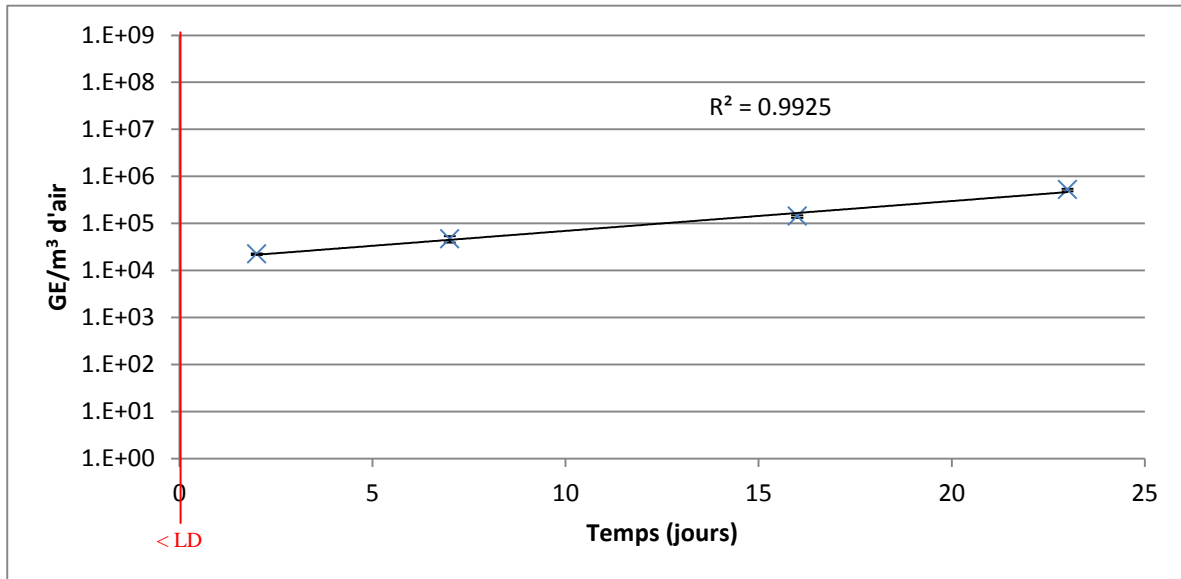


Figure 14 : Evolution de la concentration moyenne d'Eucaryotes dans l'air au cours du temps.

Le filtre ayant été préalablement autoclavé, à T0, la concentration en eucaryote est, comme attendue, inférieure à la limite de détection ($LD < 10^3 \text{ GE/m}^3$). La concentration d'eucaryotes dans l'air augmente de façon exponentielle au cours du temps. L'absence de linéarité montre des taux de charges en particules fongiques plus élevés à la fin de l'essai. Lors d'une étude réalisée au Louvre en 2012, Gaüzère *et al.* a montré une stabilité des concentrations fongiques sur une période de 6 mois (la variation observée était inférieure à un log) (Gaüzère, 2012). La forte augmentation constatée ici, en fin d'essai, peut s'expliquer par la présence de sources endogènes liées aux développements fongiques sur les supports d'étude.

En ce qui concerne les bactéries, la Figure 15 présente l'évolution de leur concentration dans l'air durant l'essai.

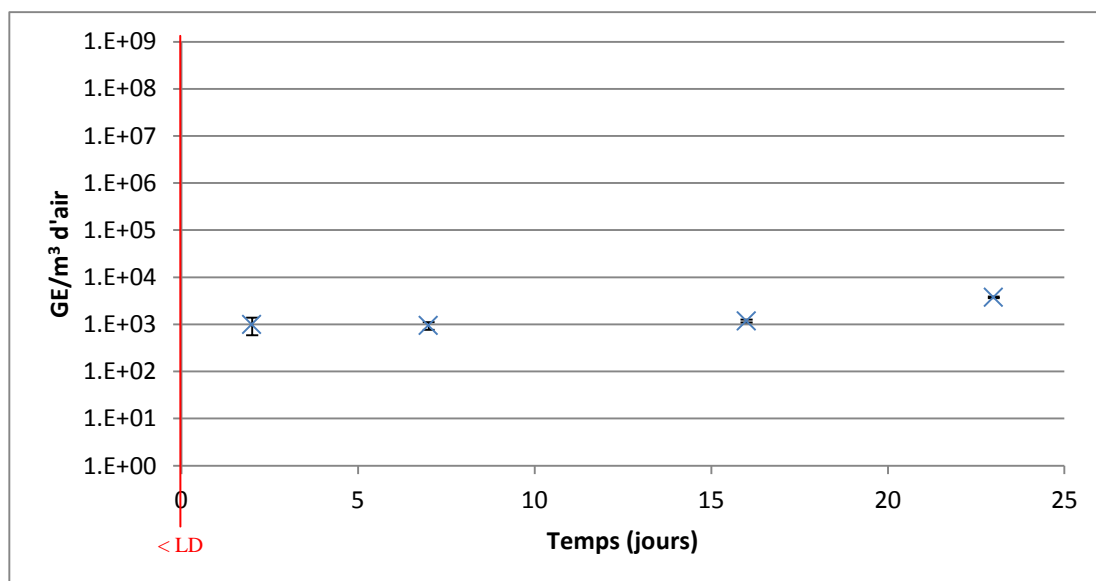


Figure 15 : Evolution de la concentration moyenne de bactéries dans l'air au cours du temps.

Le filtre ayant été préalablement autoclavé, à T0, la concentration en bactéries est, comme attendue, inférieure à la limite de détection ($LD < 10^2 \text{ GE/m}^3$). Contrairement aux eucaryotes, la concentration en bactéries est stable avec une variation inférieure à un log. Ici, les éventuels développements bactériens sur les supports ne sont pas mesurés dans l'air. Cette stabilité dans le temps a été observée lors de l'étude de Gaüzère réalisée au Louvre en 2012 (Gaüzère, 2012).

Evolution du développement microbien sur les supports (PCRq)

Eucaryotes :

Les Figure 16 à 16 présentent l'évolution au cours du temps de la concentration en eucaryotes pour les six supports testés.

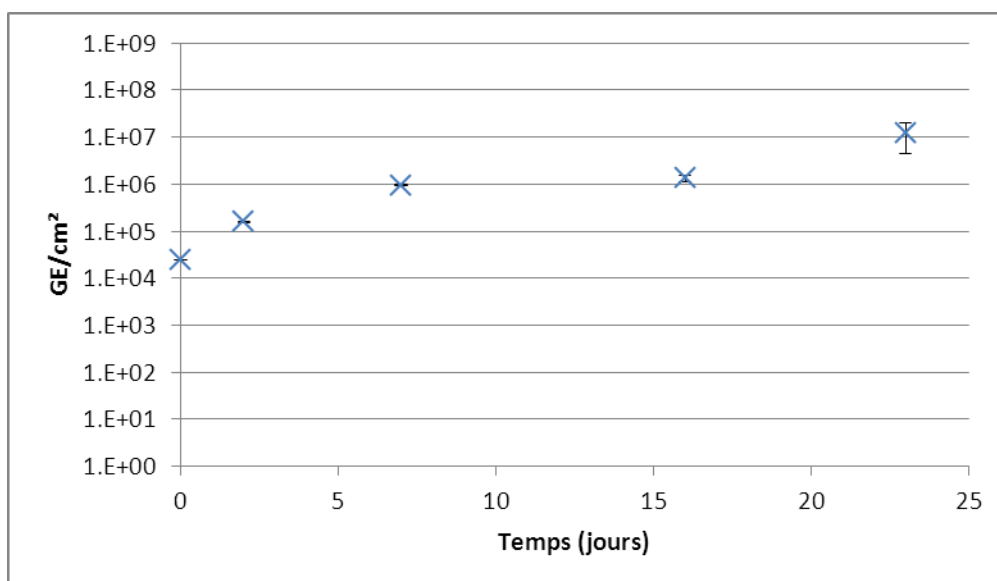


Figure 16 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur toile de verre au cours du temps.

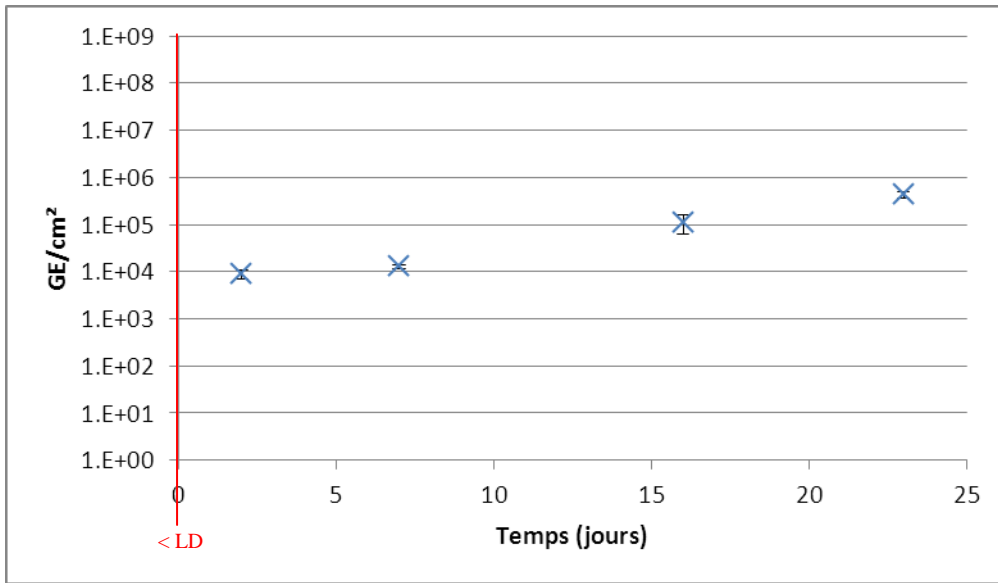


Figure 17: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur papier peint au cours du temps.

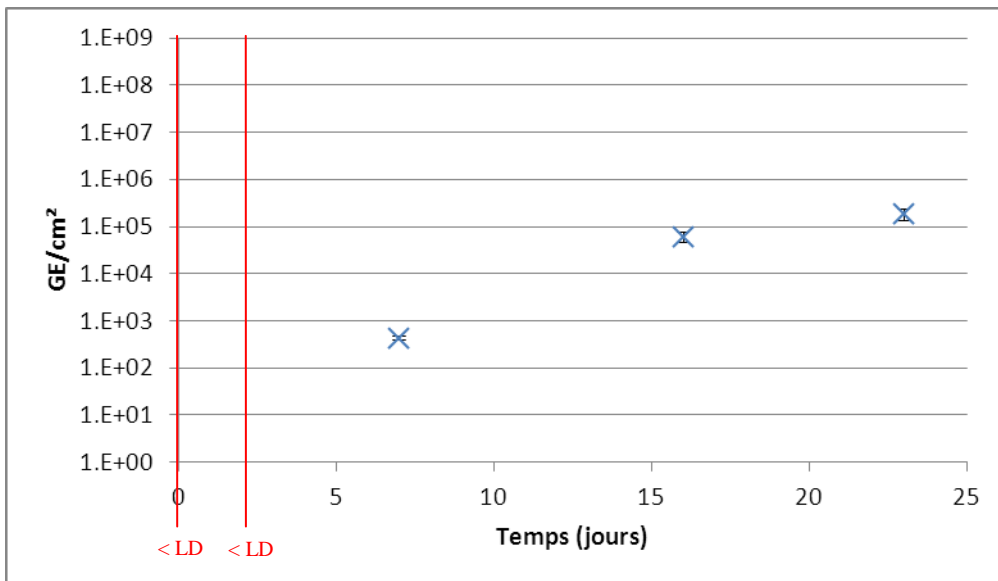


Figure 18: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur dalle de plafond au cours du temps.

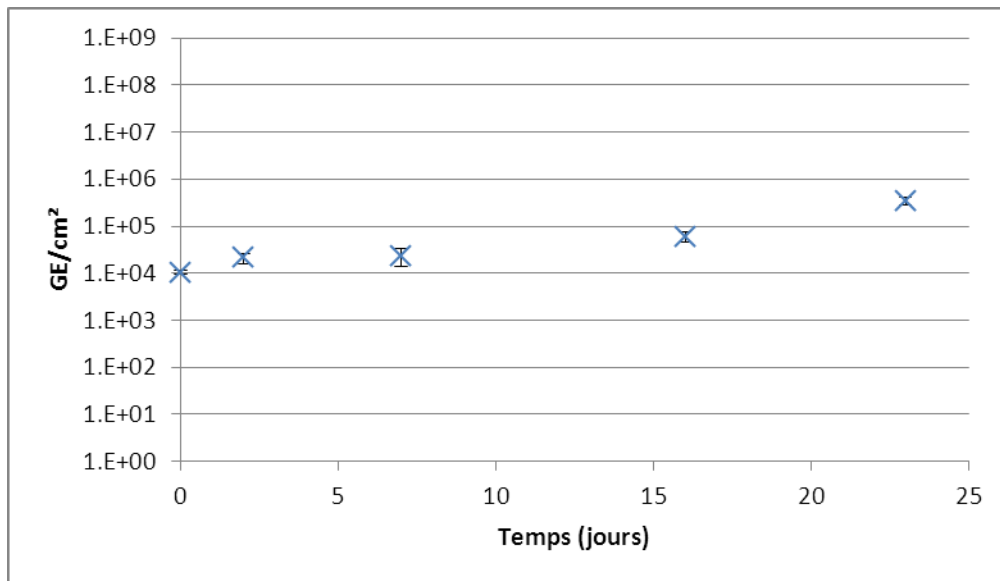


Figure 19 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur lin au cours du temps.

La croissance eucaryote présente une allure exponentielle tout au long de l'essai sur les supports (Figure 16, Figure 17, Figure 18, Figure 19) excepté pour le bois et la plaque de plâtre. Pour ces deux derniers supports, une concentration maximale est atteinte à 16 jours puis une diminution de la concentration est observée à 23 jours. Une des hypothèses pour expliquer cette décroissance est un déficit en nutriments disponibles engendrant un ralentissement de la croissance fongique (Figure 20 et Figure 21).

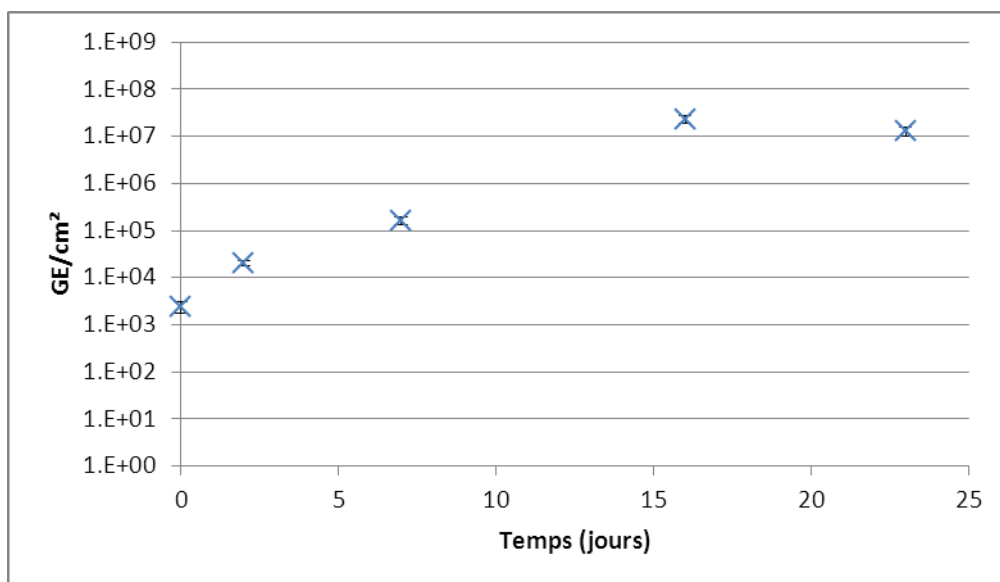


Figure 20: Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur bois au cours du temps.

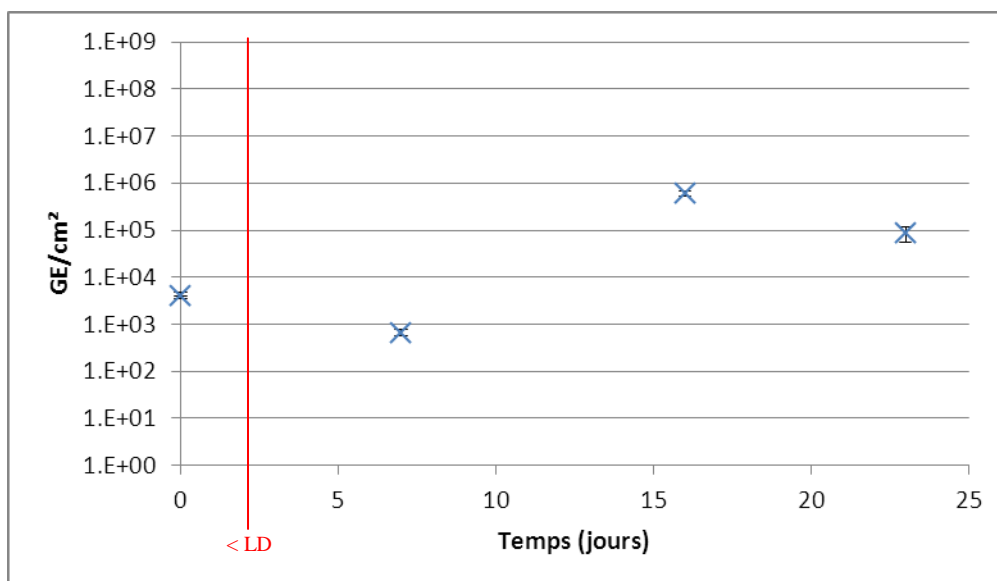


Figure 21 : Evolution de la concentration moyenne en eucaryotes sur plaque de plâtre au cours du temps.

Le Tableau 12 précise les concentrations maximales obtenues pour chaque support et la durée d'exposition correspondante.

Tableau 12 : Concentrations moyennes eucaryotes maximales atteintes sur chaque support pendant 23 jours

Support	Concentration maximale (GE/cm ²)	Durée à laquelle la concentration maximale est mesurée (jours)
Toile de verre	1,21.10 ⁷ GE/cm ²	23
Papier-peint	4,24.10 ⁵ GE/cm ²	23
Dalle de plafond	1,82.10 ⁵ GE/cm ²	23
Bois	2,32.10 ⁷ GE/cm ²	16
Lin	3,48.10 ⁵ GE/cm ²	23
Plaque de plâtre	6,01.10 ⁵ GE/cm ²	16

Ainsi, les concentrations les plus élevées ont été mesurées sur le bois (2,32.10⁷ GE/cm²) et la toile de verre (1,21.10⁷ GE/cm²). Les autres supports présentent des concentrations de l'ordre de 10⁵ GE/cm².

Bactéries :

Les Figure 22 à Figure 27 présentent l'évolution de la concentration bactérienne sur les six supports testés.

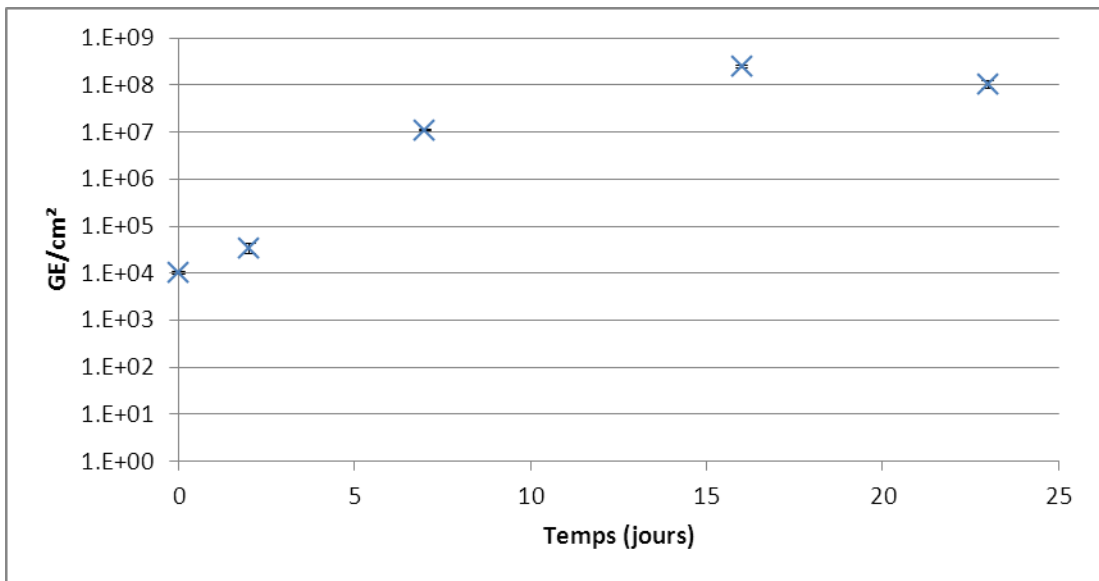


Figure 22 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur toile de verre au cours du temps.

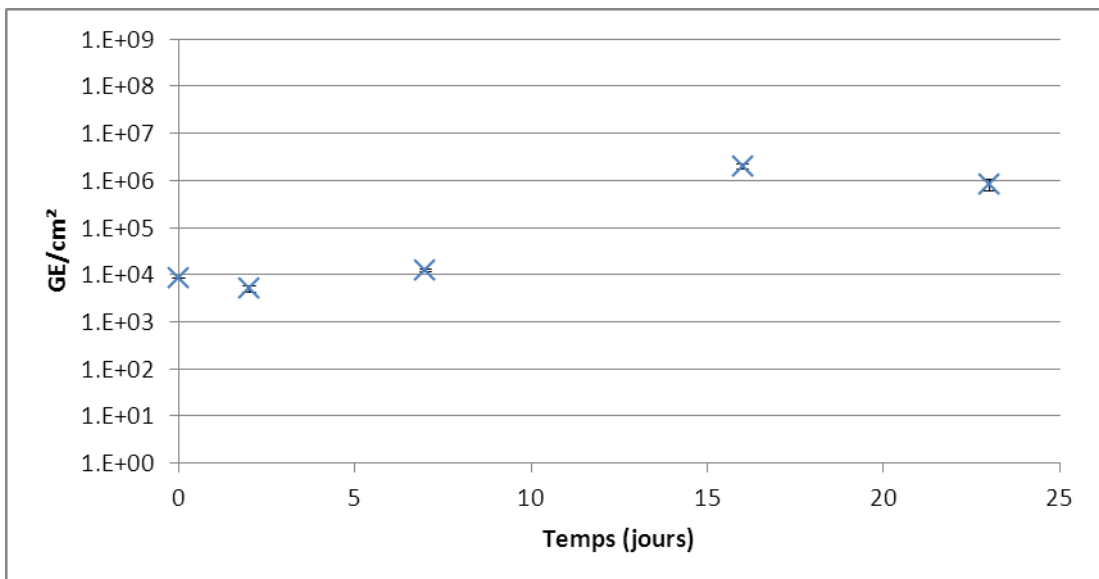


Figure 23 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur papier-peint au cours du temps.

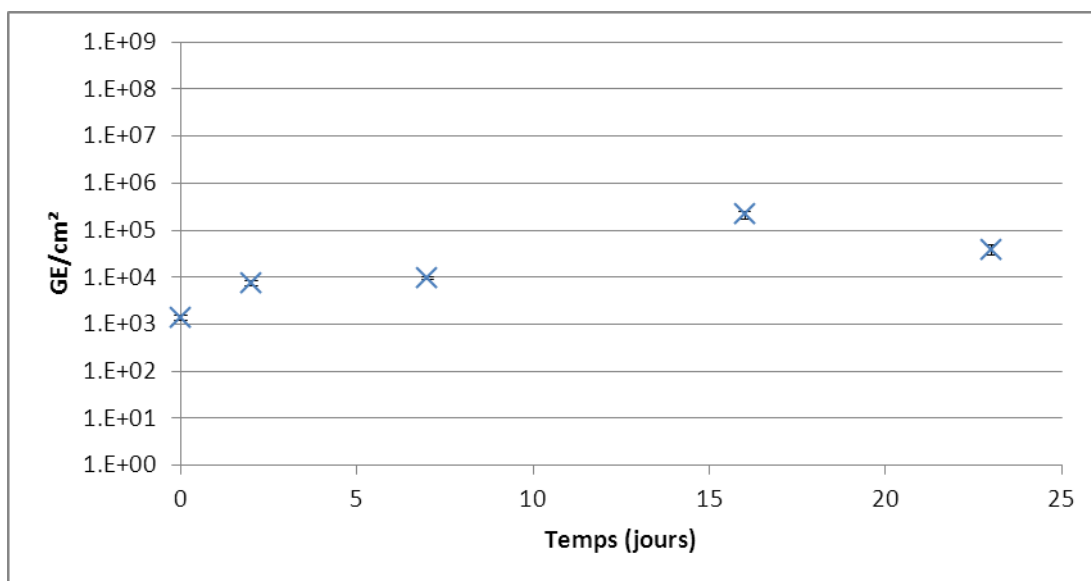


Figure 24 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur bois au cours du temps.

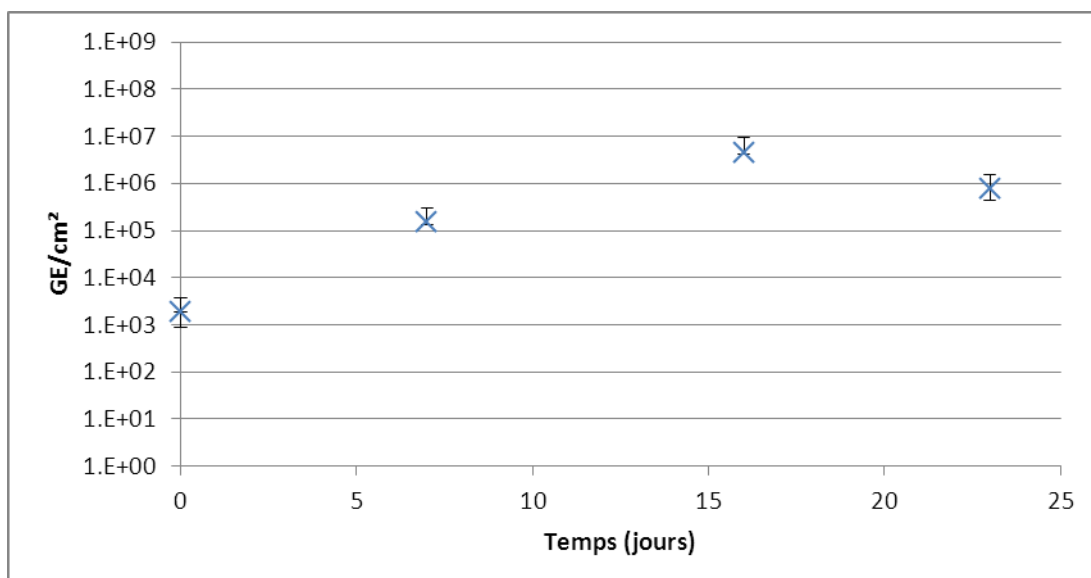


Figure 25 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur plaque de plâtre au cours du temps.

Contrairement aux eucaryotes, la population bactérienne de la plupart des supports testés (4 sur 6) diminue après 16 jours. Pour les deux autres supports, à savoir le lin et la dalle de plafond, leur concentration en bactéries augmente sur toute la durée de l'essai, avec néanmoins une augmentation pour la dalle de plafond moindre par rapport au lin (Figure 26 et Figure 27).

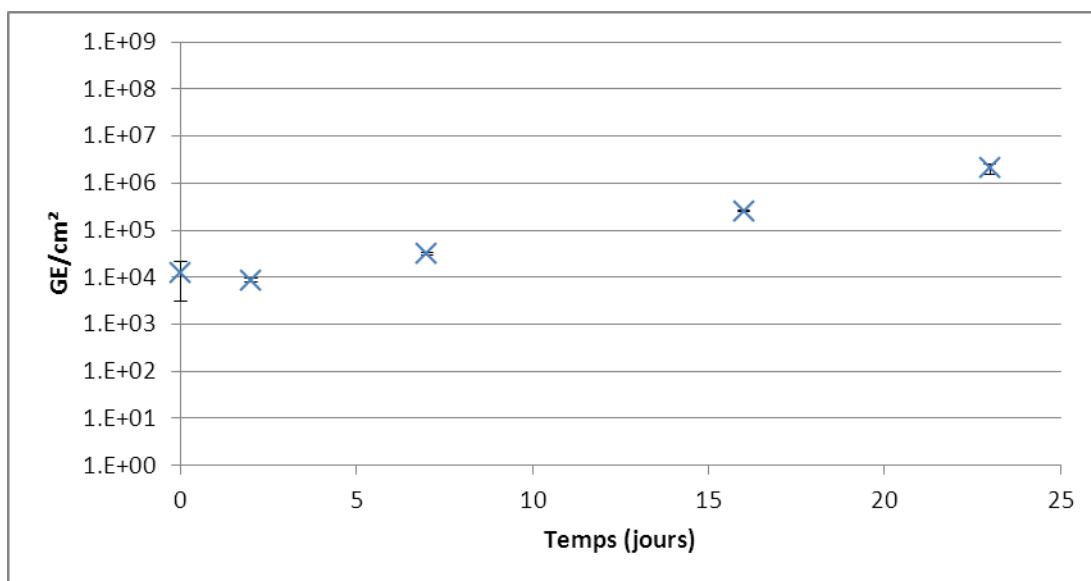


Figure 26 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur lin au cours du temps.

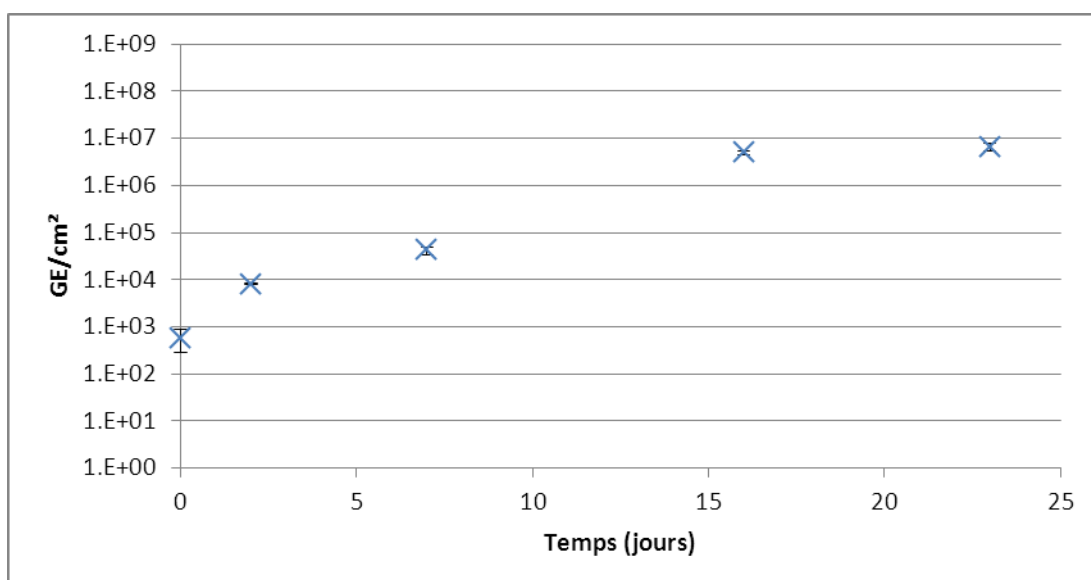


Figure 27 : Evolution de la concentration moyenne en bactéries sur dalle de plafond au cours du temps.

Le Tableau 13 présente les concentrations bactériennes maximales pour chaque matériau et la durée d'exposition à l'issue de laquelle elle a été mesurée.

Tableau 13 : Concentrations moyenne maximales en bactéries atteintes sur chaque support

Support	Concentrations maximales (GE/cm²)	Durée à laquelle la concentration maximale est mesurée (jours)
Toile de verre	$2,45.10^8$ GE/cm²	16
Papier-peint	$2,00.10^6$ GE/cm²	16
Dalle de plafond	$6,53.10^6$ GE/cm²	23
Bois	$2,16.10^5$ GE/cm²	16
Lin	$2,04.10^6$ GE/cm²	23
Plaque de plâtre	$4,59.10^6$ GE/cm²	16

Ainsi, la concentration maximale est obtenue sur la toile de verre ($2,48.10^8$ GE/cm²). Contrairement aux eucaryotes, le bois est le support présentant la concentration la plus faible ($2,16.10^5$ GE/cm²). Les autres supports présentent, quant à eux, des concentrations maximales de l'ordre de 10^6 GE/cm² (Tableau 13).

Le Tableau 14 récapitule les concentrations microbiennes maximales obtenues lors de ces essais pour chaque support.

Tableau 14 : Récapitulatif des concentrations moyennes maximales de chaque population

Supports	Eucaryotes	Bactéries
Toile de verre	$1,21.10^7$ GE/cm ²	$2,45.10^8$ GE/cm ²
Papier-peint	$4,24.10^5$ GE/cm ²	$2,00.10^6$ GE/cm ²
Dalle de plafond	$1,82.10^5$ GE/cm ²	$6,53.10^6$ GE/cm ²
Bois	$2,32.10^7$ GE/cm ²	$2,16.10^5$ GE/cm ²
Lin	$3,48.10^5$ GE/cm ²	$2,04.10^6$ GE/cm ²
Plaque de plâtre	$6,01.10^5$ GE/cm ²	$4,59.10^6$ GE/cm ²

L'étude de la vulnérabilité relative entre les supports permet les observations suivantes :

Tous les supports présentent une vulnérabilité similaire vis-à-vis des moisissures et des bactéries, à l'exception de la toile de verre et du bois,

La toile de verre présente une forte contamination bactérienne alors que le bois, support le plus vulnérable vis-à-vis des moisissures, présente la contamination bactérienne la plus faible.

La Campagne 1 a permis d'identifier deux supports particulièrement vulnérables vis-à-vis des moisissures : le bois et la toile de verre. Ces supports ont été retenus pour la Campagne 2 afin d'étudier la dynamique de colonisation microbienne.

6.2 CAMPAGNE 2 : ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE COLONISATION DES SUPPORTS

Afin d'accéder à la dynamique de colonisation des deux supports retenus, la fréquence de prélèvements des éprouvettes a été augmentée par rapport à la Campagne 1.

Par ailleurs, le mode de contamination adopté pour cette nouvelle campagne diffère de celui adopté jusque-là. Ainsi, au lieu d'être exposées à l'air « tout venant » durant l'essai, les éprouvettes ont été contaminées par impaction, puis incubées en chambres stériles pendant 11 jours.

Cette stratégie de contamination permet de s'affranchir des variations, en termes de concentration et d'espèces microbiennes, inhérentes à une exposition de plusieurs jours. Trois essais successifs ont permis de prendre en compte la répétabilité des mesures.

L'évolution des concentrations fongiques et bactériennes a été estimée par PCRq sur les deux supports et est présentée en Figure 28 à 26.

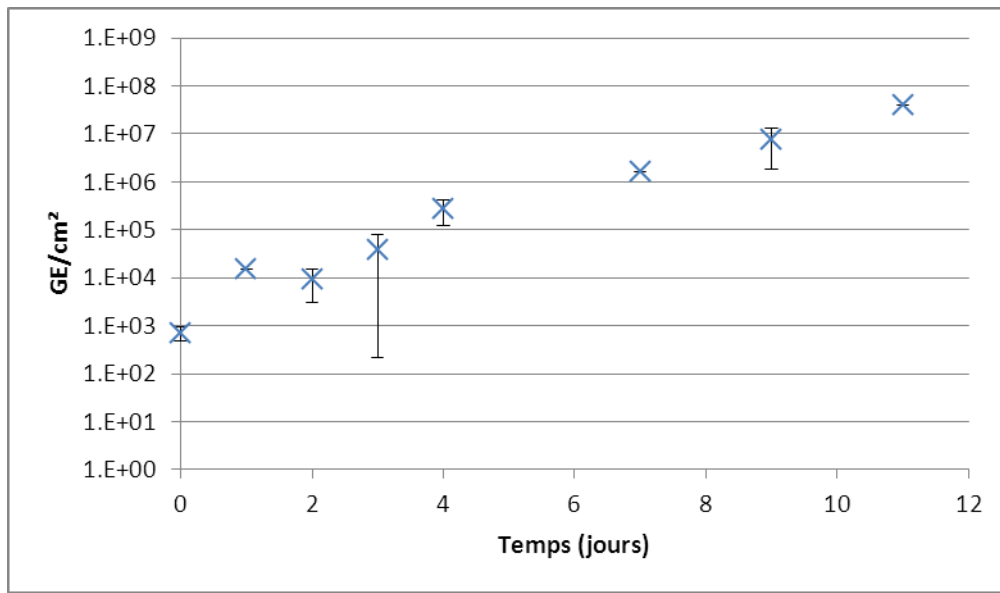


Figure 28 : Evolution de la concentration en eucaryotes sur toile de verre au cours du temps.

La **croissance fongique** sur la toile de verre débute dès le premier jour d'incubation et présente un profil exponentiel tout au long de l'essai avec une concentration maximale mesurée de $4,10.10^7$ GE/cm² mesurée après 11 jours d'incubation. Le même profil de courbe a été observé sur les deux autres essais.

Lors de la Campagne 1, la croissance visible n'avait débuté qu'après 16 jours d'exposition. Il est probable que les conditions d'incubation stables et optimales pour le développement fongique, durant la Campagne 2, expliquent la vitesse de croissance accélérée constatée.

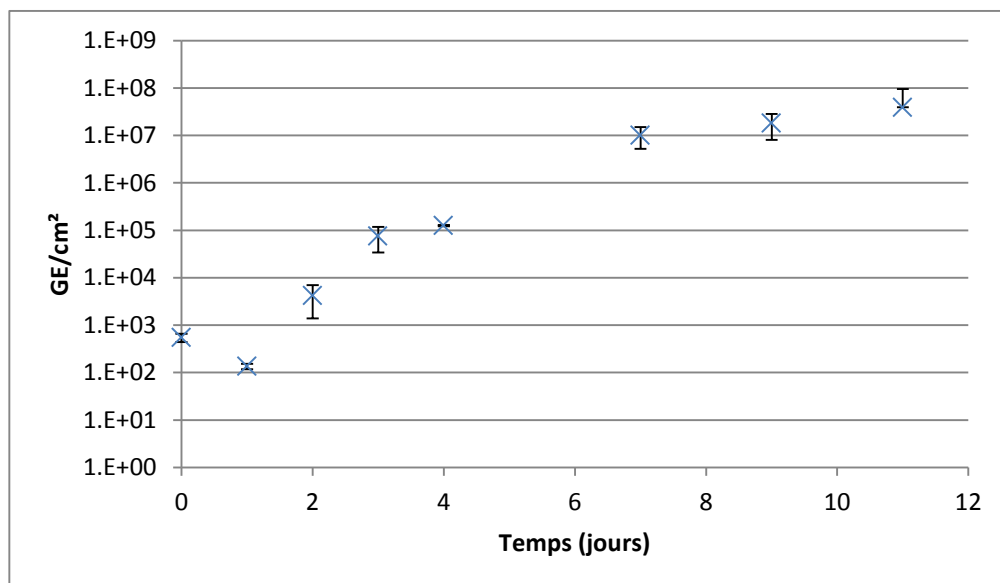


Figure 29 : Evolution de la concentration en eucaryotes sur bois au cours du temps.

Sur le bois, la concentration en eucaryotes mesurée présente un profil exponentiel jusqu'à neuf jours avec une concentration maximale égale à $1,20.10^7$ GE/cm². Dès lors, cette concentration décroît avec une valeur de $4,38.10^6$ GE/cm² à onze jours. Cette décroissance avait également été observée lors de la Campagne 1.

Si, comparé à la Campagne 1, le développement commence plus rapidement dans la Campagne 2, avec 1 jour contre 7, dans les deux cas, on observe une chute de la population eucaryote neuf jours après le début de la croissance soit respectivement 9 et 16 jours pour les Campagnes 1 et 2. Les cinétiques de croissance sont donc variables d'une campagne à l'autre mais les tendances restent les mêmes.

Les Figure 30 et 26 présentent l'évolution de la **croissance bactérienne** pour le bois et la toile de verre.

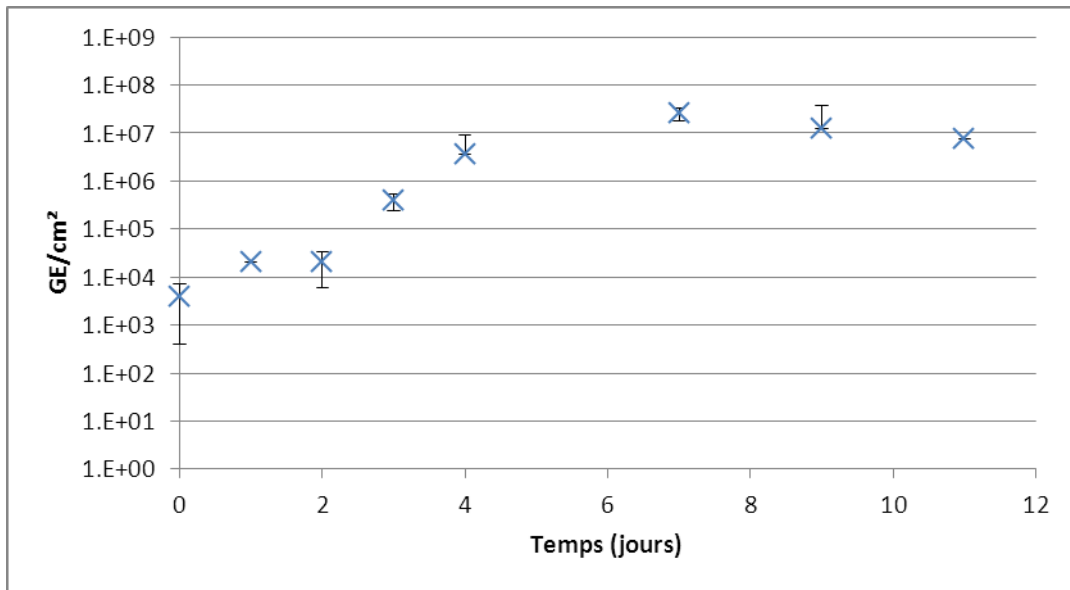


Figure 30 : Evolution de la concentration en bactéries sur toile de verre au cours du temps

La croissance bactérienne sur la toile de verre débute dès le premier jour, et présente un profil exponentiel jusqu'au neuvième jour avec une concentration maximale de $3,65 \cdot 10^7$ GE/cm². Dès lors, une décroissance est observée, la concentration ayant une valeur de $7,58 \cdot 10^6$ GE/cm² après 11 jours d'incubation.

A noter, qu'un profil identique avait été observé pour l'évolution de la concentration bactérienne en Campagne 1 avec néanmoins un décalage, la croissance débutant au 2^{ème} jour d'exposition pour croître de manière exponentielle jusqu'à 16 jours d'exposition puis décroître entre 16 et 23 jours. Ces mêmes observations ont été faites sur les deux autres essais.

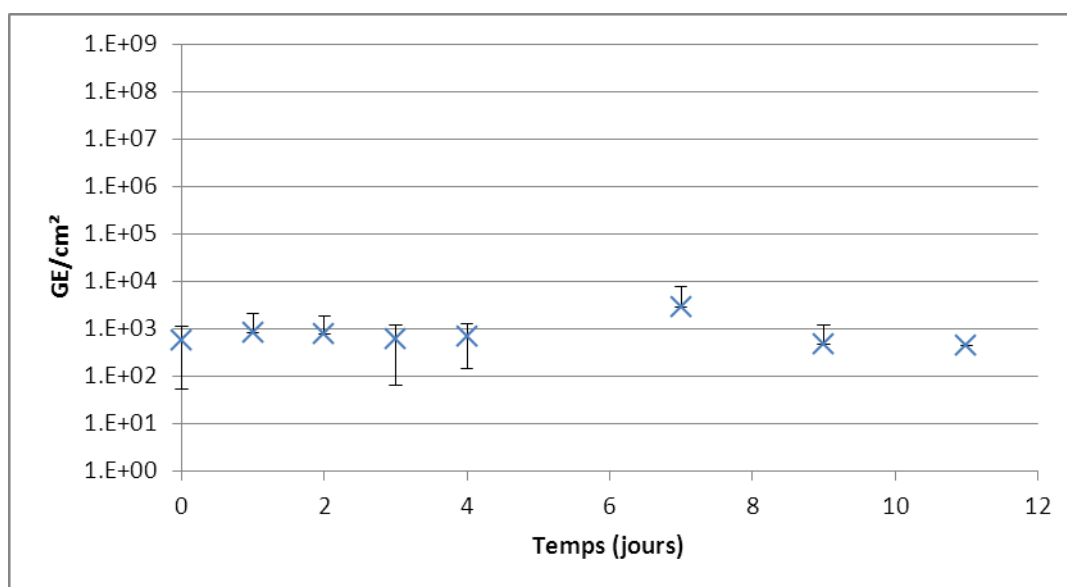


Figure 31 : Evolution de la concentration en bactéries sur bois au cours du temps.

En ce qui concerne le **développement bactérien sur le bois**, l'évolution est stable tout au long de l'essai (Figure 31), il n'y a donc pas de similitudes avec la Campagne 1. En effet, le développement bactérien débutait après six jours d'exposition puis avait un profil exponentiel jusqu'à 16 jours avant de décroître.

Lors de la présente campagne, la croissance a débuté après 1 à 2 jours d'incubation exceptée pour l'un des essais pour lequel elle a démarré après 7 jours. Cette différence est probablement liée au fait que les éprouvettes de bois utilisées pour cet essai n'avaient pas été préalablement rincées. Or le rinçage permet de lessiver une partie des tanins, substances naturellement présentes dans des végétaux ou encore certains cuirs et dont les propriétés fongistatiques ont été démontrés notamment par (Hyde *et al.*, 1951).

Les concentrations maximales atteintes pour chacun des essais visant à étudier l'évolution microbienne sur les deux types de support sont reportées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Concentrations maximales atteintes lors de chaque essai (exprimé en GE/cm²).

	Toile de verre		Bois	
	Eucaryotes	Bactéries	Eucaryotes	Bactéries
Essai 1	1,25.10 ⁷ (9 jours)	2,08.10 ⁷ (7 jours)	9,38.10 ⁶ (9 jours)	1,96.10 ³ (7 jours)
Essai 2	9,73.10 ² (7 jours)	1,13.10 ⁷ (4 jours)	7,38.10 ⁷ (11 jours)	7,94.10 ³ (7 jours)
Essai 3	4,10.10 ⁷ (11 jours)	3,65.10 ⁷ (9 jours)	1,20.10 ⁷ (9 jours)	1,11.10 ³ (4 jours)

A l'exception de l'essai 2 sur toile de verre et moisissures (surligné en jaune dans le tableau), les *maxima* atteints sont homogènes, les valeurs atteintes variant de moins d'un log. Le bois, vulnérable aux moisissures, l'est peu vis-à-vis des bactéries.

Malgré le retard de développement fongique, observé sur le bois lors de l'essai 1 en présence de tanin, la concentration maximale atteinte sur cet essai est équivalente à celles observées lors des essais 2 et 3 (concentrations et durées similaires). Ainsi si la présence des tanins semble différer le début de croissance, il ne semble pas influencer sur l'ampleur de la prolifération fongique.

En ce qui concerne les bactéries, les concentrations restent stables sur les 3 essais, avec une concentration maximale plus élevée sur Toile de verre (2,29.10⁷ GE/cm²) que sur bois (3,67.10³GE/cm²), comme préalablement observé lors de la Campagne 1.

Les concentrations eucaryotes maximales obtenues sont du même ordre de grandeur dans les deux campagnes, néanmoins, les concentrations bactériennes sont moins élevées en Campagne 2.

6.3 DIVERSITE MICROBIENNE PAR APPROCHE MOLECULAIRE

Préalablement au pyroséquençage 454, l'ensemble des échantillons a subi une analyse CE-SSCP, afin d'en évaluer la diversité microbienne.

Campagne 1

La CE-SSCP a permis de suivre la dynamique de colonisation des six supports de la Campagne 1 jusqu'à 23 jours, et de comparer la diversité retrouvée sur les produits de construction et/ou de décoration à celle de l'air collecté sur filtre (FIL). Les Figure 32 et Figure 33 montrent, pour exemple, les profils obtenus à 16 jours pour les eucaryotes et 23 jours pour les bactéries.

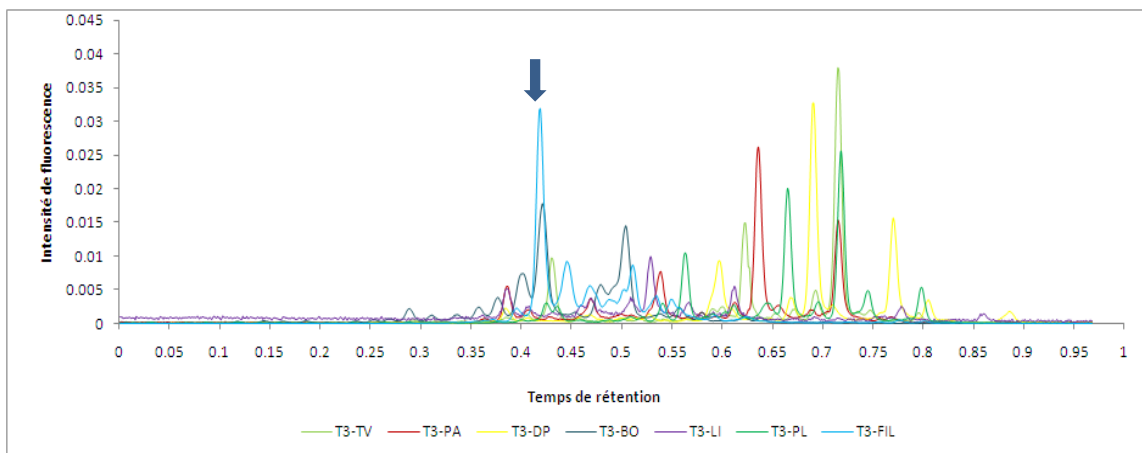


Figure 32 : Profils CE-SSCP Eucaryotes à 16 jours de colonisation (BO-bois ; DP-dalle de plafond ; FIL-air ; LI-lin ; PA-papier peint ; PL-plaque de plâtre ; Tv-toile de verre)

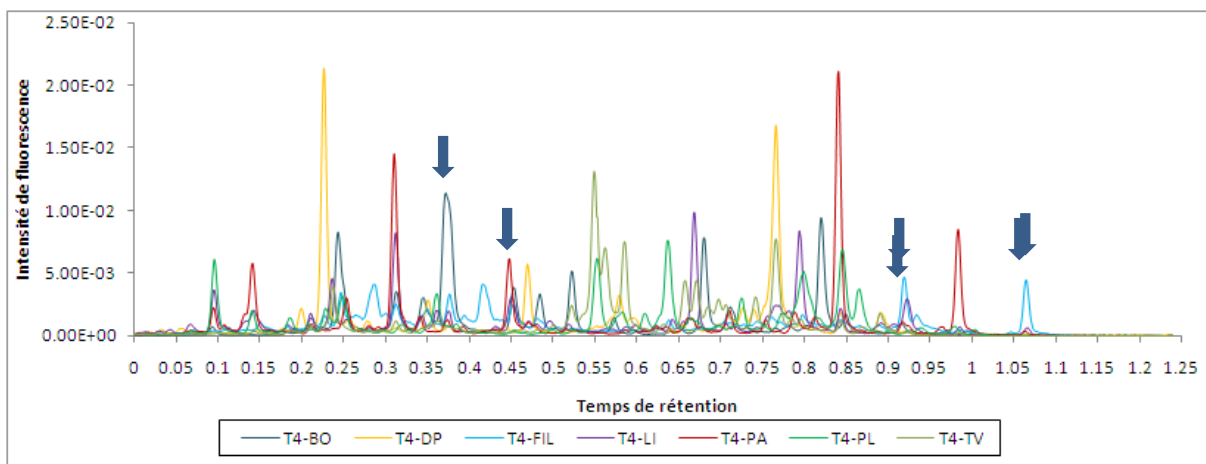


Figure 33 : Profils CE-SSCP Bactéries à 23 jours de colonisation (BO-bois ; DP-dalle de plafond ; FIL-air ; LI-lin ; PA-papier peint ; PL-plaque de plâtre ; Tv-toile de verre)

Un indice de diversité (le logarithme négatif de Simpson) a été calculé en utilisant le logiciel StatFingerprints à partir des différents profils CE-SSCP. Cet indice de diversité, est un indicateur qui englobe deux notions : la richesse et l'abondance relative de chaque espèce. Le nombre de pics majoritaires, mettant en évidence le nombre d'espèces dominantes, est également calculé et présenté.

Les Figure 34 et Figure 35 présentent les variations de l'indice de Simpson et du nombre de pics dominants sur les temps considérés, sur les supports à T0 et dans l'air.

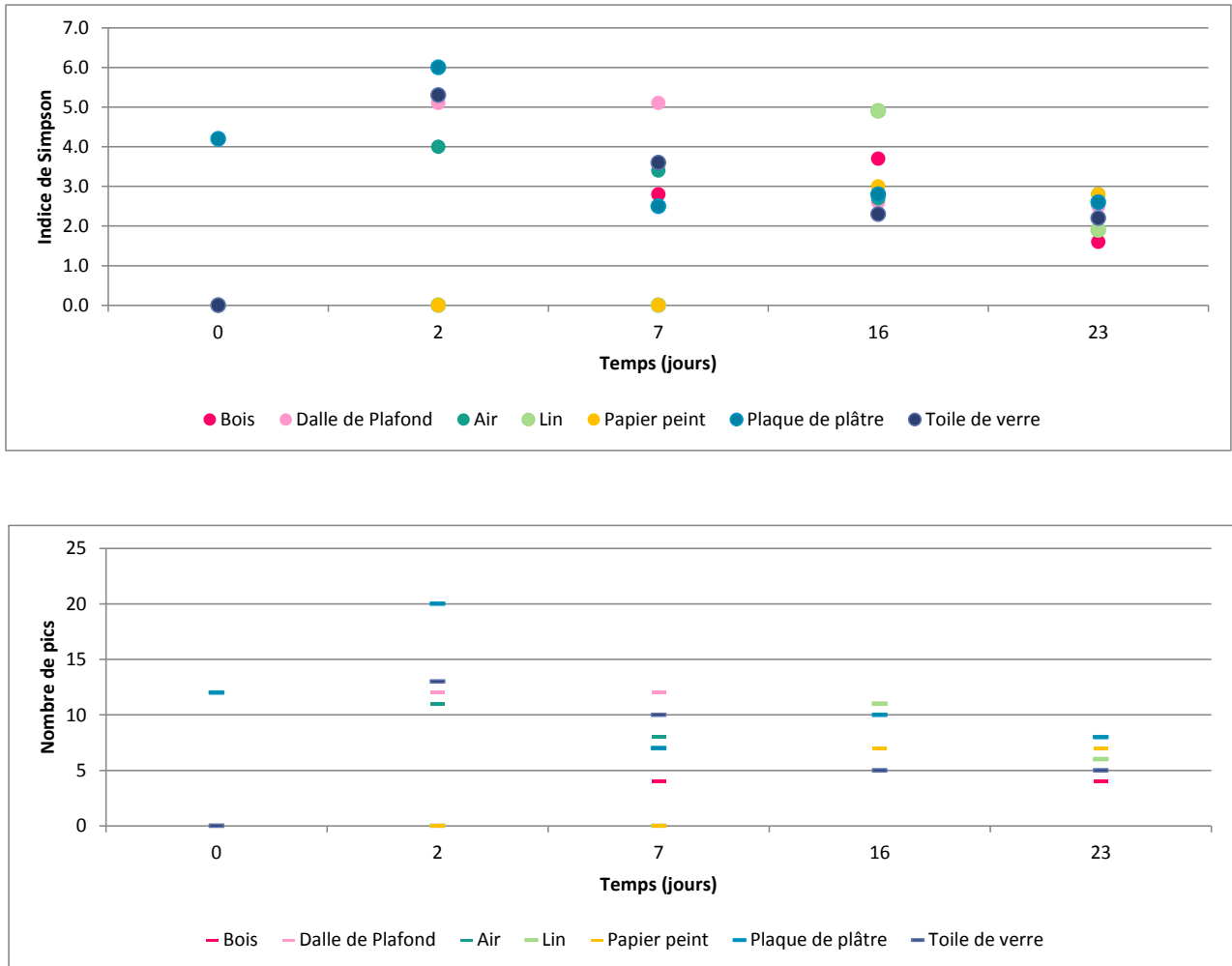


Figure 34 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP eucaryotes.

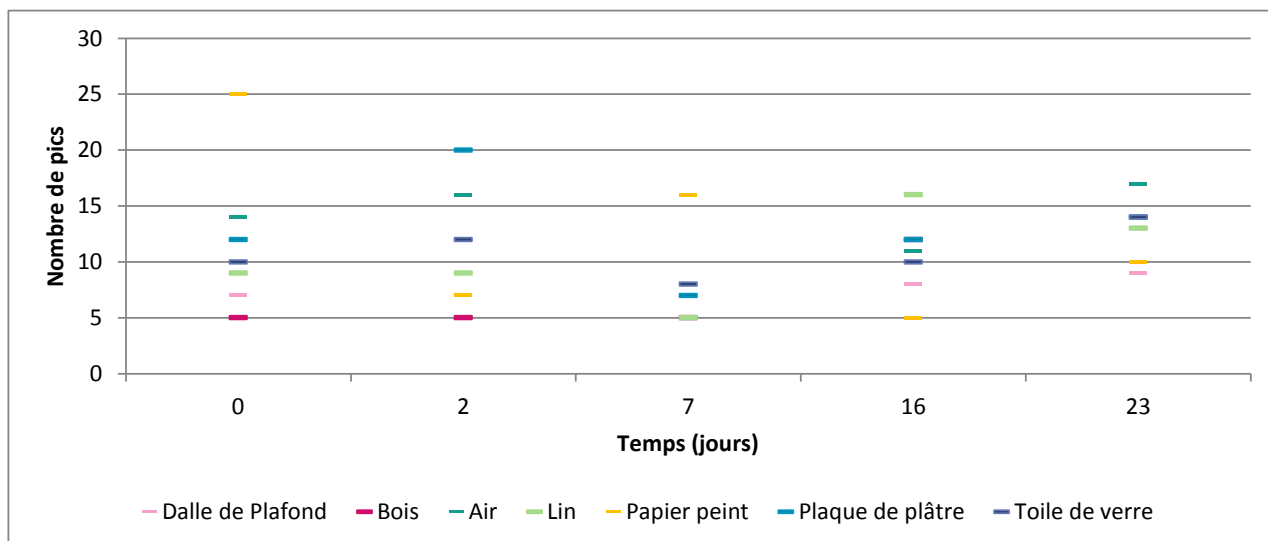
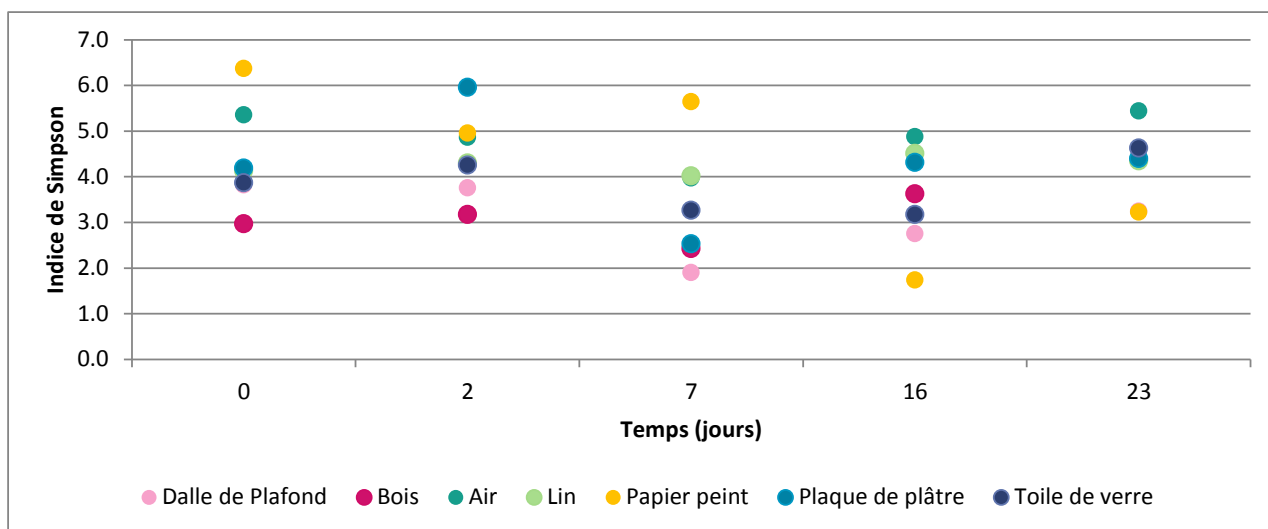


Figure 35 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP bactéries.

La diversité eucaryote et bactérienne varie au cours du temps et en fonction des supports pour tendre vers un équilibre à 23 jours.

Une diversité différente est observée dans l'air et sur les supports, montrant que la colonisation des supports par les bactéries et les eucaryotes est dynamique et que plusieurs espèces s'y succèdent. Comme attendu, la diversité retrouvée sur les supports n'est pas le reflet de la microflore de l'air. La plaque de plâtre présente une diversité plus riche tant au niveau bactérien qu'eucaryote avec respectivement 14 et 8 espèces.

Campagne 2

La diversité eucaryote mesurée par l'indice de Simpson est élevée après l'impaction pour les deux supports (Figure 36). Comme pour la Campagne 1, on observe pour les deux matériaux que la diversité diminue (ici à 3 jours). La diversité évolue de manière identique sur les deux supports.

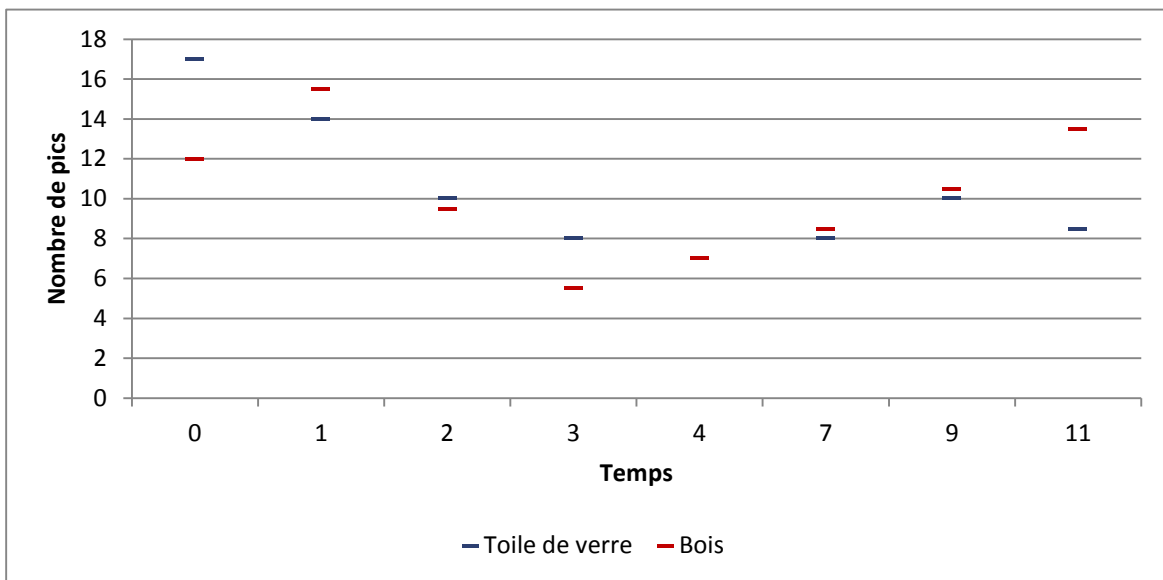
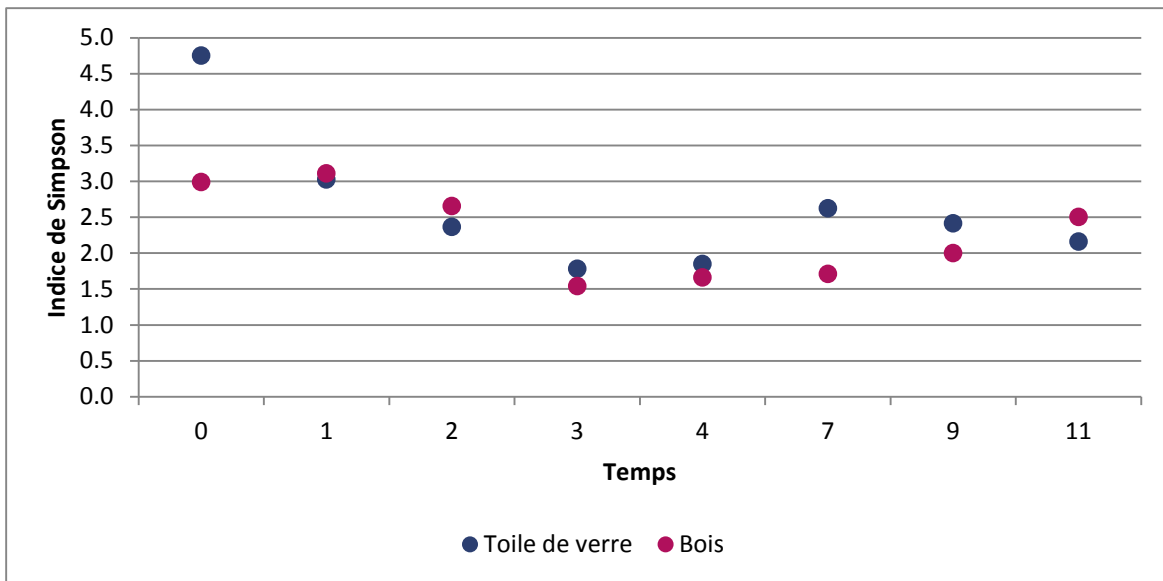


Figure 36: Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP eucaryotes.

La diversité bactérienne (Figure 37) augmente pour les deux matériaux et évolue de manière similaire sur les deux supports.

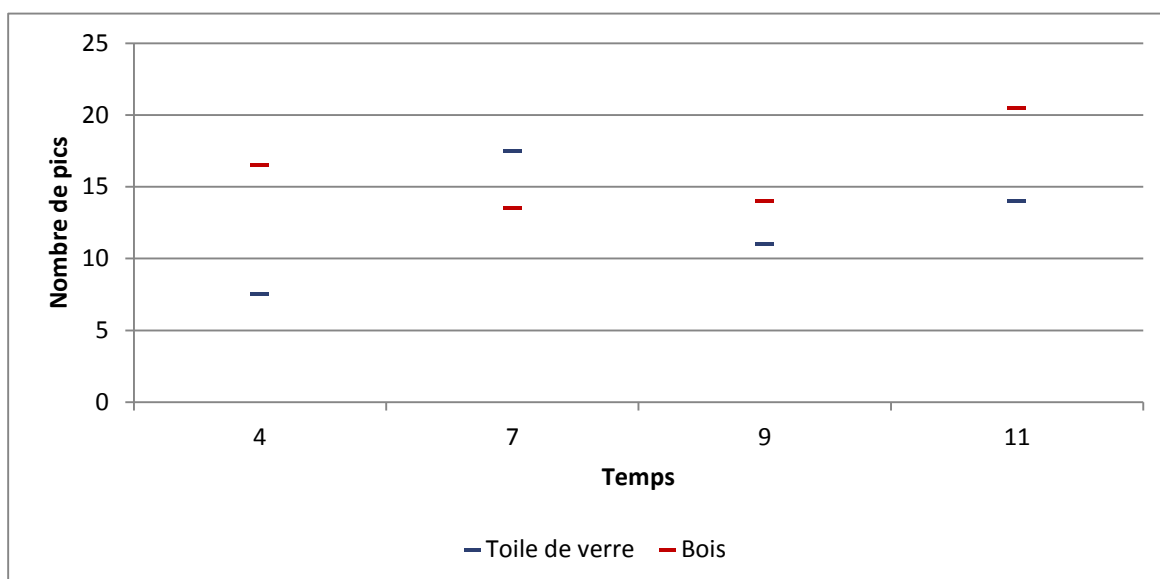
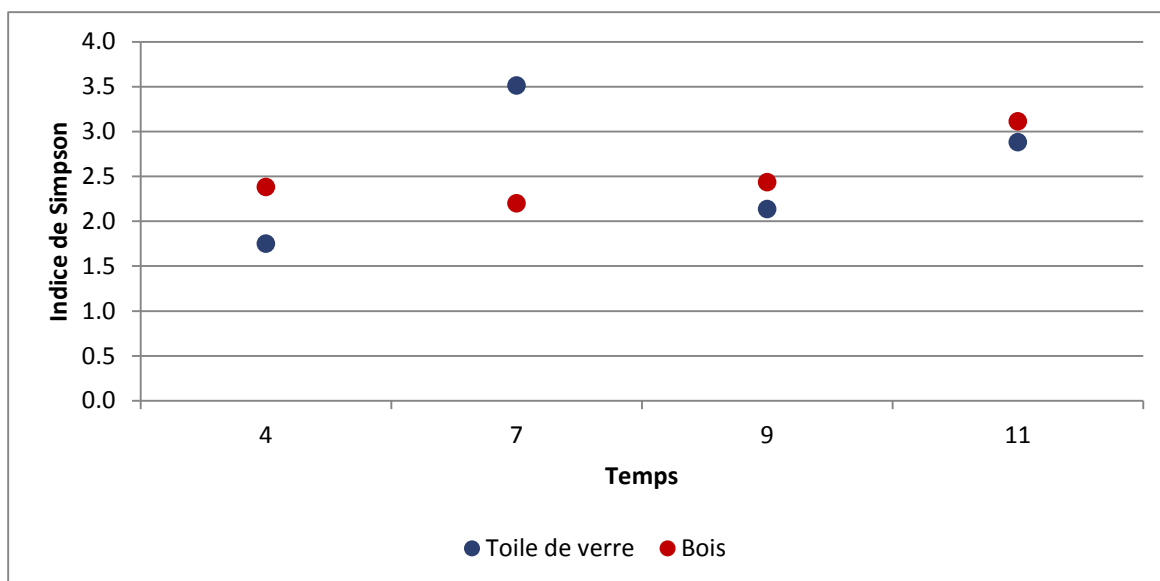


Figure 37 : Valeurs des indices de diversité et du nombre de pics mesurés à partir des profils SSCP bactéries.

La structure des communautés bactérienne et eucaryote colonisant les supports est riche (indice de Simpson compris entre 1 et 6). En Campagne 1, les valeurs de l'indice de Simpson tendent à s'équilibrer dans le cas des eucaryotes et des bactéries. Cet équilibre est observé dès le début en Campagne 2.

6.4 SEQUENÇAGE

6.4.1 QUANTIFICATION DES MATRICES ADN

Afin de s'assurer que les échantillons retenus contiennent une quantité de matrice suffisante (valeur supérieure à 2 ng/μL) pour le pyroséquençage, les matrices ADN extraites ont été quantifiées au Nanoquant. Le Tableau 16, précise les échantillons dont la concentration en ADN est compatible avec l'analyse par pyroséquençage.

Tableau 16 : Quantification des matrices ADN

Campagne 1	Concentrations	Campagne 2	Concentrations
T7-TV C1	19,22 ng/μL	T4-TV C2	17,74 ng/μL
T7-BO C1	5,72 ng/μL	T4-BO C2	8,34 ng/μL
T23-TV C1	38,92 ng/μL	T7-TV C2	11,34 ng/μL
T23-BO C1	5,82 ng/μL	T7-BO C2	8,64 ng/μL
		T11-BO C2	15,24 ng/μL
		T11-TV C2	11,54 ng/μL

6.4.2 BILAN DES SEQUENCES ANALYSEES

En ce qui concerne la Campagne 1, 22 430 séquences bactériennes et 22 313 séquences eucaryotes ont été analysées (Tableau 17). Dans cette campagne, ont été identifiés au niveau de l'espèce :

- 37,2% OTU* bactériens
- 51,09% OTU eucaryotes

*Pour rappel un OTU (Operational Taxon Unit), regroupe les séquences présentant 97% de similarité entre elles.

Pour la Campagne 2, un total de 59 865 séquences bactériennes et 5 318 séquences eucaryotes ont été analysés (Tableau 18), parmi elles :

- 45,7 % OTU bactériens,
- 60% OTU eucaryotes.

Tableau 17 : Bilan du nombre de séquences obtenues après séquençage des coupons de la Campagne 1

Nom de l'échantillon	BACTERIES		EUCARYOTES	
	Nombre de séquences	Nombre d'OTU	Nombre de séquences	Nombre d'OTU
T7.TV C1	4614	95	877	27
T23.TV C1	7445	174	14612	38
T7.BO C1	3838	36	1320	47
T23.BO C1	6533	101	5504	88
Total	22430	279	22313	137
Total des séquences affiliées au niveau espèce	104		70	

Tableau 18 : Bilan des séquençages de la Campagne 2

Nom de l'échantillon	BACTERIES		EUCARYOTES	
	Nombre de séquences	Nombre d'OTU	Nombre de séquences	Nombre d'OTU
T4.TV C2	13165	85	836	21
T4.BO C2	2284	106	1830	41
T7.TV C2	32711	107	1184	44
T7.BO C2	3571	93	490	31
T11.TV C2	5679	106	108	28
T11.BO C2	2435	114	870	33
Total	59865	252	5318	60
Total des séquences affiliées au niveau espèce	116		36	

6.4.3 CARACTERISATION DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

6.4.3.1 Campagne 1

Analyse au niveau du phylum

Les 22 430 séquences issues des 4 coupons (2 supports contaminés à 2 temps d'exposition différents) appartenant au domaine Bactérie ont été analysées au niveau phylum. Sur les 52 *phyla* présents dans la classification bactérienne, 7 sont retrouvés dans cette campagne, soulignant une faible diversité par rapport à d'autres environnements (sols, compost...). Seuls des *phyla* ayant des représentants cultivés sont retrouvés (Figure 38).

La comparaison de l'abondance des *phyla* montrent des différences marquées entre les deux supports. La figure 1, montre que les consortiums bactériens présents sur la toile de verre sont dominées par les *Proteobacteria* quelques soit le temps de colonisation, 7 ou 23 jours avec respectivement 74,79% et 72,81% des séquences. Les résultats montrent également une inversion des abondances entre les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* entre les deux temps de colonisation étudiés. En effet, l'abondance des *Bacteroidetes* augmente de presque 25% durant la colonisation, prenant la place des *Firmicutes*.

En ce qui concerne la diversité des bactéries colonisant les coupons de bois, la diversité des *phyla* présents augmente avec la durée de colonisation, passant de 4 à 7 *phyla*. Les résultats montrent que la diversité bactérienne est dominée par les bactéries à Gram positif, *Firmicutes* et *Actinobacteria* à 7 jours, avec respectivement une dominance des *Firmicutes* qui représentent 72,54% des séquences. A 23 jours d'exposition, la diversité est dominée par des bactéries à Gram négatif (*Proteobacteria*) avec 83,94 % des séquences.

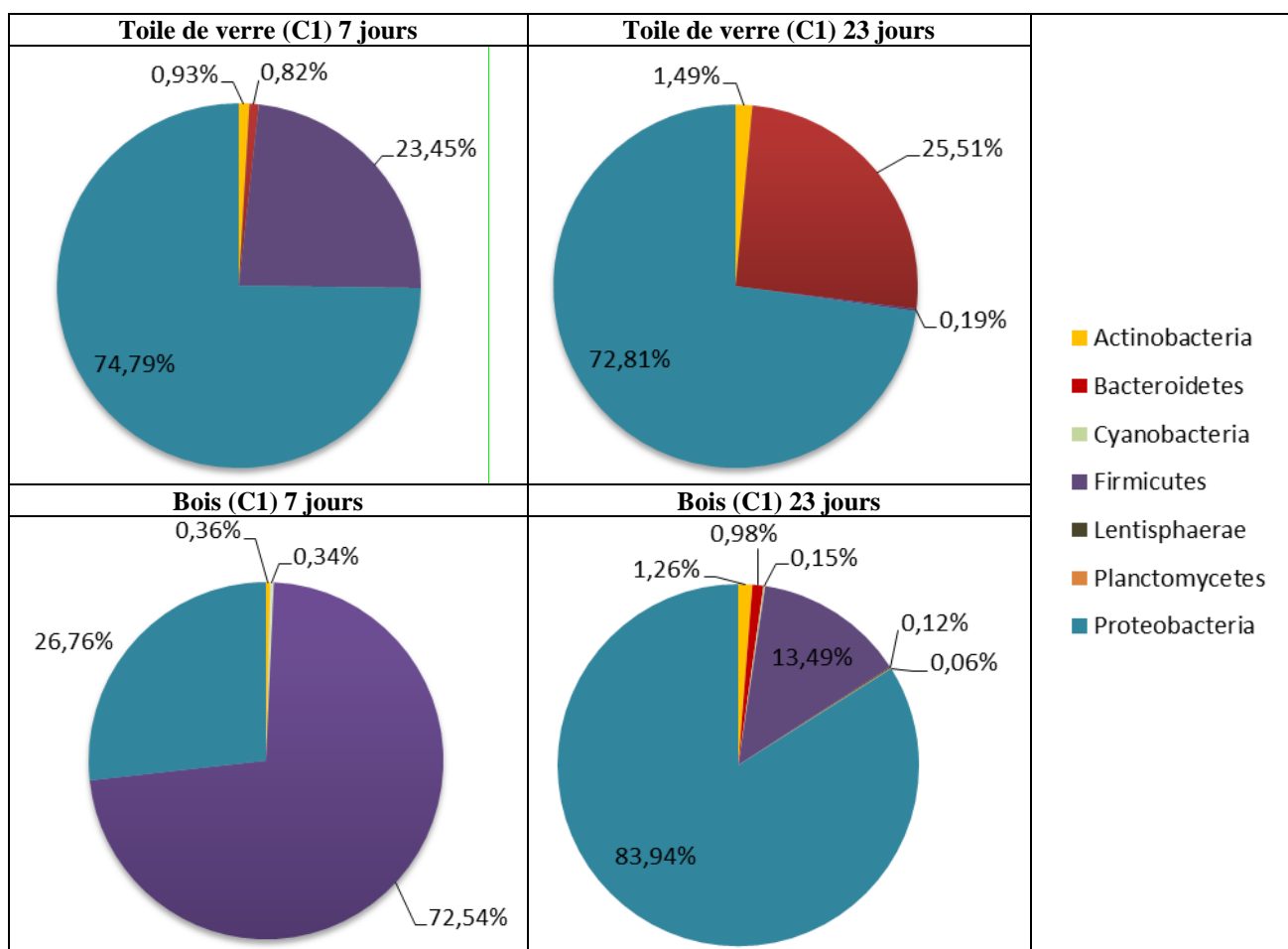


Figure 38 : Abondance des phyla retrouvés sur les coupons de toile de verre et de bois à 7 et 23 jours

L'ensemble de ces résultats ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par culture. En effet, sur toile de verre, cette dernière avait mis en évidence une majorité de *Firmicutes* aux deux temps.

En ce qui concerne le bois, une augmentation des *Proteobacteria* et une diminution des *Firmicutes* est constatée à l'inverse des résultats obtenus par culture.

Cependant, dans les études utilisant les techniques par culture, les *firmicutes* sont généralement largement représentés, montrant l'importance de croiser les différentes techniques d'analyse pour avoir la vue la plus exhaustive possible de la diversité microbienne (Kembel, 2012).

Cela a également été démontré lors de l'étude de Pietarinen et al. en 2007 qui ont utilisé la PCR quantitative en parallèle des techniques culturales pour détecter la présence de certains *Streptomyces* et 9 genres fongiques considérés comme des indicateurs de problème d'humidité dans les environnements intérieurs. Quelle que soit la nature du produit de construction, les espèces appartenant au genre bactérien *Streptomyces* et au groupe fongique *Penicillium/Aspergillus/Paecilomyces* étaient majoritaires. Une importante diversité en termes d'espèces et de concentration avait été détectée sur les matériaux à base de bois. Toutefois, les résultats obtenus avec les deux techniques ne corrélaient souvent pas (Pietarinen et al. 2007).

Analyse au niveau du genre

Les 22 430 séquences affiliées au domaine Bactérie ont été ensuite analysées au niveau du genre (Figure 39). Parmi les 279 OTU retrouvés, 71 genres ont été identifiés (Figure 7). Pour les coupons de bois, les genres dominants ne sont pas les mêmes à 7 jours et après 23 jours d'exposition. A 7 jours, la diversité bactérienne est principalement dominée par *Bacillus* spp., (71,29% des séquences), *Massilia* spp. et *Paracoccus* spp., alors que *Shingomonas* spp, *Shingobium* spp. et

Shinella spp. sont les genres dominant à 23 jours avec 54,3% des séquences. Seul *Shingomonas* était retrouvé à 7 jours de colonisation.

En ce qui concerne la toile de verre, la diversité bactérienne à 7 jours est majoritairement composée d'*Acinetobacter* spp. avec 62,39% des séquences. Le genre *Bacillus* dominant pour les coupons de bois est moins représenté avec seulement 3,4% des séquences. La colonisation à 23 jours est dominée par *Flavobacterium* spp., *Shinella* spp. et *Shingomonas* spp.. Ces genres sont également présents sur le bois mais dans des proportions moindres.

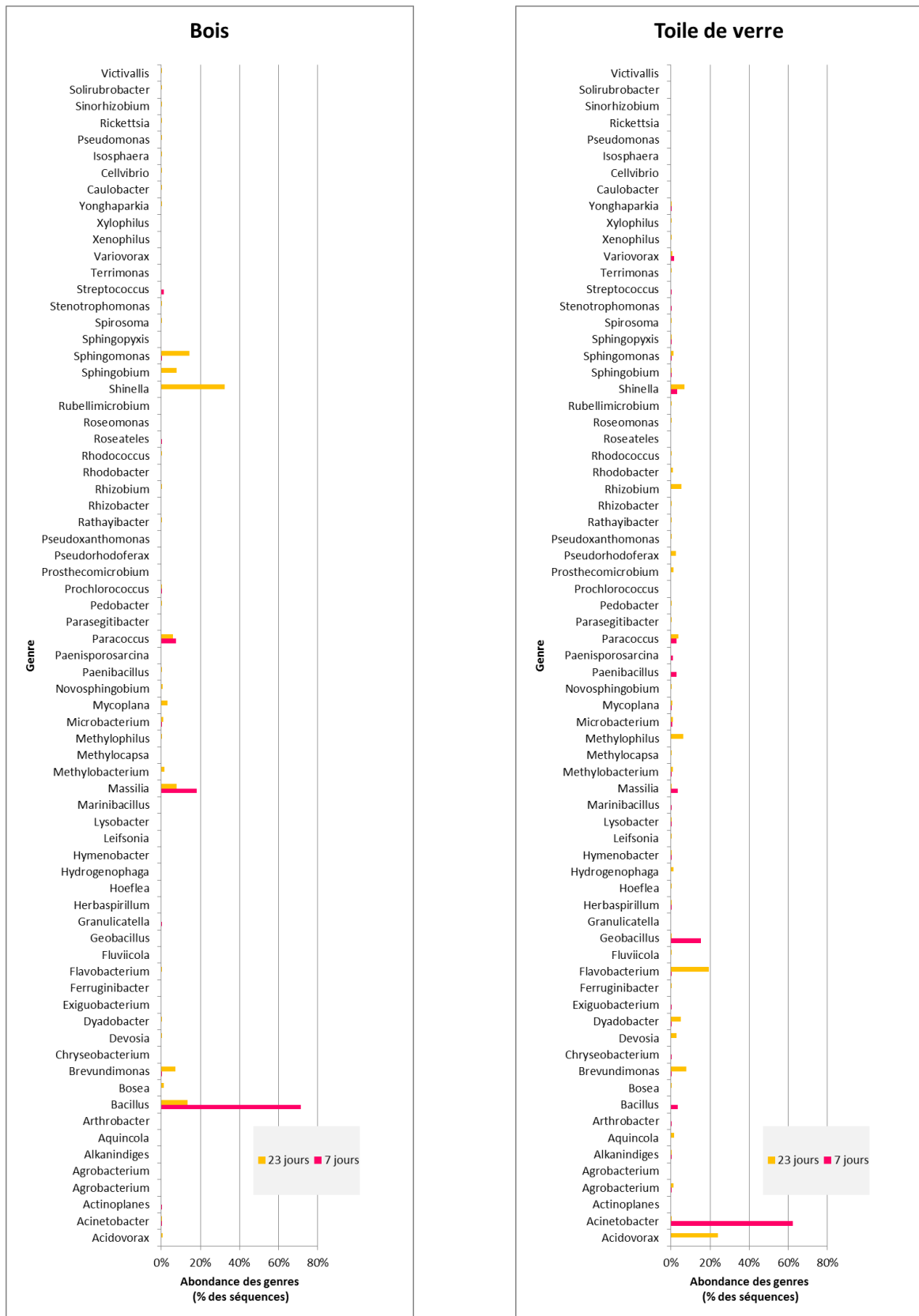


Figure 39 : Abondance des genres bactériens retrouvés sur les coupons de Toile de verre et de Bois à 7 jours et 23 jours de colonisation.

6.4.3.2 Campagne 2

Analyse au niveau du phylum

Les 59 865 séquences issues des 6 coupons contaminés appartenant au domaine Bactérie ont été analysées au niveau phylum. Sur les 52 *phyla* présents dans la classification bactérienne (Rappe et Giovannoni, 2003), 10 sont retrouvés dans cette étude et permettent de qualifier la diversité comme faible (Figure 40). On retrouve des *phyla* ayant des représentants cultivés comme les *Firmicutes* et les *Proteobacteria* mais également un *phyla* dont aucune espèce n'est cultivée (TM7).

La comparaison de l'abondance des *phyla* montre des différences marquée entre les deux supports. La Figure 40, montre que les consortiums bactériens présents sur la toile de verre sont dominés par les *Proteobacteria* quelques soit le temps de colonisation à 4, 7 ou 11 jours avec respectivement 99,37%, 90,04% et 95,69% de séquences. On peut noter, une augmentation des *Actinobacteria* après 7 jours de colonisation avec 9,83% des séquences. Cette abondance diminue ensuite à 11 jours.

En ce qui concerne la diversité des bactéries colonisant les coupons de bois, elle apparaît plus importante quel que soit le temps de colonisation considéré (Figure 4). Les résultats montrent une grande diversité de *phyla*, dominée par les bactéries à Gram positif, *Firmicutes* et *Actinobacteria* à 4 jours, avec respectivement 52,11 et 24,11% des séquences. A 7 jours de colonisation, les genres dominant sont des bactéries à Gram négatif (*Proteobacteria*) avec 68,36% des séquences. Il apparaît à 11 jours de colonisation, une augmentation des séquences « Environmental_samples » sur le bois, il s'agit de séquences présentes dans les bases de données de l'environnement.

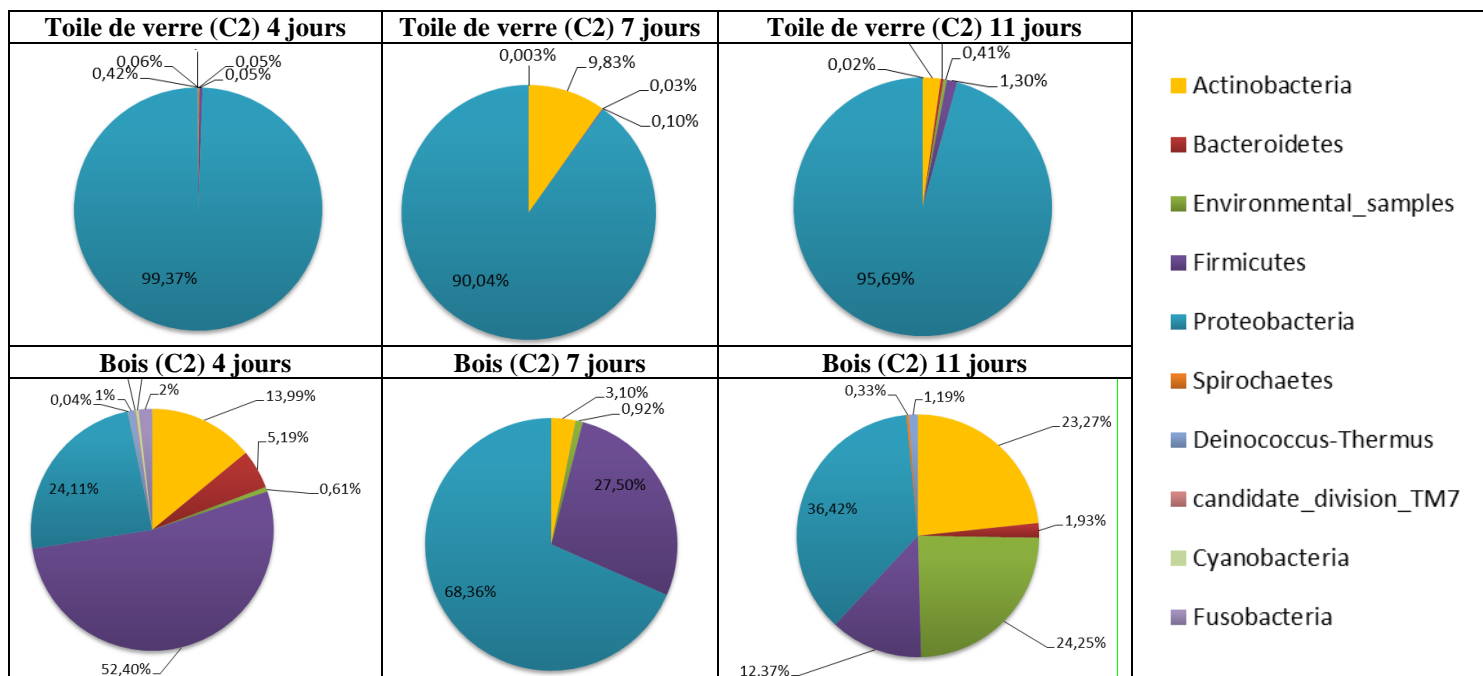


Figure 40 : Abondance des *phyla* (bactéries) retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois à trois temps d'exposition

Sur toile de verre, les *Proteobacteria* restent majoritaire durant tout l'essai comme en campagne 1. Sur le bois, les *Firmicutes* sont majoritaires au départ, puis les *Proteobacteria* deviennent majoritaires en fin d'essai. Cette tendance est observée dans les deux campagnes. Toutefois, si ces tendances sont identiques quelques soit le mode de contamination, la campagne 2 a permis de mettre en évidence une plus grande diversité d'espèces bactériennes dès 11 jours d'incubation.

Analyse au niveau du genre

Les 59 865 séquences affiliées au domaine Bactérie ont été ensuite analysées au niveau du genre. Parmi les 252 OTU retrouvés, 75 genres ont été identifiés (Figure 5). Pour les coupons de bois, les genres dominants ne sont pas les mêmes à 4 jours et 11 jours de colonisation. *Streptococcus* spp. est dominant à 4 jours avec 32,9% des séquences. L'abondance diminue ensuite à 7 et 11 jours. Ce genre n'est pas retrouvé à 4 et 11 jours sur la toile de verre, mais dans une abondance très faible à 7 jours. A 7 jours, plusieurs genres sont plus abondants qu'à 4 jours et 11 jours : *Ralstonia* spp., *Sporomusa* spp., *Blastobacter* spp., *Azospirillum* spp. ainsi que *Arthrobacter* spp. et *Sphingobium* pour la toile de verre. Sur ce support, *Pseudomonas* est majoritaire uniquement à 4 jours et la proportion de *Bradyrhizobium* augmente au cours de temps.

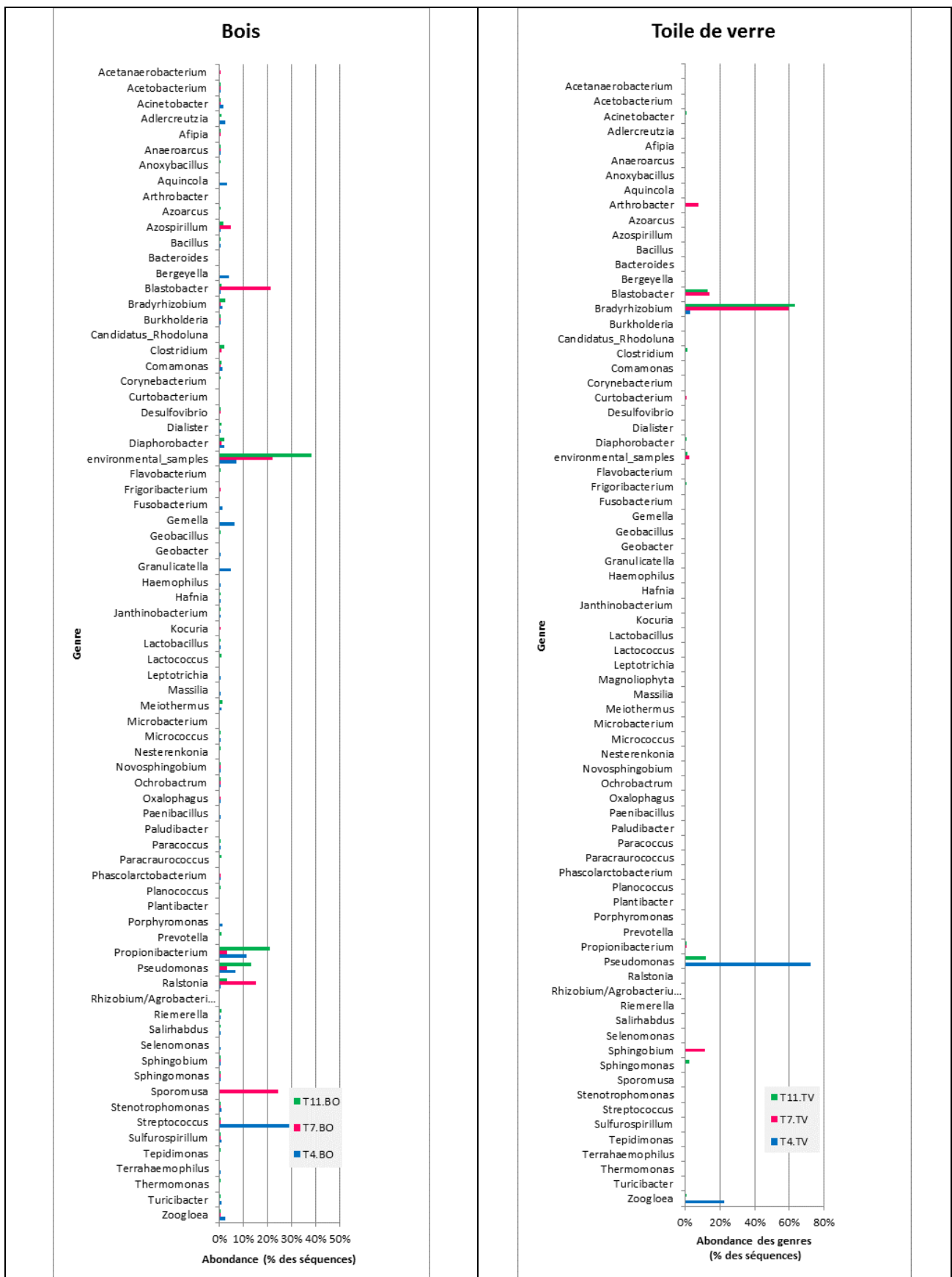


Figure 41 : Abondance des genres retrouvés sur les coupons de Toile de verre et de Bois aux trois temps considérés

6.4.4 CARACTERISATION DE LA DIVERSITE EUCARYOTE

6.4.4.1 Campagne 1

La diversité eucaryote a été caractérisée par pyroséquençage 454, un total de 23 513 séquences de l'ADN ribosomal 18S a été séquençé et analysé à partir des 2 matériaux contaminés, le bois et la toile de verre. L'ensemble des séquences est regroupé en 137 OTU sur la base consensuelle de 97% de similarité. La diversité des eucaryotes est dominée par les champignons (*Ascomycota* et *Basidiomycota*) pour la toile de verre à 7 jours (71.61% des séquences) et le bois à 7 (99,70%) et 23 jours (97,53%) de colonisation. A 23 jours de colonisation, la toile de verre est majoritairement colonisée par des amibes (*Amoebozoa*) avec 73,48% des séquences (majoritairement *Euamoebida*). Parmi les champignons, les *Ascomycota* sont majoritaires pour le bois aux deux temps de colonisation, et à 7 jours pour la toile de verre (62,14%).

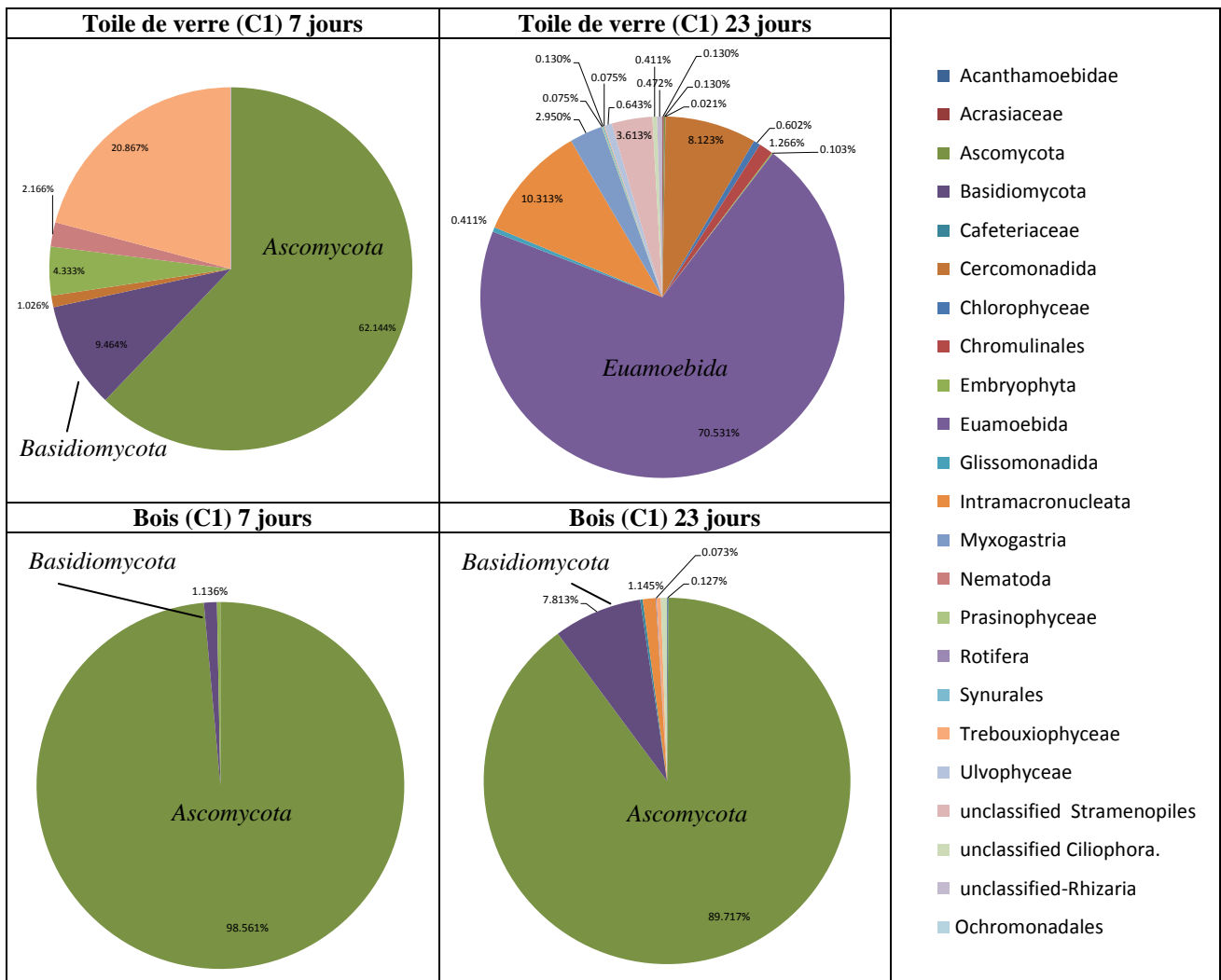


Figure 42 : Abondance des phyla (eucaryotes) retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois après 7 et 23 jours d'exposition

La diversité eucaryote a été également analysée au niveau du genre et est présentée Figure 43. En ce qui concerne la flore fongique, *Aureobasidium* spp. est retrouvé à la fois sur les coupons de

bois et de toile de verre, dans des proportions élevées pour le bois (59% et 57% des séquences respectivement à 7 et 23 jours). Ces résultats concordent avec ceux obtenus en culture.

Pour la toile de verre, on note la présence de plusieurs genres affiliés aux amibes (*Hartmanella* spp. et *Acanthamoeba* spp.). Dans la littérature, ce type de micro-organismes a été mis en évidence sur les produits de construction. Ainsi, une étude s'est intéressée à la présence des protozoaires sur différents types de produits (bois, béton, céramique, laine minérale, papier peint...) ayant subi un dégât des eaux. Elle a mis en évidence que dans 22 % des 124 échantillons testés, étaient retrouvés des amibes et autres protozoaires ciliés ou flagellés. Les amibes sont des micro-organismes qui se nourrissent de bactéries et/ou de champignons. Ceux-ci pourraient jouer un rôle dans les problèmes de santé des occupants d'un bâtiment ayant eu un problème d'humidité (Yli-Pirila *et al.*, 2004b; Yli-Pirila *et al.*, 2009b).

Dans notre étude, la diminution de proportion d'*Ascomycota* coïncide avec l'augmentation des amibes.

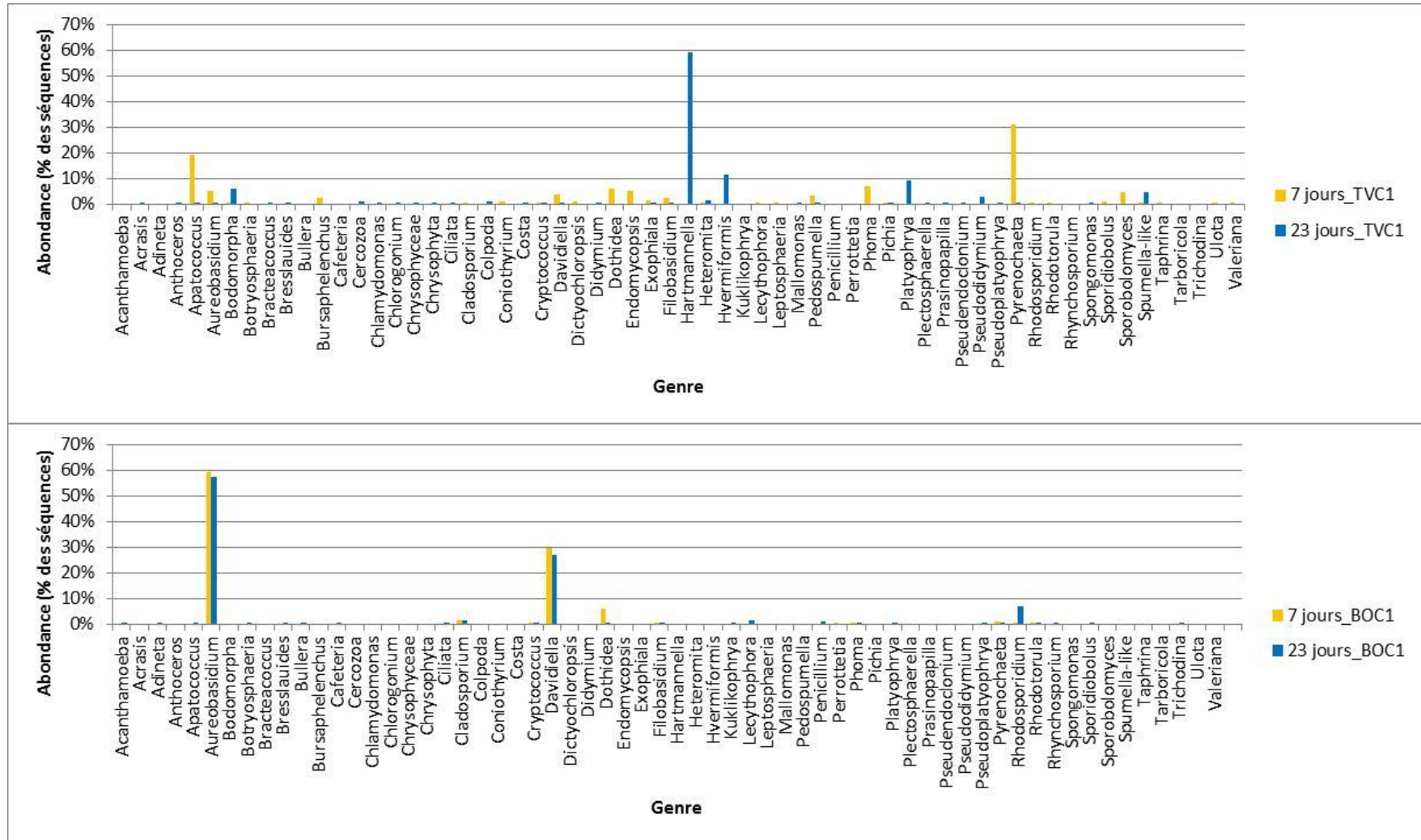


Figure 43 : Abundance des genres eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et du bois à 7 et 23 jours

6.4.4.2 Campagne 2

Afin de caractériser la flore eucaryote présente lors des différentes étapes de la colonisation, un total de 5318 séquences d'ADN ribosomal 18S a été réalisé et analysé à partir des 2 matériaux contaminés, le bois et la toile de verre. L'ensemble des séquences a été regroupé en 60 OTU sur la base consensuelle de 97% de similarité. La diversité des eucaryotes est dominée par les champignons avec plus de 96% de l'abondance des séquences pour chacun des coupons analysés. A 7 jours de colonisation, on retrouve une faible proportion de *Basidiomycota*, 2,8% et 0,8% des séquences respectivement sur la toile de verre et le bois. La présence de *Stramenopiles* (*Ochromonadales*) dans des proportions faibles est également retrouvée à 7 jours de colonisation des coupons de toile de verre. Les *Ascomycota* sont largement majoritaires sur l'ensemble des échantillons.

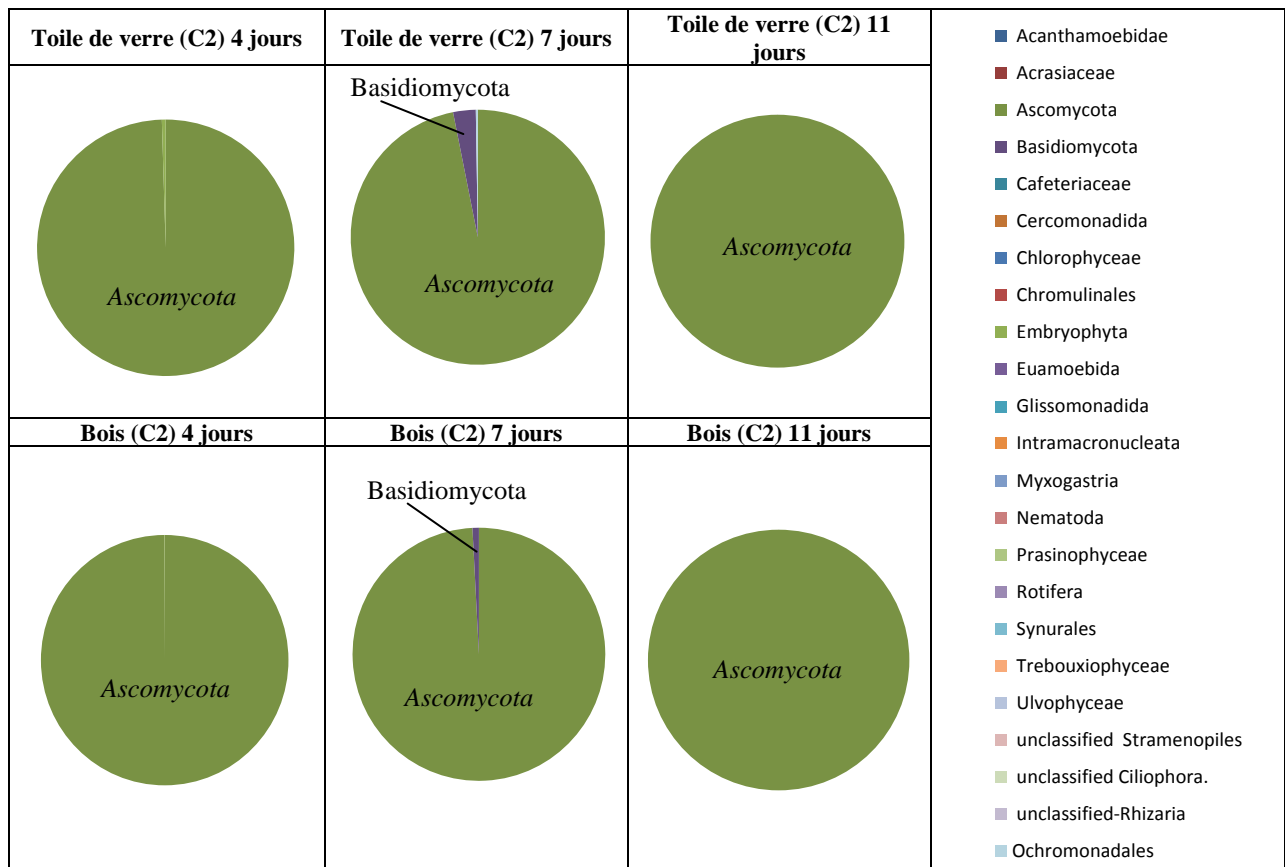


Figure 44 : Abondance des phyla eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois après 4, 7 et 23 jours d'incubation

La diversité eucaryote a été analysée au niveau du genre (Figure 45). Elle apparaît beaucoup plus faible que pour les coupons de la Campagne 1. En ce qui concerne la toile de verre, les résultats montrent comme pour la campagne 1, la croissance de *Penicillium* spp. mais dans des proportions plus faibles. *Aspergillus* spp. est retrouvé dans de fortes proportions à 11 jours de colonisation, avec 37% de séquences. On note également une diminution de l'abondance de *Cladosporium* spp. et *Fusarium* spp. à partir de 4 jours d'incubation.

Les résultats des coupons de bois contaminés montrent le développement de *Penicillium* spp. avec une abondance de 26,78% des séquences à 4 jours de colonisation et 93,91% à 11 jours. Les genres *Botryotinia* et *Cladosporium* sont représentés à 4 jours mais diminuent à 7 jours.

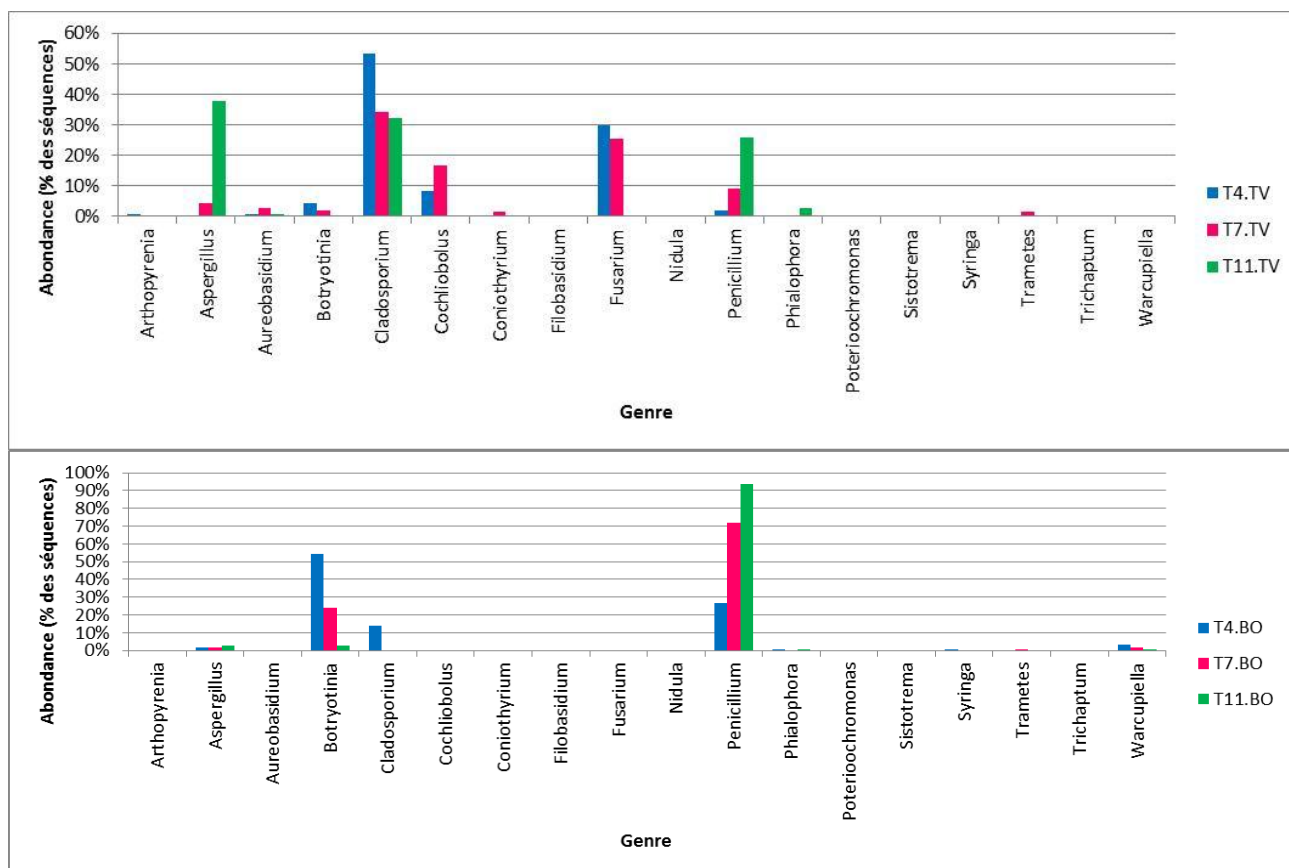


Figure 45 : Abondance des eucaryotes retrouvés sur les coupons de toile de verre et bois à 4, 7 et 11 jours

6.4.4.3 Identification des 'core-species' en fonction du support.

Un « core-species » peut être défini comme un ensemble d'espèces retrouvées dans plusieurs environnements.

Les Tableaux 19 à Tableau 22, montrent les espèces communes aux différents temps de colonisation. Les espèces surlignées dans les tableaux indiquent que celles-ci sont retrouvées sur les deux types de support.

Tableau 19 : Core-species bactérie de la campagne 1.

Toile de verre		
Nom de l'espèce	TV-7 jours	TV-23 jours
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	32,466%	0,067%
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	12,657%	0,175%
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,368%	0,981%
<i>Alkanindiges illinoisensis</i>	0,108%	0,040%
<i>Brevundimonas nasdae</i>	0,043%	0,390%
<i>Brevundimonas variabilis</i>	0,130%	7,307%
<i>Dyadobacter koreensis</i>	0,108%	0,215%
<i>Flavobacterium aquidurensense</i>	0,173%	4,782%
<i>Flavobacterium granuli</i>	0,022%	0,175%
<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	0,022%	0,860%
<i>Geobacillus pallidus</i>	11,378%	0,188%
<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	0,195%	0,054%
<i>Hymenobacter psychrotolerans</i>	0,130%	0,013%
<i>Lysobacter gummosus</i>	0,043%	0,040%
<i>Massilia aerilata</i>	0,932%	0,040%
<i>Massilia aurea</i>	0,585%	0,054%
<i>Massilia brevitalea</i>	0,173%	0,242%
<i>Massilia niastensis</i>	1,257%	0,040%
<i>Massilia timonae</i>	0,217%	0,013%
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	0,130%	1,021%
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0,672%	0,148%
<i>Mycoplana bullata</i>	0,022%	0,040%
<i>Paracoccus haeundaensis</i>	2,601%	3,573%
<i>Paracoccus yeei</i>	0,152%	0,067%
<i>Shinella zoogloeoides</i>	3,164%	7,038%
<i>Sphingobium xenophagum</i>	0,195%	0,322%
<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	0,043%	0,054%
<i>Variovorax boronicumulans</i>	1,625%	0,618%
<i>Yonghaparkia alkaliphila</i>	0,130%	0,269%

Bois		
Nom de l'espèce	BO-7 jours	BO-23 jours
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,182%	0,000%
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0,130%	0,092%
<i>Brevundimonas nasdae</i>	0,052%	6,291%
<i>Massilia aurea</i>	0,261%	0,398%
<i>Massilia timonae</i>	9,849%	4,148%
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0,104%	0,000%
<i>Paracoccus haeundaensis</i>	6,931%	2,709%
<i>Paracoccus yeei</i>	0,573%	0,092%

Tableau 20 : Core-species bactérie de la campagne 2

Toile de verre			
Nom de l'espèce	T4.TV	T7.TV	T11.TV
<i>Aquicola tertiaricarbonis</i>	0,349%	0,095%	0,088%
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	0,008%	5,240%	0,018%
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	3,608%	68,151%	70,981%
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0,235%	5,659%	5,159%
<i>Clostridium sp.</i>	0,046%	0,040%	0,704%
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0,015%	0,926%	0,018%
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	0,038%	0,049%	0,158%
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0,015%	0,003%	0,053%
<i>Massilia aurea</i>	20,547%	0,098%	0,775%
<i>Massilia brevitalea</i>	1,193%	0,003%	0,070%
<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	68,074%	0,673%	10,794%
<i>Sphingomonas aerolata</i>	0,122%	0,138%	0,247%
<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	0,053%	0,006%	0,053%
Bois			
Nom de l'espèce	T4.BO	T7.BO	T11.BO
Environmental_samples	0,17%	0,56%	17,00%
<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	0,17%	0,20%	0,08%
<i>Acetobacterium malicum</i>	0,09%	0,14%	0,04%
<i>Acetobacterium wieringae</i>	0,13%	0,17%	0,04%
<i>Anaeroarcus burkinensis</i>	0,22%	0,20%	0,33%
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	0,44%	0,06%	1,43%
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	1,39%	22,74%	2,91%
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0,09%	1,45%	0,12%
<i>Burkholderia bryophila</i>	0,17%	0,06%	0,25%
<i>Comamonas testosteroni</i>	1,09%	0,22%	0,70%
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	0,13%	13,40%	2,62%
<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	1,96%	0,81%	2,05%
<i>Leptotrichia hofstadii</i>	0,09%	0,20%	0,08%
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0,61%	18,35%	6,76%
<i>Novosphingobium panipatense</i>	0,17%	0,62%	0,25%
<i>Prochlorococcus marinus</i>	0,44%	0,11%	0,12%
<i>Propionibacterium acnes</i>	11,07%	2,97%	20,73%
<i>Propionibacterium granulosum</i>	0,17%	0,03%	0,12%
<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	0,13%	0,31%	1,02%
<i>Pseudomonas asplenii</i>	0,74%	0,34%	1,07%
<i>Pseudomonas cedrina</i>	4,62%	1,85%	7,54%
<i>Pseudomonas congelans</i>	0,48%	0,28%	2,50%
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	0,09%	0,17%	0,33%
<i>Staphylococcus capitis</i>	1,13%	0,34%	1,93%
<i>Staphylococcus caprae</i>	0,48%	0,31%	1,19%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,35%	0,50%	2,91%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,96%	0,31%	0,29%
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	10,81%	0,03%	0,12%
<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	0,92%	0,45%	0,41%

Tableau 21 : Core-species eucaryote de la campagne 1

Toile de Verre		
Nom de l'espèce	T7_TVC1	T23_TVC1
<i>Apatococcus lobatus</i>	0,228%	0,007%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,342%	0,007%
<i>Bodomorpha sp</i>	0,342%	0,985%
<i>Cryptococcus gastricus</i>	0,570%	0,007%
<i>Davidiella tassiana</i>	1,938%	6,105%
<i>Exophiala aquamarina</i>	2,509%	0,014%
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	2,851%	0,034%
<i>Heteromita globosa</i>	3,307%	0,027%
<i>Pichia burtonii</i>	18,814%	0,075%
<i>Pyrenochaeta nobilis</i>	31,015%	0,014%

Bois		
Nom de l'espèce	T7_BOC1	T23_BOC1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	59,470%	56,949%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,439%	1,444%
<i>Cryptococcus gastricus</i>	0,227%	0,090%
<i>Davidiella tassiana</i>	30,000%	26,805%
<i>Dothidea sambuci</i>	5,985%	0,686%
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0,455%	0,451%
<i>Phoma exigua</i>	0,606%	0,090%
<i>Pyrenochaeta nobilis</i>	1,136%	0,289%
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	0,303%	6,011%
<i>Rhodosporidium lusitaniae</i>	0,076%	0,939%
<i>Rhodotorula graminis</i>	0,076%	0,018%

Tableau 22 : Core-species eucaryote de la campagne 2

Toile de verre			
Nom de l'espèce	T4.TV	T7.TV	T11.TV
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,84%	2,87%	0,93%
<i>Cladosporium sp.</i>	52,15%	33,36%	32,41%
<i>Penicillium solitum</i>	1,67%	2,96%	20,37%

Bois			
Nom de l'espèce	T4.BO	T7.BO	T11.BO
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,15%	0,41%	0,11%
<i>Aspergillus niger</i>	0,98%	1,22%	0,23%
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	2,62%	1,43%	0,92%
<i>Penicillium brevicompactum</i>	61,15%	39,59%	32,07%
<i>Penicillium solitum</i>	7,65%	12,86%	18,62%
<i>Warcupiella spinulosa</i>	15,96%	40,00%	44,94%

Au niveau des genres, peu de similarités sont retrouvées entre les deux campagnes, les modes de contamination différents et les variations de contaminations initiales peuvent expliquer ces différences. Pour la campagne 1, une grande diversité d'espèces bactériennes se maintient sur les coupons de toile de verre par rapport au bois, en revanche toutes les espèces présentes sur le bois sont également retrouvées sur la toile de verre (Tableau 5). Dans le cas de la campagne 2, la diversité qui s'implante sur le coupon de bois est plus grande que celle sur toile de verre. Les résultats mettent en évidence le développement de deux espèces de *Bradyrhizobium*. En effet, *Bradyrhizobium jicamae* représente 3,6% de l'abondance à 4 jours de colonisation de la toile de verre pour atteindre à 11 jours de colonisation 70,98% de l'abondance. Cette espèce PGPR (Plant Growth promoting rhizobacteria) est symbionte des légumineuses et participe à la fixation de l'azote sur les nodules. Elle est retrouvée également sur le bois à 7 jours d'incubation. Pour les eucaryotes, la diversité sur les coupons est plus faible que celle des bactéries, pour la toile de verre et le bois, et ce pour les deux campagnes. Pour la seconde campagne, on retrouve des espèces habituellement identifiées par culture dans les environnements intérieurs (*Penicillium* spp., *Cladosporium* spp....).

Lors des deux campagnes, une à deux espèces fongiques sont majoritaires sur chacun des supports et à chaque temps d'exposition/incubation. Ainsi, en Campagne 2, *Penicillium brevicompactum* est majoritaire sur le bois en début d'essai, puis *Warcupiella spinulosa* devient majoritaire. De la même façon sur toile de verre, *Cladosporium* sp. est majoritaire au début puis *Penicillium solitum* le devient.

En campagne 1, les espèces majoritaires sont différentes de celles rencontrées en campagnes 2 à la fois au début et à la fin de l'essai, de plus l'évolution des espèces communes est également différente. Quelques soit la campagne, les espèces initialement présentes, appartenant à la classe des *Dothyeomycetes*, notamment *Davidiella Tassiana*, *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporoides*, *Aureobasidium pullulans*, se maintiennent au cours du temps et sont retrouvées en abondance. Ces résultats sont confirmés en campagne 1 en culture.

6.5 DISCUSSION SUR LA DYNAMIQUE MICROBIENNE (CAMPAGNE 2)

Afin de mettre en évidence la dynamique microbienne, une analyse statistique a été appliquée sur les proportions de chaque OTU. Ces essais, réalisés en campagne 2, avait été effectués sur toile de verre et bois à trois temps différents (T4, T7 et T11).

Les résultats se présentent sous forme d'une matrice de 7 lignes ou individus/observations (supports) et 111 colonnes ou variables (OTU). L'intersection d'une ligne et d'une colonne représente la proportion d'OTU sur chaque support.

Les dimensions de cette matrice de données sont telles qu'il est difficile de repérer directement les similitudes de comportements statistiques entre les individus ou les variables. Afin d'analyser ces résultats, l'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été choisie. L'ACP est décrite en détail dans le livre Statistique exploratoire multidimensionnelle (Lebart et al., 1997). Cette technique permet une représentation statistique de l'ensemble des données sans émettre d'hypothèse et sans utiliser de modèle a priori. L'ACP conduit à des représentations graphiques approchées et optimales du nuage de points représentant la matrice de données. Chaque facteur de l'ACP est une combinaison linéaire de variables représentant le maximum de variance dans le nuage de points. Les vecteurs propres (facteurs) sont orthogonaux entre eux de manière à ne prendre en compte que des sources de variance indépendantes. Deux espaces sont ainsi construits avec les mêmes facteurs : un espace vectoriel des variables et un espace des observations. Deux facteurs définissent un plan sur lequel les points (individus) où les vecteurs sont projetés. La proximité entre deux vecteurs (variables) indique une corrélation linéaire forte entre ces deux variables, de même pour la proximité entre deux points. Les groupes d'individus et de variables

ainsi définis permettent d'appréhender la structure des données peu évidentes au premier abord. L'ACP est normée (sur données centrées réduites).

L'ACP a donc été utilisée comme un outil exploratoire qui permet de visualiser et d'expliquer les relations entre les données.

Dans un premier temps l'ACP permet, au travers de calculs statistiques de déterminer le repère le plus représentatif de nos données. Le Tableau 23 représente le poids des axes (facteurs) définis par l'ACP.

Axes	Valeurs propres	Pourcentages	Pourcentages cumulés
1	42.08	37.92	37.92
2	29.05	26.17	64.09
3	17.06	15.37	79.45
4	14.37	12.94	92.40
5	8.44	7.60	100

Tableau 23 : Poids des facteurs défini par l'ACP

Les valeurs propres représentent le poids des variables par rapport à un axe. Ainsi l'axe 1 est représentatif de 42 variables sur 111. Les deux premiers facteurs retenus totalisent plus de 60% de la variance globale, le plan principal regroupe donc l'essentiel de l'information et sera retenu pour la représentation graphique.

Afin d'identifier les variables responsables des comportements observés, les 111 variables (OTU) sont projetées sur le cercle de corrélation du plan principal (Figure 46). La longueur des vecteurs obtenus informe sur leur représentativité dans ce cercle. Ainsi, une variable est d'autant mieux représentée dans le plan, que la norme du vecteur est proche du cercle unitaire de valeur 1.

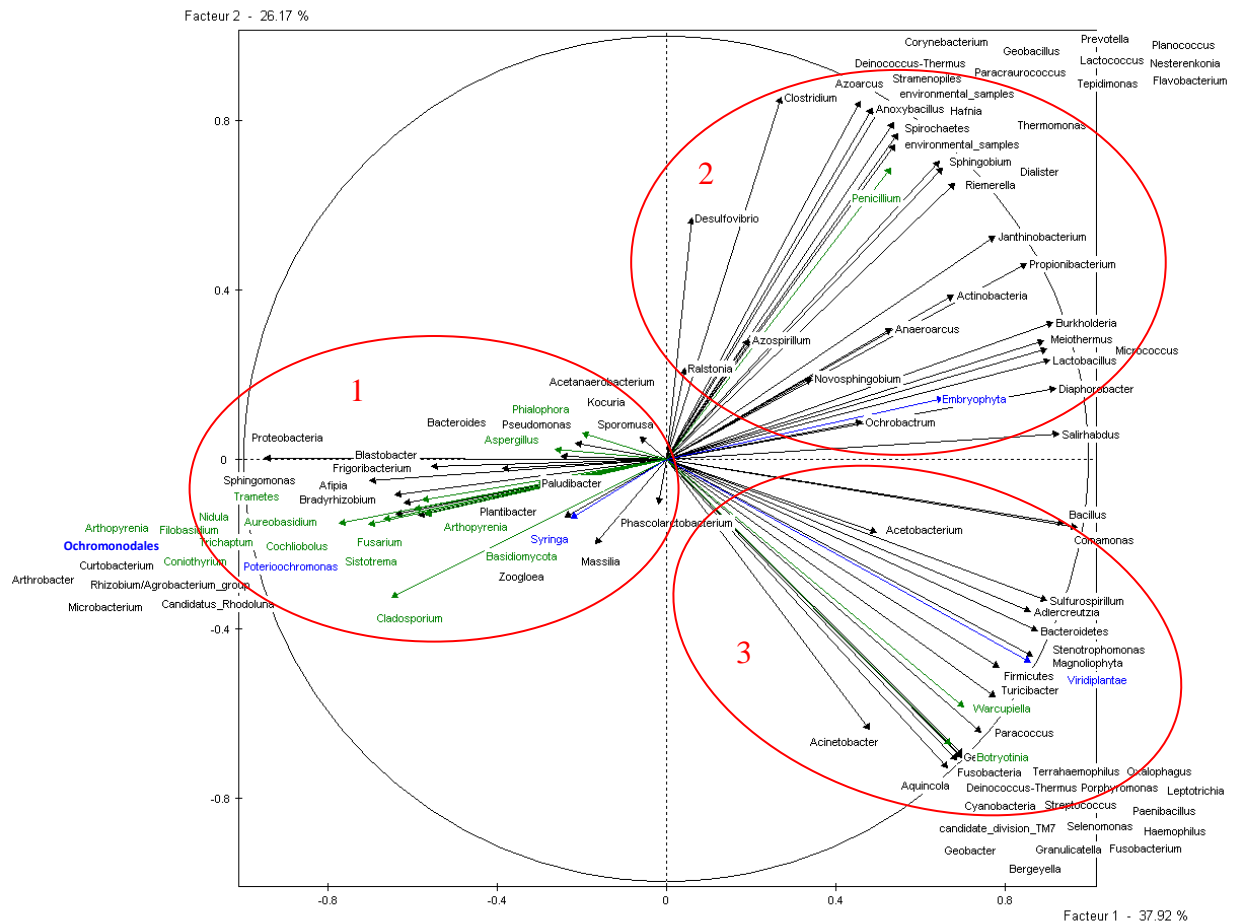


Figure 46 : Représentation des 111 variables actives (microorganismes) dans le plan des facteurs 1 et 2 (les bactéries sont représentées en noir, les champignons en vert et les autres eucaryotes en bleu)

Trois groupes de microorganismes se distinguent. La majorité des champignons (en vert) est placée dans le groupe 1. Les groupes 2 et 3 se composent principalement de bactérie (en noir). Seuls *Penicillium* (groupe 2), *Warcupiella* (groupe 3) et *Botryotinia* (groupe 3) sont des champignons représentés dans ces groupes. Ces résultats indiquent une dynamique de croissance similaire pour la plupart des champignons détectés. En revanche, *Penicillium*, *Warcupiella* et *Botryotinia* présentent des anti-corrélations (vecteurs opposés) avec d'autres champignons du groupe 1. Notamment, *Penicillium* est anti-corrélé à *Cladosporium*, ces deux genres se succèdent donc.

Ainsi, la croissance fongique semble s'accompagner du développement bactérien des genres représentés dans le groupe 1, alors que le développement des bactéries des groupes 2 et 3 ne semble se produire qu'en l'absence de la majorité des espèces fongiques.

Par exemple, notons que les genres *Aureobasidium* et *Pseudomonas* présentent une corrélation (groupe 1). Cela a également été observé lors d'une étude menée par Ciferri en 1999. En effet, ces deux genres étaient simultanément présents lors de dégradation des peintures sur bois (Ciferri, 1999). Dans notre étude, une corrélation encore plus marquée est également montrée entre *Pseudomonas* et *Aspergillus*.

De même, une corrélation est retrouvée entre les *Actinobacteria* et les *Penicillium* (groupe 2), relation retrouvée lors de l'étude de Hyvärinen (Hyvärinen *et al.*, 2002).

Le plan principal de cette ACP est présenté Figure 47, les points représentent les différents individus (essais).

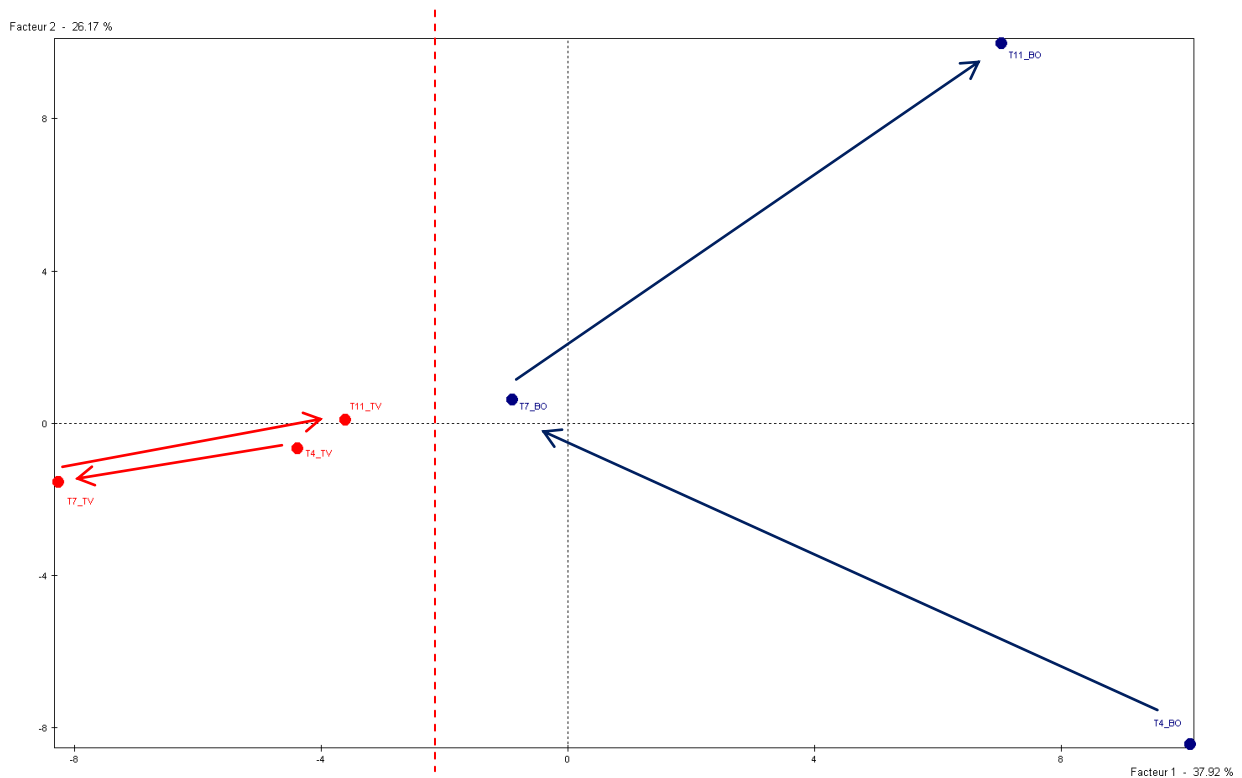


Figure 47 : Plan principal de l'ACP sur 111 microorganismes et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)

Avec des points dispersés dans le plan, cette représentation montre à la fois un effet support et une évolution temporelle des espèces fongiques et bactériennes qui se succèdent. L'effet support est décrit par le facteur 1, lui-même construit par l'ensemble des variables (microorganismes). Ainsi, les microorganismes du groupe 1 décrivent principalement la toile de verre, alors que ceux du groupe 2 et 3 sont particulièrement présents sur le bois (Figure 47).

En ce qui concerne la succession de ces microorganismes, elle reste similaire pour les deux supports (même direction), avec une influence plus marquée sur le bois (points plus espacés). Ainsi, les microorganismes du groupe 1 semblent être les premiers colonisateurs avant que ne leur succèdent les microorganismes du groupe 2 dont le seul représentant fongique est le genre *Penicillium*.

Afin de mettre en évidence la dynamique de colonisation par les champignons sur les deux supports, une deuxième analyse a été réalisée en sélectionnant uniquement les genres fongiques. Ainsi, une matrice constituée de 6 individus et 18 variables a été obtenue. Le poids des facteurs est présenté Tableau 24.

Axes	Valeurs propres	Pourcentages	Pourcentages cumulés
1	11.35	59.78	59.78
2	3.51	18.46	78.25
3	2.57	13.50	91.75
4	1.32	6.95	98.70
5	0.24	1.30	100

Tableau 24 : Poids des facteurs défini par l'ACP

Les deux premiers facteurs retenus totalisent plus de 70% de la variance globale, le plan principal regroupe donc l'essentiel de l'information et sera retenu pour la représentation graphique.

Les corrélations entre ces facteurs sont représentées sur la Figure 48.

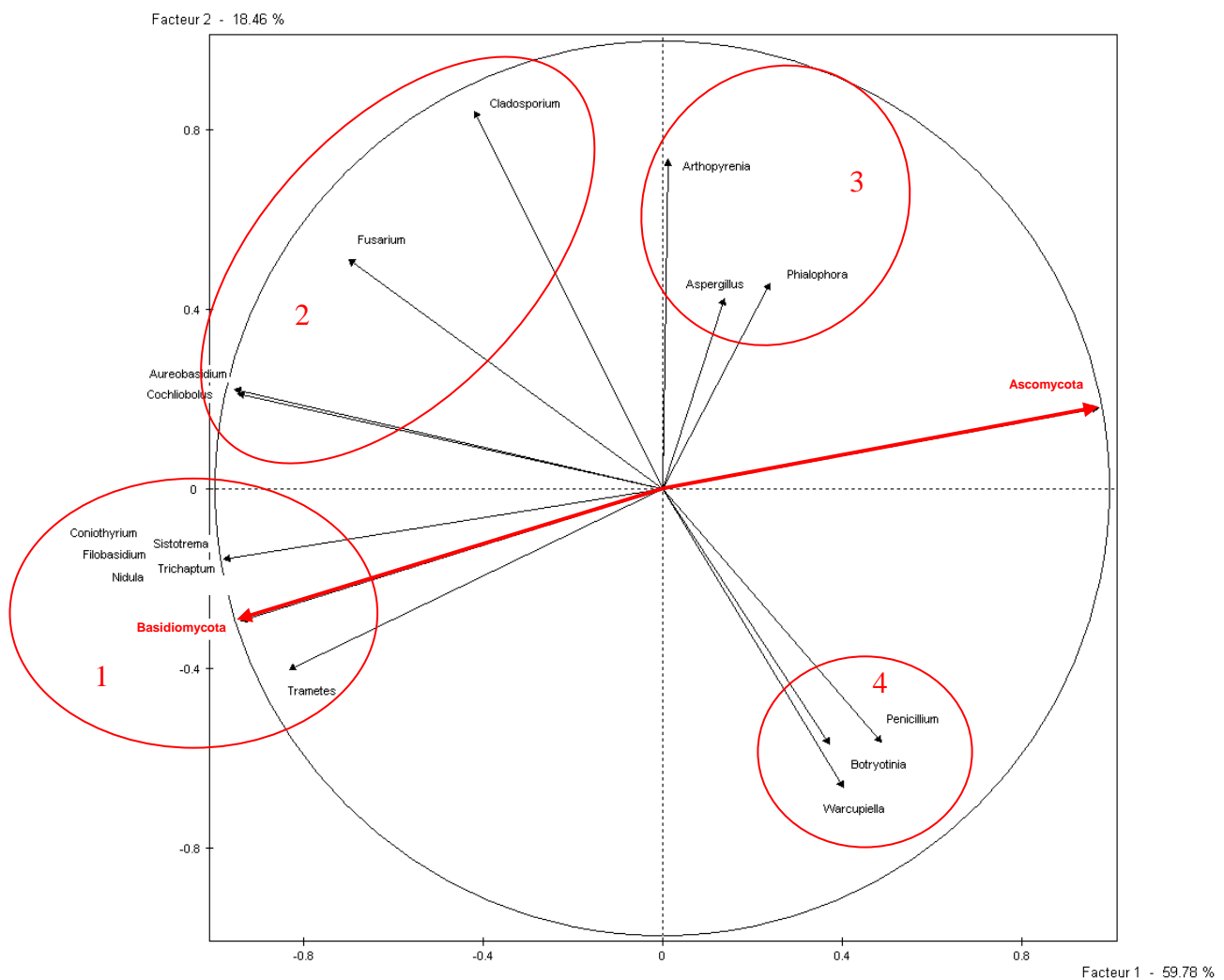


Figure 48 : Représentation des 18 variables actives (genres fongiques) dans le plan des facteurs 1 et 2.

Quatre groupes de moisissures se distinguent avec des anti-corrélations entre les groupes 1 et 3, ainsi que 2 et 4. La présence de ces anti-corrélations semble montrer des successions de croissance entre les genres de chaque groupe.

Le groupe 1 est constitué de genres appartenant à la division *Basidiomycota* à l'exception du genre *Coniothyrium* appartenant à la division des *Ascomycota*. Le genre *Coniothyrium* est souvent utilisé comme agent biologique phytosanitaire.

Les *Ascomycota* sont représentés dans les groupes 2, 3 et 4. Il s'agit de genres rencontrés couramment dans les environnements intérieurs et sur les produits (Nolard, 1997; Duchaine et Mériaux, 2001; Andersen *et al.*, 2011).

Les groupes 2 et 3 sont majoritairement représentés par les champignons appartenant à la classe des *Dothideomycetes* contrairement au groupe 4 (anti-corrélé) représentés par des *Eurotiomycetes* et des *Leotiomycetes*. Les *Basidiomycota* sont anti-corrélés aux *Ascomycota*, montrant une succession entre les genres de ces deux classes. Cette succession pourrait être expliquée par des différences de vitesses de croissance.

Le plan principal est présenté Figure 49, les points représentent les différents individus (essais).

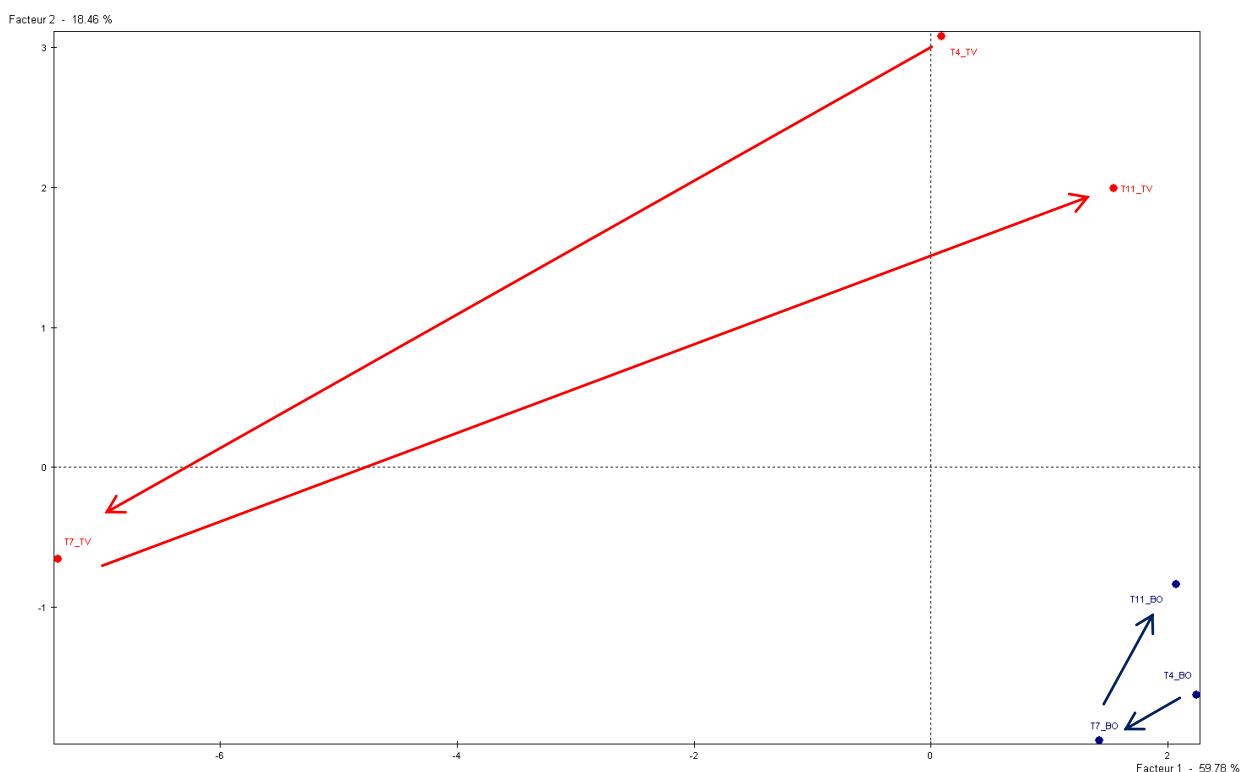


Figure 49 : Plan principal de l'ACP sur 18 genres fongiques et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)

Les effets support et temps constatés sur l'ACP de la matrice générale sont retrouvés avec les micromycètes. Ainsi, les genres du groupe 2 sont préférentiellement représentés sur toile de verre et ceux du groupe 4 sur le bois.

Dans les deux cas, le groupe 1 semble contenir les primo colonisateurs suivi du groupe 3 et 4. Au niveau de la dynamique microbienne, pour les deux supports, les genres du groupe 3 et 4 augmentent en fonction du temps.

Contrairement à la matrice générale, une dynamique plus importante des espèces fongiques est constatée sur toile de verre (plus de dispersion).

Afin de suivre l'évolution des bactéries sur les deux supports, une troisième analyse a été réalisée en sélectionnant uniquement les genres bactériens. Ainsi, une matrice constituée de 6 individus et 88 variables est obtenue. Le poids des facteurs est présenté Tableau 25.

Axes	Valeurs propres	Pourcentages	Pourcentages cumulés
1	35.51	40.35	40.35
2	27.26	30.98	71.33
3	12.15	13.80	85.13
4	8.73	9.92	95.05
5	4.36	4.95	100

Tableau 25 : Poids des facteurs défini par l'ACP

Les deux premiers facteurs retenus totalisent plus de 70% de la variance globale, le plan principal regroupe donc l'essentiel de l'information et sera retenu pour la représentation graphique.

Les corrélations entre ces facteurs sont représentées sur la Figure 50.

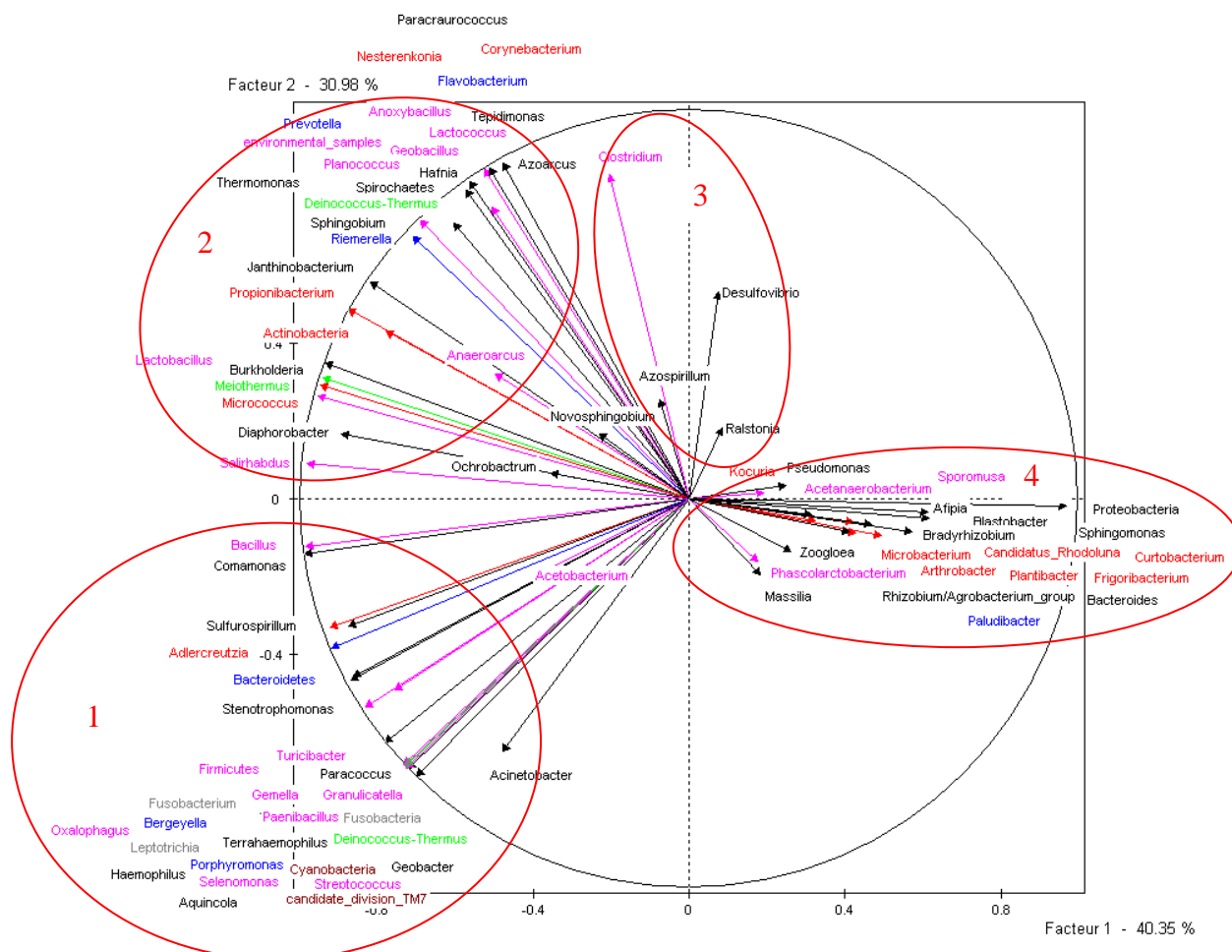


Figure 50 : Représentation des 88 variables actives (genres bactériens) dans le plan des facteurs 1 et 2 (les Proteobacteria sont représentés en noir, les Fusobacteria en gris, les Firmicutes en fuchsia, les Deinococcus en vert, les Bacteroidetes en bleu, les Actinobacteria en rouge, les autres phyla en bordeaux)

Quatre groupes de bactéries se distinguent avec des anti-corrélations entre les groupes 4 et 2. La présence de ces anti-corrélations semble montrer des successions de croissance entre les genres de ces deux groupes. Les bactéries retrouvées sont majoritairement des *Proteobacteria*, des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*.

Aucun comportement commun entre les différentes classes de *phyla* n'a été mis en évidence.

Le plan principal est présenté Figure 51, les points représentent les différents individus (essais).

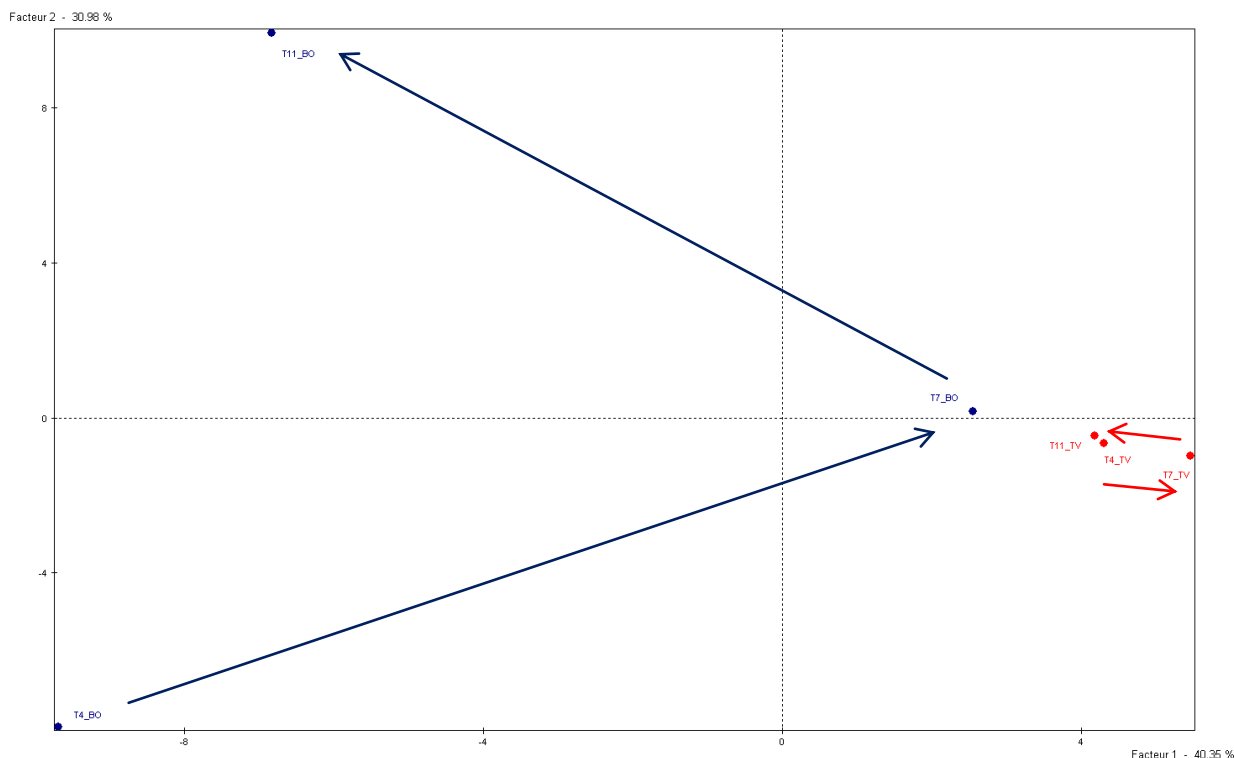


Figure 51 : Plan principal de l'ACP sur 88 genres bactériens et 6 essais (les essais réalisés sur toile de verre sont représentés en rouge et sur le bois en bleu)

Les effets support et temps constatés sur les deux ACP précédentes sont retrouvés avec les bactéries. Ainsi, les genres du groupe 4 sont préférentiellement représentés sur toile de verre et ceux des autres groupes sur le bois. Lors d'une étude sur la succession d'espèces colonisatrices sur les œuvres d'art, Ciferri avait montré la dépendance de la nature chimique du substrat sur la colonisation (Ciferri, 1999). Cet effet est également conforté en Campagne 1 avec la mise en évidence de genres bactériens et fongiques différents selon les supports.

Dans les deux cas, le groupe 4 semble contenir les primo colonisateurs suivi du groupe 2. Les genres des groupes 1 et 3 semblent avoir un rôle principalement sur le bois.

Contrairement à la matrice « micromycète » et comme la matrice générale, une dynamique plus importante des espèces bactériennes est constatée sur le bois, avec un retour à l'état initiale pour la toile de verre.

L'ensemble des résultats obtenus lors des deux campagnes montrent que la dynamique microbienne présente une forte dépendance d'abord au support, puis au mode de contamination. Dans tous les cas, cette contamination est décrite par une ou deux espèces dominantes avec une évolution de ces espèces au cours du temps. Cette observation est vérifiée lors des deux

campagnes de mesures, c'est-à-dire avec (campagne 1) et sans (campagne 2) apport de nouvelles espèces et modification des conditions hydriques durant l'essai. Par conséquent, l'inhibition d'une espèce a pour conséquence le développement d'une autre que ce soit pour les bactéries ou pour les moisissures.

Si la modification des espèces bactériennes et des espèces fongiques a lieu simultanément, en revanche, il n'a pas été mis en évidence de couple « bactérie-moisissure » commun à l'ensemble des essais. Par conséquent, la relation entre microorganismes ne permet pas à elle seule d'expliquer cette modification qui semble également liée aux conditions environnementales.

Si sur de longues périodes (plusieurs mois), la succession d'espèces microbiennes colonisant des supports avait déjà été démontrée par différents auteurs, cette étude met également en évidence une dynamique rapide à l'échelle de la journée sur plusieurs supports et à partir de plusieurs modes de contamination et d'incubation.

Aussi, concernant la flore bactérienne, une étude réalisée par Rintala *et al.*, en 2008, a montré la diversité de la communauté bactérienne et sa dynamique saisonnière. Deux bâtiments ont été investigués durant les quatre saisons. Il est apparu que les *Firmicutes* (Gram positifs) sont dominants, et que les Gram négatifs sont également en abondance, avec les genres : *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. L'abondance relative des *Alpha* et *Betaproteobacteria* augmente progressivement l'été. Les *Actinomycetes* et les *Alpha* et *Betaproteobacteria* sont majoritairement présentes au printemps et durant l'été. Un pic de *Bacteroides* est à noter à l'automne. D'autre part la proportion de *Firmicutes* et de *Gammaproteobacteria* est plus importante l'hiver (Rintala *et al.*, 2002).

La succession des colonisateurs fongiques sur les produits calcaires poreux ou compacts, exposés à des conditions subtropicales a été étudiée par culture. 90% des espèces détectées appartiennent à l'embranchement des *Ascomycetes*, et plus particulièrement aux genres *Cladosporium*, *Alternaria* et *Taeniolella* (champignon lichénisé). Après six mois d'exposition, les espèces appartenant aux genres *Scolecobasidium*, *Hyalodendron* et *Taeniolella* étaient prédominantes alors qu'après neuf mois les espèces majoritaires appartenaient aux genres *Curvularia* et *Alternaria*, suggérant que ces deux espèces remplacent les autres espèces à cause de leur capacité à résister au manque d'eau durant la saison sèche (Gómez-Cornelio *et al.*, 2012).

L'utilisation d'un « air tout venant » a également permis d'étudier cette dynamique en limitant les *a priori*. Avec une dynamique dépendante de chaque espèce en présence démontrée, ce choix s'est avéré pertinent pour l'appréhension de cas réels de contaminations. A partir des résultats obtenus, il est maintenant possible d'étudier ces dynamiques à partir de consortium d'espèces fongiques et bactériennes inoculées sur les produits. Par exemple, l'anti-corrélation observée de *Cladosporium* et *Penicillium* pourrait être étudiée spécifiquement. Ce mode de contamination avait déjà permis l'étude de la résistance d'espèces bactériennes colonisant un support (Laiz, 2011)

6.6 ETUDE DE L'EFFET DE TROIS TRAITEMENTS PREVENTIFS SUR LA CROISSANCE MICROBIENNE

Ce paragraphe est consacré à la détermination de l'impact d'un extrait d'ail et d'huiles essentielles de menthe poivrée et de thym sur la prolifération d'une contamination microbienne « tout venant » impactée sur deux types de matériaux identifiés comme les plus vulnérables au travers de la Campagne 1, à savoir :

- La toile de verre
- Le bois préalablement rincé par immersion dans de l'eau déionisée durant 48 heures afin d'en réduire la teneur en tanin, substance *a priori* fongistatique.

Cette étude a été réalisée par méthode culturale et par une approche de biologie moléculaire en qPCR décrites respectivement en §5.4.2 et §5.4.4.

La durée de l'essai est de 28 jours, durée d'incubation adoptée dans le protocole d'évaluation de la vulnérabilité des matériaux vis-à-vis d'une contamination fongique utilisé en routine au laboratoire du CSTB et conforme aux préconisations de la plupart des documents normatifs ayant trait à ce sujet.

En pratique, les coupons des deux matériaux sont « chargés » en solution traitante à base d'extrait d'ail diluée au 1/10 et d'huiles essentielles de thym et de menthe poivrée diluées au 1/500 par immersion extemporanément à leur contamination. La contamination des coupons de bois et de toile de verre traités et exempts de traitement (éprouvettes témoins) est réalisée selon la procédure appliquée pour la Campagne 2 et explicitée en §5.2.2.

Les éprouvettes sont ensuite disposées dans des enceintes (dessiccateurs) saturés en humidité.

Les matériaux sont répartis par type de supports et par traitement. Cette précaution évite les interactions éventuelles entre les différentes substances testées.

Les matériaux sont observés quotidiennement et un coupon de chaque matériau est prélevé pour analyse dès lors qu'une contamination microbienne est observée sur l'un des matériaux. L'ultime prélèvement est effectué après 28 jours d'incubation.

6.6.1 DETERMINATION DE LA CAPACITE D'ABSORPTION DES MATERIAUX D'ESSAI

Afin d'estimer la quantité de liquide susceptible d'être absorbée par chaque type de matériau, et en corolaire la charge en substance fongistatique, dix coupons de bois et autant de toile de verre préalablement déshydraté ont été immergés dans de l'eau déionisée et filtrée (stérile).

Chaque coupon est pesé à l'aide d'une balance de précision (Sartorius Genus de précision nominale de 0,1 mg) avant et après immersion. Les valeurs moyennes et données statistiques associées sont reportées dans les Tableau 26 et 18.

Tableau 26 : Capacité d'absorption des coupons de toile de verre

Toile de verre	Masse avant immersion (en mg)	Masse après immersion (en mg)	Masse de solution absorbée en mg	Masse relative en mg absorbé/mg de produit
Moyenne	61,86	139,29	77,43	1,25
Ecart type	19,53	11,09	21,95	
Dispersion	31,58%	7,96%	28,34%	

Tableau 27 : Capacité d'absorption des coupons de bois

Chêne rincé	Masse avant immersion (en mg)	Masse après immersion (en mg)	Masse de solution absorbée en mg	Masse relative en mg absorbé/mg de produit
Moyenne	1,77.10 ³	2,63.10 ³	861,77	0,49
Ecart type	74,56	109,81	80,01	
Dispersion	4,21%	4,17%	9,28%	

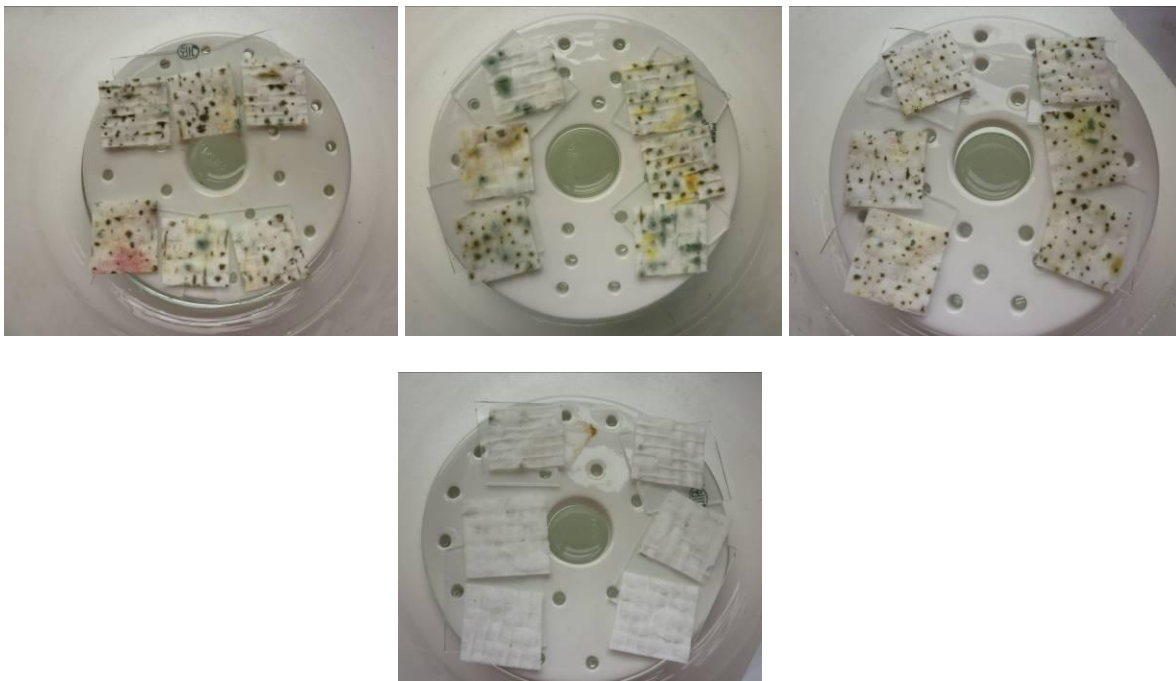
Comme attendu au vu de leurs épaisseurs, la capacité d'absorption des coupons de bois est en moyenne de 862 mg contre 77 mg pour les coupons de toile de verre.

Néanmoins ramené au poids moyen de chaque matériau sec, la toile de verre avec une valeur de 1,25 mg/mg possède une capacité d'absorption près de trois fois supérieure à celle du bois pour lequel cette valeur est de 0,49 mg/mg.

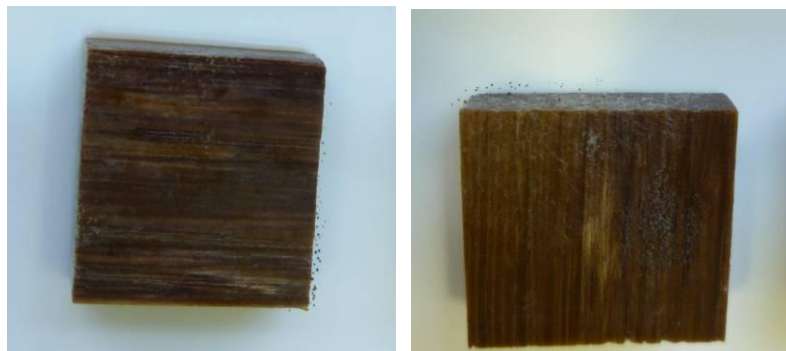
6.6.2 DENOMBREMENT DE LA FLORE MICROBIENNE CULTIVABLE

Après 7 jours d'incubation un développement microbien a été observé sur les coupons en **toile de verre** témoins et ceux traités à l'extrait d'ail et à l'huile essentielle de menthe. Un développement moindre a été constaté sur les coupons traités avec l'huile essentielle de thym (Photographie 13).

Concernant les coupons de **bois**, après cette même durée d'incubation de 7 jours, une croissance a été observée sur les éprouvettes témoins ainsi que sur celles traitées à l'huile essentielle de menthe poivrée (Photographie 14).



Photographie 13 : Développement microbien observé sur les coupons de toile de verre (de haut en bas et de gauche à droite) : exempts de traitement (témoins), traités à l'extrait d'ail, à l'huile essentielle de menthe et à l'huile essentielle de thym.



Photographie 14 : Développement microbien observé après 7 jours d'incubation sur les coupons de bois (de gauche à droite) : témoins et traités en huile essentielle de menthe poivrée

A l'issue des 28 jours d'incubation, aucun développement microbien n'a été observé sur les coupons de bois traités à l'extrait d'ail et à l'huile essentielle de thym.

A chaque échéance (T0, T7 et T28), six coupons de chaque matériau contaminés simultanément ont été traités.

Ainsi le matériel biologique est extrait selon la procédure adaptée à chaque type de support (§5.4.4.1) puis poolé.

Le fait de pooler le matériel biologique récupéré sur chacun des six coupons de même nature permet de s'affranchir de l'éventuelle hétérogénéité des matériaux.

Des volumes de 0,1 mL et 0,2 mL de cette suspension sont étalés respectivement sur milieu MEA + Chloramphénicol pour la détermination de la flore fongique cultivable et sur milieu TCS pour accéder à la flore bactérienne cultivable.

Les milieux ainsi ensemencés sont placés en incubation dans des dessiccateurs maintenus à 24°C à l'obscurité.

Le Tableau 28 récapitule les flores bactérienne et fongique cultivées évaluées pour les différentes durées d'incubation retenues, à savoir immédiatement après la contamination pour les matériaux non traités, c'est-à-dire sans incubation préalable (T0), après 7 jours d'incubation (T7), et après 28 jours d'incubation (T28).

Tableau 28 : Flores bactérienne et fongique évaluées par méthode culturale sur les différents matériaux testés après diverses durées d'incubation (ND : Non Dénombrable)

	Flore fongique (UFC/cm ³)			Flore bactérienne (UFC/cm ³)		
	Durée d'incubation (jours)			Durée d'incubation (jours)		
	T0	T7	T28	T0	T7	T28
Nature du matériau	Bois			Bois		
Sans traitement	2,93E+02	4,49E+02		7	ND	
Extrait d'ail (1/10)		1,04E+02	0		0	0
Huile essentielle de menthe poivrée (1/500)		1,58E+05	1,60E+06		ND	ND
Huile essentielle de thym (1/500)		2,62E+01	0		3,94E+01	0
Nature du matériau	Toile de verre			Toile de verre		
Sans traitement	62	1,53E+06		11	1,75E+03	
Extrait d'ail (1/10)		2,95E+05	2,99E+05		ND	4,45E+04
Huile essentielle de menthe poivrée (1/500)		7,28E+04	1,97E+05		2,97E+03	3,87E+06
Huile essentielle de thym (1/500)		4,96E+04	5,22E+04		ND	3,49E+06

Au vu de ces valeurs :

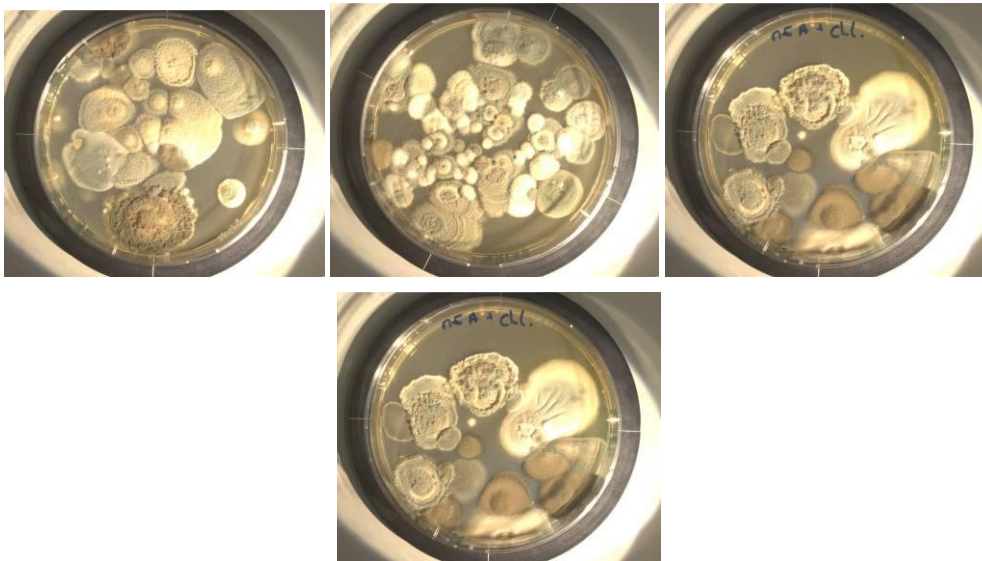
- les traitements à base d'extrait d'ail et d'huile essentielle de thym se révèlent efficaces quant à la prévention de la croissance microbienne sur le bois. L'huile essentielle de menthe poivrée semble, pour sa part, favoriser la prolifération aussi bien bactérienne que fongique et ce dès 7 jours d'incubation.
- Si sur toile de verre aucun des traitements testés n'a empêché totalement le développement microbien, néanmoins vis-à-vis de la flore fongique, on constate une prolifération plus faible à T7 avec un abattement de 1 à 2 Log selon les traitements comparativement au matériau non traité. Entre 7 et 28 jours, la flore fongique est stable. Concernant la flore bactérienne, les trois traitements semblent favoriser sa prolifération

avec un nombre d'UFC/cm³, à T7, plus élevé que celui mesuré sur la toile de verre non traitée.

Les observations macro et microscopiques des éprouvettes puis des milieux gélosés (Photographie 15 et 16) après mise en culture de la flore microbienne extraite des coupons de matériaux ont permis d'identifier différents genres fongiques reportés dans le Tableau 29. Concernant les bactéries, seuls des *Bacillus sp.* ont été observés quel que soit le support et la durée d'incubation.



Photographie 15 : Flore fongique observée sur MEA + Chloramphénicol à partir du matériel biologique extrait de coupons de bois après 7 jours d'incubation (de gauche à droite) témoins, traités à l'extrait d'ail et traités à l'huile essentielle de menthe poivrée



Photographie 16 : Flore fongique observée sur MEA + Chloramphénicol à partir du matériel biologique extrait de coupons de toile de verre après 7 jours d'incubation (de gauche à droite) témoins, traités à l'extrait d'ail et traités à l'huile essentielle de menthe poivrée. En bas : toile de verre traitée à l'huile essentielle de thym

Tableau 29 : Genres fongiques identifiés par méthode culturale sur la toile de verre et le chêne selon la nature du traitement appliqué après différentes durées d'incubation

	Moisissures		
	T0	T7	T28
Toile de verre			
Témoin	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium sp. ?</i>	Non déterminé
Extrait d'ail	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.(majoritaire)</i> <i>Penicillium spp.</i>	<i>Penicillium sp.(100%)</i>
H.E. menthe poivrée	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp.(100%)</i>
H.E. Thym	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Trichoderma sp. ?</i>	<i>Penicillium sp.(100%)</i>
Bois			
Témoin	Non déterminé	<i>Penicillium spp. (50%)</i> <i>Aspergillus niger (50%)</i>	Non déterminé
Extrait d'ail	Absence	Absence	Absence
H.E. menthe poivrée	Non déterminé	<i>Penicillium spp. (50%)</i> <i>Aspergillus niger (50%)</i>	<i>Penicillium spp. (50%)</i> <i>Aspergillus niger (50%)</i>
H.E. Thym	Absence	Absence	Absence

7 Conclusions

L'objectif de cette étude était de comprendre la dynamique de colonisation microbienne des supports.

Pour cela, un banc et un protocole d'essai ont été développés afin d'assurer le suivi des contaminations fongiques et bactériennes sur différents matériaux. Ainsi, une contamination dans des conditions réelles d'exposition a pu être réalisée sur six supports (campagne 1), sur une période de 23 jours. Des analyses macro, microscopiques, culturales et de biologie moléculaire ont été mises en œuvre.

Ces analyses ont montré une croissance microbienne sur l'ensemble des matériaux testés avec une augmentation des charges bactérienne et fongique durant l'essai.

Les essais par culture ont permis de distinguer deux types de comportement des supports vis-à-vis de la **croissance bactérienne**, un groupe constitué de la dalle de plafond, la plaque de plâtre et la toile de verre, avec une biomasse bactérienne très élevée à 23 jours, un second groupe composé de lin, bois et papier peint de charge bactérienne moindre.

Un comportement différent est observé avec la **contamination fongique** où le bois se distingue des autres supports avec un nombre élevé de spores viables et de fragments mycéliens récupérés à sa surface quelle que soit la durée d'exposition. A l'exception du papier peint, l'ensemble des supports testés présente, à 23 jours, une forte augmentation de biomasse fongique.

L'approche biomoléculaire a quant à elle conforté en partie ces résultats : la toile de verre étant la plus vulnérable vis-à-vis de la croissance bactérienne, le bois étant de loin le plus sensible vis-à-vis de la contamination fongique. Ces deux supports ont de fait été sélectionnés pour appréhender la dynamique de colonisation microbienne lors de la Campagne 2.

La diversité bactérienne et eucaryote présente sur des coupons de bois et de toile de verre a été caractérisée par séquençage haut débit. 82 285 séquences d'ADNr 16S et 27 631 séquences d'ADNr 18S ont été analysées. Les résultats montrent une diversité plus haute que celle

retrouvée par les méthodes culturales. Cette diversité caractérise un écosystème complexe composé de bactéries et d'eucaryotes. D'après ces résultats, la colonisation apparaît être un processus dynamique. Les core-species sont retrouvés aux différents temps de colonisation et sur les deux types de supports analysés par pyroséquençage, mais les abondances durant la colonisation et selon le type de support sont variables. Les résultats semblent donc montrer l'effet support sur cette diversité aussi bien au niveau bactérie qu'eucaryote. La présence d'amibes a également été mise en évidence. A 23 jours de colonisation, la toile de verre est majoritairement colonisée par ces amibes (*Amoebozoa*) avec plus de 70% des séquences. Ceci souligne l'impact potentiel de cette microflore, sur la qualité microbiologique des environnements intérieurs et la nécessité de développer des moyens de prévention et de gestion prenant en compte, la diversité microbienne dans son ensemble.

Une diversité microbienne plus importante a été observée lors de la campagne 1, montrant l'impact du mode de contamination et d'incubation sur la variabilité des espèces colonisatrices. Le mode de contamination forcée utilisé lors de la campagne 2 a permis une colonisation fongique rapide. Ces observations pourraient être expliquées par la variabilité de la microflore aéroportée.

Ainsi, une dynamique de colonisation réaliste de produit de construction et de décoration a pu être appréhendée. Il a été mis en évidence une succession de colonisateurs et la présence d'espèces majoritaires qui se succèdent et dépendent du support de colonisation y compris avec une même contamination initiale (campagne 2). Cette dynamique, observée pour les bactéries et la flore fongique en quelques jours, peut être expliquée par des différences de vitesses de croissance, une variation des conditions de croissance (nutriment, humidité, espèces en compétition) ou encore la production de métabolites secondaires tels que les mycotoxines, endotoxines, ou encore COV.

Concernant les traitements alternatifs aux biocides existants et identifiés au travers de la littérature comme possédant des propriétés antimicrobiennes, seuls l'huile essentielle de thym et l'extrait d'ail se sont révélés efficaces sur la prolifération fongique sur le bois. En effet, l'huile essentielle de menthe poivrée, troisième traitement testé, n'a limité la croissance microbienne ni sur le bois, ni sur la toile de verre. L'inefficacité constatée des trois traitements sur la toile de verre est sans doute imputable à la faible teneur en solution traitante de ce support par rapport à la charge microbienne impactée. Les résultats obtenus sur le bois corroborent les conclusions d'études visant à développer des traitements du bois à base d'huiles essentielles. L'efficacité de ces traitements reste à être démontrée sur d'autres supports.

A la lumière de ces résultats et de l'existence d'une diversité microbienne abondante et variable constatée lors des campagnes 1 et 2, le recours à un traitement à spectre d'action large apparaît indispensable pour prévenir le développement microbien. Notamment, l'utilisation de mélanges d'huiles essentielles apparaît pertinente en favorisant la synergie entre molécules actives. Cependant, cette synergie reste à étudier pour éviter des effets antagonistes. Les interactions entre ces composantes peuvent conduire à des effets antagonistes, additifs ou synergiques. Ainsi, certaines études ont démontré qu'un mélange d'huiles essentielles, présente généralement une activité antibactérienne plus élevée que les mélanges de leurs composantes principales, ce qui suggère que les composantes mineures sont essentielles à l'activité synergique, bien que des effets antagonistes et additifs aient également été observés (Davidson et Parish, 1989; Gill *et al.*, 2002; Mourey et Canillac, 2002).

L'étude des mécanismes de croissance fongique pourrait également constituer une approche pertinente pour affiner le choix des traitements préventifs. Aussi, la poursuite de ce travail consistera à étudier les mécanismes de colonisation et de dégradation des supports par les micromycètes. Pour cela la technique d'amplification des ITS pourra être sélectionnée afin d'être plus spécifique des micromycètes.

8 Références bibliographiques

- ACGIH (1999). Bioaerosols: assessment and control. American Conference of Industrial Hygienists (Cincinnati).
- Alvarez, L, Gil, A, Ezpeleta, O, Garcia-Jalon, J and Lopez de certain, A (2004). Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration. Food and Chemical Toxicology **42**: 825-834.
- Amarti, F, Satrani, B, Ghanmi, M, Farah, A, Aafi, A, Aarab, L, El Ajjouri, M and Chaouch, A (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **14**(1): 141-148.
- Amend, AS, Keith A Seifert, Robert Samson, and Thomas D Bruns (2010). Indoor Fungal Composition Is Geographically Patterned and More Diverse in Temperate Zones Than in the Tropics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(31): 13748-13753.
- Andersen, B, Frisvad, JC, Søndergaard, I, Rasmussen, IS, Larsen and Lisbeth, S (2011). Associations Between Fungal Species and Water-damaged Building Materials. Applied and Environmental Microbiology **77**(12): 4180-4188.
- Anderson, M, Nikulin, M, Koljalg, U, Anderson, M, Rainey, F, Reijula, K, Hintikka, E and Salkinoja-Salonen, M (1997). Bacteria, moulds, and toxins in water-damaged building materials. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 387-393.
- Avertit, P (2004). Des huiles essentielles tuent les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline.
- Ayerst, G (1966). Influence of physical factors on deterioration by moulds. Society of Chemical Industry Monograph **23**: 14-20.
- Bagamboula, C, Uyttendaele, M and Debevere, J (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri* Food Microbiology **21**: 33-42.
- Barral, J, Boivin, J, Coudurier, S, Desmazieres, C, Gonzalez, A, Guidez, F, Lapotre, A and Megy, F (2007). Valorisation des effets antimicrobiens de l'huile essentielle de lavandin Grosso. ONIPPAM: 1-67.
- Beguín, H (1995). Mould biodiversity in homes. II. Analysis of mattress dust. Aerobiologia **11**: 3-10.
- Beguín, H and Nolard, N (1994). Mould biodiversity in homes. I. Air and surface analysis of 130 dwellings. Aerobiologia **10**: 157-166.
- Bel Hadj, S, Mahjoub, M, Ammars, S, Imed, F, Zine, M and Mahjoub, A (2006). Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle de *Coridothymus capitatus* (L.). Les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales.
- Belghazi, L, Lahlou, N, Alaoui, I, Abousaouiria, T, Habti, N, Tantaoui, I, Talbi, M, Blaghen, M and Fellat-Zarrouk, K (2002). Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la menthe pouliot . Test antifongique . Congrès de biochimie. Biochimie et santé: 38-40.
- Bennis, S and Chami, F (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. Letters in Applied Microbiology **38**: 454-458.
- Berche, P (2003). Bactériologie générale. PCE M 2. 89.
- Billerbeck, V (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. . Phytothérapie **5**: 249-253.
- Blumenthal, CZ (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei* : justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology **39**: 214-228.
- Boissier, M (2003). Etude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques: application à l'hygiène des environnements intérieurs. UFR des sciences et de technologie. Val de Marne, Paris XII: 133.
- Botton, B, Breton, A, Feve, M, Guy, P, Larpent, JP and Veau, P (1985). Moisissures nuisibles. Moisissures utiles et nuisibles-Importance industrielle. Masson. Paris.
- Bouaoun, D, Hilan, C, Garabeth, F and Sfeir, R (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. Phytothérapie **5**: 129-134.
- Boyle, W (1955). Spices and essential oils as preservatives. Am. Perfum. Essent. Oil Rev. **66**: 25-28.

- Burt, S (2004). Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods: A review. Int. J. Food Microbiol. **94**: 223-253.
- Busse, HJ (1996). Classification and identification of bacteria : current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacteria systematics. Journal of biotechnology **47**: 3-38.
- Caillet, S and Lacroix, M (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- Carson, CF and Riley, TV (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology **78**: 264-269.
- Chami, F (2005). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. Phytother. Res **19**: 405-408.
- Ciferri (1999). Microbial Degradation of Paintings. Applied and Environmental Microbiology **65**(3): 879-885.
- Clarke, AJ (1996). Biodegradation of cellulose, CRC Press.
- Cornet, M, Fleury, L, Maslo, C, Bernard, J and Brucker, G (2002). Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area". Journal of Hospital Infection **51**(4): 288-296.
- Cosentino, S and Tuberoso, CIG (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett Appl Microbiol **29**: 130-135.
- Coutinho R. M. et & Henrissat, B (1999). *Carbohydrate - Active Enzymes Server* at URL
- Cox, SD, Mann, CM and Markham, JL (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol **88**: 170-175.
- Davidson, P and Parish, M (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol. **43**: 148-155.
- Delaquis, P, Stanich, K, Girard, B and Mazza, G (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int. J. Food Microbiol. **74**: 101-109.
- Djenane, D, Meddahi, A and Roncales, P (2006). Les systèmes antioxydants et antimicrobiens pour la conservation de la viande. Sciences des aliments **26**: 37-73.
- Do, J, Song, H, So, H and Soh, Y (2005). Antifungal effects of cement mortars with two types of organic antifungal agents. Cement and Concrete Research **35**(2): 371-376.
- Dorman, HJD and Deans, SG (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology **88**: 308-316.
- Duchaine, C and Mériaux, A (2001). The Importance of Combining Air Sampling and Surface Analysis When Studying Problematic Houses for Mold Biodiversity Determination. Aerobiologia **17**(2): 121-125.
- Durrieu, G (1993). Écologie des champignons. Collection d'écologie. Masson: 162.
- El Ajjouri, M, Satrani, B, Ghanmi, M, Aafi, A, Farah, A, Rahouti, M, Amarti, F and Aberchane, M (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement **12**(4): 345-351.
- Enrico, V, Papini, A, Baldo, F and Zhan, JM (2004). Étude expérimentale du renfort de l'immunité par le sirop du père Michel (POE 20). Institut de Sciences Naturopathiques (ISN).
- Foarde, K, JT, H and Veeck, A (2000). Efficacy of Antimicrobial Filter Treatments. ASHRAE Journal - Air Filters: 52-58.
- Freeman, L and Carel, Y (2006). Aromathérapie. NUTRA NEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé.
- Garg, KL, Jain, KK and Mishra, AK (1995). Role of fungi in the deterioration of wall paintings. the Science of the Total Environment **167**: 255-271.
- Gaüzère, C (2012). Analyse de la diversité microbienne « bruit de fond » de l'air des espaces clos par une approche métagénomique. , Université de Montpellier II / LBE, INRA de Narbonne.
- Gaüzère, C, Moletta-Denat, M, Bousta, F, Moularat, S, Oriol, G, Ritoux, S, Godon, J-J and Robine, E (2013). Reliable procedure for molecular analysis of airborne microflora in three indoor environments: an office and two different museum contexts. Clean, soil, air, water **41**(3): 226-234.
- Ghedira, K (2006). La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). Phytothérapie **5**: 220-226.

- Gljordani, R and Kaloustian, J (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. . Phytothérapie **3**: 121-124.
- Gill, AO, Delaquis, P, Russo, P and Holley, R (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol. **3**: 83-92.
- Godon, JJ, Zumstein, E, Dabert, P, Habouzit, F and Moletta, R (1997). Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. Water Science and Technology **36**(6-7): 49-55.
- Gómez-Cornelio, S, Mendoza-Vega, J, Gaylarde, CC, Reyes-Estebanez, M, Morón-Ríos, A, De la Rosa-García, SdC and Ortega-Morales, BO (2012). Succession of Fungi Colonizing Porous and Compact Limestone Exposed to Subtropical Environments. Fungal Biology(0).
- Gordon, RE, Haynes, WC and Pang, CHN (1973). The genus Bacillus. Agri culture Handbook **427**.
- Grant, C, Hunter, CA, Flannigan, B and Bravery, AF (1989). The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. International Biodeterioration and Biodegradation **25**: 259-284.
- Griffin, DH (1994). Fungal physiology - 2nd ed. New York, Wiley-Liss.
- Guesmi, A and Boudabous, A (2006). Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. Les Plantes à Parfum, aromatiques et médicinales.
- Halewyn, M-A, Leclerc, J-M, King, N, Belanger, M, Legris, M and Frenette, Y (2003). Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, Institut national de santé publique du Québec: 166 p.
- Hammer, KA, Carson, CF and Riley, TV (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiology **86**: 985-990.
- Helme, J-P, Chazan, J-B and Perrin, J-L (2004). Les antioxydants in Actifs et additifs en cosmétologie. Éditions Tec & Doc: 337-352.
- Higdon, J (2007). An evidence-based approach to dietary phytochemicals. Thieme Medical Publishers: 238.
- Hunter, C, Grant, C, Flannigan, B and Bravery, A (1988). Mould in Buildings : the Air Spora of Domestic Dwellings. International Biodeterioration **24**: 81-101.
- Hyde, G, Mitton, R and Musgrave, A (1951). A study of mould growth on pyrogallol-tanned leather and the associated changes of chemical composition and physical properties. Journal of the Society of Leather Trades' Chemists **35**: 82-103.
- Hyvärinen, A, Meklin, T, Vepsäläinen, A and Nevalainen, A (2002). Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity. International Biodeterioration and Biodegradation **49**(1): 27-37.
- Inouye, S and Abe, S (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. . Phytothérapie **1**: 2-4.
- Janinska, B (2000). Environmental requirements for fungi. Journal of Thermal Envelope and Building Science Publisher **23**: 339-348.
- Jerzy Karys, JW (2007). WOOD DRY-ROT FUNGI AS BIODEGRADATION FACTORS OF POROUS BUILDING MATERIALS. **33-40**.
- Kembel, SW, Evan Jones, Jeff Kline, Dale Northcutt, Jason Stenson, Ann M Womack, Brendan Jm Bohannon, G Z Brown, and Jessica L Green (2012). Architectural Design Influences the Diversity and Structure of the Built Environment Microbiome. The ISME Journal **6**(8): 1469-1479.
- Kleywegt, GJ, Zou, J-Y, Divne, C, Davies, GJ, Sinning, I, Ståhlberg, J, Reinikainen, T, Teeri, TT and Jones, TA (1997). The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and comparison with related enzymes. J Mol Biol **272**: 383-397.
- Koroch, A, Juliani, H and Zygodlo, J (2007). Bioactivity of Essential Oils and Their Components. Berlin, Germany, , Springer Verlag.
- Kuhn, I, Hana, V and Rohr, K (1995). Determination of ochratoxin A in bile of swine by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography B **668**: 333-337.
- Lahlou, M (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. . Phytotherapy Research **18**: 435-448.
- Laiz, L, Anna Romanowska-Deskins, and Cesareo Saiz-Jimenez (2011). Survival of a Bacterial/archaeal Consortium on Building Materials as Revealed by Molecular Methods. International Biodeterioration and Biodegradation **65**(7): 1100-1103.
- Lavigne, JP (2007). Effet des antibiotiques, mécanismes de résistance. . 1er cycle - PCEM 2 - MB7 - Bactériologie- Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, France.

- Lemaitre C., PN, Festy D. (1998). Biodétérioration des matériaux, EDP Sciences Editions.
- Loisel, P, Harmand, J, Zemb, O, Latrille, E, Lobry, C, Delgenes, JP and Godon, JJ (2006). Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. Environmental Microbiology **8**(4): 720-731.
- Mahboubi, M and Haghi, G (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. . Journal of Ethnopharmacology. **119**: 325-327.
- Marcheix, J-J, Fleuriot, A and Jay-Allemand, C (2005). Les composés phénoliques des végétaux
- Michelland, RJ, Dejean, S, Combes, S, Fortun-Lamothe, L and Cauquil, L (2009). StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. Molecular Ecology Resources **9**: 1359-1363.
- Moularat, S (2005). Etude de la contamination fongique des environnements intérieurs par la détermination et la mesure de traceurs chimiques spécifiques : application à l'hygiène de l'habitat. Champs sur Marne, Université de Marne-la-Vallée: 158.
- Moularat, S, Derbez, M, Kirchner, S, Ramalho, O and Robine, E (2008). Détermination de la contamination fongique des logements français par un indice chimique. . Pollution Atmosphérique **197**: 37-44.
- Mourey, A and Canillac, N (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. Food Control **13**: 289-292.
- Muñoz-Bonilla, A and Fernández-García, M (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. Progress in Polymer Science **37**(2): 281-339.
- Nolard, N (1997). Moisissures et allergies respiratoires. Expression **5**: 7-16.
- Orial, G and Bousta, F (2005). Les altérations biologiques et les biens patrimoniaux. Chapitre IV. Les traitements et définitions, sélection des produits et mise en œuvre. Monumental: 107-112.
- Osharov, N and May, GS (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. FEMS Microbiology Letter **199**(2, 30 May 2001): 153-160.
- Panasenko, VT (1967). Ecology of microfungi. The botanical review **33**: 189-215.
- Parat, S and Perdrix, A (2002). Les contaminants biologiques des biens culturels. Climatisation et aérobiocontamination 171-185.
- Pasanen, A, Juutinen, T, Jantunen, M and Kalliokoski, P (1992). Occurrence and moisture requirements of microbial growth in building materials. International Biodeterioration and Biodegradation **30**: 273-283.
- Pibiri, MC (2005). Assainissement microbiologique de l' air et des systèmes de ventilation au moyen d' huiles essentielles. . Thèse de doctorale. Ecole poly technique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse).
- Pitkäranta, Miia, Meklin, T, Hyvärinen, A, Nevalainen, A, Paulin, L, Auvinen, P, Lignell, U and Rintala, H (2011). Molecular Profiling of Fungal Communities in Moisture Damaged Buildings Before and After Remediation--a Comparison of Culture-dependent and Culture-independent Methods. BMC Microbiology **11**: 235.
- Pitkäranta, M, Meklin, T, Hyvärinen, A, Paulin, L, Auvinen, P, Nevalainen, A and Rintala, H (2008). Analysis of Fungal Flora in Indoor Dust by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Quantitative PCR, and Culture. Applied and Environmental Microbiology **74**(1): 233-244.
- Pitt, JI and Hocking, AD (1999.). Fungi and food spoilage. Aspen Pub. Gaithersburg: 28.
- Rappe, MS and Giovannoni, SJ (2003). The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol **57**: 369-394.
- Rasooli, I, Bagher, RM and Allameh, A (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus Niger* by essential oils from *Thymus Eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. . Food Control **17**: 359-364.
- Rayour (2003). Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The Journal of Essential oil Research. **86**: 985-990.
- Rintala, H, Nevalainen, A and al., e (2002). Diversity of streptomycetes in water-damaged building materials based on 16S rDNA sequences. Lett Appl Microbiol **34**(6): 439-443.
- Roquebert, MF and Orial, G (2002). Analyse d'une contamination : comment analyser une contamination biologique et en évaluer les risques Les contaminants biologiques des biens culturels. Elsevier. Amsterdam: 147 - 159.
- Rosenthal, GA (1991). The biochemical basis for the deleterious effects of L-canavanine. Phytochemistry **30**: 1055-1058.

- SAMSON, R, FLANNIGAN, B, FLANNIGAN, M, VERHOEFF, A, ADAN, O and HOEKSTRA, E (1994). Recommendations. Health implications of fungi in indoor environments. Amsterdam, Elsevier. **2**: 531-538.
- Samson, R and Hoekstra, E (1994). Common fungi occurring in indoor environments. Health implications of fungi in indoor environments. Amsterdam, Elsevier. **2**: 541-546.
- Sand and Wolfgang (1997). Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates--A general mechanistic overview. International Biodeterioration & Biodegradation **40**(2-4): 183.
- Sand, W (1997). Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates-A general mechanistic overview. International Biodeterioration and Biodegradation **40**(2-4): 183-190.
- Schafer, H and Wink, M (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. Biotechnol. J. **4**: 1684-1703.
- Schwammle, B, Winkelhausen, E, Kuzmanova, S and Steiner, W (2001). Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. . Biotechnol **39**: 341-345.
- Scott, WJ (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. Advances in Food Research **7**: 83-127.
- Sequeira, S, Cabrita, EJ and Macedo, MF (2012). Antifungals on paper conservation: An overview. International Biodeterioration & Biodegradation **74**(0): 67-86.
- Shirakawa, MA, Selmo, SM, Cincotto, MA, Gaylarde, CC, Brazolin, S and Gambale, W (2002). Susceptibility of phosphogypsum to fungal growth and the effect of various biocides. International Biodeterioration & Biodegradation **49**(4): 293.
- Singh, J (1994). Management of decay and health in buildings. Building mycology, E & FN SPON. **6**: 298-309.
- Stranger-Johannessen, M (1991). Providing a sound habitat for man in space. Acta Astronaut **23**: 275-277.
- Torvinen, E, Meklin, T and al., e (2006). Mycobacteria and fungi in moisture-damaged building materials. Appl Environ Microbiol **72**(10): 6822-6824.
- Tsao, SM and Yin, MC (2001). In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oil. Journal of Medical Microbiology **50** **646--649**.
- Urzi, C and Leo, F (2007). Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. International Biodeterioration and Biodegradation **60**(1): 25-34.
- van de Braak, SAAJL, G.C.J.J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and Other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, The Netherlands,.
- Vanpeteghem, D, Zemb, O and Haegeman, B (2008). Dynamics of neutral biodiversity. Mathematical Bioscience **212**(1): 88-98.
- Walsh, SE, Maillard, JY and Al., e (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram -positive and negative bacteria. Journal of Applied Microbiology. **94**(2): 240- 247.
- Yli-Pirila, T, Kusnetsov, J and al., e (2004a). Amoebae and other protozoa in material samples from moisture-damaged buildings. Environ Res **96**(3): 250-256.
- Yli-Pirila, T, Kusnetsov, J and al., e (2009a). Survival of amoebae on building materials. Indoor Air **19**(2): 113-121.
- Yli-Pirila, T, Kusnetsov, J, Haatainen, S, Hanninen, M, Jalava, P, Reiman, M, Seuri, M, Hirvonen, MR and Nevalainen, A (2004b). Amoebae and other protozoa in material samples from moisture-damaged buildings. Environ Res **96**(3): 250-256.
- Yli-Pirila, T, Kusnetsov, J, Hirvonen, MR, Seuri, M and Nevalainen, A (2009b). Survival of amoebae on building materials. Indoor Air **19**(2): 113-121.