

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

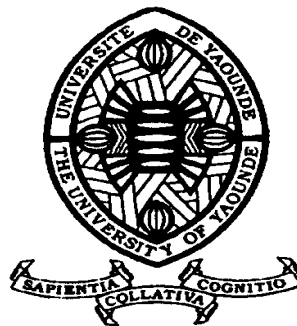
*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

Centre de Recherche et de Formation  
Doctorale en Science de la Vie, Santé et  
Environnement  
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

Centre for Research and Doctoral  
Training in Life Sciences,  
Health and the Environment  
LABORATORY OF  
MICROBIOLOGY

**Contribution à la lutte contre les contaminants  
microbiens des locaux et des collections des  
bibliothèques au moyen d'huiles  
essentielles**

THESE

« Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du  
Doctorat/Ph.D en  
Biochimie »

Par : **KENGNE GOUNMADJE Landry**  
Master en Biochimie

Sous la direction de  
**ETOA François-Xavier**  
Professeur, Université de Yaoundé I  
**NYEGUE M. Ascension**  
Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2018 - 2019



REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
-----  
FACULTE DES SCIENCES  
-----  
DEPARTMENT DE BIOCHIMIE  
-----  
BP : 812 YAOUNDE



REPUBLIC OF CAMEROON  
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
-----  
FACULTY OF SCIENCE  
-----  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY  
-----  
PO BOX : 812 YAOUNDE

### ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés Pr. **FEKAM BOYOM Fabrice** et Pr. **MOUNDIPA FEWOU Paul** respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie option Pharmacologie, soutenue par Monsieur **KENGNE GOUNMADJE Landry** (Matricule **07R379**) le 19 Août 2020 à 14 heures dans la Salle S01/S02 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : "**Contribution à la lutte contre les contaminants microbiens des locaux et des collections des bibliothèques au moyen d'huiles essentielles**", attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **14 OCT 2020**


Examineur

*Fabrice F. Boyom, Sc*  
Professor of Biochemistry

Président du jury

*Moundipa Fewou Paul*  
D3C,D. Etat  
Professor  
Enzymology-Toxicology

*Moundipa Fewou Paul*  
Professeur  
Enzymologie - Toxicologie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

## LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020  
(Par Département et par Grade)  
DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020

### ADMINISTRATION

**DOYEN :** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA :** DONGO Etienne, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE :** AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC :** ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière :** NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :**  
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

### 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS

13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste

5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste

43	YEDE	Chargé de Cours	En poste
44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOULO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste

25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD</i> s

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
23	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste

18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme &amp; Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste



13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

<i>6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)</i>			
--	--	--	--

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
---	-----------------	-----------------	----------

5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	------------------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste

14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
29	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
30	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
31	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste

16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste

26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)
---

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>

16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	<b>39 (18)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (14)</b>
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (1)	10 (02)	12 (02)	03 (0)	<b>35 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	06 (02)	<b>31 (3)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (4)</b>	<b>100 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>46 (10)</b>	<b>345 (75)</b>

Soit un total de **345 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **101 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes **75**

*A la mémoire de mon père Gounmadje*

## DEDICACE

*Je dédie cette thèse,*

*A ma chère et tendre mère Mogoung Froune*



## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé. Elle a été rendu possible grâce au soutien indéniable de nombreuses personnes et institutions que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier.

Mes remerciements les plus profonds sont adressés en premier à mon directeur de thèse, le Professeur **ETOA François Xavier** qui a accepté de diriger cette thèse malgré ses multiples occupations.

Je remercie également le Professeur **NYEGUE Maximilienne Ascension** sans qui l'entame, la réalisation et la finalisation de cette thèse n'auraient eu lieu. Professeur vos encouragements, votre amour pour la recherche et votre soutien inconditionnel m'ont permis de garder la tête haute dans les moments difficiles et de ne pas abandonner quand bien même toutes les conditions étaient réunies pour l'occasion.

Mes remerciements sont également adressés

Aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail de recherche. Vos critiques et recommandations ont permis l'amélioration de cette thèse tant sur la forme que sur le fond.

Au Professeur **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie et à l'ensemble du corps enseignant dudit Département pour le confort académique et la qualité des enseignements qu'ils nous ont assuré durant notre formation.

Au Professeur **GONSU KAMGA Hortense** qui nous a garanti un accès inconditionnel au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé dont elle en est la responsable, pour la réalisation de la partie microbiologique de notre travail.

Au Professeur **ESSI Marie-José** conservatrice en chef de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I pour sa sympathie et son accueil chaleureux me permettant un accès au moindre recoin de la bibliothèque.

A l'**Institut Français du Cameroun** pour l'intérêt accordé à notre étude ainsi que pour l'accès inconditionnel aux locaux de leur bibliothèque.

A l'**Equipe «Glyco et Nanovecteurs pour le Ciblage Thérapeutique»** de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier II, pour sa contribution sans aucune contrainte aux analyses chimiques de l'ensemble des huiles essentielles.

A mes aînés de laboratoire qui, à travers des échanges fructueux ont contribué dans l'appréhension et la réalisation de cette thèse. Je pense notamment à : **Dr VOUNDI Steve ; Dr AFAGNIGNI Alian ; Dr MONI Esther et M. NGALANI Eric**

A mes camarades et amis de promotion devenus des frères par leur attachement et leur esprit de fraternité, qualité qui nous a procuré un espace de travail convivial. Il s'agit de **Dr DJOVA Steve Valdi et Dr NGONGANG TCHAMI Dimitri.**

A tous mes cadets de laboratoires, en particulier **DJUIDJE Armelle** et **DJOMDJI Métissa** qui m'ont apporté une assistance irréfutable sur la paillasse.

A mes frères et sœurs **TOGUEU Raoul ; YOUMBI Christine ; WAFFO Ulrich ; DJUIKOM Merline ; NGUETIO Patricia** pour leur soutien moral.

A tous les membres de ma famille qui m'ont soutenus financièrement depuis le début de cette thèse jusqu'à sa finalisation.

A tous les membres de l'association Friends Forever « F.F.E » dont j'en fais partie, pour toutes ces années d'encouragement.

A ma bien aimée le **Dr JIOFACK Saurelle** pour la relecture de cette thèse et surtout pour sa patience et ses encouragements.

A tous mes amis et proches que je ne saurai citer.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à cette œuvre, je vous manifeste ma reconnaissance éternelle.

## TABLE DES MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I.....	ii
DEDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS .....	xvi
TABLE DES MATIERES .....	xviii
RESUME.....	xxvi
ABSTRACT.....	xxvi
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xxviii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxxii
LISTE DES FIGURES.....	xxxii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITERATURE .....	5
I. Généralité sur les bâtiments .....	5
I.1 Lieux confinés (définition) .....	5
I.2. Système de ventilation .....	5
I.2.1. Différents types de ventilation .....	5
I.2.2 Importance de l'aération .....	5
I.3. Nature des sources de polluants .....	6
I.4 Entretien des lieux confinés .....	6
I.4.1 Méthodes de traitement de l'air .....	6
I.4.2. Traitement des surfaces d'un local .....	7
II. Microorganismes de l'environnement intérieur .....	8
II.1 Champignons .....	8
II.1.1. Moisissures .....	8
II.1.1.1. Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux.....	9
II.1.1.2. Développement des champignons filamenteux .....	9
II.1.1.3. Facteurs favorisant la croissance des moisissures dans le milieu intérieur .....	9
II.1.1.4. Principales moisissures de l'intérieur .....	10
II.1.2. Levures.....	11
II.1.2.1. Caractéristiques morphologiques des levures.....	11
II.1.2.2. Reproduction .....	11

II.1.2.3. Principales levures de l'intérieur .....	11
II.2. Bactéries.....	12
II.2.1. Description générale .....	12
II.2.2. Reproduction bactérienne .....	12
II.2.3. Sporulation.....	12
II.2.4. Principales bactéries de l'environnement intérieur.....	12
III. Effets des microorganismes de l'environnement intérieur sur l'Homme et les objets .....	13
III.1. Effets nocifs sur l'homme .....	13
III.1.1. Effet nocifs associés aux moisissures.....	13
III.1.2. Effets associés aux bactéries .....	14
III.2. Effets néfastes sur les documents.....	14
III.3. Effets néfastes sur les locaux .....	15
IV. Généralités sur les méthodes d'échantillonnage .....	16
IV.1. Dans l'air.....	16
IV.1.1 La sédimentation .....	16
IV.1.2 L'impaction.....	16
IV.1.3 Filtration.....	17
IV.2 Prélèvements de surfaces .....	17
IV.2.1 Adhésif.....	18
IV.2.2 Boîtes et lames « contact ».....	18
IV.2.3 Ecouvillonnage.....	18
IV.3. Prélèvement sur des livres.....	19
V. Techniques d'identification microbienne .....	19
V.1. Identification des bactéries .....	19
V.1.1. Examen macroscopique.....	19
V.1.2. Examen microscopique .....	19
V.1.3. Identification biochimique .....	20
V.1.4. Identification moléculaire.....	21
V.2. Identification des champignons filamenteux.....	22
V.2.1. Examen macroscopique.....	22
V.2.2. Examen microscopique .....	22
V.2.3. Identification moléculaire.....	22
V.3. Identification des levures.....	23

V.3.1. Examen morphologique .....	23
V.3.2. Identification biochimique .....	23
VI. Description des biofilms bactériens .....	24
VI.1. Définition.....	24
VI.2. Les étapes de formation d'un biofilm .....	25
VI.2.1. Adhésion réversible.....	25
VI.2.2. Adhésion irréversible .....	25
VI.2.3. Formation de microcolonies (Le développement précoce du biofilm) .....	26
VI.2.4. Maturation du biofilm .....	26
VI.2.5. Dispersion du biofilm.....	26
VI.3. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm .....	27
VI.4. Les domaines d'intervention des biofilms .....	28
VI.4.1. Dans l'environnement et le domaine industriel .....	28
VI.4.2. Dans le domaine médical .....	28
VI.5. Les méthodes de détection de biofilm.....	28
VI.5.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) .....	29
VI.5.2. La méthode en tube (TM) .....	29
VI.5.3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA) .....	30
VI.5.4. Le Biofilm Ring Test (BFRT).....	30
VI.6. Résistance des biofilms aux antibiotiques et désinfectants.....	31
VI.6.1. Présentation de la résistance.....	31
VI.6.2. Mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques et désinfectants .....	31
VI.7. Le Quorum sensing .....	32
VII. Généralité sur les huiles essentielles.....	33
VII.1. Définition.....	33
VII.2. Répartition, localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles dans la plante .....	33
VII.3. Rôle physiologique des huiles essentielles chez les plantes .....	34
VII.4. Composition chimique.....	34
VII.5-Méthodes d'analyse et d'identification des HES .....	35
VII.5.1-Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	35
VII.5.2-Couplage CPG/SM .....	35
VII.7. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne.....	41
VII.7.1 Méthodes qualitatives .....	41

VII.7.1.1. Aromatogramme .....	41
VII.7.1.2 Technique de microatmosphère .....	41
VII.7.1.3-Technique par contact direct .....	42
VII.7.1.4-Méthode de diffusion en puits ou en cylindre .....	42
VII.7.2.-Méthodes quantitatives.....	42
VII.7.2.1-La méthode de dilution en milieu liquide.....	42
VII.7.2.2-Méthode d'incorporation dans la gélose .....	42
VII.8. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	43
VII.9. Interaction entre les HEs.....	43
VII.10. Utilisation des huiles essentielles .....	44
VIII. Généralité sur les désinfectants .....	44
VIII.1. Quelques définition .....	44
VIII.2. Distinction entre détergents et désinfectants .....	45
VIII.3. Modes d'action des désinfectants.....	45
VIII.4. Résistance microbienne aux désinfectants .....	46
VIII.5. Huiles essentielles comme alternative aux produits désinfectants.....	47
VIII.5.1. Désinfectant des surfaces .....	47
VIII.5.2. Désinfectant de l'air ambiant .....	47
VIII.6. Evaluation de l'activité des désinfectants .....	48
VIII.6.1. Principe de la NF T72-281 .....	48
VIII.6.2. Validation de l'essai .....	49
VIII.6.3. Critères d'activité bactéricide et/ou fongicide et/ou sporicide.....	49
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES.....	50
I. Matériel.....	50
I.1. Matériel d'isolement .....	50
I.2. Matériel d'identification .....	50
I.3. Matériel d'évaluation de l'activité antimicrobienne .....	50
I.4. Milieux de cultures .....	54
II. Méthodes.....	55
II.1. Lieux d'étude et justification.....	55
II.2. Echantillonnage des microorganismes .....	56
II.3. Détermination des concentrations microbiennes dans l'air et sur les surfaces.....	58
II.3.1. Détermination des concentrations microbiennes dans l'air.....	58

II.3.2. Détermination des concentrations microbiennes sur les surfaces .....	59
II.4. Identification phénotypique des isolats .....	60
II.5. Extraction et caractérisation des HEs .....	60
II.5.1. Extraction des Huiles Essentielles .....	61
II.5.2. Réalisation des combinaisons d'huiles essentielles.....	61
II.6. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles.....	62
II.6.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à ionisation de flamme.....	62
II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	64
II.7.1. Choix des souches microbiennes .....	64
II.7.2. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les isolats bactériens .....	65
II.7.2.1. La méthode du Rouge Congo Agar .....	65
II.7.2.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	66
II.8. Tests antimicrobiens .....	67
II.8.1. Méthodes qualitatives .....	67
II.8.1.1. Effet des HE après prélèvement direct .....	67
II.8.1.2. Détermination des diamètres des zones d'inhibition.....	68
II.8.2. Méthodes quantitatives .....	69
II.8.2.1. Détermination des paramètres d'inhibition des huiles essentielles (CMI, CMF) sur la croissance radiale des moisissures par la méthode de microatmosphère .....	69
II.8.2.2. Détermination des paramètres d'inhibitions (CMI, CMB, CMF) des huiles essentielle et combinaisons d'huiles essentielles par la méthode de dilution en milieu liquide.....	71
II.9. Détermination de quelques cibles cellulaires des huiles essentielles sur les isolats bactériens.....	73
II.9.1. Expérience de la lyse cellulaire .....	73
II.9.2. Evaluation de l'intégrité de la membrane cellulaire et de la paroi .....	74
II.10. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions .....	75
II.10.1. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions sur les biofilms de bactéries et levures.....	75
II.10.2. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions sur spores de moisissures. ....	77
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....	79
I. Résultats.....	79

I.1. Résultats de l'isolement des microorganismes .....	79
I.2. Résultats des concentrations microbiennes.....	80
I.2.1. Résultats des concentrations microbiennes de l'air .....	80
I.2.2. Résultats des concentrations microbiennes des surfaces .....	82
I.3. Résultats de l'identification des microorganismes.....	83
I.3.1. Résultats de l'identification des microorganismes isolés dans l'air .....	84
I.3.1.1. Identification phénotypique des isolats bactériennes.....	84
I.3.1.2. Identification phénotypique des isolats fongiques .....	88
I.3.2. Résultats de l'identification des microorganismes prélevés sur les surfaces.....	96
I.3.2.1. Identification phénotypique des isolats bactériens sur les surfaces .....	96
I.3.2.2. Identification phénotypique des isolats fongiques .....	100
I.3.3. Résultats de l'identification des microorganismes prélevés des livres.....	104
I.3.3.1. Identification phénotypique des bactéries des livres.....	104
I.3.3.2. Identification phénotypique des isolats fongiques sur les livres.....	107
I.4. Rendement d'extraction et composition chimiques des huiles essentielles et des combinaisons.....	111
I.4.1. Caractéristiques physiques et rendement d'extraction des huiles essentielles.....	111
I.4.2. Compositions chimiques des huiles essentielles.....	111
I.4.3. Compositions chimiques des combinaisons.....	114
I.5. Résultat de l'évaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les isolats bactériens ....	116
I.5.1. La méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	117
I.5.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) .....	118
I.6. Résultats de l'activité antimicrobienne .....	120
I.6.1. Effet des huiles essentielles sur les microorganismes après prélèvement direct .....	120
I.6.2. Sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles .....	121
I.6.3. Paramètres d'inhibition de la croissance radiale des moisissures.....	122
I.6.3.1. Pourcentages d'inhibition .....	123
I.6.3.2. Paramètres d'inhibition de la croissance radiale des moisissures (CMI, CMF) .....	124
I.6.4. Paramètres d'inhibition des HEs et des combinaisons en milieu liquide (CMI, CMB, CMF).....	125
I.6.4.1. Paramètres d'inhibition (CMI, CMB, CMF) des huiles essentielles sur les cellules planctoniques.....	126



I.6.4.2. Paramètres d'inhibition (CMI, CMB, CMF) des combinaisons sur les cellules planctoniques.....	126
I.6.4.3. Paramètres d'inhibition (CMIB, CMEB) des huiles essentielles et des combinaisons sur les biofilms bactériens.....	129
I.7. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries.....	131
I.7.1. Libération du matériel cellulaire absorbant à 260 nm.....	131
I.7.2. Quantification des biomolécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire.....	132
I.8. Résultats sur l'activité désinfectante des désinfectants à base d'huiles essentielles.....	134
I.8.1. Cinétique de la formation de biofilm après 240 heures.....	134
I.8.2. Traitement des coupons avec les solutions désinfectantes.....	134
I.8.3. Cinétique de létalité des désinfectants sur les moisissures.....	136
II. DISCUSSION.....	137
II.1. Isolement et identification des microorganismes de la BC-UYI.....	137
II.2. Rendement d'extraction et composition chimiques des huiles essentielles et des combinaisons.....	141
II.3. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les isolats bactériens.....	142
II.4. Effet de la fraction volatile des huiles essentielles sur les isolats microbiens.....	143
II.5. Effet de la fraction liquide des huiles essentielles sur les microorganismes après prélèvement direct.....	144
II.6. Effet des combinaisons sur la croissance microbienne.....	145
II.7. Paramètres d'inhibition (CMIB, CMEB) des huiles essentielles et des combinaisons sur les biofilms bactériens.....	146
II.8. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries.....	147
II.9. Activité désinfectante des désinfectants à base d'huiles essentielles.....	147
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	149
I. CONCLUSION GENERALE.....	149
II. PERSPECTIVES.....	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
ANNEXES.....	A
Annexe 1: Schémas d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens.....	A
Annexe 2 : Schéma d'identification des levures.....	B
Annexe 3 : Tableau de lecture des plaques API 20E.....	C
Annexe 4 : Identification des bactéries du genre <i>Bacillus</i> (d'après le document API 20 E)....	D

Annexe 5 : Composition chimique de quelques milieux de cultures .....	E
Annexe 6 : Chromatogrammes des huiles essentielles et combinaisons.....	G
Annexe 7 : Autorisations de recherche obtenues.....	M

## RESUME

La contamination des milieux intérieurs et les risques de santé y associés restent des questions peu préoccupantes dans les pays en voie de développement. Pourtant certains de ces milieux tel que la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I et celle de l'Institut Français du Cameroun reçoivent un grand nombre de personnes, sujettes à des infections microbiennes. Les Désinfectants communément utilisés pour palier à ce problème sont des produits chimiques nocifs à l'homme. Au moment où le monde entier fait face à une crise sanitaire (la COVID-19) qui est jusqu'à présent responsable de plus de 870 000 décès dans le monde, il est impératif de trouver des solutions de désinfection des locaux efficaces et sans danger pour l'homme. La présente étude avait pour but de formuler des désinfectants à base d'huiles essentielles efficaces contre les contaminants microbiens des bibliothèques. L'échantillonnage a été réalisé grâce à la méthode de sédimentation pour les bioaérosols et par écouvillonnage pour les surfaces. La caractérisation des isolats microbiens s'est faite par observation de leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques. Les huiles essentielles à partir des péricarpes de *Citrus sinensis*, des feuilles de *Cymbopogon citratus*, des boutons floraux d'*Eugenia caryophylla*, des feuilles de *Mentha* sp cf *piperita* des fleurs de *Cananga odorata* et des feuilles *Eucalyptus globulus* ont été obtenues par hydrodistillation et analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse et couplage à la Spectrométrie de Masse. Avant l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des huiles essentielles et combinaisons par les méthodes d'Aromatogramme, de Microatmosphère et de Microdilution, l'aptitude des isolats bactériens à former les biofilms a été démontrée par les méthodes de Rouge Congo Agar et Plaque de Culture de Tissus. La mise en évidence de quelques cibles cellulaires des huiles essentielles a été évaluée par spectrophotométrie. Le pouvoir désinfectant des solutions désinfectantes formulées à partir d'huiles essentielles et combinaisons a été déterminé. Une plus grande proportion d'isolats fongiques a été obtenue dans les deux bibliothèques, avec des fréquences de 56 % et 68 % pour la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I et celle de l'Institut Français du Cameroun respectivement. L'air intérieur de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I avait un niveau de pollution élevé contrairement à l'air de la Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun qui avait un niveau de pollution intermédiaire. Les bactéries les plus fréquentes dans les deux bibliothèques appartenaient aux genres *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas*. Les genres fongiques les plus représentés étaient *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp. En général, les Huiles essentielles ont présenté une meilleure activité en phase gazeuse. Les Concentrations Minimales Inhibitrices

des combinaisons étaient plus petites que celles des Huiles essentielles prises individuellement. Toutes les Huiles essentielles ont présenté un effet lytique sur la paroi et la membrane plasmique des bactéries testées entraînant la sortie du matériel génétique. Le désinfectant à base de la combinaison la plus active (Essai 1) a présenté une meilleure activité désinfectante avec une réduction logarithmique de 100 % sur l'ensemble des microorganismes testés à partir de 5 minutes de temps de contact. L'ensemble de ces résultats nous permet d'envisager l'utilisation des huiles essentielles dans la désinfection des locaux des bibliothèques.

**Mots clés :** Profil microbiologique, Bibliothèques, huiles essentielles, désinfection.

## ABSTRACT

Contamination of indoor environments and associated health risks remain of little concern in developing countries. Yet some of these environments such as the Central Library of the University of Yaoundé I and the Library of the French Institute of Cameroon receive a large number of people, subject to microbial contamination. As the whole world faces a health crisis (COVID-19) which has so far been responsible for more than 870.000 deaths worldwide, it is imperative to find effective and safe room disinfection solutions for the man. The purpose of this study was to formulate an essential oil-based disinfectant that is effective against microbial contaminants in libraries. Sampling was done using the sedimentation method for bioaerosols and by swabbing for surfaces. The characterization of microbial isolates was done by observing their macroscopic, microscopic and biochemical characters. Essential oils from the pericarps of *Citrus sinensis*, the leaves of *Cymbopogon citratus*, the flower buds of *Eugenia caryophylla*, the leaves of *Mentha sp cf piperita*, the flowers of *Cananga odorata* and the leaves of *Eucalyptus globulus* were obtained by hydrodistillation and analysed by Gas Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Before the evaluation of the antimicrobial and antibiofilm activity of these essential oils and their combinations by aromagram, microatmosphere and microdilution methods, the ability of bacterial isolates to form biofilms were demonstrated by Congo Red Agar and Tissus Culture Plate methods. The detection of some cellular targets of the essential oils were evaluated by Spectrophotometry. The disinfectant has been formulated based on these essential oils and, the most active combinations and their disinfecting powers have been determined. A greater proportion of fungal isolates were obtained in both libraries, with frequencies of 56 % and 68 % for Central Library of the University of Yaoundé I and that of the French Institute of Cameroon respectively. The indoor air of the Central Library of the University of Yaoundé I had a high level of pollution unlike the air of the French Institute of Cameroon which had an intermediate level of pollution. The most common bacteria in both libraries belonged to the genera *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. The most represented fungal genera were *Aspergillus sp* and *Penicillium sp*. In general, essential oils showed better activity in the gas phase. The Minimal Inhibitory Concentrations of the combinations were smaller than those of the individual essential oils. All the essential oils showed a lytic effect on the wall and the plasma membrane of the tested bacteria resulting in the release of the genetic material. The disinfectant based on the most active combination showed a better disinfecting activity with a log reduction of 100 % on all

microorganisms tested from 5 min of contact time. All of these results allow us to consider the use of essential oils in the disinfection of library premises.

**Key words:** Microbiological profile, Libraries, essential oils, disinfection.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b><i>A. niger</i></b>	: <i>Aspergillus niger</i>
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>AFNOR</b>	: Association Française de Normalisation
<b>AFSSAPS</b>	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>AHL</b>	: Acylhomoserine lactones
<b>API</b>	: Analysis Profil Index
<b>ARN</b>	: Acide Ribonucléique
<b><i>B. subtilis</i></b>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<b>BCC</b>	: Bouillon Cœur Cervelle
<b>BC-UYI</b>	: Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I
<b>BFRT</b>	: Biofilm Ring Test
<b>BHIB</b>	: Brain Heart Infusion Brouth
<b>BMH</b>	: Bouillon Mueller Hinton
<b>Chlo</b>	: Chloramphénicol
<b>CHUY</b>	: Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMB</b>	: Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMEB</b>	: Concentration Minimale Eradicatrice du Biofilm
<b>CMF</b>	: Concentration Minimale Fongicide
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMIB</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice du Biofilm
<b>COV</b>	: Composé Organique Volatil
<b>CPG</b>	: Chomatographie en Phase Gazeuse
<b>CSHF</b>	: Conseil Supérieur d'Hygiène de France
<b>CSTB</b>	: Centre Scientifique et Technique du Bâtiment
<b>CV</b>	: Cristal Violet
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>DSVA</b>	: Désinfection de Surface par Voie Aérienne
<b>DVA</b>	: Désinfection par Voie Aérienne
<b>EMB</b>	: Eosin Methylen Blue Agar
<b>EPS</b>	: Exo Polysaccharide
<b>HE</b>	: Huile Essentielle

<b>IRL</b>	: Indice de Retention Linéaire
<b>IRNS</b>	: Institut National de Recherche et de Sécurité
<b>ISOBA</b>	: Isolat Bactérien provenant de l'Air
<b>ISOFA</b>	: Isolat Fongique provenant de l'Air
<b>ISOBS</b>	: Isolat Bactérien provenant des Surfaces
<b>ISOFS</b>	: Isolat Bactérien provenant des Surfaces
<b>ISOBL</b>	: Isolat Bactérien provenant des Livres
<b>ISOFL</b>	: Isolat Bactérien provenant des Livres
<b>MALDI</b>	: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionisation
<b>MH</b>	: Mueller Hinton
<b>Nyst</b>	: Nystatine
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONPG</b>	: Orthonitrophényl- $\beta$ -galactosidase
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PBS</b>	: Tampon Phosphate Salin
<b>PCB</b>	: Pomme de terre- Carotte–Bile
<b>PIA</b>	: Polysaccharide Intercellular Adhesion
<b>RAPD</b>	: Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RAT</b>	: Riz –Agar-Tween
<b>RCA</b>	: Rouge Congo Agar
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphisms
<b><i>S. aureus</i></b>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Sab</b>	: Sabouraud
<b>SDA</b>	: Sabouraud Dextose Agar
<b>SM</b>	: Spectrométrie de Masse
<b>TCP</b>	: Plaque de Culture de Tissus
<b>TDA</b>	: Tryptophane Désaminase
<b>TM</b>	: Tube Multiple
<b>TOF</b>	: Time Of Fly
<b>UFC</b>	: Unité Formant Colonie
<b>UTA</b>	: Unité de Traitement d'Air



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Galerie d'identification classique des bactéries.....	21
Tableau II : Galerie d'identification classique des levures.....	24
Tableau III : Taux de réduction logarithmique exigés par la norme NF T72-281 par activité antimicrobienne.....	49
Tableau IV: Récapitulatif des combinaisons d'huiles essentielles en pourcentage (%).....	62
Tableau V : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.....	66
Tableau VI : Nombre total d'isolats microbiens en fonction du type de prélèvement.....	79
Tableau VII : Résultats des tests biochimiques des isolats 5 et 8 sur galerie classique et antibiogramme.....	87
Tableau VIII : Résultats des tests biochimiques des isolats 3 et 7.....	88
Tableau IX : Résultats des tests biochimiques des isolats 4, 6, 7 et 21.....	99
Tableau X : Résultats des tests biochimiques des isolats 1 et 4.....	106
Tableau XI : Caractéristiques physiques et rendement d'extraction des huiles essentielles..	111
Tableau XII : Composition chimique des huiles essentielles.....	112
Tableau XIII : Composition chimique des formulations.....	114
Tableau XIV : Tableau comparatif des composés majoritaires et pourcentages des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles.....	116
Tableau XV : Paramètres d'inhibition (CMI, CMF en $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air) en microatmosphère ..	124
Tableau XVI : Paramètres d'inhibition des huiles essentielles sur les cellules planctoniques.....	127
Tableau XVII : Paramètres d'inhibition des combinaisons sur les cellules planctoniques....	128
Tableau XVIII : Paramètres d'inhibition des huiles essentielles sur les biofilms.....	130

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Livre moisi .....	15
Figure 2 : Fragilisation des documents causée par des moisissures.....	15
Figure 3 : Dégâts provoqués sur la charpente en bois par <i>Aspergillus niger</i> .....	15
Figure 4 : Développement de la mérule .....	15
Figure 5 : Galerie d'identification miniaturisée API 20 E après ensemencement .....	20
Figure 6 : Galerie classique en tube .....	21
Figure 7: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm. Les images (1 à 5) montrent la croissance du biofilm en microscopie confocale.....	27
Figure 8 : Formation de biofilm en microplaque .....	29
Figure 9 : Culture sur la gélose Rouge Congo. ....	30
Figure 10 : Les trois mécanismes de résistance du biofilm aux antibiotiques. ....	32
Figure 11 : Photographie de <i>Cymbopogon citratus</i> : (à gauche) plante ; (à droite) Feuilles. ..	51
Figure 12 : Photographie d' <i>Eugenia caryophylla</i> : (1) plante ; (2) feuilles ; (3) boutons floraux .....	52
Figure 13 : Plante et feuilles de <i>Mentha cf sp piperita</i> .....	52
Figure 14 : Arbre et fleurs de <i>Cananga odorata</i> .....	53
Figure 15 : Arbre et feuilles sèches d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	53
Figure 16 : Arbre et fruits de <i>Citrus sinensis</i> .....	54
Figure 17 : Photographie du prélèvement par écouvillonnage d'une armoire à livre (A) et d'un mur moisi (B) .....	57
Figure 18 : Ecouvillonnage de livres présentant des tâches de foxing.....	58
Figure 19 : Mécanisme de réduction du Blue Alamar.....	71
Figure 20 : Proportions des groupes de microorganismes isolés de la BC-UYI et de la BIFC.....	79
Figure 21 : Concentrations microbiennes (UFC/m <sup>3</sup> ) obtenues dans la BC-UYI et la BIFC....	82
Figure 22 : Concentrations microbiennes (UFC/cm <sup>2</sup> ) obtenues dans la BC-UYI et la BIFC ..	83
Figure 23 : Proportions des isolats bactériens et fongiques identifiés dans la BC-UYI et la BIFC .....	84
Figure 24 : Fréquences des différents genres bactériens identifiés dans l'air de la BU-UYI et la BIFC .....	85
Figure 25 : Culture et observation microscopique après coloration Gram (×1000) d'ISOBA 5 .....	86

Figure 26 : Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 8	86
Figure 27 : Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 7	87
Figure 28 : Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 3	88
Figure 29 : Fréquences des champignons identifiés dans l'air de la BC-UYI et la BIFC	89
Figure 30 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) d' <i>Aspergillus niger</i>	90
Figure 31 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) d' <i>Aspergillus sp</i>	91
Figure 32 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Penicillium sp</i>	91
Figure 33 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Penicillium sp</i>	92
Figure 34 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Fusarium sp</i>	92
Figure 35 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Curvularia sp</i>	93
Figure 36 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 1000$ ) de <i>Trichosporon sp</i>	94
Figure 37 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Chrysosporium sp</i>	94
Figure 38 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Cladosporium sp</i>	95
Figure 39 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Mucor sp</i>	95
Figure 40 : Fréquences des genres bactériens identifiés sur les surfaces	97
Figure 41 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 4	97
Figure 42 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 6	98
Figure 43 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 7	98
Figure 44 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 21	99
Figure 45 : Fréquences des champignons identifiés sur les surfaces de la BC-UYI et la BIFC	101
Figure 46 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Candida sp</i>	101
Figure 47 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Chrysonilia sp</i>	102
Figure 48 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) d' <i>Aspergillus flavus</i>	102
Figure 49 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Penicillium sp</i>	103
Figure 50 : Aspect macroscopique et microscopique ( $\times 400$ ) de <i>Penicillium sp</i>	103

Figure 51 : Fréquences des isolats bactériens identifiés sur les livres de la BC-UYI et de la BIFC .....	105
Figure 52 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram (×1000) d'ISO 1 .....	105
Figure 53 : Culture et observation microscopique après coloration de Gram (×1000) d'ISO4 .....	106
Figure 54 : Fréquences des champignons identifiés sur les livres de la BC-UYI et de la BIFC. .....	107
Figure 55 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) d' <i>Aspergillus sp</i> .....	108
Figure 56 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de <i>Rhizopus sp</i> .....	109
Figure 57 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de <i>Mucor sp</i> .....	109
Figure 58 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de <i>Cladosporium sp</i> .....	110
Figure 59 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de <i>Rhodotorula sp</i> .....	110
Figure 60 : Formation de biofilms par la méthode RCA.....	117
Figure 61 : Production de slime par <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu rouge congo agar....	118
Figure 62 : Photographie de la formation de biofilm sur microplaque.....	119
Figure 63 : Formation de biofilm par la méthode TCP.....	119
Figure 64 : Effet des HEs en phase vapeur et en phase liquide sur les microorganismes de la BC-UYI après prélèvement direct.....	120
Figure 65 : Diamètres d'inhibition des HEs par les méthodes de microatmosphère et d'aromatogramme.....	122
Figure 66 : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des moisissures.....	123
Figure 67 : Photographie pourcentage d'inhibition de l'HE de <i>Mentha sp cf pipérита</i> sur <i>A. niger</i> et de l'HE de <i>Cymbopogon citratus</i> sur <i>penicillium sp</i> .....	125
Figure 68 : Effet des HEs de <i>C. citratus</i> , <i>C. odorata</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. caryophylla</i> et <i>M. sp.cf pipérита</i> sur la libération du matériel cellulaire des bactéries absorbant à 260 .....	132
Figure 69 : Quantification des biomolécules intracellulaires (ADN, ARN et Protéines) dans le milieu extracellulaire.....	133
Figure 70 : Cinétique de la formation de biofilm après 240 heures.....	134
Figure 71 : Action des désinfectants formulés sur les biofilms des différents isolats .....	135
Figure 72 : Cinétique de létalité des désinfectants sur les moisissures.....	136

## INTRODUCTION

Les lieux de travail tels que les bureaux, les salles d'hospitalisation et les bâtiments de conservation (bibliothèque et entrepôt) sont à ce jour très concernés par les problèmes de pollution intérieure (Nieguitsila, 2008 ; Djuidje, 2018). Ce qui appelle une attention particulière dans la mesure où l'homme moderne passe 90 % de son temps à l'intérieur des espaces clos (50 % dans les habitations et 30 % dans les lieux de travail) (Rocchi, 2014). Par ailleurs, un nombre croissant de travaux montre que l'air à l'intérieur des maisons et des bâtiments est fortement pollué, que ce soit dans un environnement industriel ou non (Chahrazed, 2010). Beaucoup d'espaces clos sont donc des endroits dont l'odeur reflète celle d'un lieu mal aéré, avec une humidité relative élevée, donnant lieu à une importante prolifération microbienne (OMS, 2009). La présence des spores fongiques en milieu intérieur est jusqu'à ce jour une préoccupation majeure de santé publique (Nieguitsila, 2008). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a d'ailleurs déclaré en 2016 que 4,3 millions de décès prématurés seraient liés à la pollution de l'air intérieur (OMS, 2016). Pour de multiples secteurs d'activité, les spores de champignons et de bactéries sont à l'origine des infections telles que les intoxications alimentaires et les infections nosocomiales respectivement en industrie alimentaire et en milieu hospitalier (Nieguitsila, 2008).

A côté des secteurs alimentaires et hospitaliers, la contamination des collections et des locaux des bibliothèques suscitent également un très grand intérêt. En effet, les moisissures représentent l'un des problèmes des collections, édifices et objets historiques, que ce soit sur le plan esthétique ou sur celui de l'intégrité structurale (Strang et Kigawa, 2009). D'ailleurs, en 2008, 200 000 livres sur 670 000 de la Bibliothèque municipale de Tours en France ont été contaminés par un champignon filamenteux (*Penicillium roqueforti*) à l'issue d'une panne de la climatisation. Cet incident a fait suite à un appel d'offre pour le nettoyage et la décontamination des ouvrages qui se sont effectués à hauteur de 610.000 € (bâtiment entretien, 2008). Par ailleurs, les endotoxines bactériennes et les mycotoxines sont des facteurs de risque pour la santé des usagers qui manipulent les ouvrages contaminés ainsi que des personnes travaillant dans ces locaux. La présence d'une concentration critique de microorganismes dans l'air et sur les surfaces peut donc entraîner des réactions de type allergique ou des maladies chez les occupants des bâtiments et ainsi nuire à leur état de santé général (Abed, 2014). Les microorganismes dans leur environnement sont généralement regroupés en communautés structurées et attachés à une surface, ce mode de vie est appelé

biofilm. Les cellules sessiles (biofilm) sont plus difficiles à décrocher mécaniquement d'une surface et sont plus résistantes aux antibiotiques et désinfectants conventionnels que les microorganismes sous forme planctonique (**Ito et al., 2009**).

Au cours des dernières décennies, des attitudes catégoriques ont été adoptées à l'égard des contaminations et de leur traitement, tantôt privilégiant le curatif de manière quasi exclusive, tantôt préférant ignorer les incidents relégués au rang de conséquences inévitables de l'impuissance (**Genty et al., 2001**). La présente étude vise à mettre l'accent sur la prévention contre l'envahissement par les microorganismes, des locaux des bibliothèques où l'installation d'un système de régulation climatique, couramment appelé climatisation, n'est pas toujours possible à l'échelle de toute une bibliothèque et où l'on voit périodiquement réapparaître les moisissures.

En tant qu'établissement à forte fréquentation, les bibliothèques se doivent donc de respecter les règles d'hygiène et de salubrité destinées à préserver la santé des occupants ; notamment la circulation de l'air, la protection contre l'humidité et les variations de température. A cet effet, depuis 2011, l'OMS astreint les Etablissements Recevant du Public à une surveillance de la qualité de l'air conformément à l'article L221-8 du code de l'environnement (**WHO, 2011**). Antérieurement, la loi Grenelle du 2 juillet 2010 recommandait des contrôles microbiologiques périodiques, l'installation et l'entretien des systèmes de régulation climatique et d'aération pour limiter les contaminations microbiennes inopinées. Cependant, toutes les bibliothèques ne disposent pas des moyens financiers nécessaires pour l'installation de ces systèmes de régulation. C'est le cas de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I qui contrairement à la Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun, ne dispose pas d'un système de régulation climatique à l'échelle de toute la Bibliothèque, d'où la nécessité d'un entretien et un contrôle régulier de l'état sanitaire de cette structure universitaire permettant de prévenir toutes contaminations tant pour les collections que les personnes physiques fréquentant ce lieu. De plus, au moment où le monde entier fait face à une crise sanitaire (la COVID-19) qui est jusqu'à présent responsable de plus de 870 000 décès dans le monde, il devient impératif de trouver des solutions de désinfection des locaux efficaces et sans danger pour l'homme, dans la mesure où celui-ci est contraint à séjourner d'avantage dans des espaces confinés peuplés de microorganismes (**OMS, 2020**).

Les agents antimicrobiens désignés sous le terme de désinfectants sont parfois utilisés alternativement en tant qu'agents stérilisateurs et produits d'hygiène. Ce sont le plus souvent des produits chimiques biocides ou antimicrobiens, assez puissants et habituellement toxiques,

que l'on applique sur les surfaces contaminées (**Valeriano, 2012**). Face à la préoccupation croissante que suscite la toxicité d'un grand nombre de substances classiquement utilisées comme désinfectants, les bibliothèques et les musées ont entrepris de revoir leurs stratégies actuelles qui reposent essentiellement sur la lutte chimique contre les moisissures installées (**Roquebert et Oriol, 2002**). Il est de plus en plus évident qu'il faut travailler davantage sur la prévention et les autres modes de traitement si l'on veut protéger non seulement les collections mais aussi le personnel et le public.

La désinfection par les aérosols est depuis longtemps utilisée car elle a l'avantage de traiter l'air et les surfaces mais peut s'avérer plus dangereuse qu'efficace en raison des produits utilisés qui sont parfois nocifs à l'homme (**Pibiri, 2006**). Une substitution des produits habituellement utilisés par les huiles essentielles serait une approche intéressante étant donné que plusieurs travaux ont montré qu'elles avaient de bonnes propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et même antivirales (**Ndoye, 2001 ; Bassolé et al., 2011 ; Nyegue et al., 2017 ; Ngongang et al., 2018**). Dès 1963, les travaux du **Pr Griffon** ont mis en évidence que les huiles essentielles avaient en diffusion atmosphérique, le pouvoir de détruire en une demi-heure toutes les moisissures et tous les staphylocoques et de diviser par 50 le nombre de colonies microbiennes. Sur le plan physique, les huiles essentielles stimulent et modifient nos états physiologiques en agissant directement sur le système nerveux central. Une ambiance olfactive bien ciblée peut apporter une foule de bienfaits et avoir des répercussions positives. Les huiles essentielles aident entre autres à maintenir une atmosphère saine, en luttant contre les maladies et les microbes, et à maintenir une bonne concentration.

Le choix des huiles essentielles dans cette démarche scientifique se justifierait non seulement par leur faible toxicité mais aussi par les vertus antimicrobiennes, désodorisantes et relaxantes de celles-ci. En effet, nombre de ces produits naturels bénéficient d'une composition chimique adéquate et ont l'avantage d'être nettement moins toxiques que d'autres désinfectants de synthèse pour un résultat comparable (**Pibiri, 2006**).

## **HYPOTHESE DE RECHERCHE**

Les huiles essentielles étant constituées de molécules biologiquement actives peuvent être utilisées comme désinfectant

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL :**

Dans le cadre de la recherche d'alternative aux produits chimiques toxiques utilisés pour désinfecter les locaux des bibliothèques, nous nous sommes fixé comme objectif général, de formuler un désinfectant à base d'huiles essentielles, efficace contre les bioaérosols et les contaminants de surfaces présents dans la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I et la Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun, plus spécifiquement il s'est agi de :

- Echantillonner et caractériser les microorganismes se retrouvant dans l'enceinte de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I et de la Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun
- Evaluer l'activité antimicrobienne de six huiles essentielles et de leurs combinaisons sur certains isolats microbiens obtenus après isolement et mettre en évidence quelques cibles cellulaires.
- Formuler des solutions désinfectantes à base d'huiles essentielles et de leurs combinaisons puis évaluer leur activité désinfectante.



## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITERATURE**

### **I. Généralité sur les bâtiments**

#### **I.1 Lieux confinés (définition)**

Les lieux confinés sont des endroits entièrement ou partiellement clos dont l'odeur reflète celle d'un lieu mal aéré. Un espace confiné se caractérise par un rapport volume/dimension d'ouverture tels que les échanges naturels de l'air intérieur avec l'air extérieur sont particulièrement réduits et peuvent entraîner des risques d'asphyxie, d'intoxication, d'incendie et d'infection microbienne (INRS, 2014). Il est à noter que nous passons 90% de notre temps dans des lieux clos (logements, lieux de travail, commerce, transport) qui sont le siège de la plupart des contaminants microbiens (INRS, 2014).

#### **I.2. Système de ventilation**

##### **➤ Définition**

Un système de ventilation est un système installé dans un bâtiment et dont l'action consiste à créer un renouvellement de l'air dans ledit bâtiment (Pibiri, 2006).

##### **I.2.1. Différents types de ventilation**

On retrouve deux formes principales de ventilation dans les bâtiments (Pibiri, 2006) :

- La ventilation naturelle qui est un moyen « passif » d'assurer l'aération. L'air est poussé par les forces naturelles (vent, différence de température) au travers d'ouverture ou de canaux de ventilation.
- La ventilation mécanique qui consiste à faire circuler de l'air à travers une unité de distribution et de conditionnement appelée unité de traitement d'air (UTA) dans le bâtiment par des canaux de ventilation. Ces systèmes sont principalement composés d'unité de traitement suivant : des batteries de filtre, des récupérateurs de chaleur, des caissons d'humidification, des tours de chauffage et de refroidissement ainsi que des ventilateurs.

##### **I.2.2 Importance de l'aération**

La ventilation d'un bâtiment est étudiée pour produire des conditions intérieures optimales. Il est conçu pour assurer un environnement intérieur confortable tout en maintenant

les occupants en santé (**Roullet, 2004**). Une bonne qualité de l'air dans un local est le résultat d'un ensemble d'opérations qui créent et maintiennent les conditions déterminées des différents facteurs listés ci-dessous (**Pibiri, 2006**).

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

- Physiques (Température, humidité, vitesse de l'air, taux de renouvellement d'air, ionisation, concentration de particules ou de fibres).
- Chimiques (oxyde de carbone, ozone, composés organiques volatils, toxines).
- Microbiologiques (bactéries, champignons, virus).

### **I.3. Nature des sources de polluants**

#### **I.3.1. Sources extérieures**

Il s'agit essentiellement d'une pollution de type physicochimique liée aux activités humaines. Les polluants extérieurs, de nature physicochimique (dioxyde de soufre, oxydes d'azote, monoxyde de carbone, hydrocarbures, ou l'ozone) et les contaminants naturels représentés par le pollen et les champignons microscopiques, prennent une part plus ou moins importante dans la pollution à l'intérieur des bâtiments, avec un certain délai par rapport aux événements extérieurs (**Chahrazed, 2010**). Ils sont souvent la cause de désagréments et peuvent avoir des répercussions sur la santé des occupants (**Bluyssen et al., 2003**).

#### **I.3.2. Sources intérieures**

Les sources intérieures de pollution participant à l'émission d'agents polluants dans l'air ambiant sont multiples et de nature variable. La pollution intérieure peut être liée à la fois à l'activité des occupants et leurs métabolismes, aux équipements fonctionnels du bâtiment et aux matériaux de construction. Les polluants rencontrés dans l'air intérieur se retrouvent alors en grand nombre et sont diversifiés, à des concentrations parfois alarmantes (**Chahrazed, 2010**).

### **I.4 Entretien des lieux confinés**

#### **I.4.1 Méthodes de traitement de l'air**

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

par la pratique de la stérilisation et de la désinfection. Le traitement de l'air doit être cohérent avec l'architecture, les circuits, les équipements, les procédures, les contrôles et la maintenance. Il associe deux principes (**Normand et al., 2016**) :

- L'aération dont l'objectif est d'entraîner vers l'extérieur les particules et micro-organismes en suspension dans l'air, responsables de l'aérobio-contamination. L'élimination de ces particules sera fonction de la vitesse de soufflage de l'air et de la concentration en particule. Le flux d'air doit être homogène, avec un taux de renouvellement horaire suffisant pour traiter le volume de la salle.
- La climatisation destinée à assurer le confort des occupants en ajustant la température et l'hygrométrie.

Dans le cadre du conditionnement d'air et de la climatisation, le traitement de l'air constitue un élément de confort dès lors qu'il est bien conduit et régulièrement contrôlé. En effet, s'il existe des lacunes ou des insuffisances dans la chaîne de traitement, tout simplement dans le domaine de la maintenance/nettoyage, le confort se transforme en facteur de risque aussi bien pour l'homme que pour le matériel (**Pibiri, 2006**).

#### **I.4.2. Traitement des surfaces d'un local**

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

- Les **désinfectants de surface** : produits liquides à application locale.
- Les **rayons ultraviolets** : qui émettent une longueur d'onde bactéricide (253,7 nm), pour autant que le rayonnement soit direct, la surface suffisamment proche, la longueur d'onde stable et l'intensité suffisante.
- La **désinfection par voie aérienne (DVA)**, par la diffusion de gaz : généralement du formaldéhyde, la dispersion d'agents antimicrobiens sous forme de sprays, ou par l'intermédiaire d'appareils générateurs de microgouttelettes ou aérosols.

Il existe deux stades de DVA:

- la désinfection terminale hors présence humaine.
- la désinfection en présence humaine, qui exige en plus une innocuité des produits

En règle générale, il est préférable de traiter l'air à sa production et de substituer l'entretien des gaines de ventilation et des systèmes de filtration à la DVA (**Jaffar, 2018**). Cette pratique, quoiqu'ancienne, a l'avantage de traiter l'air et les surfaces. Toutefois elle peut

s'avérer plus dangereuse qu'efficace, en raison des produits utilisés. Actuellement, en milieu hospitalier, la désinfection par voie aérienne est une méthode très controversée. Faute de produits adéquats et de résultats validés, elle est pratiquement tombée en désuétude car la désinfection par contact direct présente un rapport efficacité sur risque toxique très supérieur. Toutefois, ce procédé est appliqué dans les industries biotechnologiques, pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires car son efficacité est importante pour un coût relativement faible (Jaffar, 2018).

## II. Microorganismes de l'environnement intérieur

Les microorganismes sont des êtres qui peuplent tout notre environnement. Jusqu'à nos jours, il en existe 5 types : les virus, les bactéries, les champignons microscopiques, les algues microscopiques et les protozoaires. Cependant, les champignons microscopiques et les bactéries sont des contaminants majoritaires des environnements intérieurs.

### II.1 Champignons

#### ❖ Description générale

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes c'est-à-dire pourvu d'un noyau contenant l'ADN et séparé du cytoplasme par une membrane. Ils peuvent être unicellulaire dans le cas des levures ou pluricellulaire dans le cas des moisissures. Leur paroi est riche en chitine ce qui leur confère une bonne résistance vis à vis du milieu extérieur. Contrairement aux végétaux, les mycètes ne possèdent pas de chlorophylle et se nourrissent par absorption (Crabos, 2013). Dans la nature, les champignons colonisent avant tout les organismes morts ou en décomposition (surtout les végétaux) sur lesquels ils trouvent leurs nutriments (carbone, azote et sels minéraux) essentiels à leur croissance (Nieguitsila, 2008).

#### II.1.1. Moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquistes à croissance filamenteuse, qui regroupent des milliers d'espèces et dont le réservoir naturel se situe à l'extérieur, sur les végétaux, la matière organique en décomposition, à la surface d'eau stagnante ainsi que dans le sol ou à la surface de ce dernier (Meheust, 2012). Elles présentent trois modes de vie possibles (Chasseur et Nolard, 2003) :

- **Le saprophytisme** lorsque les moisissures se développent aux dépens de matières organiques en décomposition ou de matières animales chitineuses ;

- **Le parasitisme** lorsque la matière organique est puisée dans les organismes vivants (animaux ou végétaux) ;
- **La symbiose** lorsqu'il existe une association bénéfique et réciproque avec d'autres microorganismes.

#### **II.1.1.1. Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux**

Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres. L'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit « siphonné ». Chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Lecellier, 2013).

#### **II.1.1.2. Développement des champignons filamenteux**

Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive.

Pendant la phase végétative qui correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes.

La phase reproductive comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée et la reproduction sexuée. La reproduction asexuée correspond à la formation et la dispersion de spores asexuées, afin de coloniser d'autres substrats. La reproduction sexuée se base sur la fusion de deux gamètes haploïdes ( $n$ ) donnant un zygote diploïde ( $2n$ ) (Lecellier, 2013).

#### **II.1.1.3. Facteurs favorisant la croissance des moisissures dans le milieu intérieur**

De nombreux paramètres environnementaux influencent la croissance fongique. Les facteurs biotiques qui incluent notamment la viabilité des spores, la nature des espèces fongiques et les paramètres physiques et chimiques dits abiotiques qui influencent aussi le développement des moisissures (pH, l'oxygène, la lumière, la température, les nutriments, et l'humidité) (Meheust, 2012).

##### ➤ **Température**

La plupart des espèces de moisissures se développent dans une gamme de température comprise entre 4 et 40 °C avec une température optimale de croissance située entre 24 et 30° C. Cependant, la température ambiante de l'ordre de 20 à 25 °C maintenue dans la majorité

des environnements intérieurs correspond à une zone idéale de croissance pour la majorité d'entre elles (Meheust, 2012).

➤ **Éléments nutritifs**

Bien qu'elles soient peu exigeantes, la réunion de certains facteurs, nutritifs et environnementaux est néanmoins nécessaire au développement des moisissures. Ainsi, le Carbone et l'azote sont les éléments nutritifs les plus importants pour les moisissures en sus de quelques ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium) et ce, en très faibles quantités. Les moisissures peuvent également avoir besoin d'autres éléments tels que les acides aminés, les protéines, l'amidon et la cellulose (Meheust, 2012).

➤ **Humidité**

L'eau est un solvant qui favorise les échanges de substance avec l'environnement. La phase de germination des moisissures nécessite un apport d'eau plus important par rapport à la phase de développement ou de croissance. À partir d'une humidité relative de 60 à 65 %, il y a un risque de germination. Une fois la germination enclenchée, le processus de développement peut se poursuivre à des taux d'humidité relative inférieurs à 60 % (Caillaud *et al.*, 2006 ; François, 2009).

#### **II.1.1.4. Principales moisissures de l'intérieur**

Les études concernant la population fongique dans des locaux professionnels : scieries, caves, boulangeries, habitations et locaux publics (écoles, bibliothèques, stations de métros, hôpitaux) rapportent essentiellement la présence des genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* (Jovanovic *et al.*, 2004 ; Niemeier *et al.*, 2006 ; Sautour *et al.*, 2009). En effet, ces moisissures libèrent des spores sous l'effet des mouvements d'air importants ou en réaction à des conditions défavorables. Leur prédominance dans l'environnement intérieur dépend du mode de dispersion et de transfert des spores. Certaines, appelées gloeiospores, ont une paroi épaisse, de consistance humide et restent collées entre elles par un mucus. Elles forment des amas lourds difficilement transportables par l'air et sont véhiculées au niveau des substrats par contact, par des insectes ou par l'eau. C'est le cas des moisissures du genre *Acremonium* et *Exophiala*. D'autres genres, tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* ont des spores à paroi sèche, facilement dissociables et légères. Elles sont ainsi plus facilement dispersées dans l'air. Toutefois, la répartition géographique des espèces de moisissures varie selon les régions et les saisons (Goyer *et al.*, 2001).

## II.1.2. Levures

Les levures sont des eucaryotes chimio-hétérotrophe (capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction ou de fermentation de composés chimique tels que les sucres) faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium (**Boukhennoufa, 2014**).

### II.1.2.1. Caractéristiques morphologiques des levures

Les levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais il existe d'autres formes spécifiques (triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille). Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu' à 25 à 30 microns. Certaines peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse (pseudomycélium) à un certain stade de leur vie : on parle de champignon dimorphe. Les colonies sont, en général, blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières (**Belmaziz et Djalal, 2017**).

### II.1.2.2. Reproduction

#### ➤ Reproduction végétative

Chez les levures, le bourgeonnement est le mode de division le plus fréquent. Après la mitose, la cellule fille se détache et laisse une cicatrice visible au microscope électronique à balayage. La localisation du bourgeonnement varie selon les espèces (**Goyer et al., 2001**).

#### ➤ Reproduction sexuée

Elle implique la fusion de deux cellules haploïdes à rôle de gamètes et entraîne la formation d'un zygote diploïde (**Chasseur et Nolard, 2003**).

### II.1.2.3. Principales levures de l'intérieur

Les levures fréquemment retrouvées dans un environnement intérieur sont les *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* et *Torulopsis* (**Goyer et al., 2001**). Elles sont retrouvées à l'état saprophyte dans le milieu intérieur, se nourrissant de matière organique. Dans des conditions de stress, quelques-unes sont capables de former des structures filamenteuses (pseudomycélium) : c'est le cas de *Candida albicans*.

## **II.2. Bactéries**

### **II.2.1. Description générale**

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, qui se reproduisent par fission binaire. Elles présentent des formes variées et peuvent vivre en saprophyte ou en parasite de l'homme, des animaux ou des plantes. La coloration de Gram est la technique utilisée pour classer les bactéries en deux groupes ; celles qui retiennent la coloration violette (Gram positif) et celles qui ne la retiennent pas (Gram négatif) (**Fauchère et Avril, 2002**).

### **II.2.2. Reproduction bactérienne**

Les bactéries se multiplient par division binaire : une cellule grandit (ADN se duplique) puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Les conditions favorables à la croissance sont l'atmosphère, les nutriments, la température, le pH, la pression osmotique, l'eau libre et la pression partielle en oxygène (**Fauchère et Avril, 2002**).

### **II.2.3. Sporulation**

Diverses espèces bactériennes sont capables d'initier la formation des cellules spécialisées montrant une résistance accrue à des facteurs d'environnement défavorables, notamment à une température élevée, à l'absence d'éléments nutritifs ou à la dessiccation. Ces cellules sont appelées spores. Elles confèrent aux bactéries la capacité à pouvoir rester en latence pendant plusieurs siècles dans le milieu intérieur jusqu'à ce que les conditions soient favorables. La résistance élevée des spores est liée à ses structures. Du noyau à la tunique de la spore, tous les composants contribuent à la préserver contre le traitement qui pourrait l'endommager (**Voundi et al., 2017**).

### **II.2.4. Principales bactéries de l'environnement intérieur**

Les bactéries sont abondantes dans l'environnement et chez les humains. On en connaît plus de 150 000 espèces. Les principales bactéries retrouvées dans l'environnement sont saprophytes, elles tirent leur énergie des sources organiques et inorganiques. À l'intérieur des édifices non industriels, les bactéries proviennent principalement des occupants puisqu'elles constituent la flore naturelle de la peau et des muqueuses. Ce sont entre autre les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Micrococcus* (**Fekadu et Melaku, 2015**). Certaines bactéries sont d'origine environnementale notamment les bacilles Gram positif sporulés et les



bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*. Les bactéries Gram négatif sont rarement retrouvées dans l'air intérieur car leur paroi cellulaire fragile supporte mal la déshydratation subie pendant un passage prolongé dans l'air (**Goyer et al., 2001**). Leur survie dans l'environnement intérieur est favorisée par la formation de biofilms au niveau des surfaces (**Ito et al., 2009**). Les bactéries Gram positif prédominantes dans l'air ont une paroi plus résistante et certaines produisent des spores qui leur confèrent une résistance accrue aux variations des conditions environnementales (**Goyer et al., 2001**).

### **III. Effets des microorganismes de l'environnement intérieur sur l'Homme et les objets**

#### **III.1. Effets nocifs sur l'homme**

##### **III.1.1. Effet nocifs associés aux moisissures**

De par la petite taille de leurs spores, les moisissures peuvent atteindre les voies respiratoires et dans certains cas, entraîner des effets néfastes sur la santé (**Kuhn et Ghannoum, 2003**). Les modes d'action des moisissures et leurs effets néfastes dépendent des espèces présentes, de leur concentration, de la durée d'exposition et du type de personne exposée.

##### **➤ Réactions immunologiques**

La réponse allergique survient lorsqu'il y a production d'IgE dirigées contre des allergènes environnementaux ou autres. L'exposition aux moisissures est associée à l'apparition de pathologies allergiques diverses : rhinite, dermatite, bronchite allergique, aspergillose broncho-pulmonaire et asthme allergique. Une exposition chronique en milieu industriel ou agricole à des poussières organiques et surtout à des moisissures peut aussi induire la production d'anticorps spécifiques (IgG) et causer un syndrome appelé pneumopathie d'hypersensibilité ou alvéolite allergique extrinsèque (**Reboux et al., 2001**).

##### **➤ Effets toxiques**

Une forte exposition aux poussières organiques contaminées par des moisissures pourrait causer le syndrome toxique associé aux poussières organiques (**Reboux, 2006 ; Bünger et al., 2007**). *Stachybotrys charatrum*, moisissure la plus toxigénique, serait impliquée dans le syndrome du "malaise lié à l'habitat" qui entraîne des symptômes non spécifiques comme une irritation des muqueuses, des maux de tête ou encore de la fatigue (**Kuhn et Ghannoum, 2003**).

### III.1.2. Effets associés aux bactéries

La majorité des bactéries présentes naturellement ne causent pas d'effets néfastes à la santé. Les risques pour la santé apparaissent lorsque les concentrations de certaines espèces deviennent anormalement élevées. Ainsi, de fortes concentrations de bactéries peuvent causer de nombreux effets pathologiques.

#### ➤ Effets allergiques

Les bactéries quant à elles peuvent aussi intervenir dans les effets allergiques. Les actinomycètes, formant des spores, sont des sources d'allergènes impliquées dans les maladies respiratoires (**Douwes et al., 2003**). Le genre *Mycobacterium* est connu pour être impliqué dans les pneumopathies d'hypersensibilité d'origine professionnelle (**Rocchi, 2014**). Certains patients peuvent être colonisés par des bactéries telles que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* (**Rocchi, 2014**).

#### ➤ Effets irritatifs et toxiques

Différents composés constitutifs des bactéries ou excrétés par ces derniers peuvent également entraîner des phénomènes toxiques et irritatifs. La présence de composés bactériens comme les peptidoglycanes ou encore les endotoxines ont été reliés à des symptômes respiratoires. L'inhalation d'endotoxines, composées de lipopolysaccharides à forte dose déclenche une réponse inflammatoire pulmonaire (**Heederik et Mutius, 2012**).

### III.2. Effets néfastes sur les documents

Les moisissures peuvent détériorer physiquement les archives par la propagation des filaments mycéliens dans le substrat et chimiquement par la libération d'enzyme. En se nourrissant, les moisissures sécrètent des enzymes qui fragmentent la cellulose du papier en unités plus ou moins importantes. L'effet de cette digestion peut entraîner de sévères détériorations, voire la disparition totale des documents atteints. Les espèces les plus dangereuses sont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Chaetonium* et *Aureobasidium*. La dégradation bactérienne des documents est en majorité due à des bactéries aérobies. Leur présence se manifeste par des taches colorées discrètes, de couleur jaunâtre (**François, 2009 ; Cauliez, 2011**). Les figures 1 et 2 illustrent la dégradation des livres occasionnée par les microorganismes.



**Figure 1 :** Livre moisi (Boudih, 2011)



**Figure 2 :** Fragilisation des documents causée par des moisissures (François, 2009)

### III.3. Effets néfastes sur les locaux

Certains champignons saprophytes sont capables de se développer sur le bois de construction. C'est essentiellement cette catégorie qui préoccupe en matière d'habitat et de santé. Suivant les composés cellulaires attaqués et la vitesse de dégradation, le bois va se décomposer de diverses manières. En plus de la décomposition du bois, la détérioration des murs n'est pas du reste (Chasseur et Nolard, 2003). Les figures 3 et 4 illustrent la dégradation par les moisissures des édifices en bois.



**Figure 4 :** Développement de la mérule (Colling, 2002)



**Figure 3 :** Dégâts provoqués sur la charpente en bois par *Aspergillus niger* (Pibiri, 2006)

Vu les effets néfastes des bactéries et des champignons présents dans les bâtiments sur la santé des occupants, ainsi que sur certains édifices en bois dont sont fait ces bâtiments, il demeure impératif d'avoir des connaissances plus approfondies sur ces bioagresseurs.

L'identification de ces microorganismes passe par un isolement et une purification de ceux-ci. A ce propos, plusieurs méthodes sont disponibles de nos jours pour l'échantillonnage des microorganismes dans l'air et sur les surfaces solides

#### **IV. Généralités sur les méthodes d'échantillonnage**

##### **IV.1. Dans l'air**

Les techniques de recueil ont pour objet de séparer les particules du flux d'air pour les recueillir sur un ou plusieurs milieux sélectionnés. Les trois méthodes communément utilisées sont la sédimentation, l'impaction et la filtration.

##### **IV.1.1 La sédimentation**

C'est une technique ancienne qui a été très répandue et a constitué une approche simple de l'aérocontamination. Cette technique consiste à exposer de façon passive un support nutritif ou non (boîte de Pétri, plexiglas, gel) à la chute naturelle des spores sous l'effet de la gravitation. Outre les avantages liés à un coût faible, à l'absence d'appareillage, cette technique permet d'exposer les supports pendant des durées importantes dans la limite toutefois de la dessiccation des gels et des milieux. Cependant le volume d'air ainsi traité n'est pas mesurable et dépend largement des flux au sein de l'espace échantillonné. Les inconvénients principaux qui ont fait abandonner cette méthode sont liés à la remise en suspension des spores les plus petites favorisant la sélection des spores les plus volumineuses. La reproductibilité de ce type d'échantillonnage est faible (**Drolet et Beauchamp, 2012**).

##### **IV.1.2 L'impaction**

Les propriétés d'inertie des particules sont souvent utilisées pour les extraire d'un écoulement transportant un aérosol. En effet dans le cas d'un écoulement curvilinéaire, l'inertie provoque la déviation des particules des lignes de courant du fluide. Ce mécanisme est mis en œuvre, notamment dans les impacteurs au sein desquels l'air est brusquement accéléré par passage au travers d'une section réduite et brutalement dévié par une surface de collection solide (gélose ou surface adhésive) ou liquide. Les particules selon leur inertie vont, soit suivre les lignes de courant, soit s'impacter sur la surface de collection pour celles possédant l'inertie la plus importante. L'impaction dépend de plusieurs facteurs tels que la taille, la densité et la vitesse initiale des particules ainsi que des paramètres physiques du dispositif de collecte (dimension de la buse, débit du gaz porteur, distance entre la buse et la surface de collection). L'efficacité physique de ces biocollecteurs peut être figurée par le diamètre de coupure d50 qui

correspond au diamètre aérodynamique des particules à partir duquel toutes les particules de diamètre supérieur sont théoriquement collectées (**Drolet et Beauchamp, 2012**).

### IV.1.3 Filtration

Le principe de recueil des particules est l'interception à la surface du filtre, ce qui permet de collecter efficacement des particules de diamètre inférieur à la taille des pores du filtre (diamètre des pores variables de 0,01 à 10  $\mu\text{m}$ ). Par exemple un filtre de porosité 5  $\mu\text{m}$  collecte les particules de 0,3  $\mu\text{m}$  avec une efficacité supérieure à 95 %.

Le filtre peut être fibreux (fibres de verre) ou membraneux (ester de cellulose, chlorure de polyvinyle, polycarbonate, téflon). Ils peuvent être enduits d'une substance collante (PVC + vaselinetoluène) pour piéger les spores. Les filtres sont placés dans des cassettes porte filtres. Le prélèvement peut se faire « cassette totalement ouverte » (ensemble des particules) ou «cassette partiellement ouverte» (ouverture de 4 mm avec débit de 1 à 2 L/min, pour ne collecter que la fraction inhalable des particules, de diamètre centré autour de 20  $\mu\text{m}$ , inférieur à 100  $\mu\text{m}$ ). Les cassettes filtrantes sont reliées à des pompes aspirantes de faible débit (classiquement 1-5 L/min) de type Gilian air. Des filtres en gélatine existent également. Ils sont généralement disposés dans des porte-filtres prêts à l'emploi. Ils ont une texture fibreuse (**Drolet et Beauchamp, 2012**).

### IV.2 Prélèvements de surfaces

L'aérosolisation des spores de moisissures dépend de plusieurs facteurs tels que la « viscosité » de leur paroi. Ainsi des spores de *Stachybotrys* ou de *Fusarium* dites visqueuses auront davantage de difficultés à être décrochées de leur support que des spores de *Penicillium* ou d'*Aspergillus* dites sèches. Aussi des prélèvements de surfaces apparaissent-ils indispensables pour compléter les prélèvements d'air afin de quantifier, identifier les micro-organismes présents dans un local et ainsi mieux appréhender l'exposition réelle des individus. A l'inverse, toutes les espèces présentes sur les surfaces ne sont pas forcément présentes en forte concentration dans l'air (adhésion au support, biofilm) (**Drolet et Beauchamp, 2012**).

La réalisation de ces prélèvements de surface est généralement influencée par l'aspect visuel des moisissures présentes. Les espèces de couleur sombre (dématiées) donneront un aspect vert à noir aux surfaces alors que les espèces claires (moniliacées) ne donneront pas cet aspect moisi caractéristique. Les prélèvements de surface sont donc *a priori* orientés vers certaines familles de champignons. La multiplication de ces échantillons, y compris dans les zones d'apparence normale, est nécessaire. Pour certains auteurs, ces prélèvements doivent

impérativement être associés aux prélèvements d'air pour refléter l'exposition réelle des individus. D'autant que dans certains cas, des prélèvements d'air dans des locaux visiblement contaminés (moisissures apparentes abondantes) ne montrent pas d'aérocontamination particulière, et ne traduiraient donc pas l'exposition réelle (CSHF, 2006).

Les techniques suivantes sont donc utilisées pour les prélèvements de surface :

#### **IV.2.1 Adhésif**

Sur les surfaces planes et non humides un support adhésif est appliqué. Les spores adhèrent à la surface et peuvent être soit transférées sur un milieu de culture, soit être dénombrées et identifiées directement au microscope. Dans le cas d'une lecture directe au microscope, les spores de morphologie caractéristique peuvent être identifiées sans équivoque (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*...), alors que les spores de faibles diamètres et présentant des ornements sombres ne peuvent être différenciées (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*) (CSHF, 2006).

#### **IV.2.2 Boîtes et lames « contact »**

Le milieu nutritif est contenu dans une boîte de Pétri particulière (boîte « contact ») qui permet de couler le milieu sous forme d'une surface en léger ménisque, afin que celle-ci puisse être en contact avec la surface à prélever. Après l'échantillonnage, la surface de gélose est protégée par un couvercle qui n'est pas en contact avec la gélose. Le prélèvement est standardisable en durée et en terme de pression appliquée (les valeurs communément utilisées sont une pression de 25g par cm<sup>2</sup> pendant 10 secondes). Les surfaces verticales peuvent être également prélevées, mais avec une moins grande standardisation. Des « Petri-films » gélosés, sous emballage, peuvent également être utilisés. Ces petites plaques de papier sont recouvertes d'un milieu nutritif déshydraté que l'on applique sur les surfaces et qui sont humidifiées au moment où on les place dans l'incubateur (Chasseur et Nolard, 2003 ; CSHF, 2006).

#### **IV.2.3 Ecouvillonnage**

L'écouvillonnage, avec un écouvillon stérile humidifié ou non, d'une surface de 25 cm<sup>2</sup> est considéré comme équivalent au prélèvement par boîte contact à condition de décharger l'écouvillon en étoile sur une boîte de Pétri de diamètre 9 cm. La standardisation est cependant difficile à obtenir et dépend du manipulateur (CSHF, 2006).

### **IV.3. Prélèvement sur des livres**

#### **➤ Ecouvillonnage**

Cette technique consiste à récupérer les spores fongiques présentes sur les tranches et les couvertures des livres en frottant le coton de l'écouvillon sur le support. L'écouvillon utilisé est ensuite étalé par frottement sur milieu nutritif de façon à leur donner aux microorganismes la possibilité de se développer puis, d'être identifiés (**Roquebert *et al.*, 2002**).

### **V. Techniques d'identification microbienne**

Identifier un microorganisme suppose que l'on dispose d'un ensemble complet de renseignements sur la souche microbienne. Ces renseignements concernent les caractères morphologiques, culturels, biochimiques et moléculaires. La première étape dans l'identification microbienne est la purification des cultures.

#### **V.1. Identification des bactéries (Joffin et Leyral, 2005)**

##### **V.1.1. Examen macroscopique**

L'étude macroscopique consiste à une observation à l'œil nu des colonies bactériennes présentes dans les boîtes de pétri afin de décrire ses caractéristiques (odeur, forme, taille, relief, consistance, surfaces, présence de pigmentations, présence ou absence d'hémolyse).

##### **V.1.2. Examen microscopique**

Cet examen consiste à visualiser la morphologie des microorganismes au moyen d'un microscope optique. Il comprend, l'état frais et l'état coloré.

#### **➤ Etat frais**

L'étalement entre lame et lamelle du prélèvement permet de visualiser la présence éventuelle de bactéries, leur forme, leur mode de regroupement et leur mobilité.

#### **➤ Coloration de Gram**

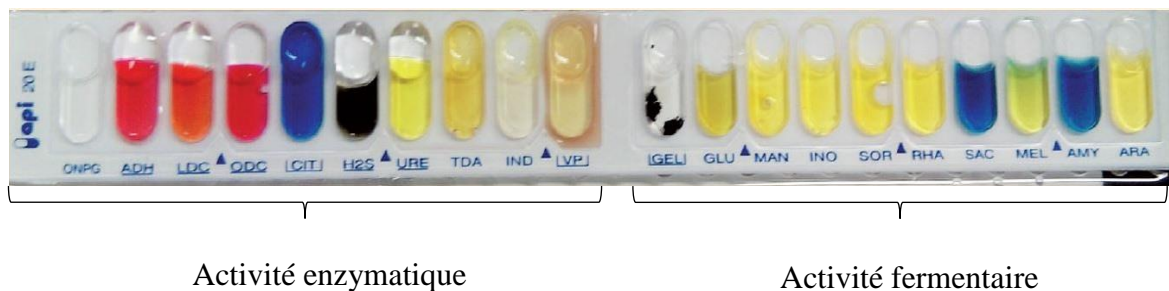
L'examen microscopique des frottis après coloration de Gram oriente sur le groupe bactérien (Gram positif ou Gram négatif). Il permet également d'observer la forme de la bactérie (cocci, bacilles, coccobacilles et spirochètes), le mode de regroupement (tétrade, amas, diplocoque ou chaînette) et la présence ou non des spores.

### V.1.3. Identification biochimique

L'identification du genre et de l'espèce d'une souche doit se poursuivre par la recherche des caractères biochimiques du métabolisme glucidique et protidique. Pour ce faire, les méthodes d'ensemencement dans un ensemble de milieux de culture appelé galerie sont utilisées. Celles-ci peuvent se présenter soit en tubes (macro-galerie), soit en système miniaturisé. Outre ces tests biochimiques, les tests à la catalase et à l'oxydase sont réalisés en complément pour mettre en évidence le type respiratoire (**Rajash et Rattan, 2008**).

#### ➤ Système miniaturisé (API)

La galerie miniaturisée API (Analysis Profil Index) est un ensemble de tubes prêts à l'emploi permettant l'identification des microorganismes par réalisation rapide et facile des tests biochimiques. Elle utilise plusieurs types de test à savoir l'étude de la fermentation de divers glucides, l'auxanogramme et la recherche directe d'enzymes. La lecture des réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture (**Voir annexe 3**) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Rajash et Rattan, 2008**).



**Figure 5** : Galerie d'identification miniaturisée API 20 E après ensemencement (Source : <http://sites.crdp-aquitaine.fr/sti/lexique/galerie-didentification>)

#### ➤ Galerie d'identification classique

Le tableau I ci-après présente l'ensemble des milieux de culture que peut comprendre une galerie d'identification classique et met en exergue les caractères qui peuvent être lus. Une fois ces différents critères déterminés à l'aide des techniques appropriées, l'identification fait appel à une base de données c'est-à-dire un catalogue contenant les caractères des différents taxons, et revient à déterminer dans cette base le(s) taxon(s) compatible(s) avec les résultats obtenus. Deux méthodes sont proposées (**Joffin et Leyral, 2005 ; Droguet, 2016**) :

- **Une méthode dichotomique** : les caractères sont hiérarchisés afin de construire des schémas d'identification que l'on suit pas à pas en fonction des résultats obtenus.



- Une **méthode probabiliste** basée sur le principe de l'égalité des caractères : chacun est considéré comme ayant la même valeur discriminatrice.

**Tableau I** : Galerie d'identification classique des bactéries.

Milieu	Caractères lus
Milieu Hajna Kliger	Catabolisme du glucose (culot jaune), lactose (pente jaune), production du H <sub>2</sub> S (précipité noir), gaz (présence de bulle)
Citrate de Simmons	Utilisation du citrate comme seule source de carbone (pente bleue)
Urée-tryptophane	Uréase (virage de l'indicateur au rouge phénol), TDA (précipité marron foncé), production d'indole (complexe coloré en rouge)
Mannitol Mobilité Nitrate	Nitrate-réductase (complexe rouge), catabolisme du mannitol (milieu jaune), mobilité (diffusion des bactéries dans la gélose)
Gélose Viande Foie	Test respiratoire
Gélose à l'esculine	Esculinase (diffusion d'un pigment noir sur la gélose)

La figure 6 ci-dessous illustre en image quelques milieux de la galerie classique.



**Figure 6** : Galerie classique en tube

#### V.1.4. Identification moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaires ont grandement amélioré la capacité de détecter et d'identifier les bactéries. Le principe consiste à amplifier un gène entier ou non avec des amorces spécifiques (Polymerase Chain Reaction) qui peut être ultérieurement révélé par

électrophorèse sur gel, ou par hybridation (hybridation) ou encore séquencé et comparé avec ceux déposés dans des banques (séquençage nucléotidique) (Alsanie *et al.*, 2018).

## **V.2. Identification des champignons filamenteux**

L'identification des champignons filamenteux en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification doivent être complétées par une analyse moléculaire.

### **V.2.1. Examen macroscopique**

Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons filamenteux, plusieurs aspects de l'appareil végétatif sont observés :

- L'aspect : duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre.
- Le relief : plat, plissé ou cérébriforme.
- La taille : petite, étendue ou envahissante.
- La couleur : blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grise).

La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres tels que la vitesse de la pousse des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure (Lecellier, 2013).

### **V.2.2. Examen microscopique**

Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures sont observées comme l'appareil végétatif, les organes de fructification et les spores.

- Le thalle végétatif : il peut être septé ou siphonné (filaments peu ou pas ramifiés), paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline).
- Les organes de fructifications : à la microscopie, on note la présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation des conidies (issues directement du thalle ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masses).
- Les spores : elles peuvent être endogènes ou exogènes (Lecellier, 2013).

### **V.2.3. Identification moléculaire**

Les méthodes d'identification des champignons filamenteux par biologie moléculaire reposent sur l'analyse des séquences portant l'information génétique. L'émergence de la PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis d'important progrès des techniques moléculaires.

Plusieurs techniques sont appliquées (La RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) et la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)).

Pour une identification plus précise, une nouvelle méthode d'analyse phénotypique a émergé comme outil d'identification des champignons filamenteux en routine. Cette technique qui repose sur la spectrométrie de masse (MALDI-TOFMS), permet d'obtenir sous forme de spectre le profil protéique des champignons filamenteux. Ces méthodes sont généralement assez coûteuses et longues à mettre en œuvre (**Lecellier, 2013**).

### **V.3. Identification des levures**

#### **V.3.1. Examen morphologique**

La culture sur milieu de Sabouraud permet une orientation dans l'identification, en particulier par l'aspect des colonies observées. Ainsi, parmi les levures d'intérêt médical :

- Les espèces du genre *Candida* donnent des colonies crémeuses, de type « S » ;
- Les colonies de *Cryptococcus* sont souvent muqueuses, parfois de type « S », blanchâtres, se pigmentant en ocre au bout d'une semaine d'incubation ;
- *Geotrichum* et *Trichosporum* forment des colonies crémeuses et filamenteuses ; *Rhodotorula rubrum* produit des colonies pigmentées en rose.

La culture sur un milieu RAT (Crème de riz-agar-tween) ou PCB (pomme de terre-carotte-bile) permet le développement de chlamydospores, caractéristiques des levures du genre *Candida*. La production de tubes germinatifs en sérum ou en milieu pour blastèse n'est observée que pour *Candida albicans* et constitue un excellent critère d'identification de cette espèce. Une identification plus précise, en particulier des espèces du genre *Candida* d'espèce autre qu'*albicans* implique l'ensemencement de galeries adaptées (**Dufresne, 2018**).

#### **V.3.2. Identification biochimique**

Les tests biochimiques sont réalisés soit en ensemençant dans un ensemble de milieux de culture soit en utilisant des galeries miniaturisées.

##### ➤ **Galeries miniaturisées**

Différentes galeries sont proposées pour l'identification des microorganismes d'intérêt médical. Ces galeries grâce aux tests biochimiques qu'elles offrent, permettent de différencier certaines espèces de champignons (principalement des levures) et de bactéries. On peut citer entre autre les galeries API 20C AUX (bioMérieux sa), ID32 C (bioMérieux sa), API *Candida*

(bioMérieux sa) utilisées pour l'identification des espèces de *Candida* ; les galeries API 20E utilisées pour l'identification des entérobactéries (**Dufresne, 2018**).

➤ **Galerie d'identification classique**

Le tableau II ci-après présente l'ensemble des milieux de culture que peut comprendre une galerie d'identification classique de levures et met en exergue les caractères qui peuvent être lus.

**Tableau II :** Galerie d'identification classique des levures.

Milieux	Caractères lus
Gélose de réisolement (gélose Sabouraud)	Aspect des colonies, pureté, catalase, examens microscopiques (état frais, Gram, coloration des spores)
Milieu Urée-Tryptophane	Uréase (si l'on soupçonne <i>Cryptococcus</i> )
Gélose Viande Foie	Test respiratoire
Milieu Cystine Trypticase Agar	Catabolisme du glucose, du xylose, du mannitol et de l'arabinose

Dans l'environnement naturel, les microorganismes sont principalement attachés à une surface, organisés en communautés structurées et englobés à une matrice d'exopolymères. Ce mode de développement appelé biofilm a pris une importance toute particulière lorsqu'il a été établi qu'il était impliqué dans un grand nombre d'infections bactériennes (**Khalilzadeh, 2009**).

## VI. Description des biofilms bactériens

### VI.1. Définition

Les biofilms sont un ensemble de microorganismes regroupés en communauté structurée, entourés d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS). C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif (**Espinal et al., 2012**). Cette définition regroupe des situations très différentes, depuis quelques bactéries adhérentes à une surface, à des biofilms épais présentant une diversité écologique importante, en passant par la flore commensale de la peau. Le biofilm constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes,

par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (**Espinasse *et al.*, 2010**). Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (**Behlau et Gilmore, 2008**).

On admet généralement que dans un écosystème donné le nombre de bactéries attachées aux surfaces est 1000 à 10 000 fois plus important que le nombre de bactéries planctoniques (**Bellifa, 2014**).

La matrice extracellulaire est constituée d'exopolymères bactériens, de matière organique et non organique, ainsi que de macromolécules du milieu environnant. Ces biofilms, de par leurs caractéristiques physiologiques et génomiques, ainsi que de par leur importance quantitative dans les écosystèmes, constituent une interface primordiale physiologiquement active (**Campanac *et al.* 2002**).

## **VI.2. Les étapes de formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des microorganismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe qui passe par plusieurs étapes listées ci-après (**Bellifa, 2014**).

### **VI.2.1. Adhésion réversible**

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions de faibles énergies entre la surface et les bactéries (interactions de type Van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut résorber de la surface et retrouver son état planctonique (**Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005**).

### **VI.2.2. Adhésion irréversible**

L'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères (slime) par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions spécifiques entre les composants superficiels bactériens (adhésines) et les récepteurs de surface de la cellule hôte ou de la sonde avec des liaisons de type hydrophobe (**Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005**) et surtout grâce à des structures d'adhésion variant selon les types de micro-organismes concernés (**Beloin *et al.*, 2005**). Pour les bactéries Gram négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries Gram positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant presque

uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine (**Bellifa, 2014**).

### **VI.2.3. Formation de microcolonies (Le développement précoce du biofilm)**

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux (**Stanley *et al.*, 2003**).

### **VI.2.4. Maturation du biofilm**

Le biofilm a une maturation exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un biofilm hétérogène tridimensionnel (**Sauer *et al.*, 2002**). Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. Finalement l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (**Clutterbuck *et al.*, 2007**).

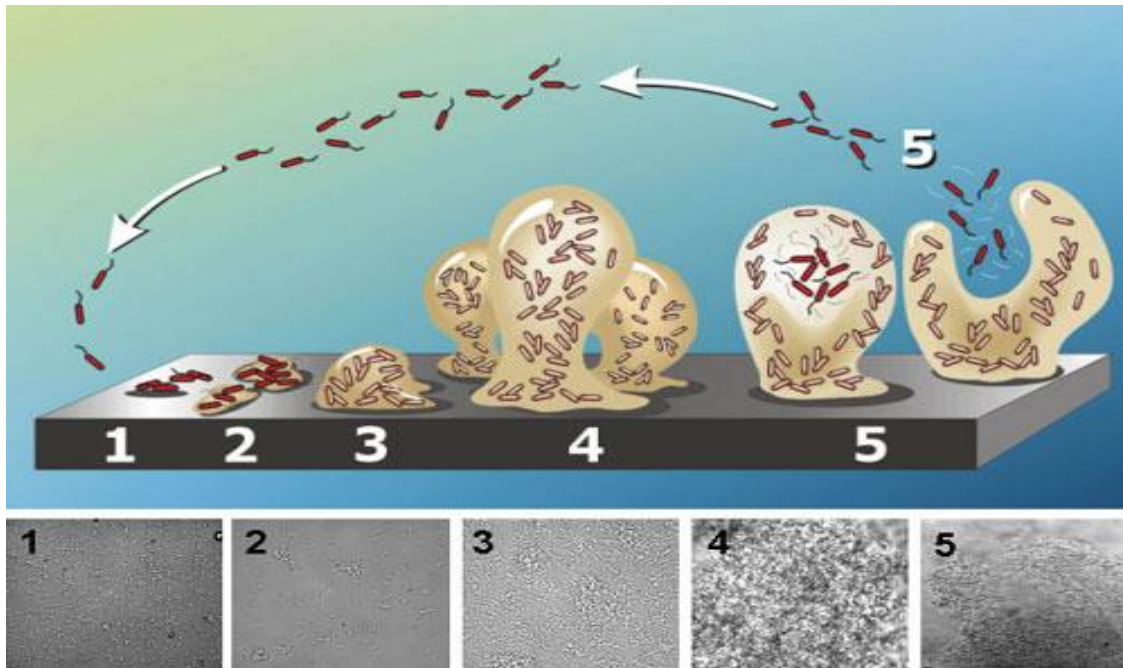
### **VI.2.5. Dispersion du biofilm**

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables par exemple : une limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, une apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques et une diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (**Sauer *et al.*, 2002**).

La dispersion du biofilm se fait selon trois étapes (**Kaplan, 2010**).

- Détachement des cellules de la colonie du biofilm
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement
- Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance (Figure 7) (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009**).



**Figure 7:** Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm. Les images (1 à 5) montrent la croissance du biofilm en microscopie confocale (**Grasteau, 2011**).

### **VI.3. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels : la surface, le milieu et les microorganismes (**Branger et al., 2007**).

#### **✚ Les caractéristiques de la surface**

La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des bactéries à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm (**Klein, 2011 ; Bellifa, 2014**).

#### **✚ Les caractéristiques du milieu**

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides.) (**Marchal, 2010**).

#### **✚ Caractéristiques des microorganismes**

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent

importantes (**Liesse, 2012; Bellifa, 2014**). Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule) (**Perrin, 2009 ; Elyajouri, 2012**).

Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces et de grandes différences existent au sein d'une même espèce bactérienne (**Grasteau, 2011**).

## **VI.4. Les domaines d'intervention des biofilms**

### **VI.4.1. Dans l'environnement et le domaine industriel**

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'homme ou ses activités :

- Les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre (acide acétique).
- Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques par exemples : un réacteur à biofilm à lit fluidisé a donné de meilleurs résultats de la production de pénicilline.
- Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux résiduaires.
- La formation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Alnnasouri, 2010**).

### **VI.4.2. Dans le domaine médical**

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. En effet, 65 % des infections sont dues à des biofilms. Plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**De Chalvet de Rochemonteix, 2009**). La formation des communautés sessiles et leurs résistances inhérentes aux agents antimicrobiens sont la base de plusieurs infections bactériennes persistantes et chroniques. Ces infections peuvent être causées par une seule espèce ou d'espèces mixtes de bactéries ou de moisissures (**Arciola et al., 2015**).

## **VI.5. Les méthodes de détection de biofilm**

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm, parmi lesquelles ; la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP), la méthode en Tube (TM), la culture sur milieu rouge Congo (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT).

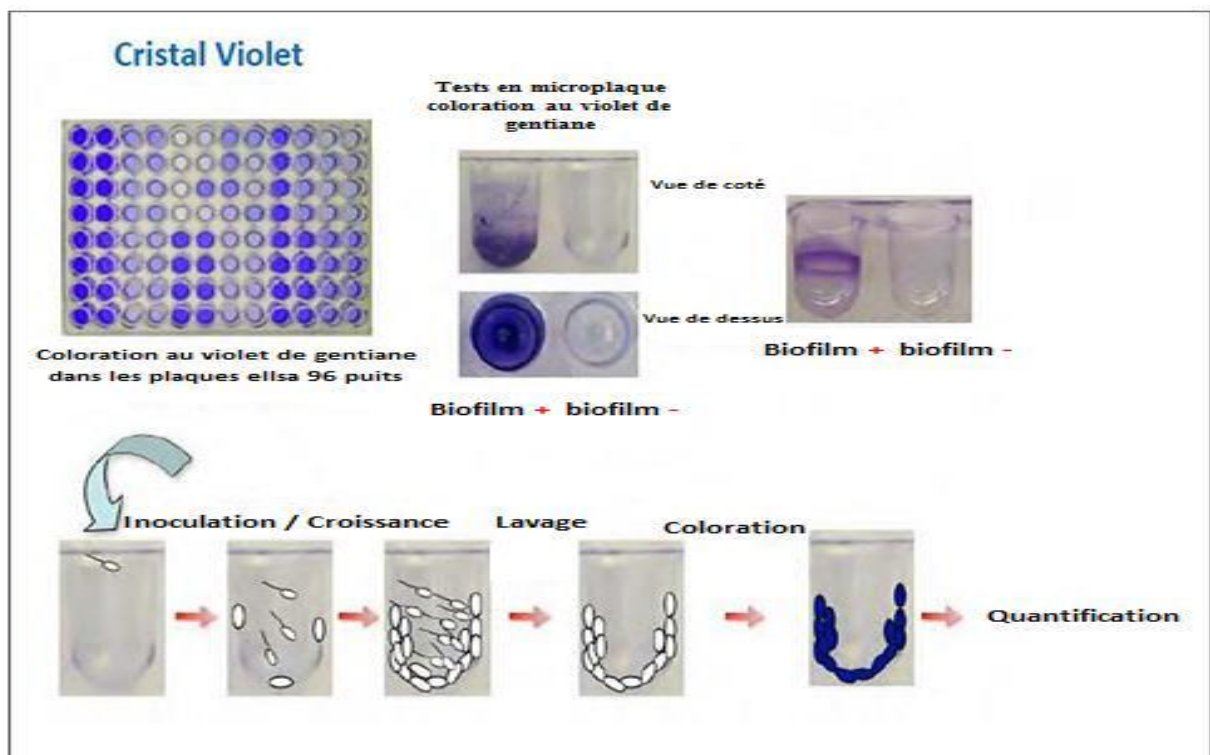


### VI.5.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) décrit par **O'Toole *et al.*, (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (**Bellifa, 2014**). Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cerveau (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37 °C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS) (Figure 8).

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1 %. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Mathur *et al.*, 2006 ; Bellifa, 2014**)



**Figure 8** : Formation de biofilm en microplaque (**Bellifa, 2014**).

### VI.5.2. La méthode en tube (TM)

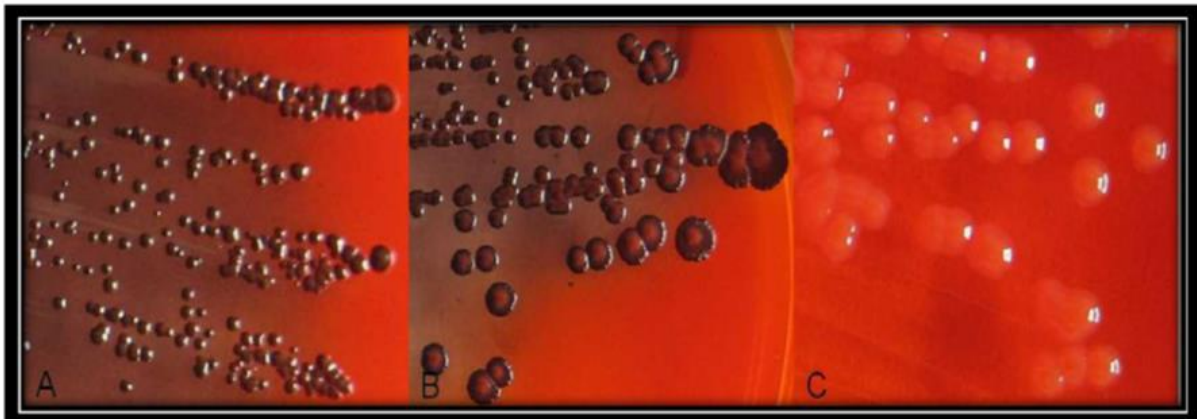
C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm.

A partir d'une culture de 18 à 24 heures, une colonie est ensemencée dans de BHIB supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV.

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (Mathur *et al.*, 2006 ; Alnasouri, 2010 ; Djelloul, 2010 ; Bellifa, 2014).

### VI.5.3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices d'exopolymères (slime) (Nagaveni *et al.*, 2010 ; Kara, 2014 ) (Figure 9). Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Mathur *et al.*, 2006 ; Bellifa, 2014).



**Figure 9** : Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou *et al.*, 2012).

(A) RCA-positive souche de *S. epidermidis* (colonies noires), (B) RCA-positive souche de *S. aureus* (colonies noires), (C) RCA-négative souche de *P. aeruginosa* (colonies rouges).

### VI.5.4. Le Biofilm Ring Test (BFRT)

Une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms : le Biofilm Ring Test (BFRT) technique décrite par Chavant *et al.* (2007) (Liesse, 2012 ; Nagant, 2013) et développé par la Société Biofilm Control. Cette méthode devait permettre de suivre la formation de biofilm d'une façon simple et rapide, sans étapes de lavage ni de coloration (Perrin, 2009).

Elle permet de suivre de façon simple et rapide l'immobilisation de billes magnétiques par les cellules bactériennes adhérant au fond du puits. Plus les billes seront piégées, moins elles se déplaceront dans le champ magnétique et moins elles se regrouperont au centre du puits. L'immobilisation des billes est secondaire soit au fait qu'elles sont «piégées» par des bactéries qui adhèrent au fond du puits, soit au fait que les propriétés rhéologiques du milieu sont modifiées (Liesse, 2012 ; Nagant, 2013).

## **VI.6. Résistance des biofilms aux antibiotiques et désinfectants**

### **VI.6.1. Présentation de la résistance**

Les bactéries au sein du biofilm résistent à des concentrations en antibiotiques plus élevées que les bactéries planctoniques. Pour Dupont, (2000), cette augmentation de résistance peut être d'un facteur 1500. Pour Rediske *et al.*, (1999) il faut multiplier de 50 à 500 fois la dose thérapeutique normale pour éliminer les jeunes biofilm (moins de 24h) et par 5000 cette dose dans le cas des biofilms matures (Burin, 2002).

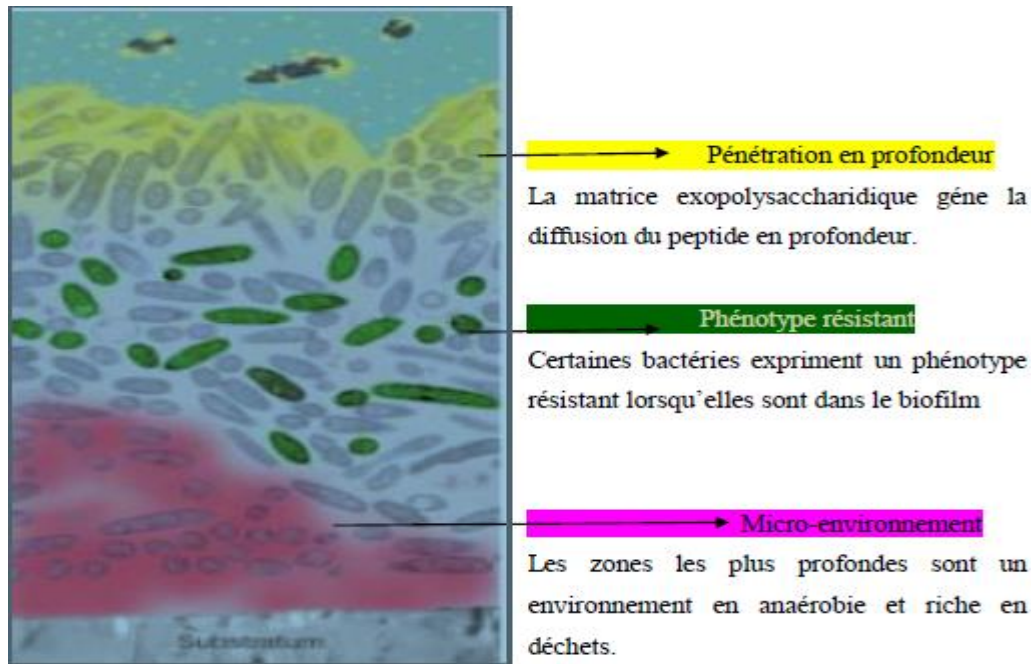
La notion de «résistance» des biofilms aux antibiotiques mérite d'être clarifiée. En effet, une souche bactérienne est définie comme étant résistante si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotique généralement observée pour la majorité des souches de l'espèce considérée. Les cellules d'un biofilm sont quant à elles décrites comme résistantes par comparaison avec leurs homologues planctoniques (Daddi, 2012).

### **VI.6.2. Mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques et désinfectants**

Trois hypothèses principales sont avancées afin d'expliquer les mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques. La première repose sur une notion de barrière physique qui expliquerait la pénétration lente et incomplète de certains antibiotiques. La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides, pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique. Et enfin la dernière hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms dont les micro-organismes constituants pourraient présenter des formes plus résistantes (Figure 10) (Stewart et Costerton, 2001).

Ces trois hypothèses reposent sur la nature communautaire et multi-cellulaire du biofilm. La plupart des spectres antibiotiques ont été étudiés sur des formes planctoniques et doivent maintenant être étudiés sur des modèles de biofilms plus complexes. Ainsi, de nouvelles concentrations minimales d'inhibition et de nouvelles associations médicamenteuses doivent être envisagées. Les recherches actuelles essaient d'envisager des molécules capables de

rompre ou d'empêcher la formation de la matrice polysaccharidique, voire d'agir sur les signaux de différenciation du « quorum sensing » (Etienne, 2004).



**Figure 10** : Les trois mécanismes de résistance du biofilm aux antibiotiques (Stewart, 1996).

## VI.7. Le Quorum sensing

Ce mécanisme a été retrouvé chez des bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*. Il contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules par des facteurs moléculaires diffusibles « les auto-indicateurs ». C'est le phénomène de comportement communautaire « Biofilm » où les bactéries communiquent entre elles (De Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Djelloul, 2010 ; Pecastaings, 2010).

Ce mécanisme est lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal (AI) dans l'environnement extracellulaire. Quand la concentration d'une molécule signal atteint un niveau seuil, capable d'activer la production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la production d'EPS (Alnnasouri, 2010 ; Pecastaings, 2010). Il existe plusieurs molécules signal chez les micro-organismes parmi lesquelles les Acylhomoserine lactones (AHL) produites par les bactéries à Gram négatif.

Les méthodes actuelles de désinfection de l'air et des surfaces des locaux sont basées sur l'utilisation des produits chimiques biocides à l'instar de l'hypochlorite de sodium (eau de javel) et de l'éthanol 70°. A ceux-ci s'ajoutent certains désinfectants commercialisés sous

forme d'aérosols dont pour la majorité, le formaldéhyde se trouve être le principe actif. Il se pose donc ici un problème de toxicité de ces différents produits, c'est pourquoi l'AFNOR recommande que certains procédés de désinfection se fassent hors présence humaine. Outre les effets toxiques de ces produits de désinfection sur l'homme, viens se heurter le problème de résistance bactérienne lesquelles se retrouve préférentiellement sous forme de biofilm dans la nature. Face donc à tous ces problèmes, il est important de se retourner vers d'autres sources antimicrobiennes respectueuses de l'Homme et de son Environnement et pouvant servir de substitue aux produits chimiques couramment utilisés comme désinfectant. Les huiles essentielles, composés volatiles des plantes répondent amplement à ces exigences.

## **VII. Généralité sur les huiles essentielles**

### **VII.1. Définition**

L'huile essentielle (HE) ou (essence végétale) est communément définie comme un liquide aromatique d'aspect fluide et de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite. Mais d'après la commission de la pharmacopée européenne et la norme ISO 9235 (1997), c'est : « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (AfSSAPS, 2008).

### **VII.2. Répartition, localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles dans la plante**

Dans le règne végétal, les huiles essentielles ne sont pas présentes dans toutes les plantes. Parmi les 800 000 espèces végétales recensées, seules 10 % sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont alors dites aromatiques. Certaines familles en sont particulièrement riches, c'est le cas des Conifères, des Myrtacées, des Ombellifères, des Labiées et des Composées (Rhayour, 2002).

Les huiles essentielles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries, écorces, racines, rhizomes, fruits, bois et graines. Dans une même plante, elles peuvent être présentes dans différents organes. La composition des HEs peut alors varier d'un organe à l'autre (Rhayour, 2002). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées telles que, les cellules à huile essentielle des *Lauraceae* et *Zingiberaceae*, les poils sécréteurs des *Lamiaceae*, les poches sécrétrices des *Myrtaceae* et des *Rutaceae* et les canaux sécréteurs des *Apiaceae* et

des *Asteraceae*. Plusieurs tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voir dans un même organe (**Mohammedi, 2006**).

### **VII.3. Rôle physiologique des huiles essentielles chez les plantes**

Le rôle exact des huiles essentielles dans le processus de la vie de la plante demeure mal connu, c'est pourquoi il existe beaucoup de spéculation à ce sujet (**Mohammedi, 2006**). Elles seraient impliquées dans : la protection contre les prédateurs de la plante, l'attraction des insectes pollinisateurs, l'inhibition de la germination et de la croissance ou encore dans l'inhibition de la multiplication des bactéries et champignons.

### **VII.4. Composition chimique**

La composition chimique d'une HE est assez complexe et variable, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux groupes de composés caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques ( $C_5$ ) et répondent pour la plupart des cas à la formule générale  $(C_5H_8)_n$ . Parmi ces composés on distingue : les monoterpènes ( $C_{10}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), les diterpènes ( $C_{20}$ ) et les triterpènes ( $C_{30}$ ). Ces composés ont tous la même origine métabolique. Les composés les plus fréquemment rencontrés en plus des terpènes sont : les alcools (phénols et sesquiterpénols), les cétones, les aldéhydes, les esters, les éthers, et les oxydes (**Ndoye, 2001**).

Au sein d'une même espèce, la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente. On parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique. Une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. C'est le cas de l'HE de *Mentha sp cf piperita* ou deux chémotypes sont retrouvés au Cameroun (la menthe au menthol et la menthe à la piperiton) (**Nyegue et al., 2017**). Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (**Boti et al., 2006, Oussou et al., 2009**).

## VII.5-Méthodes d'analyse et d'identification des HEs

### VII.5.1-Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation qui permet la détermination quantitative et qualitative des constituants chimiques d'une substance. Il s'agit d'une technique d'analyse de mélange de composés volatils ou susceptibles d'être volatilisés sans être décomposés par une élévation de température (**Kenmegne et al., 2018**).

Lors de la séparation, les composés sont vaporisés par chauffage au niveau de l'injecteur, ils sont ensuite élués sur une colonne (phase stationnaire) par un gaz vecteur (phase mobile) à des vitesses différentes selon leur volatilité et leur solubilité dans la phase stationnaire. Ils sont enfin détectés au niveau du détecteur à ionisation de flamme. On obtient ainsi au niveau de l'enregistreur une succession de pics caractérisés par des temps de rétention et des aires correspondants aux quantités de composés présents dans l'H.E. Les indices de rétention sont calculés par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une série d'alcane permettant un étalonnage du chromatogramme (**Kenmegne et al., 2018**).

### VII.5.2-Couplage CPG/SM

La technique de couplage CPG/SM permet une identification plus précise des composés en tenant compte de leur structure moléculaire. En effet, dans cette technique, le détecteur du chromatographe est le spectromètre de masse. Cet appareil comprend également trois modules : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur

1. **La source d'ions** qui est la partie du spectromètre où sont produits les ions gazeux ; elle est maintenue à une température élevée pour éviter la condensation de l'analyste.

2. **L'analyseur** est la partie qui possède quatre paramètres à savoir : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapport (masse/charge) balayée et la transmission. L'analyseur grâce à ces paramètres sert à trier ou à séparer les ions en fonction de leur rapport (m/z).

3. **Le détecteur** dont le rôle est de compter les ions en faisant correspondre leur rapport (m/z) et de fournir un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés. L'enregistreur est intégré à ce système pour traiter le signal et permettre la visualisation des spectres.

Durant tout ce processus, un système de calibrage est mis en place pour permettre l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z.

La comparaison de l'indice de rétention calculé et du spectre de masse avec les données de la littérature permet en général l'identification des composants usuels (Adams, 2012 ; NIST 2014).

## VII.6. PLANTES UTILISEES

### VII.6.1. *Eugenia caryophylla*

#### ➤ Caractères généraux de la plante

*E. caryophylla* ou le giroflier est une plante de la famille des Myrtaceae originaire des petites îles volcaniques de l'archipel des Moluques en Indonésie, plus particulièrement dans la région de Bandah. Bien qu'il soit cultivé de façon industrielle en Tanzanie, à Madagascar et en Indonésie. Il peut être cultivé dans tous les pays ayant un climat tempéré. C'est un très bel arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 12 à 15 m de haut. Les parties principalement utilisées sont les boutons du giroflier communément appelés clous de girofle. Les clous de girofle sont utilisés pour la fabrication des « Kretek », cigarettes indonésiennes constituées à 60% tabac et à 40% de clous girofle. Ils entrent aussi dans la composition de la poudre de curie. Ils servent à calmer la rage de dent, à donner une bonne haleine, à prévenir les infections dentaires et à parfumer le linge. Au Cameroun les boutons d'*E. caryophylla* sont exclusivement utilisés comme épices de choix dans la préparation des mets tels que la chèvre sautée et le poulet DG (Voundi, 2017).

#### ➤ Travaux antérieurs

L'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* de l'HE des boutons de *E. caryophylla* (Clou de girofle) contre *Candida albicans* et quelques dermatophytes à déjà été mise en valeur par plusieurs auteurs (Pinto *et al.*, 2009 ; Nyegue *et al.*, 2014 ; Ngongang *et al.*, 2018). Le mécanisme de l'action bactéricide de l'huile essentielle des boutons de *E. caryophylla* sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoneae*, *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* a été mis en valeur (Rhayour, 2005, Ngongang *et al.*, 2019).



## VII.6.2. *Mentha sp cf piperata*

### ➤ Caractères généraux de la plante

*Mentha sp cp pipérिता* (*Menthe poivrée*) est une plante herbacée de la famille des Lamiaceae, très odorante et mesurant entre 30 et 90 cm de haut. C'est une plante vivace par son rhizome qui s'accroche dans la terre, et elle se propage par ses stolons ou drageons (branches basses qui développent des racines au contact du sol). Elle est caractérisée par son odeur mentholée et par ses feuilles dentées, ovales et vertes foncées (Saha et D'Mello, 2004). Originaires des régions au climat tempéré, on la cultive néanmoins sur tous les continents. Traditionnellement la *Mentha sp cf piperita* est utilisée pour traiter les troubles gastriques tels que : les flatulences, les coliques intestinales et les nausées (Saha et D'Mello, 2004). L'HE de *Mentha sp cf pipérिता* est quant à elle utilisée pour traiter les douleurs dentaires, les douleurs musculaires, la toux et l'inflammation des muqueuses orales (Saha et D'Mello, 2004). Au Cameroun la *Mentha sp cf piperita* est couramment employée comme herbe aromatique pour assaisonner les plats de viande à odeurs fortes et en décoction pour calmer les crises de nerfs.

### ➤ Travaux antérieurs

L'étude de la composition chimique de l'HE de menthe a été effectuée. Deux composés majoritaires ont été mis en évidence, le menthol et le menthone (Derwich *et al.*, 2010). Les travaux de Nyegue (2014) ont montré que le composé majoritaire de la menthe utilisée dans leurs travaux est la pipéritone. Les HES de menthe ont montrées qu'elles possèdent les propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, et antioxydantes (Burt, 2004). L'HE de *mentha sp cf piperata* s'est avérée fortement efficace contre *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* et *Escherichia coli* (Sartoratto *et al.*, 2004). L'activité antifongique et toxicologique de l'HE de *Mentha sp cf pipérिता* a été évaluée sur des rats contaminés par des dermatophytes. Après 36 jours de traitement, les rats traités étaient complètement guéris (Sokovic *et al.*, 2006).

## VII.6.3. *Cymbopogon citratus*

### ➤ Caractères généraux de la plante

*C. citratus* (Poaceae) ou la citronnelle est une plante herbacée pérenne, à longues feuilles linéaires, dressées, de 90 cm à 2 m de long, à bords rugueux et coupants, poussant en touffes denses pouvant atteindre 0,5 à 1,5 m de haut. Sa couleur est verte et son odeur est agréable et relaxante. Les tiges sont creuses, bulbeuses à la base et enveloppées dans la gaine des feuilles (Manvitha et Bidya, 2014). Cette plante herbacée tropicale serait originaire d'Inde mais on la

trouve aujourd'hui dans de nombreuses régions tropicales humides et subtropicales (**Seaforth et al., 2008**). Ainsi, elle est cultivée en Afrique (**Bossou et al., 2013**), en Amérique du Sud (**Franz et al., 2011; Seaforth et al., 2008**), en Asie tempérée mais aussi dans les îles de l'archipel des Mascareignes (**Samoisy et Mahomoodally, 2016**). L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* y est alors utilisée comme répulsif naturel contre les moustiques (**Sritabutra et Soonwera, 2013**). *Cymbopogon citratus* est connue pour différentes applications. Elle est utilisée aussi bien pour un usage alimentaire qu'en médecine traditionnelle ou encore en aromathérapie (**Avoseh et al., 2015 ; Ekpenyong et al., 2015**), et son exploitation varie selon les régions.

#### ➤ **Travaux antérieurs**

Longtemps réservées à des usages traditionnels, les propriétés de l'huile essentielle de citronnelle sont aujourd'hui réévaluées dans une démarche scientifique rigoureuse. Ainsi les propriétés anti-inflammatoires de *Cymbopogon citratus* ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*, son infusion agit sur les voies de l'inflammation (**Tiwari et al., 2010**). L'huile essentielle de citronnelle cultivée en Thaïlande inhibe la croissance de plusieurs bactéries (*Salmonella* spp, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*) (**Wannissorn et al., 2005**). L'huile essentielle, ainsi que ses composés majoritaires comme le citral ou le myrcène ont une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*. Par contre, seuls l'huile essentielle totale et le citral inhibent la croissance du *Bacillus subtilis* et *E.coli*. L'huile essentielle de citronnelle est aussi capable de détruire des structures plus complexes, comme le biofilm formé par *Streptococcus mutans* (**Tofiño-Rivera et al., 2016**). L'activité antifongique de l'huile essentielle de citronnelle a été établie contre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* mais aussi *Candida albicans* et *Candida tropicalis* (**Bansod et Rai, 2008**). Elle agit aussi contre le parasite *Leishmania*, de même que son composé majoritaire, le citral (**Machado et al., 2012**). L'activité de cette huile contre le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* a été démontrée *in vitro* (**Kpoviessi et al., 2014**).

#### **VII.6.4. *Eucalyptus globulus***

##### ➤ **Caractères généraux de la plante**

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres de la famille des Myrtaceae dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur. Originaire d'Australie, notamment de la province de Tasmanie ; l'*Eucalyptus globulus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie

et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'*Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom « d'arbre à la fièvre » ou *Australien fever tree*. De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'*Eucalyptus* dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion, Europe. Au Cameroun l'*Eucalyptus globulus* est principalement cultivé dans la région de l'Ouest où ses feuilles sont utilisées pour soigner les infections de l'appareil respiratoire et la toux (**Rabiai, 2014**).

#### ➤ Travaux antérieurs

Après avoir présenté trois espèces d'*Eucalyptus*, utilisées en Phyto-aromathérapie **Warot, (2006)** a énuméré des formulations d'H.E à base d'*Eucalyptus* utilisés pour lutter contre un grand nombre de maladies inflammatoires comme la toux et le rhume. **Souhila et Nafaa (2007)** ont déterminé « *in vitro* » le pouvoir antibactérien d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et ont évalué « *in vivo* » sur la viande fraîche type hachée en vue d'une application future comme conservateur. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles des extraits ainsi que de l'HE d'*Eucalyptus globulus* pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche, ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (**Rabiai, 2014**).

#### VII.6.5. *Cananga odorata*

##### ➤ Caractères généraux de la plante

*Cananga odorata* (Ylang-ylang) est un arbre de la famille Annonaceae d'environ trois mètres de hauteur qui produit des fleurs de couleur allant du vert à jaune et des fruits verts à odeur forte. Au Cameroun, il est cultivé dans les jardins, les parcs et près des habitations à cause de l'odeur fruitée et agréable que dégage ses fleurs à l'aube. Son huile essentielle est très appréciée dans les filières cosmétiques pour générer des produits de très haute valeur ajoutée (**Moni, 2013**).

### ➤ Travaux antérieurs

En valorisant cette plante, **Benini et al., (2010)** ont noté que malgré le fait que son utilisation soit rentable sur le plan économique dans les filières cosmétiques, elle ne fait pas l'objet d'un programme de protection. Les travaux de **Fekam, (2004)** ont montré que l'HE de ses fruits était constituée  $\beta$ -pinène (10,1%) ; (E) pinocarvéol (5,4%) ; myrtenol (6,4%) ;  $\alpha$ -ylangène (5,3%) et camène (4,9%); l'évaluation de son activité sur le Plasmodium a montré qu'elle ne présentait aucune activité antiplasmodiale. Les travaux de **Nyegue et al., (2017)** ont montré que l'HE de *Cananga odorata* avait une activité bactériostatique sur *Bacillus cereus* et *salmonella thyphi* responsable des diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans.

### VII.6.6. *Citrus sinensis*

#### ➤ Caractères généraux de la plante

Les espèces du genre *Citrus* sont des arbres ou des arbustes de la famille des Rutaceae de moins de 4 m à 12 m de haut. Les feuilles sont généralement simples et persistantes, sauf chez les hybrides de *Poncirus* dont de nombreuses espèces portent des épines. Le fruit, très caractéristique, est enveloppé d'une écorce parfois très épaisse : le zeste. Au Cameroun les fruits du genre *Citrus* sont utilisés en pharmacopée pour lutter contre les maladies comme le diabète, la toux, et la grippe mais aussi pour régler des carences comme l'avitaminose.

#### ➤ Travaux antérieurs

L'analyse de la composition de *citrus sinensis* ainsi que des autres espèces de citrus, rapporte le limonène comme étant le composé majoritaire à des proportions comprises entre 90 et 97 %, bien que dans certaines études, ce pourcentage peut descendre jusqu'à 64 % (**Chen et al., 2014**). L'HE de *Citrus sinensis* est largement utilisé pour procurer des parfums fruités naturels et comme ingrédients aromatisants dans les aliments, les produits pharmaceutiques et cosmétiques (**Palazzolo et al., 2013; Othman et al., 2017**), Les travaux de **shalu, (2015)** ont démontrés une activité inhibitrice importante de l'HE de *Citrus sinensis* sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella* et *Candida albicans*.

## VII.7. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour déterminer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Le choix du test à utiliser dépend non seulement de la nature de la substance à tester, du microorganisme mais également des paramètres recherchés. (CLSI, 2011) ont regroupé ces différents tests en deux catégories :

- Les tests qualitatifs, permettant de déterminer la présence ou non des substances à activité antimicrobienne.
- Les tests quantitatifs, permettant de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI, CMB) et le profil bactériologique d'un extrait ou d'une huile essentielle.

### VII.7.1 Méthodes qualitatives

#### VII.7.1.1. Aromatogramme

Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance (Toure, 2015).

#### VII.7.1.2 Technique de microatmosphère

Le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celui des aromatogrammes. Cette méthode en boîte de Pétri constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils (De Billerbeck, 2000). Selon Bousbia (2004), cette méthode consiste à déposer une coupelle contenant une quantité d'HE au centre du couvercle d'une boîte de Pétri renversée sans que l'HE entre en contact avec la géloseensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum se traduisant par un halot qui sera mesuré par un pied à coulisse.

### **VII.7.1.3-Technique par contact direct**

La technique par contact direct consiste à mettre en contact l'HE et les microorganismes pendant un temps précis, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide (**Bousbia, 2004**). Cette méthode peut à la fois évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antimicrobienne réelle des HEs.

### **VII.7.1.4-Méthode de diffusion en puits ou en cylindre**

Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consiste à réaliser un trou cylindrique vertical dans la gélose et à y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffuse radialement. Si elle est active, elle crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

### **VII.7.2.-Méthodes quantitatives**

Elles font référence aux méthodes de détermination des paramètres d'inhibitions (CMI et CMB) et au profil bactériologique CMB/CMI de chaque substance à tester sur un ou plusieurs germes (**Fauchere et Avril, 2002 ; Nyegue, 2006**). On pourra distinguer :

#### **VII.7.2.1-La méthode de dilution en milieu liquide**

L'inoculum bactérien est cultivé en présence d'une série de concentration décroissante d'extrait selon une dilution géométrique de raison 2. Cette méthode présente plusieurs variantes selon que la série de dilution des extraits se fait dans une série de tubes (macrométhode de dilution) ou dans des cupules d'une microplaque (microméthode de dilution) contenant le milieu de culture. L'inoculum bactérien est équitablement distribué dans chaque tube ou cupule. Deux témoins sont réalisés ; un témoin positif (bouillon nutritif + microorganisme) et un témoin négatif (bouillon nutritif + extrait). Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus petite concentration ayant inhibé toute croissance visible à l'œil nu (**CLSI, 2012**). La croissance bactérienne se traduit par le trouble du milieu ou par le changement de couleur d'un indicateur coloré préalablement introduit dans le bouillon.

#### **VII.7.2.2-Méthode d'incorporation dans la gélose**

Cette méthode est généralement utilisée pour mesurer l'activité des substances hydrophyles sur les microorganismes sporulants (moisissures) (**Hadacek et Greger, 2000**). Elle consiste à mélanger avec le milieu de culture, l'extrait ou la substance dont on veut évaluer

l'activité et ensuite le couler dans des boîtes de Pétri. Après solidification, le milieu est inoculé et les pourcentages d'inhibition sont calculés au cours de l'incubation à des intervalles de temps bien définis. Cette dernière méthode est communément utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des champignons mycéliens (Nyegue, 2014).

#### VII.8. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). De ce fait, les chercheurs se focalisent très souvent sur les potentielles cibles cellulaires et les dommages que causent les HEs sur les cellules (Hend, 2009 ; Cai *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2016 ; Babii *et al.*, 2018). On peut citer entre autre :

- Attaque de la paroi et de la membrane bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- 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.

#### VII.9. Interaction entre les HEs

Les effets antimicrobiens des associations d'HE, comme pour les associations d'antibiotiques, peuvent se définir selon quatre interactions possibles (Piribi, 2006) :

- **Indifférence** : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) n'est pas affectée par l'autre.
- **Addition** : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) donne un effet d'association qui est égal à la somme des activités de chaque H.E étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) donne un effet significativement supérieur à la somme de chaque HE. étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) aboutit à la diminution de l'activité de l'une ou l'autre. Cet effet est inférieur à la somme des effets de chaque HE prise séparément.

## VII.10. Utilisation des huiles essentielles

Les HEs sont de plus en plus utilisées dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques (**Franchomme et Pénéol, 2011**). Elles sont largement exploitées pour traiter certaines maladies externes et internes (infections d'origine fongiques, troubles humoraux ou nerveux). Elles servent également à préserver les cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable (**Sarkic et Stappen, 2018**).

Certaines huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antiseptique marqué. Ce dernier s'exerce sur des souches bactériennes variées, y compris celles habituellement antibiorésistantes. En effet, elles sont « eubiotiques », c'est-à-dire qu'elles détruisent les parasites sans interférence avec l'organisme hôte, contrairement aux antibiotiques et désinfectants chimiques qui très souvent interagissent avec les parasites en les dénaturant avec des effets secondaires sur les sujets traités (**Valeriano, 2012**).

Certaines huiles essentielles sont également actives sur les bactéries, les champignons. Elles agissent généralement à faible dose. Les essences de sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont les plus antiseptiques. Leur utilisation pour la désinfection des locaux est un champ en pleine exploration ( **Rabiai, 2014**).

## VIII. Généralité sur les désinfectants

### VIII.1. Quelques définition

#### ➤ Désinfectant

Santé Canada définit un désinfectant comme un agent antimicrobien pouvant détruire des microorganismes pathogènes et susceptibles d'être pathogènes sur les surfaces inanimées (**AFNOR, 2007**).

#### ➤ Antiseptique

Un antiseptique par contre est un agent antimicrobien pouvant détruire des microorganismes pathogènes et susceptibles d'être pathogènes présents sur des tissus vivants (**AFNOR, 2007**).

#### ➤ Désinfection

C'est une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés (**AFNOR, 2007**).



Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération".

➤ **Décontamination (ou pré-désinfection)**

C'est une opération utilisant un produit détergent contenant au moins un principe actif reconnu pour ses propriétés bactéricides, fongicides, sporicides ou virucides.

C'est le premier traitement à effectuer sur les objets, les surfaces et matériels souillés par des matières organiques dans le but de diminuer la population des micro-organismes et de faciliter la désinfection ultérieure (AFNOR, 2007).

### **VIII.2. Distinction entre détergents et désinfectants**

Souvent les termes détergents et désinfectants sont confondus alors que tous les deux font appel à des réalités physicochimiques différentes. Par conséquent, ces produits ont un rôle différent qui peut cependant être complémentaire, selon la nature de l'intervention désirée. Il y a donc lieu de faire la distinction entre un détergent et un désinfectant (AFNOR, 2007).

Un détergent cherche à déloger les organismes ou les salissures qui adhèrent à une surface. Le fait qu'un organisme soit détaché de son support augmente la surface de contact avec un désinfectant, ce qui se traduit par une augmentation de l'efficacité de ce dernier.

Un désinfectant a pour objectif de s'attaquer aux constituantes d'un organisme. Il a été démontré que le simple fait de nettoyer permettait de réduire de 80 % la charge environnementale en micro-organismes. Dans une désinfection de l'environnement, l'objectif d'utiliser des désinfectants est de réduire davantage cette charge. En général, on vise une réduction de la charge environnementale en germes avoisinant 95 % (CCLIN, 2000).

La désinfection de l'environnement ne vise donc pas un effet stérilisant comme dans le cas des instruments chirurgicaux où l'on cible une réduction d'environ 99,999 %.

### **VIII.3. Modes d'action des désinfectants**

On a constaté que la résistance des organismes était principalement liée à la composition de la membrane cytoplasmique qui est à la fois un obstacle physique et chimique. Les désinfectants, pour être efficaces, doivent donc être en mesure de s'attaquer à la membrane cytoplasmique ou au contenu de la cellule. Ces modes d'action sont basés sur les interactions moléculaires entre les désinfectants et les composantes cellulaires en présence. Il ne faut pas oublier que la membrane cytoplasmique possède une partie qui aime l'eau (polaire), dite hydrophile, et une partie composée de lipides, dite hydrophobe, (qui n'aime pas l'eau ou non

polaire). Cette dernière nécessite l'utilisation de désinfectants qui attaquent les graisses (lipides). Il existe trois modes d'action possibles des désinfectants (AFNOR, 2007) :

- destruction de la membrane cytoplasmique,
- réduction des échanges avec le milieu extérieur,
- destruction par oxydation du matériel cellulaire.

#### VIII.4. Résistance microbienne aux désinfectants

L'élément majeur de la résistance des micro-organismes est la composition de la paroi cellulaire. Cette résistance naturelle est un caractère inné qui détermine le spectre d'activités d'un désinfectant donné. En raison de leurs caractéristiques biologiques (exemple : composition de la membrane cellulaire) qui leur sont propres, les organismes susceptibles d'occasionner des infections nosocomiales ne réagissent pas tous de la même façon aux désinfectants.

Selon la documentation, les micro-organismes peuvent développer une résistance aux produits, que l'on qualifie de résistance acquise. La fréquence des résistances acquises aux désinfectants est nettement moins importante que la résistance aux antibiotiques (Singer *et al.*, 2016). Cette résistance est le résultat d'un changement au niveau du génome qui induit une mutation et une sélection. Dans les faits, c'est le principe de la sélection naturelle qui s'applique.

Une mutation spontanée au niveau d'un chromosome peut conférer à un organisme un caractère qui le rend résistant à un type de désinfectant. Cet organisme, lorsqu'il se multiplie, transmet ce gène de résistance. Ce caractère devient graduellement dominant à chaque fois que l'on effectue une désinfection avec le même produit et avec la même concentration car à chaque fois, on élimine une partie de la population microbienne qui est non résistante.

Ces modifications permettant aux organismes de s'adapter peuvent s'opérer à différents niveaux (Singer *et al.*, 2016) :

- Production de nouvelles enzymes résistantes ;
- Changement dans la structure interne de la cellule ;
- Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique ;
- Modification de la structure de la paroi de la cellule.

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

La désinfection « chimique » des locaux et l'utilisation de gaz remonte au moins au VIIe siècle avant Jésus Christ. De nombreux gaz sont toujours utilisés pour désinfecter, voire

stériliser. Certains ont été abandonnés en raison de leur toxicité, comme le bromure de méthyle qui était utilisé pour la désinfection des cargaisons des navires.

En milieu hospitalier, l'oxyde d'éthylène et le formaldéhyde sont les deux gaz utilisés couramment pour une stérilisation à basse température, entre 37 °C et 55 °C. Celle-ci s'opère dans des espaces clos et sur des objets et matériaux inertes. Des tentatives d'utilisation d'ozone, de dioxyde de chlore et de peroxyde d'hydrogène ont été tentées, mais leur utilisation n'a pas été retenue dans la pratique (**Jaffar., 2018**). La toxicité des désinfectants usuels a amené les chercheurs à explorer le pouvoir désinfectant des huiles essentielles.

## **VIII.5. Huiles essentielles comme alternative aux produits désinfectants**

### **VIII.5.1. Désinfectant des surfaces**

Etant donné les propriétés antibactériennes et antifongiques des HEs, leur utilisation en tant que « désinfectant » de surface semble envisageable. Les huiles essentielles étant actives à très faibles concentration, l'huile devra donc être diluée de façon optimale dans le produit. L'objectif sera d'avoir une concentration suffisante pour être efficace sur les microorganismes sans être trop élevé, pour limiter les risques pour la personne utilisatrice du produit (possibilité de réaction allergique, toxicité). Il se pose également la question du rôle des éventuels autres éléments constitutifs de la solution désinfectante : les différents additifs et composés chimiques sont-ils susceptibles d'interagir avec l'huile essentielle ? Peuvent-ils limiter l'activité de l'huile essentielle ? Toutes ces questions nécessitent donc la réalisation d'études plus approfondies prenant en compte la globalité du produit et ses effets testés en conditions réelles d'utilisation. De même une comparaison avec l'action des différents désinfectants utilisés actuellement serait intéressante. Des récentes études ont démontrés l'aptitude de certaines huiles essentielles (**Pibiri, 2006**)

### **VIII.5.2. Désinfectant de l'air ambiant**

Certaines études montrent une activité bactéricide et fongicide de certaines huiles essentielles sur les microorganismes de l'air ambiant (**Pibiri, 2006 ; Su et al., 2006**). Ces résultats suggèrent une possible utilisation de ces propriétés pour traiter l'air ambiant (dans les hôpitaux et les domiciles par exemple). Il faut cependant considérer ces données avec prudence car ce sont des résultats obtenus en laboratoire. L'étude de **Pibiri (2006)** notamment était faite dans un bioréacteur de 7 litres. L'auteur a préalablement démontré une activité des HEs en phase liquide et en phase gazeuse dans des boites de Pétri par les méthodes d'aromatogramme et microatmosphère respectivement. L'huile essentielle d'*Origanum compactum* a présenté le

meilleur diamètre sur la souche référencée de *Staphylococcus aureus* en phase gazeuse et liquide. L'auteur a par la suite mené l'expérience de diffusion d'HEs dans un bioréacteur de 7 litres dans le but de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation des HEs pour désinfecter l'air ambiant. Bien que l'expérience ait montré des résultats intéressants, l'application en conditions réelles soulève de nombreuses questions : quelles concentrations d'huiles essentielles doit-on utiliser pour qu'elle soit efficace sans risquer d'incommoder les personnes présentes dans le bâtiment ? Y a-t-il un risque pour les personnes allergiques ? Existe-t-il des interactions possibles entre l'huile essentielle et d'autres composés de l'air ambiant ?

L'étude de **Su et al. (2006)** est venue répondre à quelques-unes de ces questions. Les auteurs ont étudié l'activité antimicrobienne des huiles essentielles en conditions réelles d'évaporation dans l'air ambiant dans des pièces d'habitation (bureau et chambre). Ils ont mis en évidence une diminution de la concentration en bactéries de l'air ambiant suite à l'évaporation de l'HEs d'*Eucalyptus globulus* et de *Lavandula angustifolia*. Cette diminution a été observée seulement pendant les 30 à 60 premières minutes après l'évaporation des HEs. L'étude ne précise malheureusement pas les souches bactériennes étudiées, l'auteur se contente de parler de « l'air ambiant » (l'objectif de l'étude étant de d'étudier les COV émis lors de l'évaporation des HEs, elle est donc peu précise sur l'aspect microbiologique)

### **VIII.6. Evaluation de l'activité des désinfectants**

L'évaluation de la l'activité d'une substance ou d'un produit destiné à la désinfection doit se réaliser en fonction de l'objectif visé ainsi que des normes et recommandations. N'ayant pas trouvé de normes camerounaises validant les essais sur les procédés de désinfection de surface par voie aérienne (DSVA), nous nous sommes référés aux normes Française (notamment la norme NF T72-281 de l'AFNOR 2014).

#### **VIII.6.1. Principe de la NF T72-281**

La norme NF T72-281 décrit une méthode générale destinée à tester l'activité désinfectante, dans des conditions voisines de la pratique, d'un procédé automatique ou manuel destinés à la DSVA. Cette norme précise aussi les conditions expérimentales telles que les souches de micro-organismes, l'inoculum de départ, la température, l'hygrométrie.

L'essai consiste à déposer les microorganismes sur un support inerte. Le produit est ensuite diffusé par voie aérienne ou alors les supports sont immergés dans le produit. Les microorganismes restant sur le support sont ensuite recueillis et dénombrés (**AFNOR, 2014**).

### VIII.6.2. Validation de l'essai

Des témoins de survie des germes sur les supports inclus dans l'essai permettent de déterminer le nombre initial de micro-organismes cultivables déposés sur des supports volontairement contaminés, dans des conditions semblables aux conditions de désinfection mais non exposés au désinfectant. L'inoculum cultivé sur les supports témoins doit être au minimum de  $10^6$  germes/support pour chacune des souches testées (AFNOR, 2014).

### VIII.6.3. Critères d'activité bactéricide et/ou fongicide et/ou sporicide

La norme française NF T72-281 précise également les taux de réduction logarithmique minimum, présentés dans le Tableau III, requis pour démontrer une efficacité microbiologique par activité.

Le taux de réduction logarithmique "d" s'obtient en prenant en compte d'une part le nombre de germes sur les témoins de survie des germes "T", et d'autre part le nombre de germes survivants lors de l'essai proprement "n'1" et "n'2", selon la formule suivante (AFNOR, 2014)

$$d = \log T - \log (n'1 + n'2) / 100 = \log [T / (n'1 + n'2)] / 100$$

$n'1 + n'2$  = nombre total de germes survivants par support d'essai

Une réduction logarithmique de 5 log correspond, par exemple, avec  $10^6$  unités formant colonies (UFC) initialement présentes, à une destruction de la population microbienne de 99,999%, soit 10 UFC résiduelles.

**Tableau III** : Taux de réduction logarithmique exigés par la norme NF T72-281 par activité antimicrobienne

Activité	Réduction logarithmique
Bactéricide	$\geq 5 \log$
Sporicide	$\geq 3 \log$
Fongicide	$\geq 4 \log$
Levuricide	$\geq 4 \log$

## **CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES.**

### **I. Matériel**

#### **I.1. Matériel d'isolement**

Le matériel nécessaire aux prélèvements était constitué de boîtes de Pétri (90mm) et d'écouvillons stériles humidifiés. Les boîtes de Petri contenant les milieux d'isolement ont servi au prélèvement des microorganismes dans l'air tandis que les écouvillons ont été utilisés pour les prélèvements de surfaces solides.

#### **I.2. Matériel d'identification**

Pour l'identification des isolats microbiens, nous avons utilisé la galerie classique et la galerie miniaturisée (API). La galerie d'identification classique a servi à l'identification des bactéries Gram positif et Gram négatif. Elles comprenaient entre autre les milieux Hajna Kliger (Liofilchem)<sup>®</sup>, Citrate Simmons (Liofilchem)<sup>®</sup>, Urée-Indole (Biomérieux)<sup>®</sup> et Mannitol Mobilité Nitrate (Bio-Rad)<sup>®</sup>. La galerie miniaturisée API 20E (Biomerieux)<sup>®</sup> a été utilisée de manière complémentaire dans l'identification des bactéries du genre Bacillus et des entérobactéries.

Les disques d'oxydase et l'eau oxygénée ont été utilisés pour les tests d'oxydase de catalase. Les réactifs NIT 1 et 2 ont été utilisés pour révéler la présence du nitrate réductase. Le réactif de James et le TDA nous a permis de révéler l'indole et la Tryptophane Désaminase respectivement. Les disques de Bacitracine (BA) 40 mUI.dm<sup>-3</sup> et de Nitrofurantoin (F/FUR) 15 µg ont servi à effectuer les tests de sensibilité des Cocci Gram positif aux antibiotiques suscités. Enfin, le bleu coton a été utilisé pour l'observation microscopique des champignons filamenteux.

#### **I.3. Matériel d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

##### **I.3.1. Antimicrobiens de référence**

La Gentamycine<sup>®</sup> et la Nystatine<sup>®</sup> ont été utilisées comme antimicrobiens de référence pour la réalisation des tests antimicrobiens

##### **I.3.2. Matériel végétale**

Les plantes ont été collectées dans diverses localités du Cameroun. L'identification botanique et l'authentification des spécimens ont été effectuées à l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé où des spécimens sont stockés sous un numéro d'identification.

Le matériel végétal est constitué de six plantes aromatiques et médicinales du Cameroun, retenues non seulement pour leurs propriétés antimicrobiennes, mais aussi pour leurs aptitudes à désodoriser, à stimuler et favoriser la mémoire. A ce sujet *Citrus sinensis* (Rutaceae) ; *Cymbopogon citratus* (Poaceae) ; *Eugenia caryophylla* (Myrtaceae) ; *Mentha* sp cf *piperita* (Lamiaceae) ; *Cananga odorata* (Annonaceae) et *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) sont quelques plantes aromatiques et médicinales du Cameroun que nous avons choisis pour ce travail.

➤ ***Cymbopogon citratus* (Poaceae) :**

Les feuilles fraîches de *Cymbopogon citratus* (communément appelé citronnelle) ont été récoltées en Avril 2017, dans la région du Centre Cameroun au quartier Biyem'assi (3° 50' 25'' Nord, 11° 29' 12'' Est) (Figure 11). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 48536/SFR/Cam.



**Figure 11** : Photographie de *Cymbopogon citratus* : (à gauche) plante ; (à droite) Feuilles (Photo Kengne).

➤ ***Eugenia caryophylla* (Myrtaceae) :**

Les boutons floraux secs d'*Eugenia caryophylla* (communément appelé clous de girofle) ont été achetés dans la région de l'ouest Cameroun au marché Bamendjou (5° 23' 23.6'' Nord, 10° 19' 48.5'' Est) en Mai 2017 (Figure 12). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous le numéro 506167/SRF/Cam.



(1)



(2)



(3)

**Figure 12** : Photographie d'*Eugenia caryophylla* : (1) plante ; (2) feuilles ; (3) boutons floraux (Photo Kengne).

➤ *Mentha sp cf piperita* (Lamiaceae) :

Les feuilles fraîches de *Mentha sp cf piperita* fraîchement cueillies ont été achetées au marché Mfoundi (3° 50' 38'' Nord, 11° 30' 4'' Est) en Juillet 2017 dans la région du Centre Cameroun (Figure 13). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 25t45/SFR/Cam.



**Figure 13** : Plante et feuilles de *Mentha sp cf piperita* (Photo Kengne).

➤ *Cananga odorata* (Annonaceae)

Les fleurs de *Cananga odorata* ont été cueillies en Juillet 2017 dans la région du Centre Cameroun au campus de l'Université de Yaoundé I (3° 50' 24'' Nord, 11° 30' 12'' Est) (Figure 14). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 42250/HNC/Cam.





**Figure 14** : Arbre et fleurs de *Cananga odorata* (Photo Kengne)

➤ *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae)

Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* ont été récoltées en juin 2017, dans la région du Centre Cameroun au quartier Biyem'assi (3° 50' 25'' Nord, 11° 29' 12'' Est) (Figure 15). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 48536/SRFK/Cam.



**Figure 15** : Arbre et feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* (Photo Kengne)

➤ *Citrus sinensis* (Rutaceae)

Les fruits frais de *Citrus sinensis* ont été achetés au marché Mfoundi (3° 50' 38.8284'' Nord, 11° 30' 4.8456'' Est) en Juillet 2017 dans la région du Centre Cameroun (Figure 16). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun.



**Figure 16** : Arbre et fruits de *Citrus sinensis* (Photo Kengne)

#### **I.4. Milieux de cultures**

Pour la réalisation de cette étude, deux types de milieux de culture ont été utilisés. Il s'agit notamment des milieux de culture non sélectifs, utilisés pour l'échantillonnage des microorganismes et la réalisation des tests antimicrobiens ainsi que des milieux sélectifs, utilisés pour l'identification des microorganismes échantillonnés.

##### ➤ **Milieux d'isolement des microorganismes**

Pour l'isolement des bactéries, le milieu de culture non sélectif Mueller Hinton Agar (Scharlau)<sup>®</sup> supplémenté à la Nystatine (0.3 g/L, pour inhiber la croissance des champignons saprophytes) a été utilisé ; le milieu Sabouraud Dextrose Agar additionné au Chloramphénicol 0,5 g/L (Acumedia)<sup>®</sup> a été utilisé ; pour l'isolement des levures et moisissures, le Bouillon Cœur Cerveille (BCC) (TM MEDIA)<sup>®</sup> a été utilisé pour l'isolement et l'enrichissement des microorganismes prélevés sur les surfaces.

##### ➤ **Milieux d'identification des microorganismes :**

Les milieux d'identification des bactéries ont été choisis en fonction des résultats de la coloration de Gram. En effet, pour l'identification des bacilles à Gram négatif, le milieu Eosine Bleu de Méthylène (Oxoid)<sup>®</sup> a été utilisé, la gélose au sang + ANC (Acide Nalidixique Colistine) pour les bacilles à Gram positif, le milieu Chapman (Oxoid)<sup>®</sup> et Dnase (Oxoid)<sup>®</sup> pour les Cocci Gram Positifs catalase (+).

##### ➤ **Milieux d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

Quatre milieux de culture dont la composition est donnée en annexe ont été utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des HES à savoir :

- le milieu Mueller Hinton Agar (Scharlau)<sup>®</sup> supplémenté à la Nystatine (0,3g/L) utilisée pour déterminer le profil de sensibilité des souches bactériennes aux HEs.

- le milieu Sabouraud Dextrose Agar additionné au Chloramphénicol 0,5g/L (Acumedia)<sup>®</sup>, utilisée pour déterminer les pourcentages d'inhibitions.

- Le Brouillon Nutritif Muller Hinton (**BIO-RAD<sup>®</sup> 077266 France**) supplémenté à la Nystatine (0,5g/L), utilisé pour la détermination des CMI et des CMBs.

- Le Brouillon Nutritif Sabouraud (**BT41 1QS, United Kingdom**) supplémenté au Chloramphénicol 0,5g/L, utilisé pour la détermination des CMI et des CMFs.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Lieux d'étude et justification**

La Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I (BC-UYI) est un édifice éducatif établi en juillet 1999. Elle se situe à l'intérieur du campus universitaire de Yaoundé I, juste derrière le Rectorat. Elle a une superficie de 5800 m<sup>2</sup>, dispose d'un fond d'environ 1 millions de volumes, a une capacité d'accueil de 1000 places assises et emploie 28 personnes permanentes. Les horaires d'ouverture varient de 9 heures à 22 heures en fonction des jours de la semaine (lundi-samedi). Cet édifice accueille en moyenne 1500 étudiants par jour et ne dispose pas d'un système de régulation climatique à l'échelle de toute la bibliothèque. Dans sa structure, la BC-UYI comporte 02 niveaux, un sous-sol et un rez-de-chaussée.

La Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun quant à elle a une superficie de 350 m<sup>2</sup> dispose d'un fond d'environ 15 000 volumes a une capacité d'accueil de 86 places assises reçoit en moyenne 160 personnes par jour mais, dispose d'un système de régulation climatique permettant de limiter toute invasion microbienne

Nous avons choisis ces deux structures comme lieux d'étude pour plusieurs raisons. Premièrement, parce que ces bibliothèques sont fréquentées par nombreux étudiants et autres usagers. Deuxièmement, les bibliothèques comme tout espace partiellement clos et mal aérés, est susceptible d'abriter de nombreux microorganismes qui à des concentrations critiques pourraient nuire non seulement à la santé des usagers mais aussi dégrader le patrimoine documentaire et les édifices en bois de ces bâtiments.

## II.2. Echantillonnage des microorganismes

Dans ce travail, la méthode d'échantillonnage ciblé décrite par le **Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales (2008)** a été utilisée, elle a consisté à prélever des échantillons à des endroits où l'on soupçonne la présence de contaminants. Les échantillons obtenus ont été analysés dans le laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé (CHUY) et le laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I.

Le prélèvement des échantillons s'est effectué suivant les méthodes décrites par le **Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, (2006)** et adaptées à nos travaux. Afin de mettre en évidence le maximum d'espèces et assurer la fiabilité des résultats nous avons effectué des prélèvements de façon simultanée. Toutes les boîtes de Pétri utilisés ont été étiquetées de façon à fournir les informations sur : le lieu, l'heure et le type de prélèvement (surfaces, air et livres). Et pour chacune des séries d'échantillonnage, un témoin a été utilisé pour s'assurer que tous les microorganismes proviennent bien du site de collecte. Les paramètres environnementaux (température et le taux d'humidité) ont été pris en compte et mesurés au moment des prélèvements à l'aide d'un thermomètre et d'un hygromètre respectivement.

### ➤ Echantillonnage des bioaérosols

L'échantillonnage des bioaérosols s'est réalisé par la méthode de sédimentation sur boîtes Pétri ouvertes. Pour cela, les différentes boîtes de Pétri contenant les géloses MH + Nyst et Sab + Chlo ont été déposées sur les tables d'études et les armoires à livre des niveaux 1 et 2, du rez- chaussée et du sous-sol de la BC-UYI ainsi qu'à différents endroits de la BIFC. Les boîtes ont été ouvertes pendant 30, 60, 90 minutes pour permettre non seulement aux spores présentes dans l'air de décanter librement et de se déposer sur le milieu gélosé contenu dans la boîte de Pétri mais aussi pour obtenir la densité superficielle appropriée pour pouvoir compter et déterminer la charge en fonction du temps d'exposition (**Fekadu et al., 2014**). Par la suite, les boîtes de Pétri ont été refermées et acheminées à l'aide d'une glacière médicale (pour éviter toutes contaminations) jusqu'au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé (CHUY) où elles ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 2 à 7 jours pour les champignons. Les échantillons ont été ainsi collectés deux fois par jour à 7 heures 30 minutes du matin en l'absence d'activité humaine et à 14 heures 30 minutes le soir en présence des personnes en activités et tenant compte des

paramètres environnementaux pour évaluer l'influence de la présence humaine sur la charge microbienne.

➤ **Echantillonnage des surfaces solides**

La méthode d'écouvillonnage a été utilisée pour le prélèvement des microorganismes sur les surfaces des tables d'études, des armoires à livres (A) et des murs moisissés (B) (Figure 16).

A l'aide des 2 écouvillons stériles humidifiés, nous avons frotté plusieurs fois de haut en bas et de gauche à droite un carré de 25 cm<sup>2</sup> (5 cm × 5 cm) afin de récolter un maximum de microorganismes contenus dans la poussière. Par la suite, ces écouvillons ont été transportés de façon aseptique au laboratoire de bactériologie du CHUY. Arrivé au laboratoire, l'un des écouvillons a servi au dénombrement et l'autre à l'identification après enrichissement des microorganismes dans le BCC pendant 24 heures.



**Figure 17 :** Photographie du prélèvement par écouvillonnage d'une armoire à livre (A) et d'un mur moisi (B) (Photo Kengne)

➤ **Echantillonnage des livres**

L'isolement des microorganismes sur les livres s'est effectué grâce à la méthode d'écouvillonnage et par tapotage des poussières.

À l'aide d'un écouvillon stérile humidifié, nous avons frotté légèrement au niveau de la couverture, des tranches des livres présentant des traces de foxing et de moisissures (figure 17). Ensuite, nous avons transporté les écouvillons jusqu'au laboratoire du CHUY. Les spores récupérées par le coton de l'écouvillon ont étéensemencées sur milieu Mueller Hinton+ Nyst et Sabouraud + Chlo, puis incubés à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 2 à 7 jours pour les champignons.



**Figure 18 :** Ecouvillonnage de livres présentant des tâches de foxing (**Photo Kengne**)

Après incubation, les diverses colonies observées sur les boîtes de Pétri ont été repiquées chacune sur de nouveaux milieux gélosés à savoir MH+ Nyst (colonies bactériennes) et Sab + Chlo (colonies fongiques) pour avoir une culture pure et des colonies bien isolées. Chaque isolat pur a été conservé dans des creotubes contenant du BCC glycérimé à 10 %.

### **II.3. Détermination des concentrations microbiennes dans l'air et sur les surfaces**

#### **II.3.1. Détermination des concentrations microbiennes dans l'air**

Les concentrations microbiennes dans l'air ont été déterminées à l'aide de la méthode de sédimentation sur boîte de Pétri utilisant la formule d'Omeliansky (**Borrego, 2010 ; Hameed *et al.*, 2012**). Cette méthode consistait tout d'abord à isoler les microorganismes présents dans l'air par sédimentation passive, puis à compter les colonies présentes à la surface des boîtes de Pétri après incubation. A partir du nombre de colonies compté par boîte de Pétri, le nombre de micro-organismes par mètre cube d'air (UFC/m<sup>3</sup>) a été calculé et ce grâce à la formule d'Omeliansky ci-contre.

$$N = 5a \cdot 10^4 \text{ (bt)}^{-1}$$

Où : **N** = nombre de micro-organisme dans l'air par mètre cube (UFC/m<sup>3</sup>)

**a** = nombre de micro-organisme par boîte de Pétri

**b** = surface des Boîtes de Pétri (cm<sup>2</sup>)

**t** = temps d'exposition (min)

### II.3.2. Détermination des concentrations microbiennes sur les surfaces

La détermination des concentrations microbiennes sur les surfaces a été effectuée par la méthode de dénombrement sur milieu solide. Pour cela, nous avons effectué une série de dilution décimale afin d'avoir une densité microbienne dénombrable. La méthode de dénombrement consistait à réaliser des dilutions à partir de la solution mère. A cet effet, nous avons homogénéisé la suspension microbienne mère au vortex, ensuite prélevé 1ml de suspension à l'aide d'une micropipette et introduit dans un tube à vis contenant de 9 mL d'eau distillée stérile. Par la suite, 0,1 ml de la solution diluée a été ensemencé à la surface des géloses Mueller Hinton + Nyst et Sabouraud + Chlo. Après incubation, les colonies microbiennes ayant poussé ont été comptées avec un marqueur sur le fond de la boîte de Pétri. A l'aide de la formule ci-dessous les concentrations exprimées en UFC/cm<sup>2</sup> ont été déterminées (**Teagasc, 2008**).

$$C = \frac{N \cdot V \cdot D}{S \cdot v}$$

**C** = nombre d'Unité Formant Colonies par cm<sup>2</sup> de surface prélevée ;

**N** = nombre de colonies par boîte de Pétri dénombrée ;

**V** = volume de la solution mère ;

**D** = inverse du facteur de dilution ;

**S** = surface totale prélevée ; et

**v** = volume ensemencé

## II.4. Identification phénotypique des isolats

Une fois l'isolement réalisé, les isolats obtenus ont été identifiés. L'identification des isolats s'est réalisée selon le type de microorganisme. Celle-ci est basée sur des critères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des différents isolats à identifier.

### ➤ Identification phénotypique des isolats bactériens

Les isolats bactériens ont été identifiés à l'aide des techniques de microbiologie décrites par **Joffin et Leyral (2005)**. Cela consistait à réaliser la coloration de Gram pour chaque germe isolé, ensuite ensemercer ces germes sur des milieux spécifiques et décrire les caractères culturels de la colonie (taille, pigmentation ou non, couleur des colonies, odeur et présence ou absence de l'hémolyse). Par la suite, effectuer certains tests biochimiques à partir des galeries classiques et miniaturisées (API) et enfin réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques afin de différencier les cocci Gram positif catalase +. Une fois ces différents critères déterminés, les résultats obtenus sont comparés à ceux de la base de données de la littérature, c'est-à-dire un catalogue contenant les caractères des différents taxons.

### ➤ Identification des isolats fongiques

L'identification des isolats fongiques a été faite grâce à la clé d'identification de **Dufresne (2014)**. La démarche d'identification était basée essentiellement sur l'observation des caractères :

- Macroscopiques (aspect de colonie à l'endroit et au revers, le relief, la taille, la couleur des colonies et la présence ou non d'un pigment) ;
- Microscopique d'un fragment de la culture entre lame et lamelle. Pour une meilleure observation, le bleu coton a été utilisé afin d'observer les organes de fructification, thalle végétatif et les spores.

## II.5. Extraction et caractérisation des HEs

L'extraction et la caractérisation des HEs ont été réalisées suivant les normes internationales NF ISO 212 et 279 d'**AFNOR (2007)**. Une collaboration entre le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et l'équipe Glycochimie, **IBMM-UMR** de l'Université de Montpellier nous a permis de réaliser l'analyse des HE par CPG et CPG/SM.



### II.5.1. Extraction des Huiles Essentielles

Le matériel végétal a été récolté ou acheté au marché de la ville de Yaoundé puis, identifier à l'Herbier national du Cameroun. L'extraction des HEs a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type clevenger.

#### ➤ Principe

Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon ou un alambic un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (Toure, 2015).

#### ➤ Mode opératoire

La partie de la plante à hydrodistiller a été pesée puis introduit dans un alambic en inox de 30 L au-dessus duquel est fixée une verrerie adéquate (de type laboratoire pyrex). L'ensemble est associé à un système de refroidissement. Chaque partie de la plante (épicarpes, feuilles ou fleurs) immergée dans de l'eau a été soumise à une hydrodistillation pendant 4 à 5 heures.

Chaque HE a été séparée du mélange eau-HE par décantation puis, introduit dans un flacon marron (AFSSAPS, 2008). Après sa pesée, le flocon d'HE a été étiqueté et conservé à basse température (4 °C) (AFNOR, 2007 ; AFSSAPS, 2008). Le rendement en HE est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé ; il a été calculé suivant la formule ci-contre et exprimé en pourcentage (%).

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'huile essentielle}}{\text{masse du matériel végétal}} * 100$$

### II.5.2. Réalisation des combinaisons d'huiles essentielles

#### ➤ Principe :

Il consiste à mélanger de façon proportionnelle, des produits d'origine naturelle (HE) et/ ou d'ingrédients synthétiques afin de non seulement potentialiser l'activité de ces différents

produits pris individuellement mais aussi d'obtenir un résultat équilibré dans le cas d'un accord ou d'une base et de créer une forme olfactive originale dans le cas d'une fragrance (**Kaloustia et Hadli-minaglou, 2012**).

➤ **Protocole expérimental :**

A l'aide des compte-gouttes, six combinaisons ont été réalisées à des proportions différentes à partir des six HEs obtenues, de manière à obtenir différentes notes de fraîcheur et gamme de fragrance. Chaque combinaison regroupe l'ensemble des six HEs de sorte à avoir dans chaque une de ces combinaisons, une HE majoritaire à 50 % (tableau IV).

**Tableau IV:** Récapitulatif des combinaisons d'huiles essentielles en pourcentage (%)

HEs / Combinaisons	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
<i>Eugenia caryophylla</i>	50	10	10	10	10	10
<i>Cymbopogon citratus</i>	10	50	10	10	10	10
<i>Cananga odorata</i>	10	10	50	10	10	10
<i>Eucalyptus globulus</i>	10	10	10	50	10	10
<i>Mentha sp</i> <i>cf piperita</i>	10	10	10	10	50	10
<i>Citrus sinensis</i>	10	10	10	10	10	50
Total en pourcentage (%)	100	100	100	100	100	100

## II.6. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles et des combinaisons

La technique de chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été réalisée par les méthodes couplée au détecteur à ionisation de flamme (CPG/FID) et au spectromètre de masse (CPG/SM) afin d'évaluer la qualité et la quantité des différents composants présent dans les HEs (**Lehotay et Hajslova, 2002 ; Noudogbessi et al., 2014**)

### II.6.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à ionisation de flamme

**Principe :**

La technique de CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et la phase stationnaire. Le mélange à analyser est vaporisé

puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte appelé « gaz vecteur » qui constitue la phase mobile. L'enregistreur signale une succession de pics, caractérisés chacun par un temps de rétention et une aire proportionnelle à la quantité du composé dans l'échantillon d'HEs (Adams, 2012).

### Protocole :

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type TRACE 1300 (Thermo scientific) équipé de deux colonnes capillaire en silice ; une colonne apolaire de TG-5MS (5 % phenyl methylpolysiloxane), 30 cm x 0,25 mm de diamètre intérieure et 0,25 µm d'épaisseur de film et une colonne polaire TG-WAWMS (polyethylene glycol), colonne capillaire de 30 m x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film. Le gaz vecteur était l'azote (N<sub>2</sub>) avec un débit constant de 0,5 mL/min une injection de 2 µL d'une solution d'HE diluée au 10/100 diethyl ester, l'injecteur en mode a été split 1:20 réglé à 220 °C, le détecteur réglé à 250 °C et un programme de température de 60 à 220 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 220 °C pendant 17 min. les informations sur l'ordre d'élution des composé et leurs pourcentage ont été obtenus grâce au profil chromatographique de la colonne capillaire DB-5. Le calcul des indices de rétention linéaire (il varie peu avec la température sur une même colonne mais varie en fonction du type de colonne) de chaque composé (IRL) a été déterminé par rapport au temps relatif d'une série de n-alcane puis, calculés par la formule ci-dessous (Adams, 2012).

$$IRL = 100 \left( \frac{Tr(i) - Tr(n)}{Tr(n+1) - Tr(n)} \right) + 100 * n$$

**Légende :** IRL = Indices de rétention linéaire ; Tr(i) = Temps de rétention du composé inconnu ; Tr(n) = Temps de rétention du n-alcane directement élué avant i ; Tr (n+1) = Temps de rétention du n-alcane directement élué après i.

## II.6.2. Analyse par couplage CPG/MS

### Principe :

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer les structures moléculaires. Elle consiste à séparer en fonction du rapport

masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, les fragments chargés issus d'une molécule soumise à un phénomène d'ionisation (Adams, 2012).

### **Protocole :**

Cette dernière a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent 5977 série MSD équipé de deux colonnes capillaire en silice : une colonne apolaire HP-5 MS (30 m x 250 µm diamètre intérieur et 0,25 µm épaisseur du film), (5 % phenyl-methylpolysiloxane) et une colonne polaire HP-ONNOWAX (20 m x 250 µm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film). Le détecteur de masse est de type quadripôle, la température source était de 230 °C et celle du quadripôle de 150 °C. Le programme de température a été 60 °C pendant 2 minutes, 60 à 240 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 240 °C pendant 8 minutes. La température de l'injecteur a été de 240 °C et la température de transfert de 250 °C. Le gaz vecteur est l'Helium avec un débit de 0,7 mL/min, et une injection de type split 20:1 (1 µL d'une solution d'HE est diluée à 10 % de dichlometthane) et l'énergie d'ionisation utilisée était de 70 eV (electromutiplier 1000 eV, rand de masse 33 à 400 amu, taux de balayage 1,56 scan/s. L'identification des composés a été basée sur la comparaison des indices de rétention relatif aux composé authentique et/ou aux composés issu des données publiées de la littérature (Adams, 2012) et par appariement de leurs spectres de masse obtenus aux échantillons authentiques et /ou ceux de la banque de données NISTI4, FFNSC 2.L et ESSENCES L.

## **II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

### **II.7.1. Choix des souches microbiennes**

L'échantillonnage des microorganismes dans les deux bibliothèques a permis d'obtenir un grand nombre d'isolats microbiens parmi lesquels trois isolats bactériens et trois isolats fongiques (deux moisissures et une levure) ont été sélectionnés pour l'étude des activités biologiques des HEs. Plusieurs critères ont guidé le choix de ces isolats

Le premier critère a été motivé par l'activité de l'HE que nous voulions démontrer (bactéricide, fongicide). L'objectif de l'étude étant de démontrer la capacité des HE à servir de désinfectant, et n'ayant pas trouvé de normes camerounaises sur le sujet, nous avons examiné les procédés d'évaluation des désinfectants, décrits par les normes françaises (AFNOR) et européennes (CEN), ainsi que les souches conseillées pour ces tests. L'évaluation de l'activité d'un produit découle d'une extrapolation des résultats obtenus sur quelques souches à des

populations microbiennes connues ou inconnues. On attend d'un désinfectant une action à large spectre sur les moisissures, les levures ainsi que sur l'ensemble des bactéries : sur les espèces à Gram positif et à Gram négatif sans exclure le groupe CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*). Ces trois groupes de bactéries se distinguent par la structure de leur paroi cellulaire dont dépendent les perméabilités aux agents antimicrobiens (AFNOR, 2009).

Le second critère a été celui de la fréquence d'isolement ainsi que l'aptitude des isolats à former des biofilms.

En définitive, deux bactéries Gram +, une bactérie Gram -, deux moisissures et une levure répondant aux critères sus-cités ont été retenues pour ce travail. Il s'agit des isolats bactériennes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et des isolats fongiques de *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* et *Candida albicans*

## **II.7.2. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* par les isolats bactériens**

Pendant longtemps les bactéries ont été étudiées sous forme planctonique en tant que cellules libres, alors que paradoxalement dans la nature la majorité d'entre elles se trouvent sous forme de biofilm. Pour montrer l'aptitude de certains isolats bactériens à former des biofilms nous avons utilisé deux méthodes standards.

### **II.7.2.1. La méthode du Rouge Congo Agar**

C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies (Chaieb *et al.*, 2005).

#### **➤ Technique**

Le milieu RCA a été préparé avec 37 g/L BMH, 50 g/L de saccharose, 10 g/L d'agar et 0,8 g/L du Rouge Congo Agar, puis autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes (Nasr *et al.*, 2012). Les souches sont ensemencées par stries en surface du milieu Rouge Congo coulé en boîtes Pétri et incubé à 37 °C pendant 24 à 48 heures (Mathur *et al.*, 2006).

#### **➤ Lecture**

Les souches productrices de slime donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).

### II.7.2.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

#### ➤ **Technique**

Le test TCP décrit par **O'Toole *et al.*, (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm dans des microplaques de 96 puits.

Les puits d'une microplaque de 96 puits ont été remplis avec 150 µL de BMH. Puis il a été introduit 10 µL d'une suspension bactérienne renfermant 10<sup>8</sup> UFC/mL. Les microplaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec 0,2 mL de tampon phosphate salin PBS (pH<sub>7,2</sub>) afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques) ainsi que toute trace de milieu de culture. Les biofilms formés par adhérence des organismes sessiles ont été colorés avec du cristal violet (0,1 %) pendant 5 min. L'excès de colorant a été ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (**Stepanovic *et al.*, 2000**).

#### ➤ **Lecture**

Le cristal violet fixé sur les parois des puits de la microplaque a été solubilisé à l'aide d'une solution éthanol 70 %. Après 1 heure du temps, l'absorbance de la solution obtenue a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés a ainsi été quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

L'expression des résultats obtenus s'est faite grâce à la classification de **Mathur *et al.*, (2006)** basée sur les valeurs de la DO (Tableau V).

**Tableau V** : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon **Mathur *et al.*, (2006)**.

Valeurs de DO	Adhérence	Formation de biofilm
< 0,120	non adhérente	Non formatrice
[0,120-0,240]	faiblement adhérente	Faiblement formatrice
> 0,240	fortement adhère	Fortement formatrice

## II.8. Tests antimicrobiens

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour déterminer l'activité antimicrobienne d'une substance. Le choix du test à utiliser dépend non seulement de la nature de la substance à tester et de celle du microorganisme mais également des paramètres recherchés. La **CLSI (2012)** a regroupé ces différents tests en deux catégories :

- Les tests qualitatifs *in vitro*, permettant de déterminer la présence ou non des substances à activité antimicrobienne par la détermination des diamètres de zones d'inhibition.
- Les tests quantitatifs *in vitro*, permettant de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI, CMB et CMF).

### II.8.1. Méthodes qualitatives

#### II.8.1.1. Effet des HE après prélèvement direct

##### Effet de la phase vapeur

Afin de vérifier les effets de la phase gazeuse des HEs sur les microorganismes présents dans l'enceinte de la BC-UYI et de la BIFC, un disque de papier wattman de 80 mm de diamètre imprégné d'huiles essentielles a été déposé dans le couvercle d'une boîte contenant un prélèvement par tapotage de poussières et par sédimentation. Un témoin à l'identique sans huiles essentielles a été réalisé conjointement. Les boîtes ont été incubées dans les conditions standards (**Pibiri, 2006**).

##### Effet de la phase liquide

Pour tester l'effet de la phase liquide des HEs sur les microorganismes présents dans la BC-UYI et la BIFC, nous nous sommes inspirés de la méthode d'incorporation à la gélose communément utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des substances sur les champignons mycéliens (**CLSI, 2011**).

Le test a consisté à mélanger des quantités d'HEs avec le milieu de culture gélosé en surfusion, et ensuite le couler dans des boîtes de Pétri. Après solidification, les microorganismes ont été prélevés dans ces boîtes par tapotage des poussières et par sédimentation puis les boîtes ont été incubées dans des conditions standards.

### II.8.1.2. Détermination des diamètres des zones d'inhibition

Pour mieux s'inscrire dans le cadre de notre travail, ou il s'agissait de tester l'effet des HE en phase vapeur et en milieu liquide, nous avons utilisé deux méthodes : la méthode de microatmosphère telle que décrite par De **Billerbeck (2000)** et la méthode des aromagrammes

#### ✚ **Méthode de microatmosphère**

##### ➤ **Principe**

Contrairement à la technique des Aromagrammes, basée sur le contact direct de l'huile essentielle dans sa globalité avec le microorganisme, la méthode de microatmosphère repose sur l'évaluation de la capacité inhibitrice de la fraction volatile de l'HE, à une température d'incubation donnée, sur la croissance d'un germe.

##### ➤ **Protocole expérimental**

Un disque de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 microlitres de chaque huiles essentielles pure a été délicatement déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, la boîte a été hermétiquement fermée puis incubée de façon renversée de telle sorte que l'HE ne soit pas directement en contact avec la géloseensemencée par les microorganismes par écouvillonnage ( $1 \times 10^5$  UFC/mL pour les levures et  $1 \times 10^8$  pour les bactéries) en boîte de Pétri. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les souches bactériennes et pendant 48 heures pour les levures.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque essai a été réalisé 3 fois et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type.

#### ✚ **Méthode des aromagrammes**

La méthode de diffusion par disques sur gélose (méthode de Kirby-Bauer) a été utilisée pour évaluer l'activité des huiles essentielles après dilution à l'eau par la formation de zones d'inhibition, selon le protocole M2-A9 du **CLSI (2006)**.

##### ➤ **Principe**

La méthode des disques est basée sur la diffusion des substances à tester de concentration connue, imprégnées sur les disques de papier filtre en contact avec le milieu de culture solide coulé en boîtes de Pétri, préalablementensemencées d'un inoculum bactérien. Après incubation, si la substance contenue sur les disques a une activité antibactérienne vis-à-vis du germeensemencé, une zone d'inhibition de croissance est observée autour de ces derniers



### ➤ **Mode opératoire**

Des disques en papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 microlitres de chaque huile essentielle à une concentration de 50 mg/mL ont été déposés à la surface d'une gélose pré-ensemencée par écouvillonnage avec suspension microbienne ( $1 \times 10^5$  UFC/mL pour les levures et  $1 \times 10^8$  pour les bactéries) en boîte de Pétri. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les souches bactériennes et pendant 48 heures pour les levures. Des standards d'antibiotique de Gentamicine® à 10 µl/disque ont été testés dans les mêmes conditions. Après incubation, les résultats sont lus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm).

La souche sera qualifiée de résistant (-) pour les diamètres inférieurs à 8mm ; Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm ; Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm (**Moreira et al., 2005**).

## **II.8.2. Méthodes quantitatives**

Elles font référence aux méthodes de détermination des paramètres d'inhibitions (CMI, CMF et CMB) et au profil bactériologique CMB/CMI de chaque substance à tester sur un ou plusieurs germes. Elles peuvent être pratiquées en milieu solide et liquide. Nous avons pratiqué les deux options (**Fauchère et Avril, 2002 ; Nyegue, 2006 ; CLSI, 2008**).

### **II.8.2.1. Détermination des paramètres d'inhibition des huiles essentielles (CMI, CMF) sur la croissance radiale des moisissures par la méthode de microatmosphère**

Inspiré de la méthode de microatmosphère, le protocole a été modifié par **Laghchimi et al. (2014)**. Ce protocole applicable sur les champignons mycéliens a été utilisé pour évaluer l'effet des constituants volatils des HEs sur la croissance radiale des moisissures, ce qui nous a permis de déterminer les pourcentages d'inhibition ainsi que les Quantités Minimales Inhibitrices et Fongicides (QMI, QMF) qui ont été converties en Concentrations (dans l'air) Minimales Inhibitrices et Fongicides (CMI et CMF exprimées en µL/mLd'air) applicable en boîte de Pétri.



### **Principe**

Cette méthode est basée sur l'aptitude des HEs déposées sur des disques de papier Whatman à se volatiliser et à inhiber les microorganismes préalablement ensemencés à la surface d'une gélose en raison de leur pouvoir antimicrobien intrinsèque (**De Billerbeck, 2000**).

## Protocole expérimental

Les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre sont préparées extemporanément par remplissage de 20 mL de milieu Sabouraud en surfusion (20 mL de milieu Sabouraud offre 80 mL d'air dans chaque boîte). L'inoculation est réalisée en surface, sous forme de dépôts du disque mycélien (6 mm) au centre de la boîte. Des papiers filtre de 80 mm de diamètre sont placés au fond du couvercle de chaque boîte de pétri et imprégnés avec différentes quantités d'HE : 0 (témoin), 10, 20, 40, 80 et 100 µL/disque (équivalent à des concentrations de 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 1,25 µL/mL d'air, respectivement). Immédiatement, les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm pour éviter l'évaporation de l'HE, puis incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C pendant 5 jours. Pour chaque espèce fongique et chaque concentration, trois répétitions ont été réalisées et trois boîtes sont utilisées par essai. La croissance mycélienne a été suivie en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte. La fongitoxicité, exprimée en terme de pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium (I %), a été calculée selon la formule de **Pandey *et al.* (1982)**

$$\% I = \frac{D_t - D_i}{D_t} * 100$$

**D<sub>t</sub>** est le diamètre de la culture de champignons (en mm) dans un milieu sans HEs (témoin),  
**D<sub>i</sub>** est le diamètre de la culture du même champignon dans un milieu en présence de base.

Ces mesures ont été utilisées pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices de la croissance radiale des moisissures (CMI exprimées en µL/mL d'air).

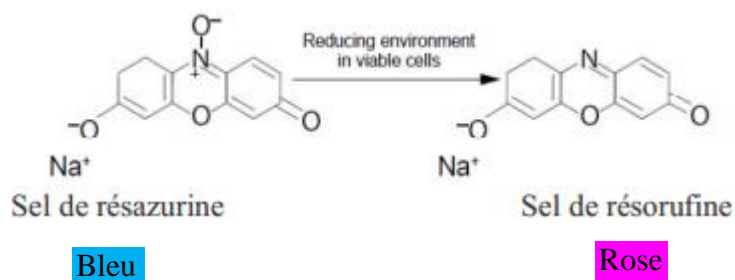
Les Concentrations Minimales fongicides CMF ont été déterminées par transfert des disques mycéliens à partir des boîtes de pétri, où l'inhibition par les HEs a été complète, dans un nouveau milieu SDA dépourvu d'HEs. L'HE est fongistatique si la croissance du champignon reprend à nouveau et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance.

### II.8.2.2. Détermination des paramètres d'inhibitions (CMI, CMB, CMF) des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles par la méthode de dilution en milieu liquide.

L'activité antimicrobienne des HES a été évaluée par la méthode de dilution en milieu liquide (microdilution) (CLSI, 2011). Le Blue Alamar a été utilisé comme révélateur de croissance après incubation. Cette évaluation a consisté à déterminer les paramètres d'inhibition (CMI, CMB et CMF) des HES et combinaisons sur les isolats bactériens et fongiques sélectionnés et la microdilution a été réalisée en utilisant une microplaque de 96 puits.

#### Principe

Cette méthode colorimétrique est basée sur la capacité qu'ont les cellules viables à métaboliser, par réduction la résazurine (forme oxydée de Blue Alamar, Sigma) en résorufine (forme réduite de Blue Alamar). Le mécanisme réactionnel de réduction est le suivant :



**Figure 19** : Mécanisme de réduction du Blue Alamar (Elshikh *et al.*, 2016).

L'indicateur redox Blue Alamar sous forme oxydé (résazurine), de couleur bleue est réduit en présence des cellules microbiennes en croissance en résorufine de coloration rose ou rouge. Si par contre, la croissance des cellules microbiennes est complètement inhibée par une HE, la coloration bleue est maintenue (Elshikh *et al.*, 2016)

#### Protocole expérimental

Les solutions mères d'HES et de combinaisons ont été préparées à une concentration de 50 mg/mL dans de l'eau plus Tween 7 % et les solutions de Gentamicine et de Nystatine à une concentration 1 mg/mL. Un volume de 100  $\mu$ L de bouillon Mueller Hinton (BMH) pour les bactéries ou de bouillon Sabouraud pour les champignons a été introduit dans les puits de la microplaque et des dilutions successives de progression géométrique de raison 2 des HES ont été réalisées après introduction de 100  $\mu$ L de solution mère d'HES dans les cupules de la première ligne. La série de dilutions nous a permis d'obtenir une gamme de concentration allant

de 25 mg/mL jusqu'à 0.02mg/mL. Ensuite 100 µL d'inoculum de charge  $10^8$  UFC/mL pour les bactéries,  $10^6$  UFC/mL pour les moisissures et  $10^5$  UFC/mL pour la levure ont été par la suite ensemencés. Les microplaques ont été incubées dans les conditions standards selon le germe (pendant 24 heures à 35 °C pour les bactéries, pendant 48 heures à 24 °C pour les levures et pendant 72 heures à 24 °C pour les moisissures).

Après incubation, il a été introduit un volume de 20 µL de blue alamar (50 mg/L) dans chaque puits de la microplaque (pour les bactéries et les levures). Le passage de la coloration bleu à la coloration rose caractérise la croissance microbienne, pourtant le milieu reste inchangé si il y a effet antimicrobien des substances testées. La CMI a été déterminée comme étant la plus petite concentration ayant inhibée toute croissance visible (CLSI, 2011).

La CMB a été déterminée par subculture. Pour cela, 50 µL du contenu des puits aux concentrations supérieures ou égales à la CMI ont été ensemencés en milieu liquide dans les cupules de nouvelles microplaques renfermant 150 µL BMH et incubés dans les conditions standards. La CMB a été déterminée après introduction de 20 µL de blue alamar (50 mg/L) et a été considérée comme la plus petite concentration de HEs ou il n'y a pas eu changement de coloration.

Le calcul du rapport CMB/CMI et CMF/CMI a permis de déterminer l'activité bactéricide ou fongicide (CMB/CMI ou CMF/CMI =1 ou 2), bactériostatique ou fongistatique ( $4 < \text{CMB/CMI}$  ou  $\text{CMF/CMI} < 16$ ), ou tolérante (CMB/CMI ou CMF/CMI  $> 32$ ) (Fauchère et Avril, 2002 ; Berche, 2003).

### **II.8.2.3. Activité anti-biofilms des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles**

#### **II.8.2.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm « CMIB »**

Les CMIBs des HEs ont été déterminées selon la méthode de Nostro *et al.* (2007). Dans un premier temps, une microplaque de 96 puits est remplie par 100 µL de bouillon MH renfermant une charge bactérienne de  $10^8$  UFC/mL puis incubée à 37 °C pendant 24h. Après incubation, les cellules microbiennes flottantes sont éliminées des puits par aspiration à l'aide d'une seringue stérile et les puits sont ensuite rincés trois fois par un tampon phosphate salin (PBS). En même temps, dix concentrations de chaque HE sont préparées dans de l'eau distillé plus Tween 80 à 3,33 % et diluées dans du BMH de sorte à avoir des concentrations finale d'HEs allant de 12,5 à 0,02 mg/mL et une concentration finale de Tween 80 est à 1 %. Ensuite, les puits de la microplaque sont remplis par 100 µL de BMH renfermant chaque concentration d'HE, sauf deux rangés sont remplies par 100 µL de bouillon stérile et qui sont considérées

comme des témoins. La microplaque est de nouveau ré-incubée dans les mêmes conditions. Après ré-incubation, la révélation de la croissance du biofilm est réalisée par ajout de 20 µL de blue alamar (50 mg/L). La CIMB est définie comme précédemment avec les cellules planctoniques.

#### **II.8.2.3.2. Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm**

##### **« CMEB »**

Les CMEBs des HEs ont été déterminées selon la méthode modifiée de **Nostro *et al.* (2007)**. L'expérience est poursuivie dans les mêmes microplaques utilisées pour la détermination des CMIBs. Dans le jour même après lecture des résultats des CMIBs, le milieu de culture est éliminé de la microplaque par aspiration à l'aide d'une seringue et les puits sont ensuite rincés trois fois par du tampon phosphate salin (PBS) et une fois par une solution d'éthanol à 20 % (v/v) (afin d'éliminer les traces restantes de l'HE). Ensuite, tous les puits sont remplis par 100 µL du BMH stérile et les microplaques sont re-incubées à 37 °C pendant 72 heures. La CMEB est définie en tant que la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance microbienne dans les puits, visuellement déterminée par aucun changement de coloration après ajout du blue alamar. Des contrôles sont réalisés pour vérifier que l'éthanol à 20 % n'a pas d'effet sur les bactéries.

### **II.9. Détermination de quelques cibles cellulaires des huiles essentielles sur les isolats bactériens.**

#### **II.9.1. Expérience de la lyse cellulaire**

##### **➤ Principe**

Cette méthode permet de déterminer une éventuelle action lytique des huiles essentielles sur la membrane des microorganismes par mesure de l'absorbance à 260 nm. En effet, la présence du matériel génétique (ADN et ARN) qui absorbe à 260 nm à l'extérieur des cellules microbiennes caractériserait un effet lytique des huiles essentielles sur la membrane du microorganisme. il y aura donc bactériolyse si l'absorbance à 260 nm augmente au cours du temps selon (**Carson *et al.*, 2002**).

##### **➤ Mode opératoire**

L'analyse de la perte du matériel cellulaire des cellules bactériennes absorbant à 260 nm a été réalisée selon la méthode de **Carson *et al.*, (2002)**. Deux colonies bactériennes, ensemencées la veille, ont servi à inoculer 400 mL de milieu BMH. La culture a été incubée à

37 °C, pendant 24 heures. Les bactéries ont ensuite été séparées du milieu de culture par centrifugation à 3500 g pendant 10 minutes.

Le culot bactérien a ensuite été lavé 2 fois avec du tampon phosphate de sodium (PBS) puis remis en suspension dans du PBS-Tween 80 (0,01 %, v/v). La suspension bactérienne obtenue a été standardisée à  $2,5 \times 10^7$  UFC/mL à l'aide d'un spectrophotomètre. Ensuite cette suspension a été traitée avec les différentes HEs à leurs CMI's respectives à différents intervalles de temps (0, 30 et 60 minutes).

La suspension non traitée a été utilisée comme contrôle négatif. Après traitement des échantillons, l'absorbance du surnageant a été lue à 260 nm utilisant un spectrophotomètre à UV.

## II.9.2. Evaluation de l'intégrité de la membrane cellulaire et de la paroi

Pour confirmer l'effet des huiles essentielles sur la membrane et sur la paroi des microorganismes, nous avons quantifié les biomolécules intracellulaires retrouvées dans le milieu extracellulaire. Il s'agit ici d'utiliser le NanoDrop 1000 qui est un spectrophotomètre à spectre complet (220-750 nm) qui mesure 1 µL d'échantillon à haute précision et reproductibilité. Il utilise une technologie de rétention d'échantillon brevetée qui utilise uniquement la tension de surface pour contenir l'échantillon en place (**Desjardins et Conklin, 2010**).

### ➤ Principe

Le système de rétention NanoDrop microvolume (*Thermo Scientific NanoDrop*) combine les fonctions de technologie des fibres optiques et les propriétés naturelles de tension de surface pour capturer et retenir des quantités infinies d'échantillon. Par ailleurs, le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte dans une large gamme de mesures de concentration d'acides nucléiques, éliminant la nécessité d'effectuer des dilutions et réduisant le volume d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique (**Desjardins et Conklin, 2010**).

### ➤ Protocole

Après ouverture du logiciel de l'appareil, les biomolécules à mesurer ont été sélectionnées (ADN double brin, ARN, ou protéines). L'essai à blanc a été réalisé dans le but de calibrer l'appareil, cette opération s'est effectuée par dépôt d'1 µL du milieu extérieur contenant les cellules qui pour nous a été le milieu de culture BMH préparé, sur la partie inférieure optique et le bras de levier a été abaissé puis l'opération « blank » a été sélectionné. Cette opération a été faite deux fois selon les recommandations données par l'appareil. Une fois

le calibrage terminé, les deux surfaces optiques ont été nettoyé avec du papier absorbant et il s'en est donc suivit la mesure de la quantité des différents paramètres présents dans les échantillons. Puis, 1 $\mu$ L d'échantillon a été pipeté et déposé sur la partie inférieure optique, le bras de levier abaissé et l'opération « measured » a été sélectionné. Après chaque mesure l'opération de calibrage est effectuée.

Le rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 et à 280 nm a été utilisé pour évaluer la pureté par rapport à l'ADN. Un échantillon dont ce ratio est compris entre 1,8 et 2 est généralement considéré comme « pur » pour l'ADN ; si le rapport est sensiblement inférieur, il peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres Contaminants qui absorbent fortement à près de 280 nm (**Desjardins et Conklin, 2010**).

Les résultats du NanoDrop nous ont donc permis d'évaluer la présence ou l'absence de biomolécules hors de la cellule donc de conclure à une perturbation de l'intégrité membranaire et une diminution de la rigidité de la paroi cellulaire par les HEs.

## **II.10. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions**

Après formulation des solutions désinfectantes, l'activité des solutions a été évaluée sur les spores de moisissures et sur les biofilms de bactéries et levures choisis pour les tests antimicrobiens en raison de leurs aptitudes à se fixer sur un support et ainsi développer des résistances. Les coupons d'acier inoxydables ont été choisis comme porte germe pour la fixation du biofilm.

### **II.10.1. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions sur les biofilms de bactéries et levures**

#### **✓ Formulation des solutions de désinfectants (Valeriano, 2012)**

Les solutions de désinfectants ont été préparées avec les huiles essentielles comme principe actif. Elles ont été formulées comme suite :

- Solution saline (NaCl 0.85 % p/v)
- Ethanol 95 % v/v
- Huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles

Toutes les solutions de désinfectant ont été préparées à un volume total de 10 ml, et la quantité d'huile essentielle de chaque solution a été définie en fonction des CMI's précédemment déterminées en milieu liquide.

### ✓ Préparation et nettoyage des coupons

Le matériel utilisé dans cette expérience comme porte germe était des coupons en acier inoxydable (hauteur 1mm, longueur 20mm et largeur 10mm). Pour initier l'adhésion des cellules microbiennes et la formation du biofilm, les coupons ont préalablement été hygiénisés et stérilisés. La procédure d'hygiénisation a consisté à nettoyer les coupons avec de l'acétone 100 %, lavés par immersion dans un détergeant alcalin (NaOH 1 %, pH 13.2) pendant 1heure, rincés avec de l'eau distillé stérile, séchés et nettoyés avec de l'éthanol 70 % (v/v).

Après hygiénisation, les coupons sont lavés à l'eau distillée stérile et séchés à 60 °C pendant 2 heures. Pour la stérilisation, les coupons sont autoclavés à 121°C pendant 15min. (**Rossoni et gaylarde, 2000**)

### ✓ Adhésion des microorganismes à la surface des coupons

Dans deux boites de pétri de 120 mm de diamètre, ont été introduits 45 coupons avec 80 mL de milieu de culture non gélosé, puis il a été introduit un inoculum microbien de façon à obtenir  $10^8$  UFC/mL, dans le but de favoriser le développement du biofilm sur les coupons. Les boites de Pétri ont été incubées à 37 °C avec une agitation orbitale de 50 rpm. Après 48h d'incubation, les coupons ont été retirés puis lavés avec de l'eau peptonée (0.1 % p/v) pour éliminer les cellules qui n'avaient pas adhérees aux coupons, puis immergés dans un nouveau milieu de culture stérile. La procédure a été réalisée 5 fois dans le but de compléter la formation et la maturité du biofilm qui nécessite 10 jours d'incubation (**joseph et al., 2001**).

### ✓ Enumération des cellules ayant adhérees aux coupons

Pour le comptage des cellules, un coupon était retiré de la boite de pétri après chaque 48 heures d'incubation, puis rincé à l'eau peptoné. Les cellules sessiles étaient récupérées à l'aide d'un coton qui était par la suite introduit dans un tube contenant de l'eau peptonée (0.1 % p/v). Le tube était agité au vortex pendant 2 min à l'issu de quoi les séries de dilutions étaient réalisées et la charge microbienne déterminées par ensemencement de 0.1 mL d'une dilution sur milieu gélosé coulé dans une boite de pétri. La charge microbienne déterminée a été exprimée en UFC/cm<sup>2</sup>.



### ✓ **Traitement des biofilms par les désinfectants**

Après 10 jours d'incubation, les coupons ont été retirés puis rincés à l'eau peptoné 0.1% p/v. les coupons ont été par la suite introduits dans les différentes solutions désinfectantes à différents temps de contact (0.5 ; 2 ; 5 et 10 minutes). Après cela les coupons ont été retirés nettoyés à l'eau peptoné puis frottés à l'aide d'un coton stérile qui a été transféré dans un tube renfermant de l'eau peptoné. Des séries de dilution ont été réalisées et la charge microbienne déterminé par la méthode d'ensemencement en surface tel que précédemment décrit. Les résultats ont été exprimés en UFC/cm<sup>2</sup> et les taux de réduction logarithmique (d) a été calculés par la formule ci-après.

$$d = \frac{\text{Log T} - \text{Log (n'1+n'2)}}{100}$$

**d** = taux de réduction logarithmique

**T** = témoin de survie des germes

**n'1 + n'2** = nombre total de germes survivants par support d'essai

#### **II.10.2. Evaluation de l'activité désinfectante des solutions sur spores de moisissures.**

L'action des désinfectants formulés sur les moisissures a été évalué par mesures de la cinétique de létalité de ces solutions désinfectantes après leur mise en contact avec les spores d'*A niger* et *Penicillium* sp pendant 0.5 ; 2 ; 5 et 10 minutes selon le protocole décrit par **Gupta et al (2002)**.

Le traitement a été effectué en ajoutant 0,5 mL d'inoculum fongique renfermant une charge microbienne de 10<sup>6</sup> cellules/mL à 4,5 ml de solution désinfectante puis le mélange a été vortexé. Après différents temps de contacts, la présence des cellules vivantes a été déterminée après réalisation d'une série de dilution. Chaque dilution a été inoculée sur milieu SDA coulé dans des boîtes de Pétri pour permettre le comptage. Les boîtes de Pétri ont été incubées à température ambiante pendant 5 jours et étaient examinées régulièrement pour noter l'apparition de colonies de champignons.

## **II.11. Analyse statistique des résultats**

L'analyse des résultats a été faite à l'aide du logiciel SPSS 20.0 et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les différences statistiques entre ces valeurs ont été déterminées par le test de comparaison de Variance (ANOVA) au seuil de significativité  $P < 0,05$ .

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Résultats

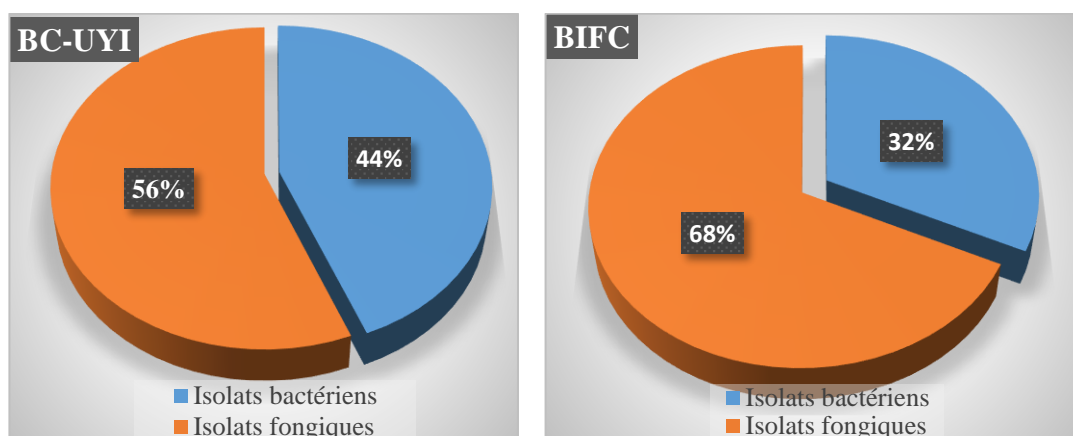
#### I.1. Résultats de l'isolement des microorganismes

Au terme de l'isolement, un nombre considérable de microorganismes a été isolé des locaux des bibliothèques. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau VI ci-dessous. Il en ressort que le nombre d'isolats varie d'un type de prélèvement à un autre, au total, 173 contre 66 isolats microbiens ont été obtenus des différents prélèvements effectués dans la BC-UYI et la BIFC respectivement.

**Tableau VI** : Nombre total d'isolats microbiens en fonction du type de prélèvement

Groupes de microorganismes	Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I			Bibliothèque de l'Institut du Français Cameroun		
	Air	Surfaces	Livres	Air	Surfaces	Livres
Isolats bactériens	32	37	7	8	10	4
Isolats fongiques	41	46	10	23	14	7
Total	73	83	17	31	24	11

La figure 20 ci-dessous représente les proportions des isolats microbiens. Il est observé que les isolats fongiques ont été prédominants dans les deux bibliothèques, avec des fréquences de 56 % et 68 % respectivement pour la BC-UYI et la BIFC.



\*Légende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

**Figure 20** : Proportions des groupes de microorganismes isolés de la BC-UYI et de la BIFC

## **I.2. Résultats des concentrations microbiennes**

Les concentrations microbiennes de l'air intérieur et des surfaces de la BC-UYI ont été déterminées à partir de 90 échantillons. Les résultats obtenus indiquent que le nombre de colonies microbiennes dans l'air varie entre  $917 \pm 147$  UFC/m<sup>3</sup> pour la flore mésophile fongique de la salle d'étude du niveau 2 et  $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup> pour la flore mésophile fongique de la salle d'étude du sous-sol et celui des surfaces varie entre  $200 \pm 0$  UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile fongique des tables d'étude du niveau 2 et  $5000 \pm 282$  UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile bactérienne des tables d'étude du sous-sol. Concernant la BIFC, ces concentrations varient de  $424 \pm 29$  à  $631 \pm 56$  UFC/m<sup>3</sup> pour les bioaérosols et de  $40 \pm 0$  à  $600 \pm 53$  UFC/cm<sup>2</sup> pour les contaminants de surface.

### **I.2.1. Résultats des concentrations microbiennes de l'air**

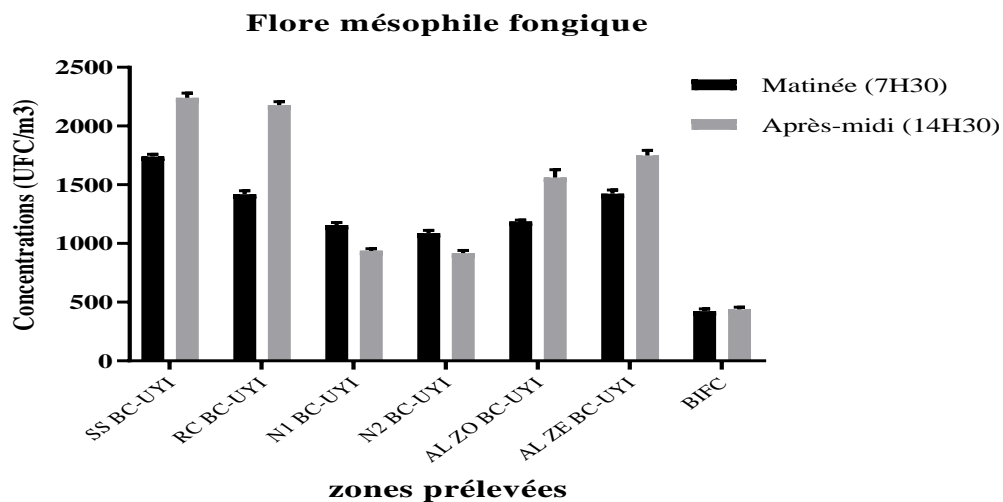
La figure 21 présente les moyennes  $\pm$  écarts types des concentrations microbiennes de l'air. Il ressort de cette figure que pour la BC-UYI, la plus grande concentration bactérienne a été reportée dans l'après-midi (présence d'activité humaine) au niveau de la salle d'étude du sous-sol ( $1817 \pm 256$  UFC/m<sup>3</sup>) et la plus petite concentration en matinée (absence d'usagers) dans la salle du niveau 1 ( $1142 \pm 198$  UFC/m<sup>3</sup>). La plus grande concentration fongique a été reportée dans l'après-midi au niveau de la salle d'étude du sous-sol ( $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup>) alors que la plus petite concentration a été enregistrée dans la salle d'étude du niveau 2 ( $917 \pm 147$  UFC/m<sup>3</sup>) à la même heure.

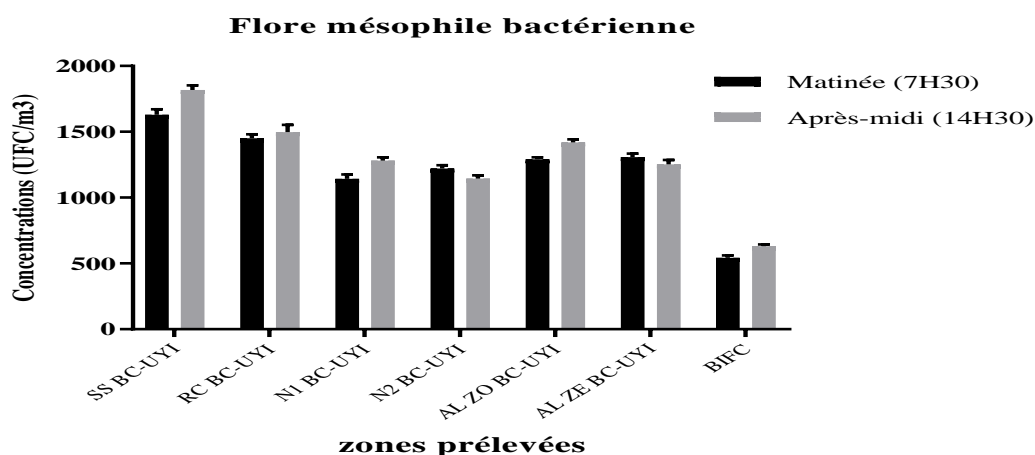
Il est également observé que les concentrations bactériennes de l'air prélevé en matinée dans toutes les salles d'étude ne sont pas significativement différentes ( $p \leq 0,05$ ) de celles de l'après- midi. Cependant, les concentrations bactériennes de l'air prélevé en matinée ( $1629 \pm 287$  UFC/m<sup>3</sup>) et en après-midi ( $1817 \pm 256$  UFC/m<sup>3</sup>) dans la salle d'étude du sous-sol sont significativement supérieure ( $p \leq 0,05$ ) à celles des niveaux 1 ( $1142 \pm 198$  UFC/m<sup>3</sup>) et 2 ( $1220 \pm 196$  UFC/m<sup>3</sup>) et à toutes les autres salles d'étude respectivement. Aucune différence significative ( $p \leq 0,05$ ) n'a été mise en évidence entre les concentrations bactériennes de l'air prélevé au niveau des armoires à livre en zones obscure et en zone éclairée.

Les concentrations fongiques de l'air prélevé en matinée dans les salles d'étude du sous-sol ( $1740 \pm 262$  UFC/m<sup>3</sup>) et du rez-de-chaussée ( $1420 \pm 152$  UFC/m<sup>3</sup>) sont significativement inférieures ( $p \leq 0,05$ ) à celles de l'après- midi ( $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup> et  $2179 \pm 129$  UFC/m<sup>3</sup> respectivement). Par ailleurs, la concentration fongique de l'air prélevé en matinée ( $1740 \pm 262$  UFC/m<sup>3</sup>) dans la salle d'étude du sous-sol s'avère significativement supérieure ( $p \leq 0,05$ ) à

celles des autres salles d'étude. Dans l'après-midi, les concentrations fongiques de l'air des salles d'étude du sous-sol ( $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup>) et du rez-de-chaussée ( $2179 \pm 129$  UFC/m<sup>3</sup>) sont significativement plus élevées ( $p \leq 0,05$ ) que celles des niveaux 1 ( $938 \pm 110$  UFC/m<sup>3</sup>) et 2 ( $917 \pm 147$  UFC/m<sup>3</sup>). Aucune différence significative ( $p \leq 0,05$ ) n'a été observée entre les concentrations fongiques de l'air prélevé au niveau des armoires à livre en zone obscure ( $1561 \pm 381$  UFC/m<sup>3</sup>) et en zone éclairée ( $1750 \pm 332$  UFC/m<sup>3</sup>).

Dans la BIFC les concentrations en bioaérosol variaient de  $424 \pm 29$  UFC/m<sup>3</sup> pour les concentrations fongiques prises en matinée en absence humaine à  $439 \pm 61$  UFC/m<sup>3</sup> pour les concentrations fongiques prises en soirée en présence humaine. Pour la flore mésophile bactérienne, ces concentrations variaient de  $542 \pm 68$  UFC/m<sup>3</sup> pour les concentrations prises en absence humaine à  $631 \pm 56$  UFC/m<sup>3</sup> pour les concentrations prises en présence humaine. D'un point de vue statistique, aucune différence n'a été observée entre les concentrations prises en matinée en absence humaine et celles prises en soirée en présence humaine tant pour la flore mésophile bactérienne que pour la flore mésophile fongique mais ces concentrations étaient nettement inférieures aux concentrations obtenues dans l'enceinte de la BC-UYI ( $p \leq 0,05$ ).





\*Legende : SS BC-UYI : Sous-sol de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; RC BC-UYI : Rez-de-chaussée de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; N1 BC-UYI : Niveau1 de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; N2 BC-UYI : Niveau2 de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; AL ZO BC-UYI : Armoires à Livres Zone Obscure de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; AL ZE BC-UYI : Armoires à Livres Zone Eclairée de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun.

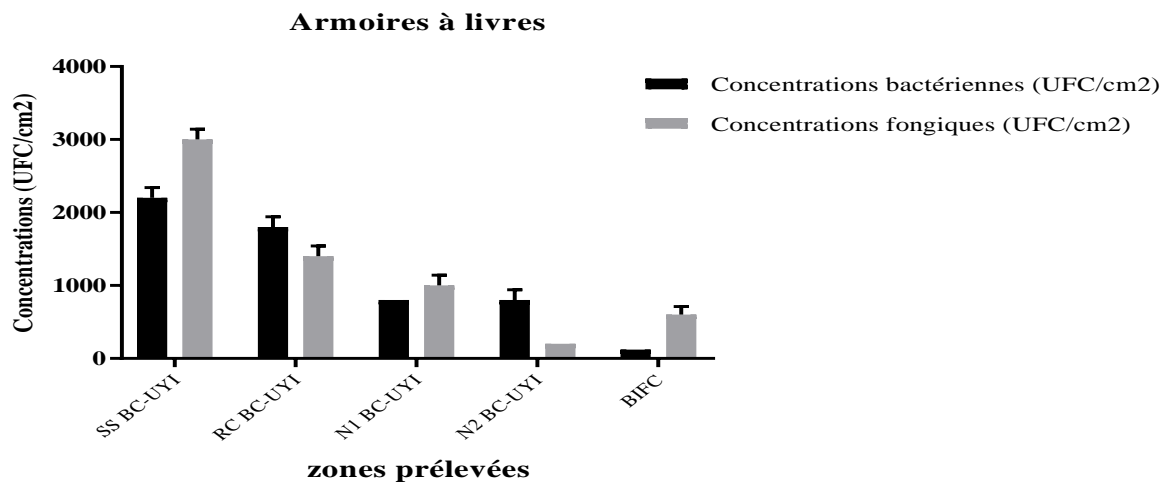
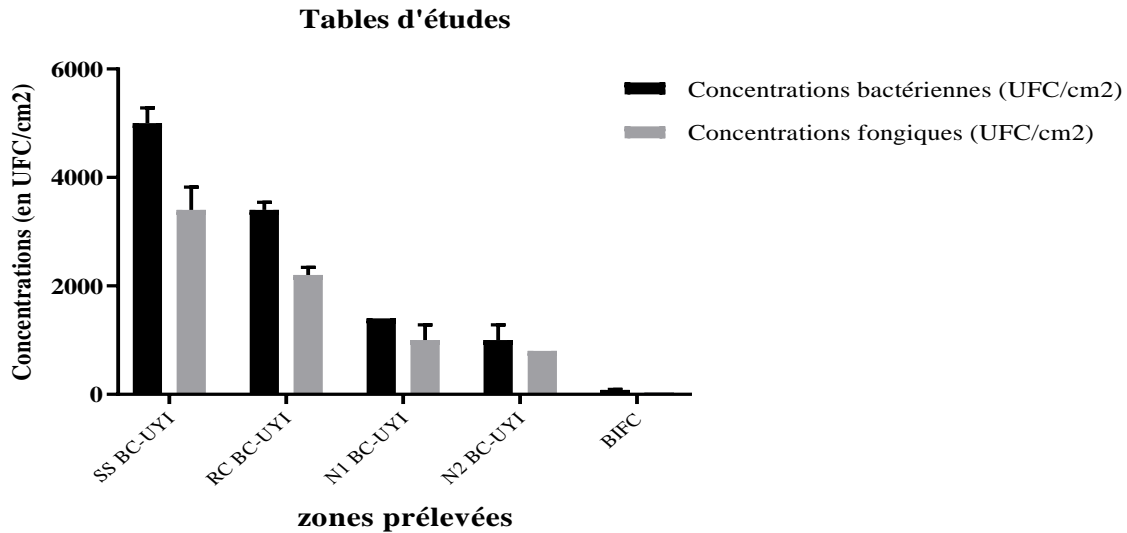
**Figure 21** : Concentrations microbiennes (UFC/m<sup>3</sup>) obtenues dans la BC-UYI et la BIFC

### I.2.2. Résultats des concentrations microbiennes des surfaces

La figure 22 présente le nombre de colonies bactériennes et fongiques obtenues au niveau des différentes surfaces. Les résultats des concentrations microbiennes obtenues sur 25 cm<sup>2</sup> de surfaces prélevées, indiquent que ces concentrations étaient comprises entre 40 ± 0 UFC/cm<sup>2</sup> pour les tables d'étude de la BIFC et 5000 ± 282 UFC/cm<sup>2</sup> pour les tables d'étude du sous sol de la BC-UYI.

Dans la BC-UYI, les plus grandes concentrations bactériennes ont été reportées sur les tables d'étude du sous-sol (5000 ± 282 UFC/cm<sup>2</sup>) suivi des tables d'étude du rez-de-chaussée (3400 ± 141 UFC/cm<sup>2</sup>). Les concentrations fongiques, des tables d'étude et des armoires à livre du sous-sol (3400 ± 141 et 3000 ± 66 UFC/cm<sup>2</sup> respectivement) sont plus élevées que celles des autres niveaux.

Les concentrations microbiennes au niveau des surfaces de la BIFC étaient comprises entre 80 ± 14 et 120 ± 0 UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile bactérienne et 40 ± 0 et 600 ± 53 UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile fongique. Comme pour les concentrations microbiennes obtenues dans l'air, les concentrations au niveau des surfaces de la BIFC étaient nettement inférieures à celles obtenues dans la BC-UYI (800 ± 0 à 5000 ± 282 UFC/cm<sup>2</sup> et 200 ± 0 à 3400 ± 141 UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore mésophile bactérienne et fongique respectivement).



\*Legende : SS BC-UYI : Sous-sol de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; RC BC-UYI : Rez-de-chaussée de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; N1 BC-UYI : Niveau1 de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; N2 BC-UYI : Niveau2 de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun.

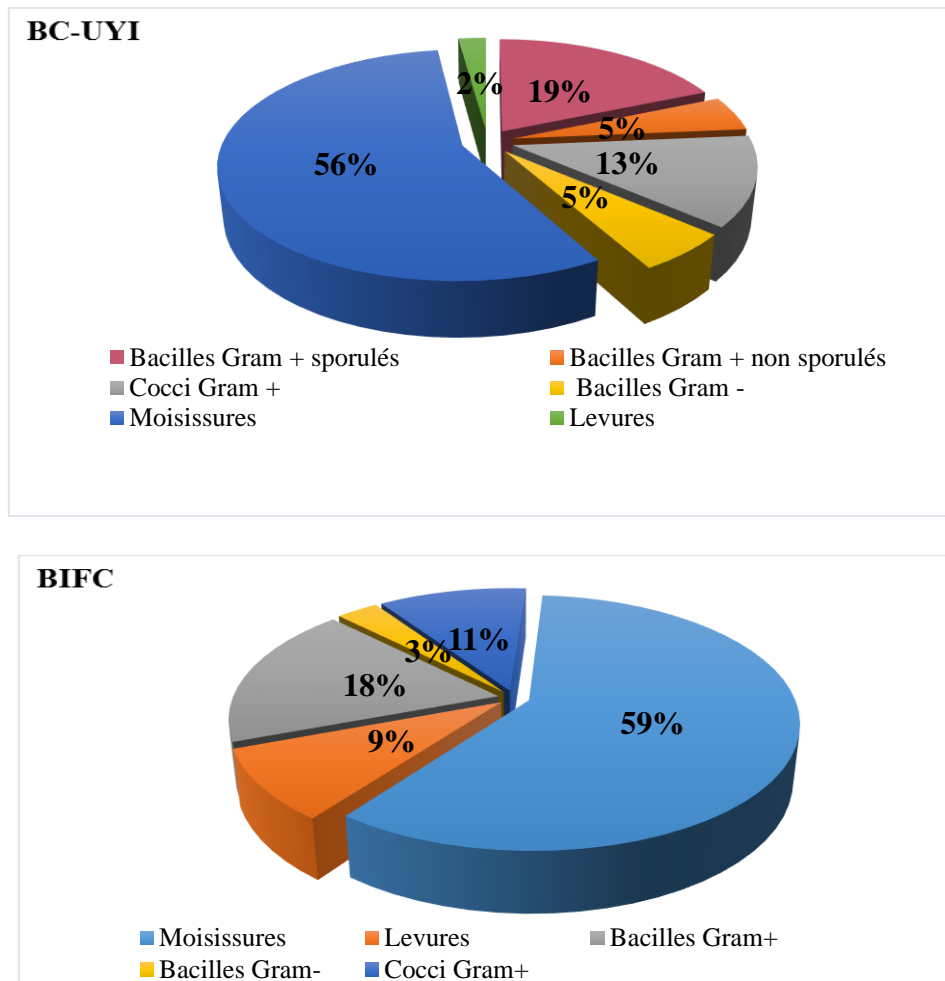
**Figure 22** : Concentrations microbiennes (UFC/cm<sup>2</sup>) obtenues dans la BC-UYI et la BIFC

### I.3. Résultats de l'identification des microorganismes

À l'issue des différentes techniques utilisées, plusieurs types de microorganismes ont été identifiés. Les différentes proportions de microorganismes isolés de la BC-UYI et identifiés présentées dans la figure 23 ci-après révèlent que les bactéries les plus retrouvées à l'intérieur de cette bibliothèque sont : les bacilles Gram + sporulés (20 %) et les cocci Gram + catalase + (13 %). S'agissant des champignons identifiés, les moisissures étaient prédominantes (56 %).

La figure 23 ressort également les proportions de microorganismes isolés de la BIFC et identifiés. Comme dans la BC-UYI, les moisissures étaient prédominantes (59 %) comparé aux

levures (9 %). Pour les isolats bactériens, les bacilles Gram + (18 %) suivis des cocci Gram + catalase + (11 %) ont été les plus retrouvés.



\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

**Figure 23 :** Proportions des isolats bactériens et fongiques identifiés dans la BC-UYI et la BIFC

### I.3.1. Résultats de l'identification des microorganismes isolés dans l'air

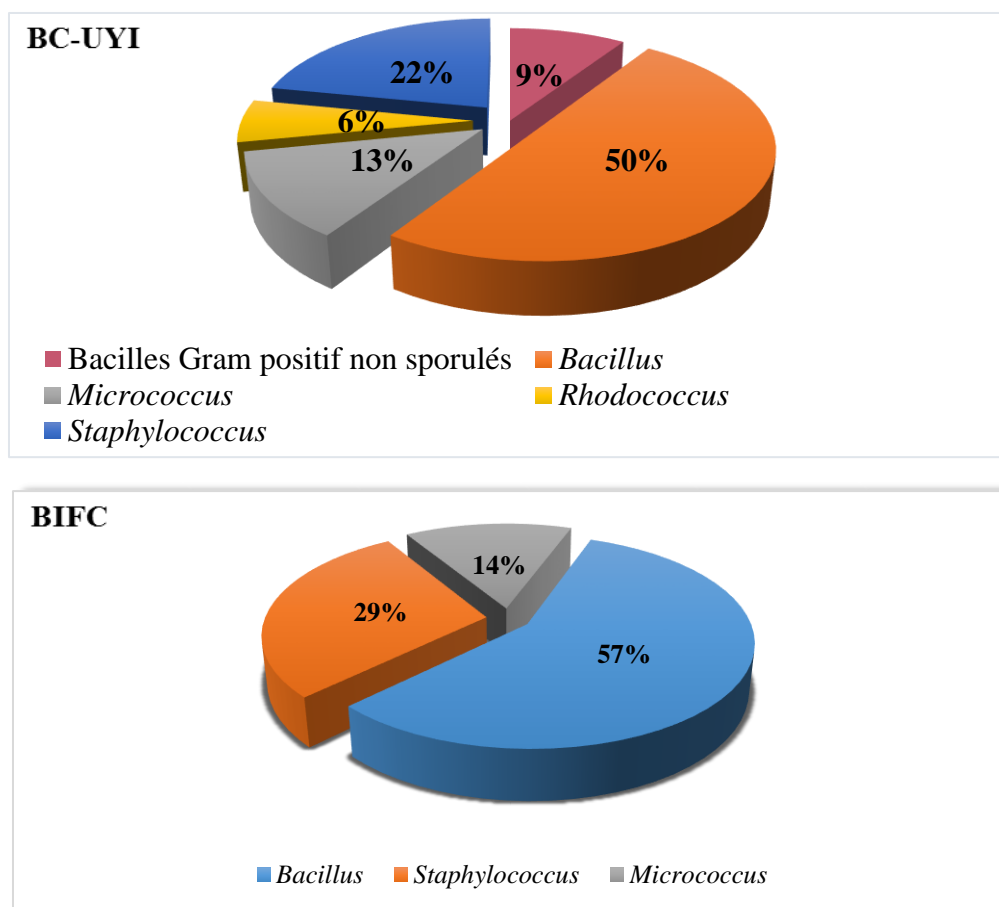
Dans l'air des différentes salles d'études de la BC-UYI, soixante-treize (73) isolats microbiens ont été identifiés parmi lesquels 32 bactéries (codifiées ISOBA 1 à ISOBA 32) et 41 champignons (ISOFA 1 à ISOFA 41). Dans l'air de la BIFC, trente un isolats (31) ont été identifiés parmi lesquels 08 bactéries (codifiées ISOBA A à ISOBA H) et 23 champignons (ISOFA A à ISOFA W)

#### I.3.1.1. Identification phénotypique des isolats bactériennes

À l'issue des examens microscopiques, des tests biochimiques et de sensibilité aux antibiotiques, 4 genres bactériens dont les fréquences sont indiquées dans la figure 24 ci après



ont été identifiés dans l'air de la BC-UYI à savoir les genres *Bacillus*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* et *Staphylococcus* contre 3 genres dans la BIFC (*Bacillus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus*).



\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

**Figure 24 :** Fréquences des différents genres bactériens identifiés dans l'air de la BC-UYI et la BIFC

Nous présentons ici des exemples d'isolats de ces 4 genres. Les figures 25, 26, 27 et 28 représentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOBA 5, ISOBA 8, ISOBA 7 et ISOBA 3 respectivement.

#### ➤ Description ISOBA 5

**Observation macroscopique :** l'isolat présente des petites colonies jaunes d'or, rondes, bords réguliers sur milieu Chapman.

**Observation microscopique :** Elle montre des cocci immobiles et la coloration de Gram révèle des cocci colorés en violet avec un mode de groupement en amas.



**Figure 25** : Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA

➤ **Description ISOBA 8**

**Observation macroscopique** : l'isolat présente des petites colonies, rondes, de couleur rose, lisses et luisantes, diffusant un pigment rose sur le milieu Chapman.

**Observation microscopique** : À l'examen direct de la culture, on observe des cocci immobiles. A la coloration de Gram, on observe de gros cocci colorés en violet et groupés tétrade et en amas.



**Figure 26** : Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 8

Le tableau VII ci-dessous présente les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats 5 et 8. Il ressort de ce tableau que les deux isolats sont des Cocci Gram + catalase +, avec des tests respiratoires différents mais fermentant le glucose et possédant une nitrate réductase.

**Tableau VII : Résultats des tests biochimiques des isolats 5 et 8 sur galerie classique et antibiogramme**

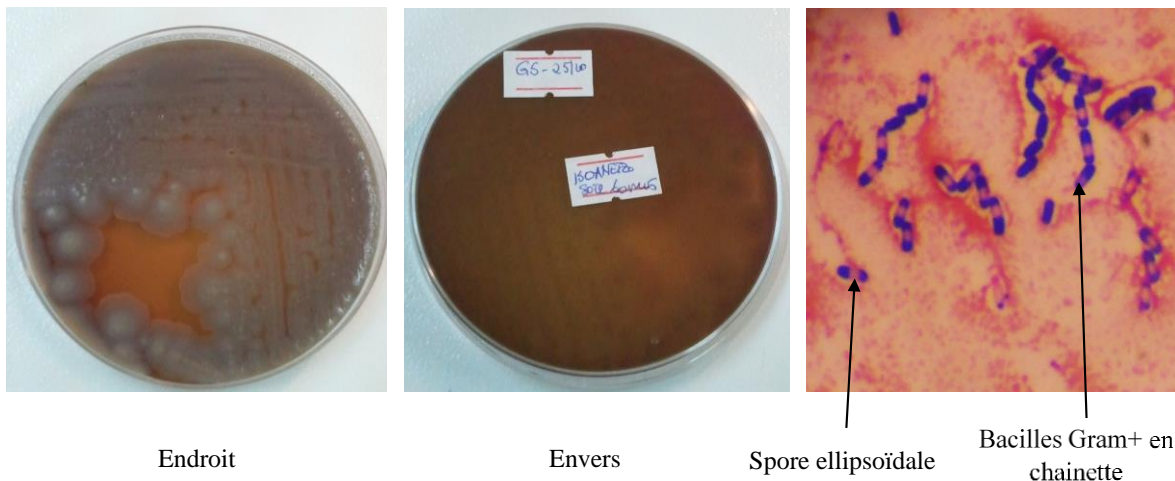
Isolats	Urée	Dnase	Coagulase	Glucose	Lactose	ONPG	Mannitol	N	B	Nitrate	Catalase	Test respiratoire	Germes présumés
ISOBA 5	+	+	+	+	+	-	+	S	R	+	+	Aéro-anaérobie	<i>Staphylococcus aureus</i>
ISOBA 8	/	/	/	+	-	/	-	R	S	+	+	Aérobie strict	<i>Micrococcus roseus</i>

\*Legende : ONPG : OrthoNitroPhényl-  $\beta$ D Galactopyranosidase ; N : Nitrofurantoïne ; B : Bacitracine  
(+): Réaction positive ; Réaction négative ;(/): Non déterminé

### ➤ Description ISOBA 7

**Observation macroscopique :** l'isolat présente des colonies ovales planes, rugueuses au-dessus, de taille moyenne et de couleur gris- verdâtre avec hémolytique sur gélose au sang.

**Observation microscopique :** Elle révèle des bacilles mobiles regroupés en chaînes et la coloration de Gram présente des bacilles colorés en violet avec des spores ellipsoïdales en position centrale.

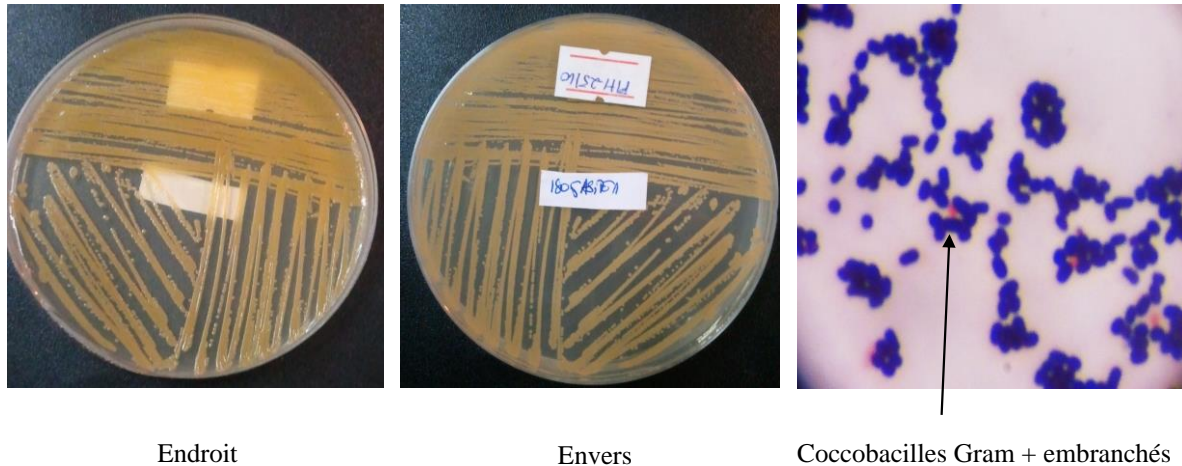


**Figure 27 :** Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 7

### ➤ Description ISOBA 3

**Observation macroscopique :** l'isolat présente de petites colonies, jaunes, rondes, lisses, légèrement bombées avec des bords réguliers sur MH et sans hémolyse sur gélose au sang.

**Observation microscopique :** On observe à l'examen microscopique de la colonie des bacilles immobiles et à la coloration de Gram des coccobacilles colorés en violet avec des branchements en culture âgée.



**Figure 28 :** Culture et observation microscopique après coloration Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBA 3

Les résultats des tests biochimiques réalisés sur les isolats 3 et 7 sont représentés dans le tableau VIII ci-dessous. Il ressort que les deux isolats sont les bactéries Gram + catalase + fermentant le mannitol et possédant une nitrate réductase.

**Tableau VIII :** Résultats des tests biochimiques des isolats 3 et 7

Isolats	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Lactose	Catalase	Esculine	Nitrate	Mannitol	Germes présumés
ISOBA 3	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	-	+	+	+	+	<i>Rhodococcus sp</i>
ISOBA 7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	/	+	/	+	+	<i>Bacillus cereus</i>

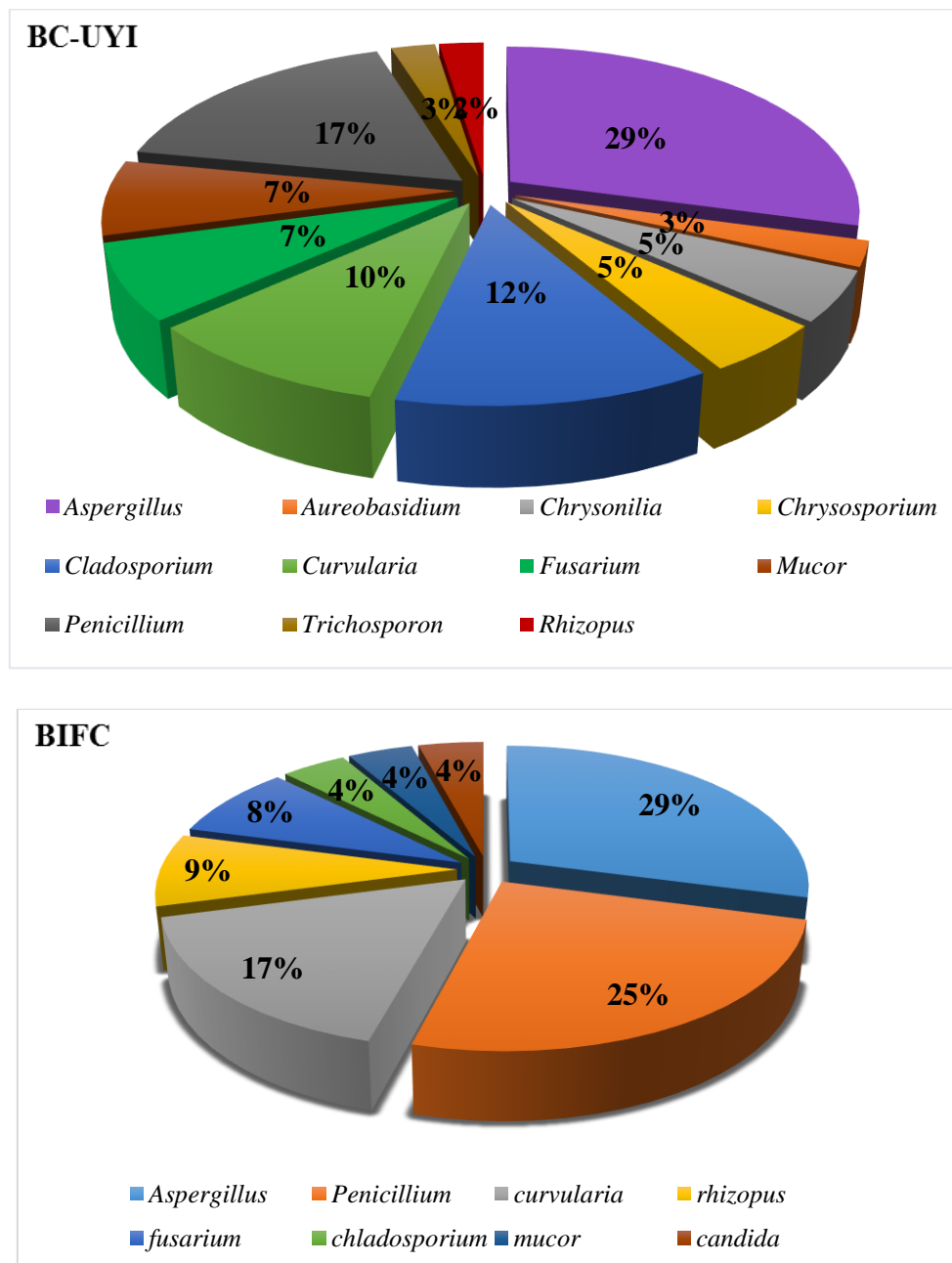
\*Legende : ONPG : OrthoNitroPhényl-  $\beta$ D Galactopyranosidase ; ADH: Arginine Déshydrolyase ; ODC: Ornithine Décarboxylase ; CIT: Citrate; TDA: Tryptophane Désaminase ; IND: Indole ; VP: ; GEL: Gelatinase ; GLU: Glucose ; MAN: Mannitol ; INO: Inositol ; SOR: Sorbitol ; RHA: Rhamnose ; SAC: Saccharose ; MEL: Melibiose ; AMY: Amygdaline ; ARA: Arabinose ; (+): Réaction positive ; Réaction négative ; /: Non déterminé

### I.3.1.2. Identification phénotypique des isolats fongiques

Grâce aux examens macroscopiques et microscopiques des cultures, 11 genres fongiques ont été identifiés dans la BC-UYI parmi lesquels *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Curvularia*, *Chrysonilia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*,

*Rhizopus* et *Trichosporon* contre 8 genres pour la BIFC (Figure 29). Ce qui nous permet de dire que la flore fongique aérienne est polymorphe.

La figure 29 ci-dessous montre la fréquence des isolats fongiques identifiés. Il est noté que les genres les plus fréquents dans l'air sont *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* et *Cladosporium sp*.



\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

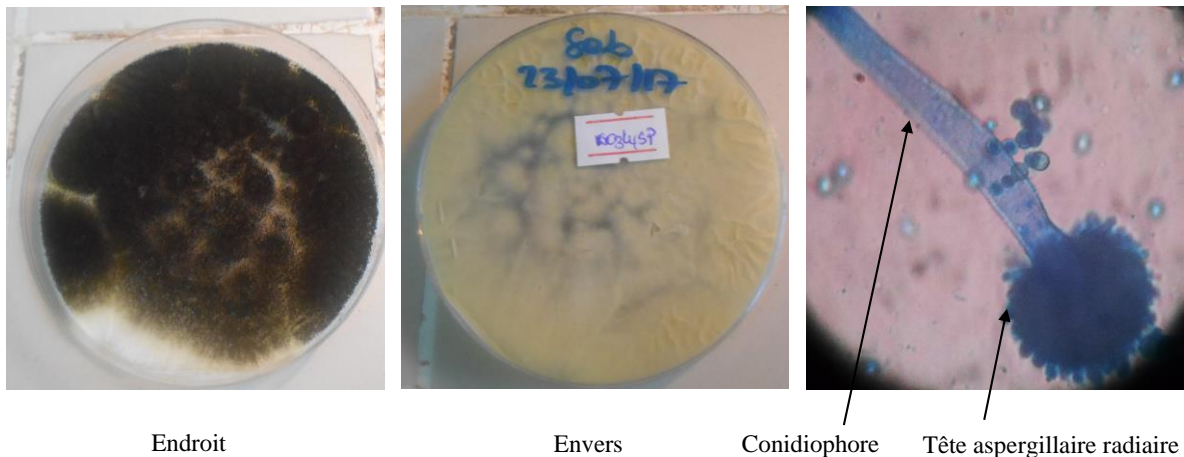
**Figure 29 : Fréquences des champignons identifiés dans l'air de la BC-UYI et la BIFC**

Nous présentons ici les aspects macroscopiques et microscopiques qui nous ont permis d'identifier certains genres fongiques. Les figures 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 39 représentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOFA 6, ISOFA 15, ISOFA 4, ISOFA 11, ISOFA 21, ISOFA 7, ISOFA 19, ISOFA 10 et ISOFA 1 respectivement

➤ **Description ISOFA 6**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies filamenteuses avec des mycéliums aériens blanc en début de croissance puis jaune citron, se ponctuant de noir à l'endroit et incolore à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** On note la présence des conidiophores non cloisonnés avec à leurs extrémités une grosse vésicule sphérique (tête aspergillaire) sur laquelle sont insérées les phialides courtes. Ces caractères orientent vers le genre *Aspergillus*, spécifiquement l'espèce *Aspergillus niger*.

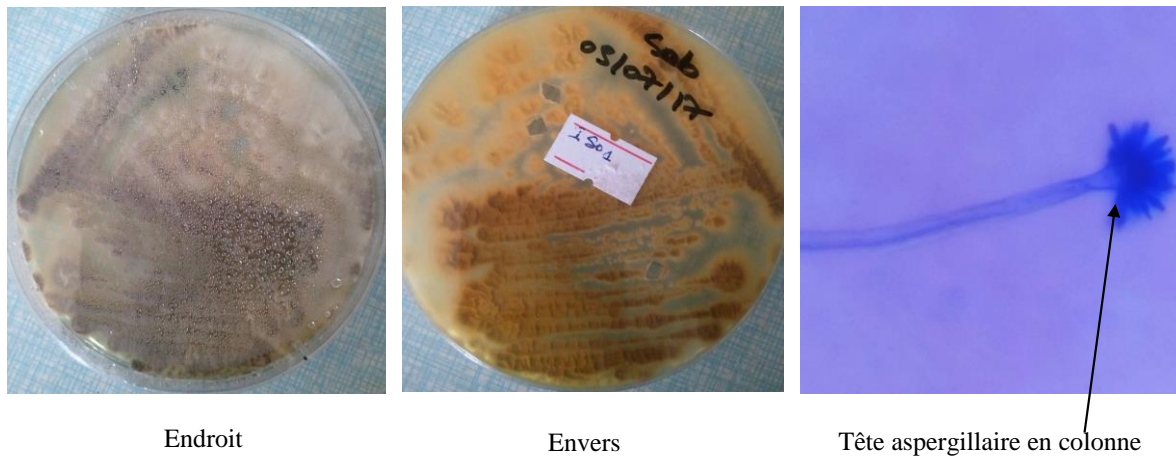


**Figure 30 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) d'*Aspergillus niger*

➤ **Description ISOFA 15**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies veloutées, de couleur marron à l'endroit et incolore à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** On observe la tête aspergillaire en colonne fixée sur un conidiophore non septé. Ces caractères orientent vers l'espèce *Aspergillus sp.*

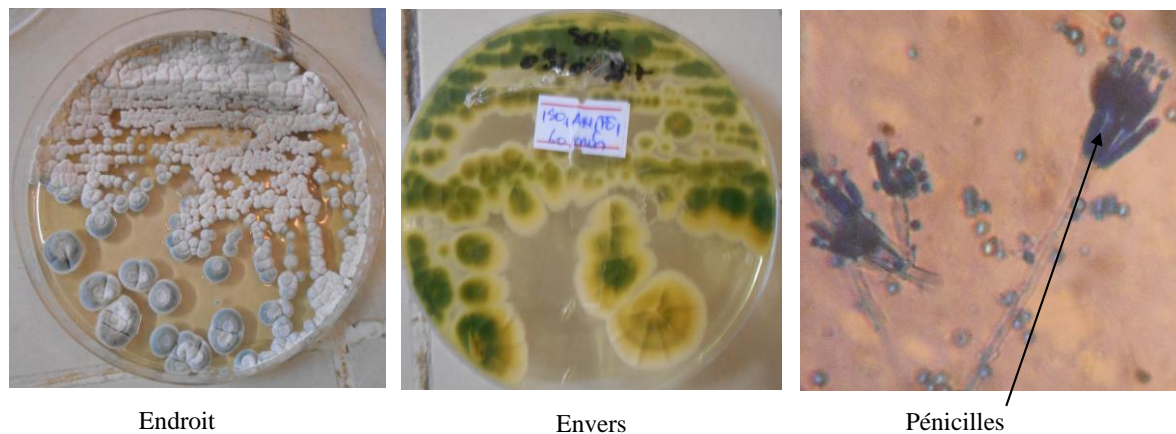


**Figure 31** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) d'*Aspergillus sp*

➤ **Description ISOFA 4**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies glabres, de couleur grise blanche à l'endroit et jaune verdâtre au revers sur Sab + Chlo.

**Observation microscopique** : Elle présente des conidiophores ramifiés, portant des métules sur lesquels se placent des bouquets de phialides productrices de longues chaînettes de spores ronde sous forme de pinceaux (pénicille). Ces caractères observés orientent vers le genre *Penicillium*.

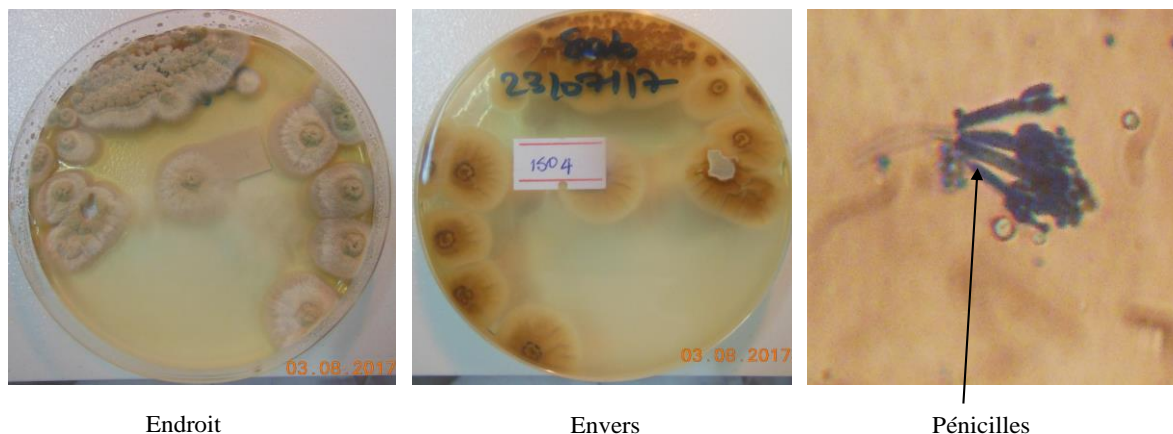


**Figure 32** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Penicillium sp*

➤ **Description ISOFA 11**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies poudreuses cannelle brun à l'endroit et marron au revers sur Sab + Cho.

**Observation microscopique** : On note la présence de pénicilles plus de deux verticilles symétriques portés par un conidiophore ramifié. Ces caractères observés orientent vers l'espèce *Penicillium sp.*

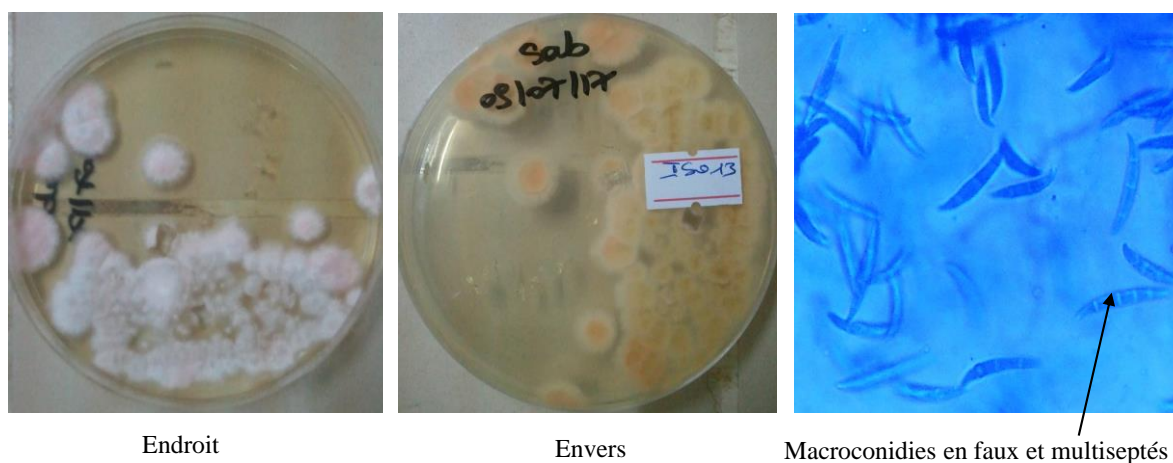


**Figure 33** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Penicillium sp*

➤ **Description ISOFA 21**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies cotonneuses blanches en début de croissance puis roses avec le temps sur Sab + Chlo.

**Observation microscopique** : Elle révèle la présence de macrospores en forme de faux, multiseptés, lisses et également quelques microconidies unicellulaires.



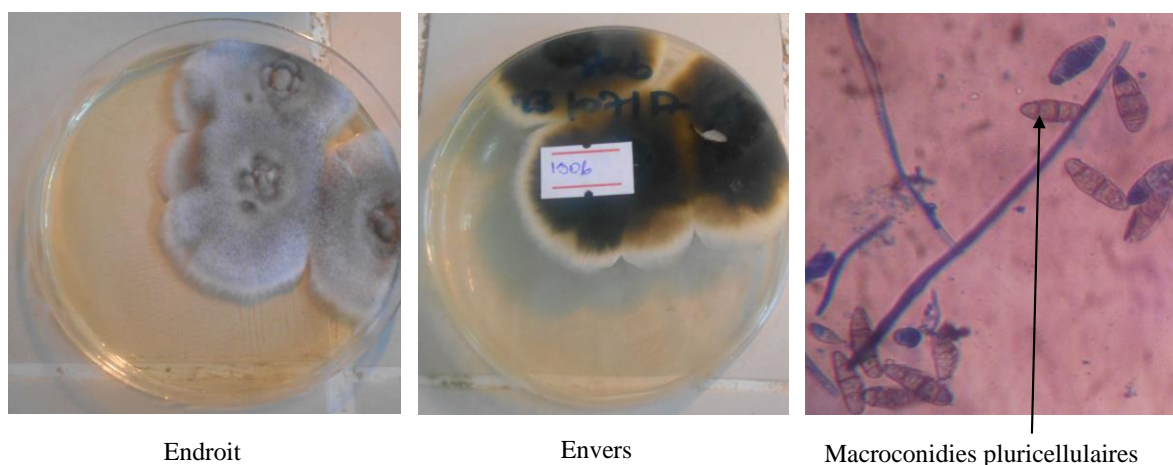
**Figure 34** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Fusarium sp*



### ➤ Description ISOFA 7

**Observation macroscopique :** Les colonies sont duveteuses, avec des mycéliums pigmentés de gris à l'endroit et brun-noir à l'envers sur Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** l'observation d'un fragment de colonie au bleu coton montre des conidies brunes, cylindriques, légèrement incurvées et cloisonnées en 2 ou 3 cellules. Ces caractéristiques orientent vers *Curvularia sp.*



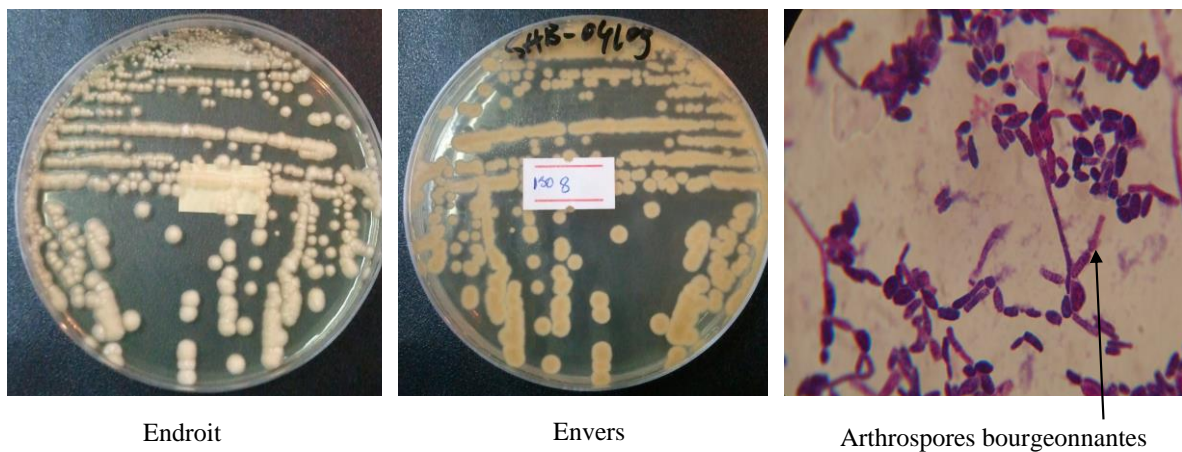
**Figure 35 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Curvularia sp*

### ➤ Description ISOFA 19

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies blanc cassé, rondes, bombées, de consistance crémeuse avec un aspect filamenteux en surface sur Sab+ Chlo.

**Observation microscopique :** L'examen direct de la culture après coloration de Gram montre d'abondante d'arthrospores bourgeonnantes de formes rectangulaires et ovalaires. Cette description correspond à l'espèce *Trichosporon sp.*

**Test biochimique :** Uréase positif

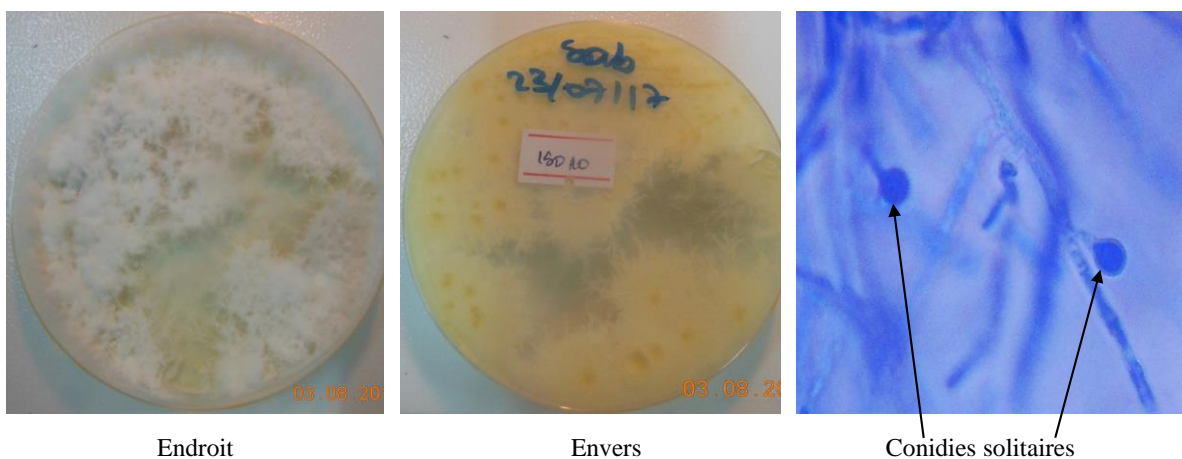


**Figure 36 :** Aspect macroscopique et microscopique (x1000) de *Trichosporon sp*

➤ **Description ISOFA 10**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies cotonneuses, blanches à l'endroit et brun à l'envers sur Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** On note la présence des spores unicellulaires ovoïdes, isolées à l'extrémité du conidiophore. Ces caractères orientent vers le genre *Chrysosporium*.

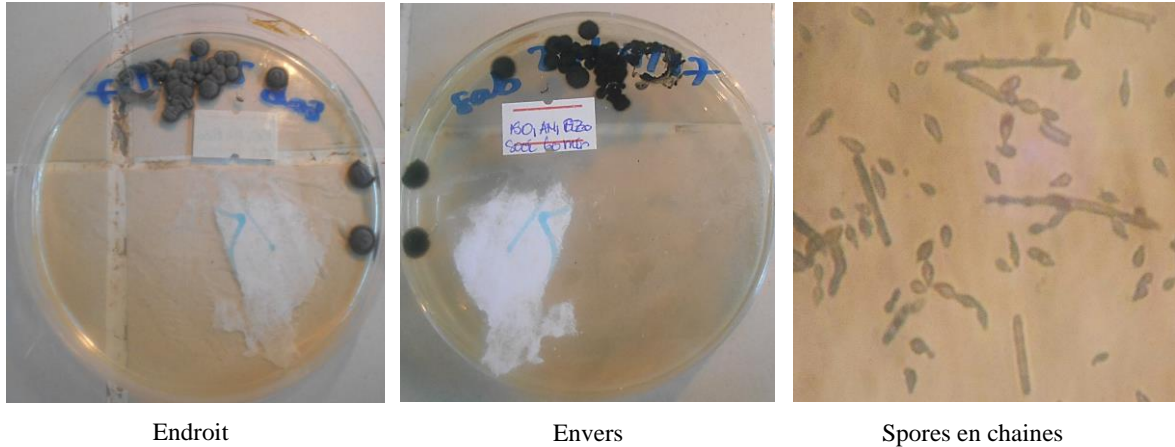


**Figure 37 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Chrysosporium sp*

➤ **Description ISOFA 33**

**Observation macroscopique :** On observe des colonies veloutées de couleur noire à l'endroit et noire à l'envers sur milieu Sab+ Chlo.

**Observation microscopique** : l'examen direct de la culture au bleu coton montre des spores en chaînes ramifiées, avec une cicatrice à chaque extrémité. Ces caractéristiques observées orientent vers l'espèce *Cladosporium sp.*

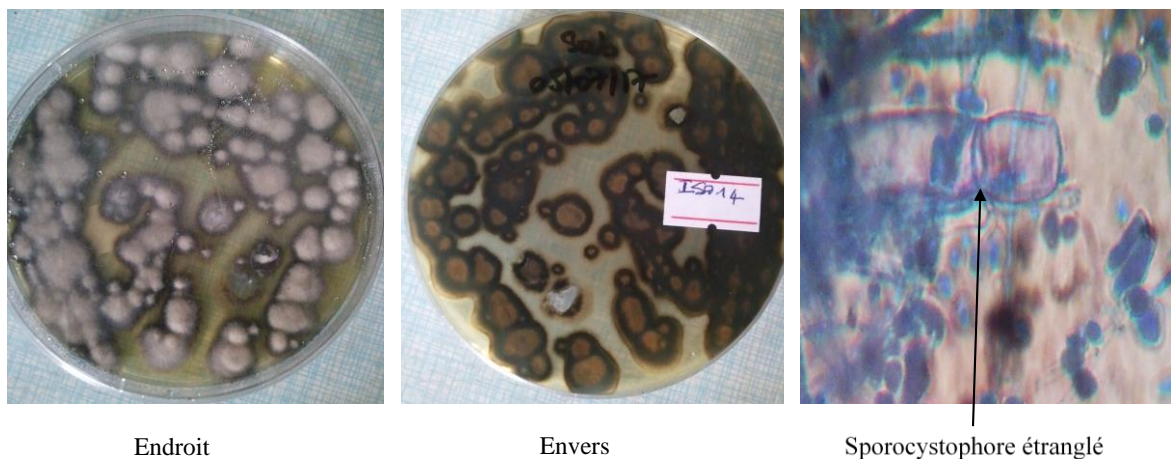


**Figure 38** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Cladosporium sp*

➤ **Description ISOFA 1**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies duveteuses de couleur grise à l'endroit et marron à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique** : On observe des sporocystophores étranglés à la base de la columelle, aucun rhizoïde n'est présent. Ces caractéristiques orientent vers l'espèce *Mucor sp.*



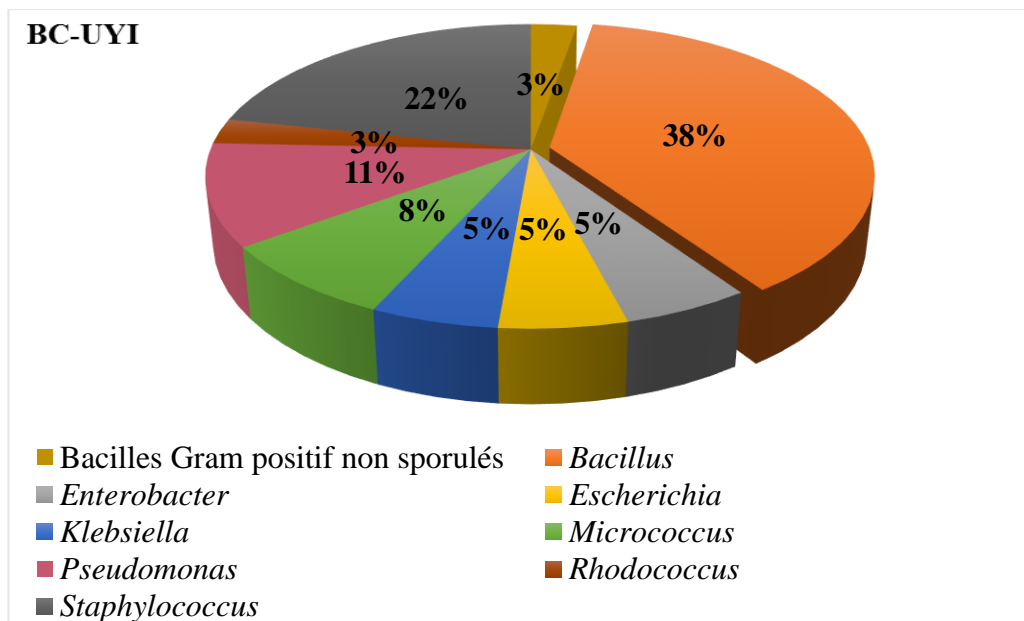
**Figure 39** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Mucor sp*

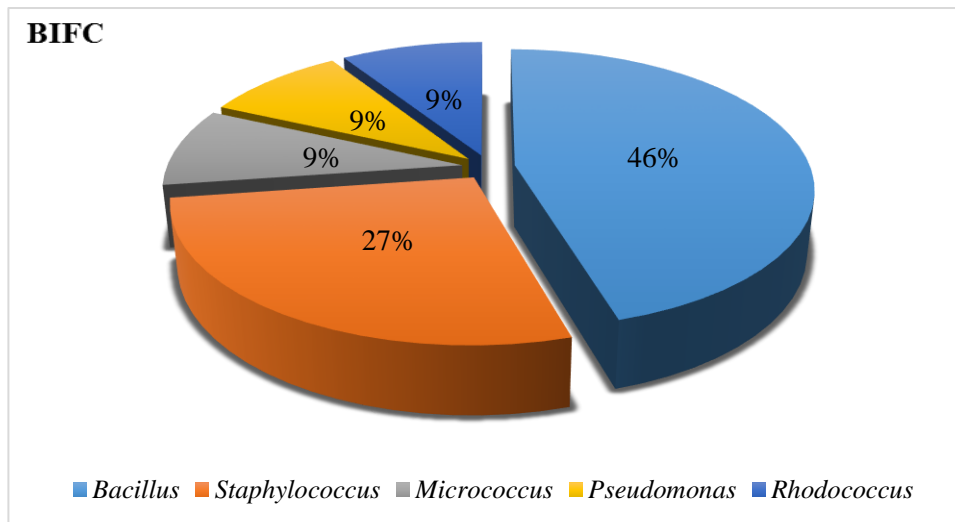
### I.3.2. Résultats de l'identification des microorganismes prélevés sur les surfaces

Des différentes surfaces prélevées, 83 isolats microbiens ont été identifiés, soit 37 isolats bactériens (ISOBS 1 à ISOBS 37) et 46 fongiques (ISOFS 1 à ISOFS 46). L'examen direct des prélèvements a permis d'observer de nombreux filaments mycéliens, de multiples spores. Les isolats identifiés se constituaient de bacilles Gram + sporulés (17 %), de bacilles Gram + non sporulés (2 %), de cocci Gram + catalase + (13 %), de bacilles Gram (-) (12 %), de moisissures (52 %) et de levures (4 %). On constate une prédominance de bacilles Gram + sporulés, de cocci Gram + catalase +, de bacilles Gram (-) et de moisissures.

#### I.3.2.1. Identification phénotypique des isolats bactériens sur les surfaces

À partir des examens microscopiques et des tests biochimiques, il a été identifié au total 8 genres bactériens au niveau des surfaces de la BC-UYI et de la BIFC (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*). Uniquement 5 de ces 8 genres ont été retrouvés sur les surfaces de la BIFC avec une prédominance des genres *Bacillus* (46 %) et *Staphylococcus* (27 %) (Figure 40). On peut observer pour les résultats obtenus dans la BC-UYI que parmi les bactéries Gram +, le genre *Bacillus* (38 %) prédomine suivi de *Staphylococcus* (22 %). En outre, le genre *Pseudomonas* (11 %) est plus fréquent parmi des entérobactéries identifiées sur les surfaces.





\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

**Figure 40** : Fréquences des genres bactériens identifiés sur les surfaces

Nous présentons ici quelques genres bactériens identifiés sur les surfaces. Les figures 41, 42, 43 et 44 présentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOBS 4, ISOBS 6, ISOBS 7 et ISOBS 21 respectivement.

#### ➤ Description ISOBS 4

**Observation macroscopique** : l'isolat présente de colonies moyennes, larges, grasses, luisantes, lisses, légèrement surélevées et muqueuses sur la gélose MacConkey.

**Observation microscopique** : On note la présence de bacilles immobiles à l'examen direct de la culture et la coloration de Gram montre des bacilles colorés en rose.



**Figure 41** : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 4

#### ➤ Description ISOBS 6

**Observation macroscopique** : l'isolat présente de colonies moyennes, muqueuses, bords réguliers, de couleur claire, lisse, luisantes sur MacConkey.

**Observation microscopique** : Elle présente des bacilles mobiles et la coloration de Gram révèle des coccobacilles colorés en rose.



**Figure 42** : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 6

#### ➤ Description ISOBS 7

**Observation macroscopique** : l'isolat présente de fines colonies, rondes, lisses, luisantes, bords réguliers, de couleur claire à centre violet sur gélose EMB.

**Observation microscopique** : Elle révèle des bacilles mobiles et la coloration de Gram présente des bacilles colorés en rose.

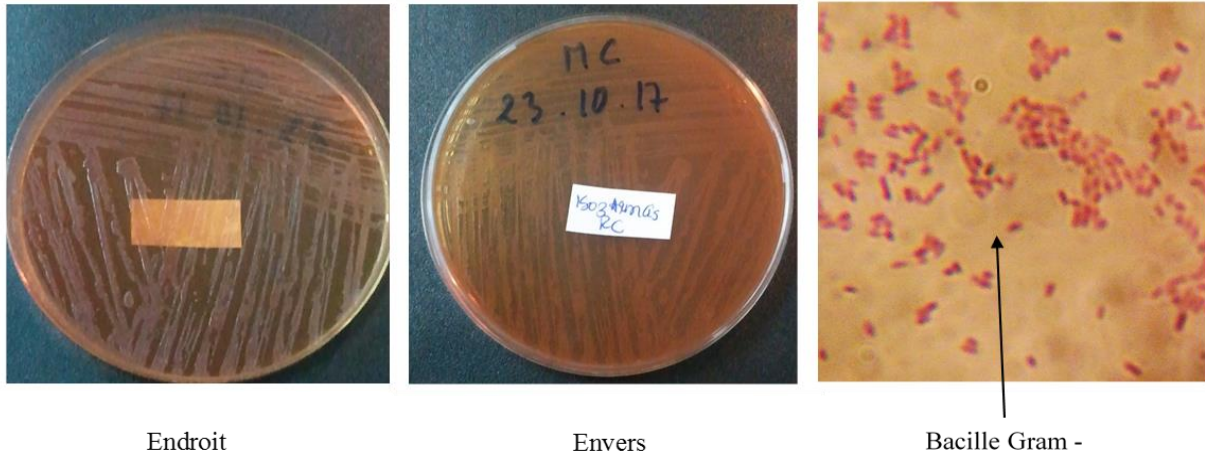


**Figure 43** : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 7

#### ➤ Description ISOBS 21

**Observation macroscopique :** l'isolat présente de colonies moyennes, bombées, visqueuses, bords réguliers sur gélose MacConkey.

**Observation microscopique :** Elle montre des bacilles mobiles et la coloration de Gram révèle des bacilles fins colorés en rose.



**Figure 44 :** Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISOBS 21

Les résultats de la lecture des tests biochimiques effectués sur les isolats 4, 6, 7 et 21 à partir des galeries classiques et miniaturisées (API 20 E) sont répertoriés dans le tableau IX ci-dessous. De ce tableau, on constate que les isolats 4, 6 et 7 sont des bactéries Gram – catalase + oxydase – de la classe des entérobactéries tandis que l'isolat 21 est une bactérie Gram - catalase + oxydase + de la classe des non-fermentaires.

**Tableau IX :** Résultats des tests biochimiques des isolats 4, 6, 7 et 21

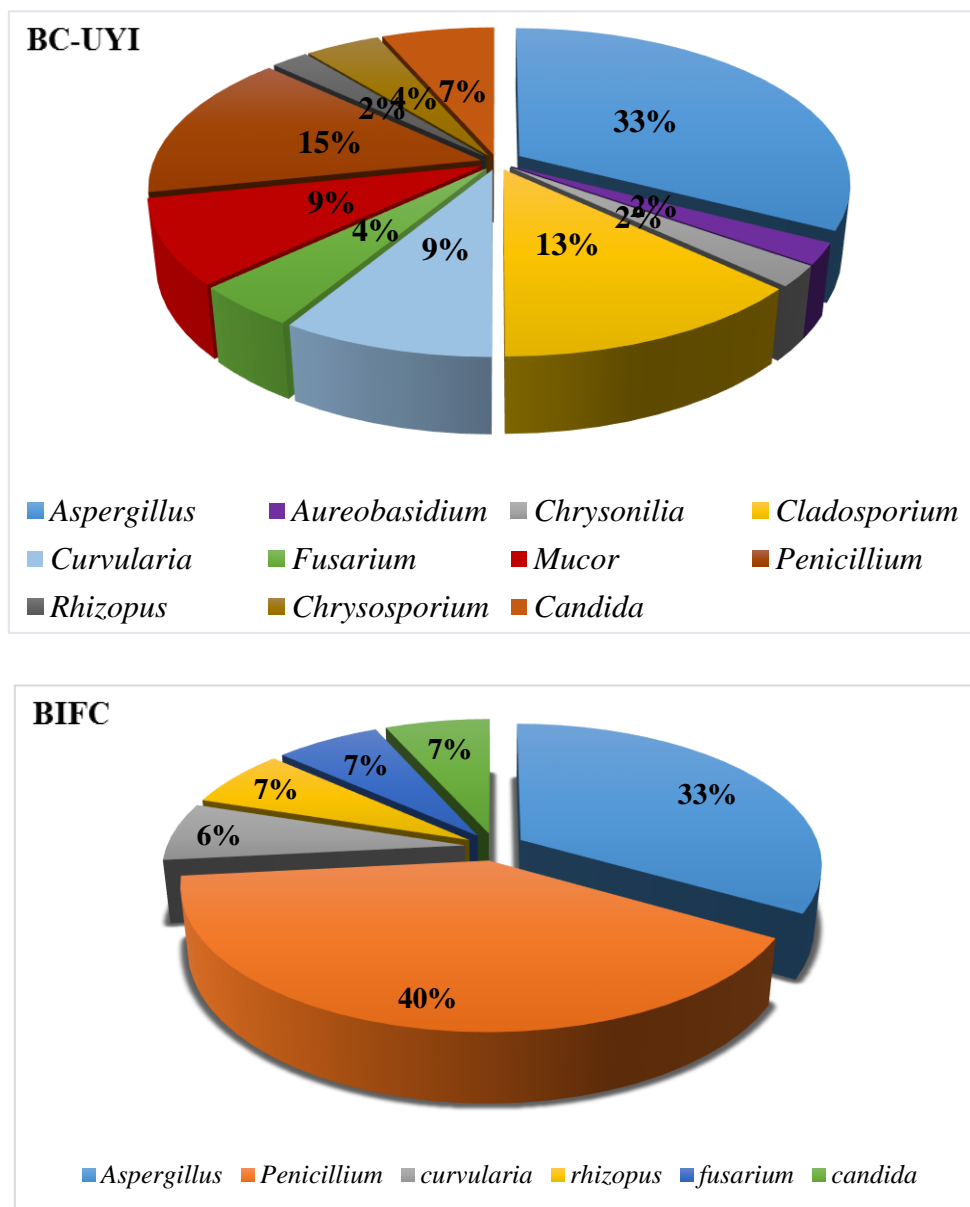
Isolats	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Germes présumés
ISOBS 7	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
ISOBS 4	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
ISOBS 6	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
ISOBS 21	-	/	/	/	+	-	-	-	-	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/	/	+	<i>Pseudomonas sp</i>

\*Legende : ONPG : OrthoNitroPhényl-  $\beta$ D Galactopyranosidase ; ADH: Arginine Déhydrolase ; ODC: Ornithine Décarboxylase ; CIT: Citrate; TDA: Tryptophane Désaminase ; IND: Indole ; VP: ; GEL: Gelatinase ; GLU:

Glucose ; MAN: Manitol ; INO: Inositol ; SOR: Sorbitol ; RHA: Rhamnose ; SAC: Saccharose ; MEL: Melibiose ; AMY: Amygdaline ; ARA: Arabinose ; (+): Réaction positive ; Réaction négative ; /: Non déterminé

### I.3.2.2. Identification phénotypique des isolats fongiques

Grâce aux examens macroscopiques et microscopiques de la culture, Quarante-six (46) isolats fongiques ont été identifiés des surfaces de la BC-UYI contre 14 pour les surfaces de la BIFC. La figure 45 illustre les résultats obtenus et il en ressort que ces isolats appartenaient aux genres *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Candida*, *Chrysonilia*, *Chrysosporium*, *Mucor*, *Penicillium* et *Rhizopus*. Les plus fréquents appartenaient aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* avec des fréquences de 33 % et 15 % respectivement pour la BC-UYI et de 40 % et 33 % respectivement pour la BIFC (figure 45).





**Figure 45 :** Fréquences des champignons identifiés sur les surfaces de la BC-UYI et la BIFC

Nous présentons ici les images des aspects macroscopiques et microscopiques qui nous ont permis d'identifier certains isolats fongiques. Les figures 46, 47, 48, 49 et 50 présentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOFS 1, ISOFS 20, ISOFS 18, ISOFS 3 et ISOFS 21 respectivement.

➤ **Description ISOFS 1**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente de colonies blanches, ovales, planes, lisses de consistance crémeuse sur Sab+ Chlo.

**Observation microscopique :** Elle montre d'abondantes levures rondes, ne présentant pas de bourgeonnement ni de tube germinatif. Cette description correspond à *Candida sp.*



**Figure 46 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Candida sp*

➤ **Description ISOFS 20**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies laineuses blanches à orange pale à l'endroit, brunes à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** Elle présente des conidiophores plus ou moins septés avec des conidies en chaînes. Les caractères observés orientent vers le genre *Chrysonilia*.

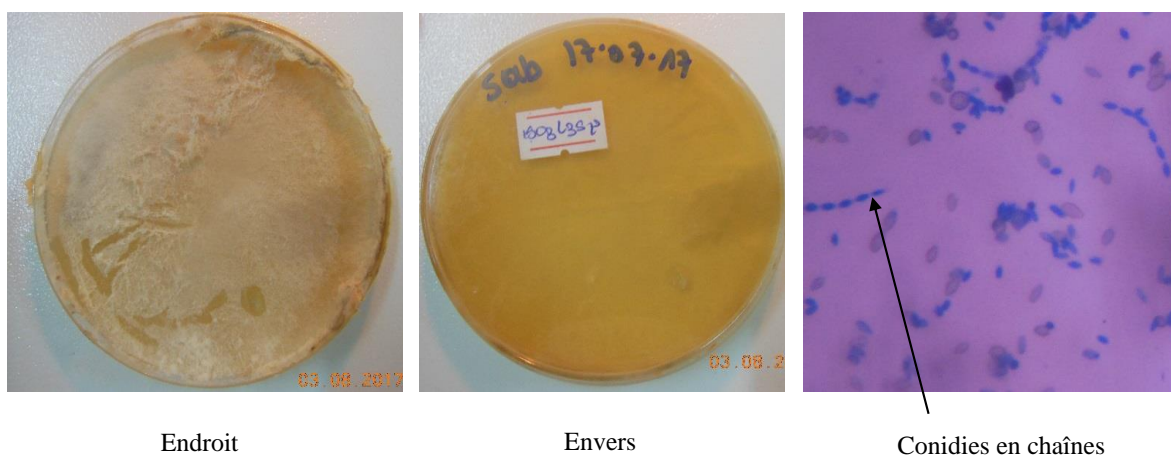


Figure 47 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Chrysonilia sp*

➤ **Description ISOFS 18**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies poudreuses vert olive à l'endroit et incolore à jaunâtre au revers, de croissance rapide sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique** : Elle révèle à l'examen direct après coloration au bleu coton, la présence d'une tête aspergillaire radiaire avec une série de phialide à la surface de la vésicule de forme sphérique. Ces caractéristiques orientent vers *Aspergillus flavus*.

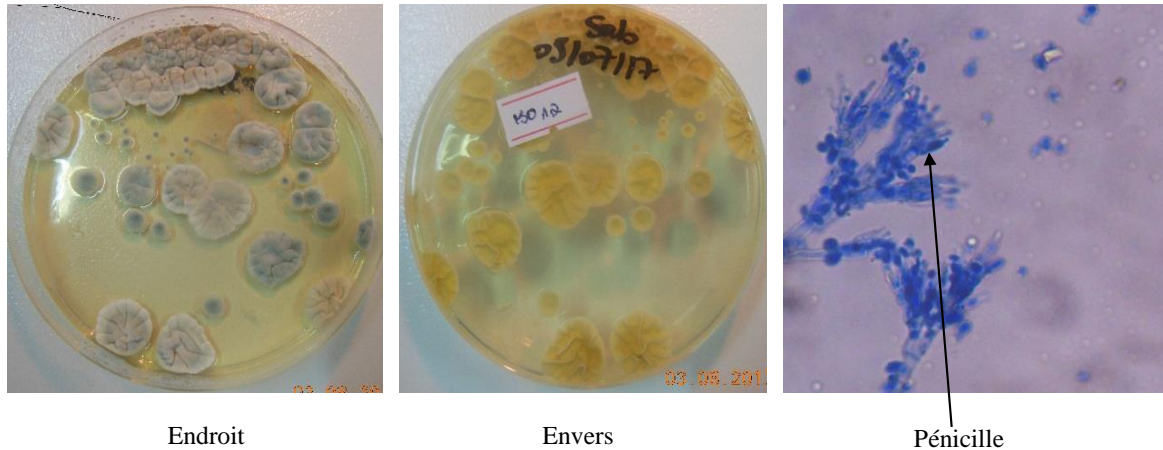


Figure 48 : Aspect macroscopique et microscopique (x400) d'*Aspergillus flavus*

➤ **Description ISOFS 3**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies grises, d'aspect velouté à poudreux avec le temps à l'endroit mais incolore à brun à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** L'état coloré de la culture au bleu coton montre des conidiophores ramifiés, portant des métules sur lesquels se placent des bouquets de phialides productrices de longues chainettes de spores rondes sous forme de pinceaux (pénicille). Ces caractéristiques observées orientent vers le genre *Penicillium*.

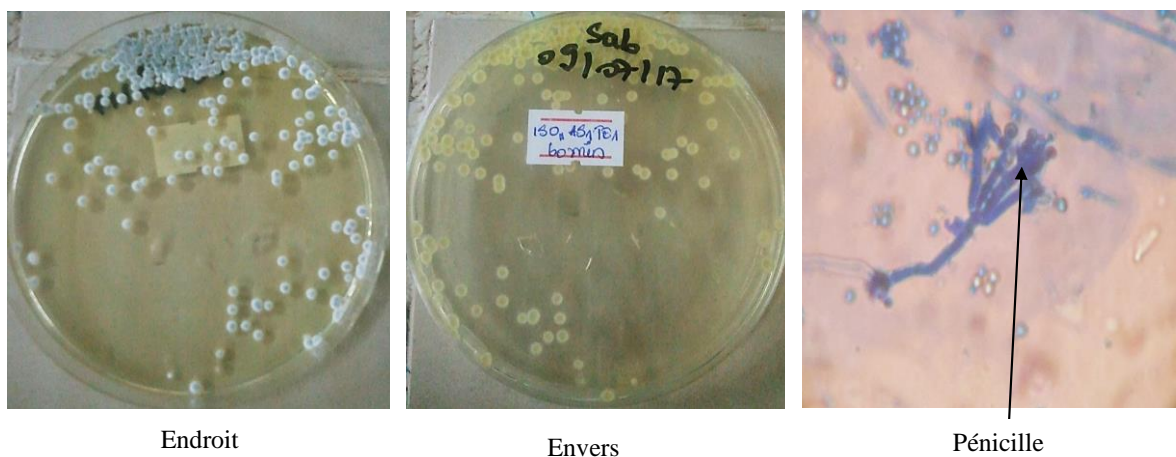


**Figure 49 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Penicillium sp*

➤ **Description ISOFS 21**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies veloutées, de couleur bleue blanche à l'endroit et jaune vermiculé à l'envers sur Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** On observe la présence de trois pénicilles symétriques attachés à des métules fixés au conidiophore. Les spores produites sont rondes et disposées à l'extrémité du phialides. Ces caractères observés orientent vers l'espèce *Penicillium sp*.



**Figure 50 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Penicillium sp*

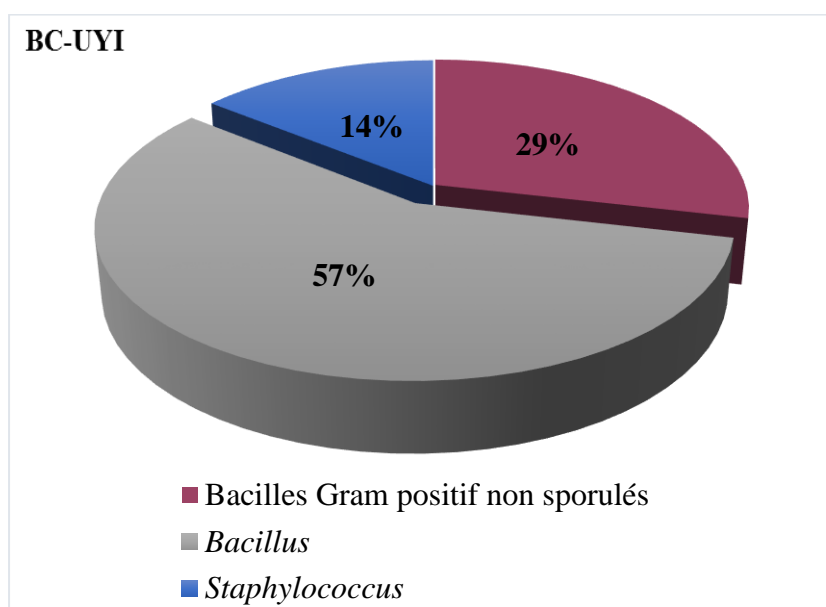
### I.3.3. Résultats de l'identification des microorganismes prélevés des livres

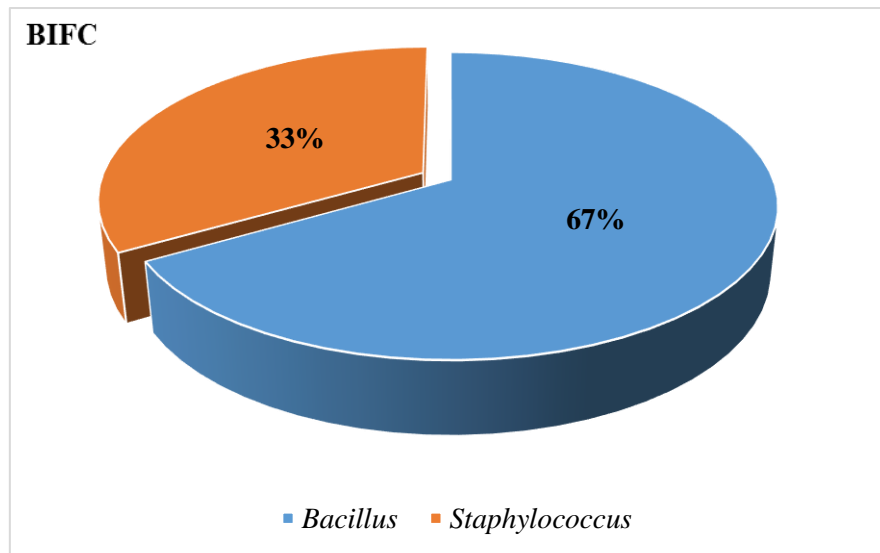
Après le prélèvement de 4 livres suspects, les examens microscopiques à l'état frais ont permis d'observer de nombreuses spores et filaments mycéliens et quelques bactéries revivifiables. Au total 17 isolats microbiens ont été identifiés parmi lesquels 10 isolats bactériens (ISOBL 1 à ISOBL 10) et 7 isolats fongiques (ISOFL 1 à ISOFL 7). Ces isolats comprenaient essentiellement des bacilles Gram + sporulés (23 %), des bacilles Gram + non sporulés (12 %), des cocci Gram + catalase + (6 %), des moisissures (53 %) et des levures (6 %). On constate que la flore microbienne présente sur les livres est diversifiée. De plus, on remarque que les bacilles Gram + sporulés et les moisissures sont prédominants.

#### I.3.3.1. Identification phénotypique des bactéries des livres

À l'issue des examens microscopiques et des tests biochimiques, 2 genres bactériens ont été identifiés des livres de la BC-UYI et de la BIFC, notamment les genres *Bacillus* et *Staphylococcus*.

La fréquence des types d'isolats bactériens identifiés sont présentés sur la figure 51 ci-dessous. Il ressort de cette figure que le genre *Bacillus* est le plus fréquent sur les livres.





\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

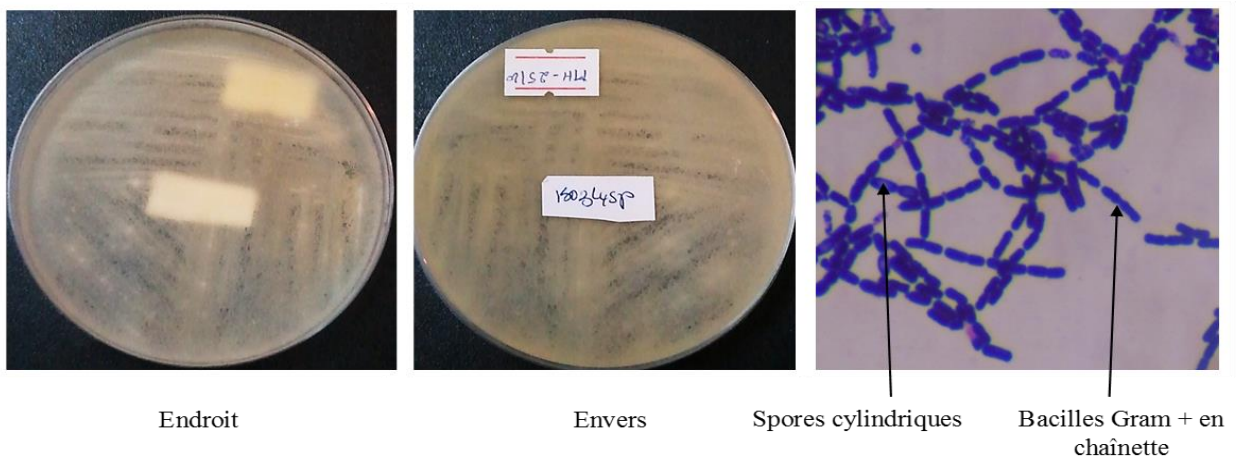
**Figure 51** : Fréquences des isolats bactériens identifiés sur les livres de la BC-UYI et de la BIFC

Nous présentons ici la description de ces genres bactériens identifiés. Les figures 53 et 54 représentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOBL 1 et ISOBL 4 respectivement.

### ➤ Description ISOBL 1

**Observation macroscopique** : l'isolat présente des colonies filamenteuses et envahissantes de forme rhizoïde, plate, translucide sur Mueller Hinton.

**Observation microscopique** : Elle montre des bacilles mobiles regroupés en chaînettes et après coloration de Gram, des bacilles colorés en violet avec des endospores cylindriques situés en position centrale.

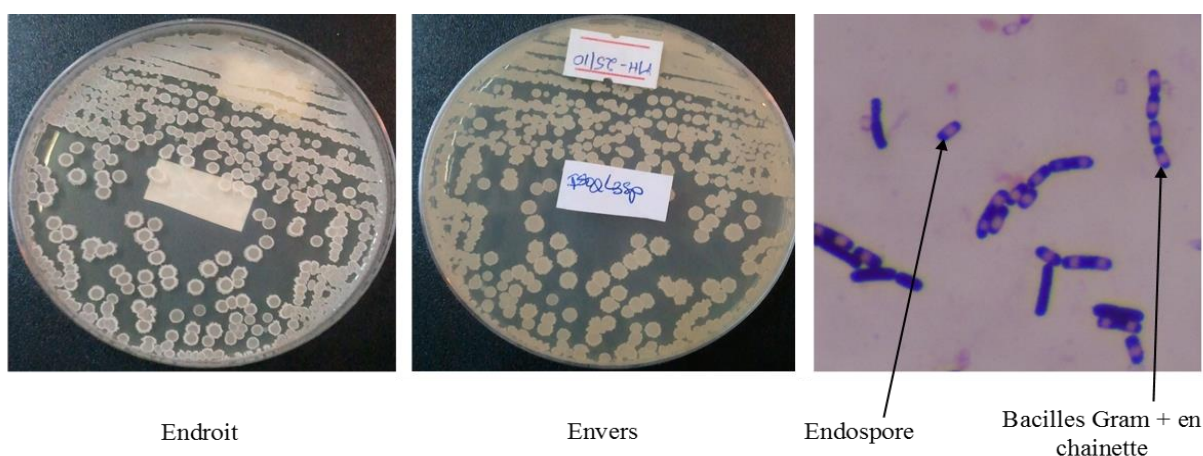


**Figure 52** : Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISO 1

### ➤ Description ISOBL 4

**Observation macroscopique :** l'isolat présente des petites colonies, de forme irrégulière, ronde, de couleur, blanc crème, avec des marges dentelées et une consistance gluante sur Mueller Hinton.

**Observation microscopique :** l'examen direct de la culture révèle de courts bacilles mobiles. A la coloration de Gram, on observe des courts bacilles violets regroupés en chaînettes, d'autres isolés avec des endospores de forme sphérique et centrale.



**Figure 53 :** Culture et observation microscopique après coloration de Gram ( $\times 1000$ ) d'ISO4

Les tests biochimiques effectués sur les isolats 1 et 4 sont présentés dans le tableau X ci-après. Les résultats des différentes réactions montrent que ces isolats ne possèdent pas d'uréase ni de tryptophanase mais réduisent le nitrate en nitrite.

**Tableau X :** Résultats des tests biochimiques des isolats 1 et 4

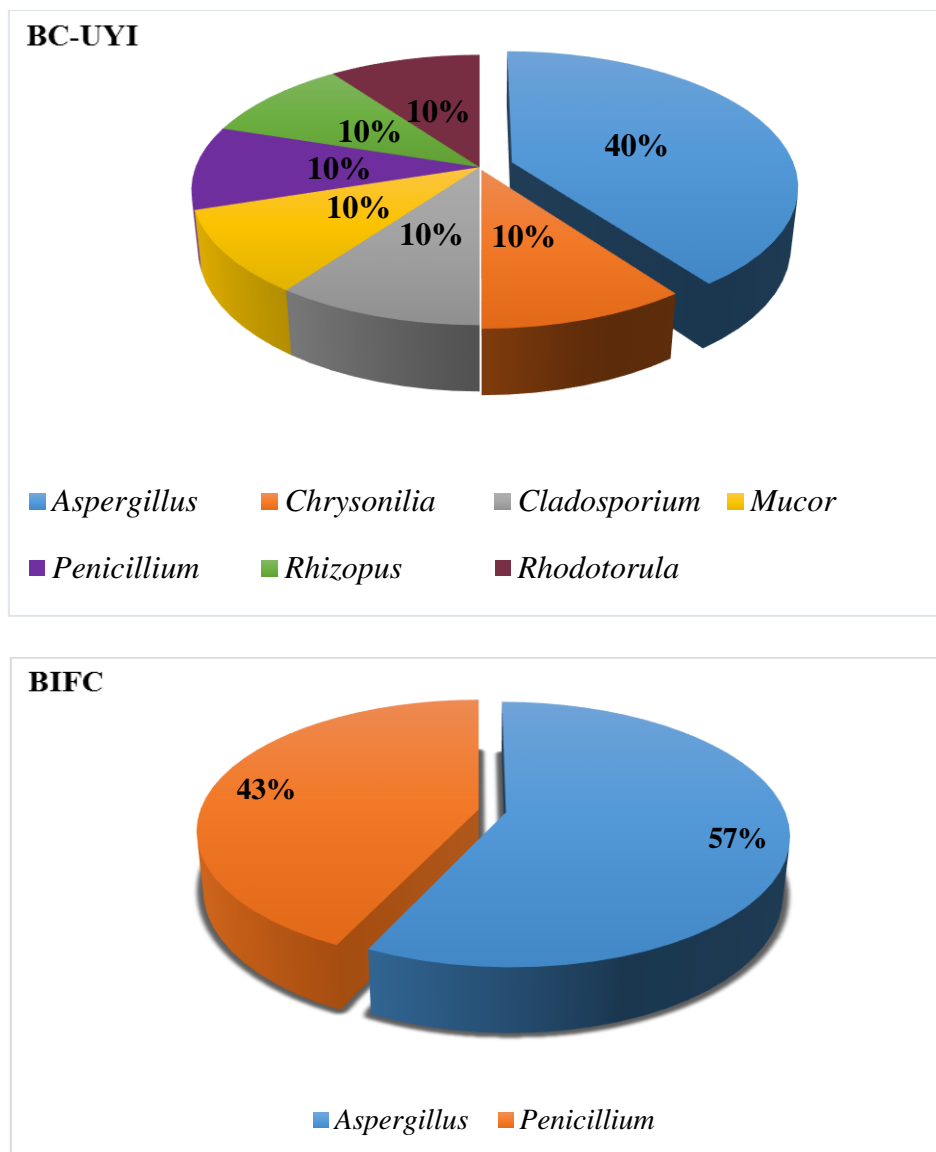
Isolats	ONPG	CIT	H <sub>2</sub> S	UREE	TDA	IND	GLU	MAN	OX	Nitrate	Germes présumés
ISOBL 1	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Bacillus mycoides</i>
ISOBL 4	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus subtilis</i>

\*Legende : ONPG : OrthoNitroPhényl-  $\beta$ D Galactopyranosidase ; CIT: Citrate; TDA: Tryptophane Désaminase ; IND: Indole ; GLU: Glucose ; MAN: Manitol ; (+): Réaction positive ; Réaction négative ;(/): Non déterminé

### I.3.3.2. Identification phénotypique des isolats fongiques sur les livres

À l'issue de l'examen microscopique d'un fragment de colonie de chaque isolat fongique obtenu, 7 genres de champignons ont été identifiés dans la BC-UYI dont 6 genres de moisissures en l'occurrence *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chrysonilia*, *Penicillium*, *Mucor* et *Rhizopus* ; 1 genre de levure à savoir *Rhodotorula*. Sur les livres de la BIFC, seul les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été retrouvés.

La figure 54 ci-dessous présente la fréquence des isolats fongiques identifiés. On constate de part cette figure que le genre *Aspergillus* (40 %) est le plus fréquent sur les livres de la BC-UYI par contre, sur les livres de la BIFC, le genre *Penicillium* (57 %) est prédominant.



\*Legende : BC-UYI : Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I ; BIFC : Bibliothèque de l'Institut Français du Cameroun

**Figure 54** : Fréquences des champignons identifiés sur les livres de la BC-UYI et de la BIFC.

Nous présentons ici les images des aspects macroscopiques et microscopiques qui nous ont permis d'identifier certains de ces isolats. Les figures 55, 56, 57, 58 et 59 présentent les aspects macroscopiques et microscopiques d'ISOFL 8, ISOFL 5, ISOFL 1, ISOFL 10 et ISOFL 7 respectivement.

#### ➤ Description ISOFL 8

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies veloutées avec des mycéliums aériens blancs à l'endroit et brun à rouge pourpre à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** On note la présence d'une tête aspergillaire en colonne fixée sur un conidiophore non septé. Ce caractère oriente vers l'espèce *Aspergillus sp.*



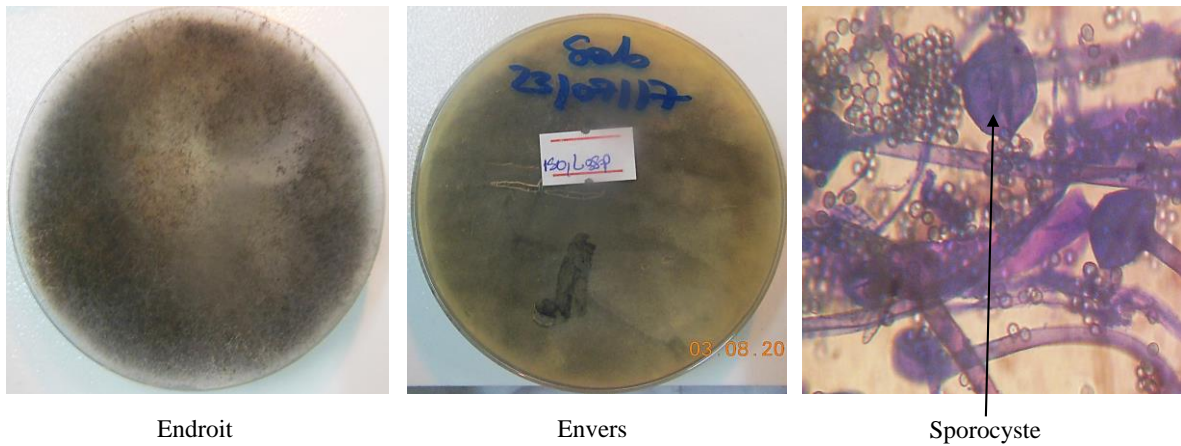
**Figure 55 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) d'*Aspergillus sp*

#### ➤ Description ISOFL 5

**Observation macroscopique :** Les colonies laineuses grises à l'endroit et noir à l'envers sur milieu Sabouraud+ Chlo.

**Observation microscopique :** On observe après coloration au bleu coton des sporocystes globuleuses à columelle large et arrondie, avec des spores allongées. Le filament portant le sporocyste est simple. Ces caractéristiques orientent vers le genre *Rhizopus*.





**Figure 56 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Rhizopus sp*

➤ **Description ISOFL 1**

**Observation macroscopique :** Les colonies présentent des mycéliums aériens gris à l'endroit et marron à l'envers ; de texture duveteuse et envahissant toute la gélose Sab + Chlo.

**Observation microscopique :** l'observation de la culture permet d'observer des sporangiophores simples, sans rhizoïdes. Ces caractéristiques observées orientent vers le genre *Mucor*.

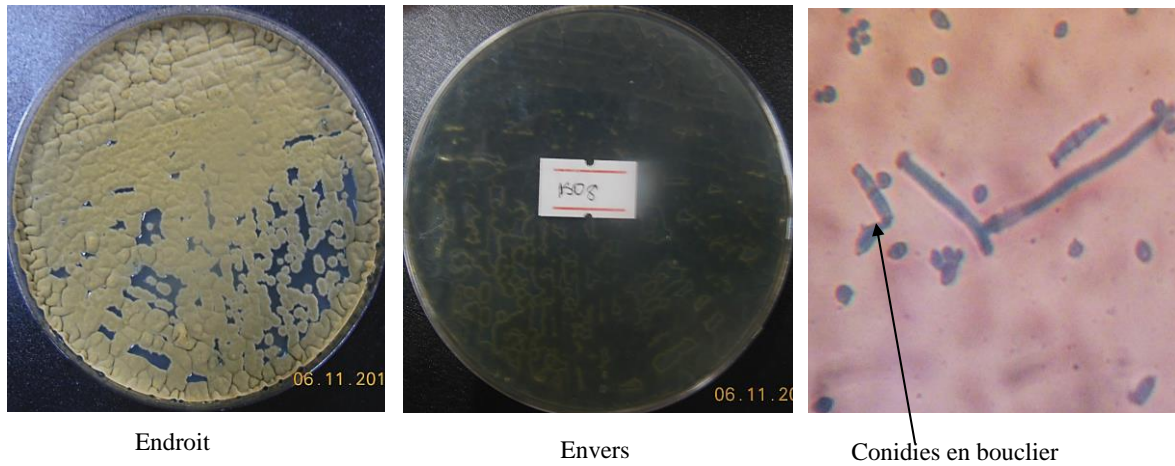


**Figure 57 :** Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Mucor sp*

➤ **Description ISOFL 10**

**Observation macroscopique :** L'isolat présente des colonies vert foncé à noire à l'endroit et sombre à l'envers sur milieu Sab + Chlo.

**Observation microscopique** : l'examen direct de la culture au bleu coton montre des conidies en bouclier, ramifiées sur des conidiophores. Ces caractéristiques observées orientent vers le genre *Cladosporium*



**Figure 58** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Cladosporium sp*

➤ **Description ISOFL 7**

**Observation macroscopique** : L'isolat présente des colonies roses, rondes et luisantes aux bords réguliers, légèrement surélevés sur milieu Sabouraud+ Chlo.

**Observation microscopique** : Elle présente des levures ovoïdes, allongées ne présentant pas de pseudomycelium. Ces caractéristiques orientent vers le genre *Rhodotorula*.



**Figure 59** : Aspect macroscopique et microscopique (x400) de *Rhodotorula sp*

## I.4. Rendement d'extraction et composition chimiques des huiles essentielles et des combinaisons

### I.4.1. Caractéristiques physiques et rendement d'extraction des huiles essentielles

Au terme des extractions, les HEs ont été pesées et les rendements d'extraction déterminés en rapportant la masse de l'HE à celle du matériel végétal hydrodistillé. Les valeurs obtenues sont mentionnées dans le tableau XI ci-dessous ainsi que la partie végétale utilisée pour le processus d'hydrodistillation. Il ressort que le rendement d'extraction varie d'une plante à l'autre avec des valeurs comprises 0,047 pour l'HE de *Mentha sp cf piperita* à 1,70 pour l'HE d'*Eugenia caryophylla*.

**Tableau XI** : Caractéristiques physiques et rendement d'extraction des huiles essentielles

HEs	<i>Cananga odorata</i>	<i>Eugenia caryophylla</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Mentha sp cf piperita</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Citrus sinensis</i>
Partie utilisée	Fleurs	Boutons floraux	Feuilles fraîches	Feuilles fraîches	Feuilles fraîches	péricarpe
Rendement	0,22	1,70	0,282	0,047	0,471	0,92

### I.4.2. Compositions chimiques des huiles essentielles

Après analyse de la composition chimique des différentes HEs, les résultats ont été consignés dans le tableau XII ci-dessous.

27 composés ont été identifiés dans l'HE de *Cananga odorata* représentant un pourcentage de 99,1 %, les composés majoritaires étant le linalol (49,1 %), germacrène D (12,4 %), le benzoate de benzyl (8,0 %) et le méthyl- p- anisole (7,6 %). Pour l'HE de *Mentha sp cf pipérta*, 24 composés ont été identifiés représentant un pourcentage de 98,1 %, avec pour composés majoritaires la pipéritone (50,7 %),  $\beta$ -phéllandrène (20,9 %) et l'acetate de menthyl (19,3 %). Pour l'HE d'*Eugenia caryophylla*, 9 composés ont été identifiés représentant un pourcentage de 94,0 %, avec pour composés majoritaires l'eugénol (70 %), l'acetate d'eugénol (16,2 %) et le  $\beta$ -caryophyllène (5,2 %). Pour l'HE de *Citrus sinensis*, 12 composés ont été identifiés représentant un pourcentage de 96,1 %, le limonène a été le composé majoritaire avec un pourcentage de 88,2 %. 22 composés ont été identifiés dans l'HE d'*Eucalyptus globulus* représentant 99,3% d'identification. L' $\alpha$ -pinène (49,3 %), l'eucalyptol ou 1.8-cinéole (23,0 %) et l' $\alpha$ -terpinéol (5,7%) étaient les composés majoritaires. Pour l'HE de *Cymbopogon citratus*,

23 composés ont été identifiés représentant un pourcentage de 97,5 %. Le géraniol (33,8 %), le néral (23,8 %), le nérol (8,5 %) et le géraniol (7,3 %) étaient les composés majoritaires.

**Tableau XII** : Composition chimique des huiles essentielles.

Composés	IRL	Pourcentage (%)					
		<i>Cananga odorata</i>	<i>Mentha cf. sp. piperita</i>	<i>Eugénia caryophylla</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
$\alpha$ -Pinène	940	-	0,6	-	0,5	49,3	2,4
Camphène	943	-	-	-	-	2,6	0,3
Benzaldehyde	963	0,1	-	-	-	-	1,8
Sabinène	967	0,2	-	-	0,2	0,3	-
$\beta$ -Pinène	985	-	0,7	-	-	0,3	1,0
Myrcène	995	0,1	1,4	-	1,2	-	6,9
$\alpha$ -Terpinène	1011	-	-	-	-	0,6	-
<i>p</i> -Methyl anisole -	1029	7,6	-	-	-	-	-
Limonène	1036	-	-	-	88,2	-	-
$\beta$ -Phéllandrène	1038	-	21,0	-	-	-	-
Eucalyptol	1041	-	-	-	-	23,0	-
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimène	1042	0,1	-	0,2	-	-	-
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1049	0,1	0,2	-	-	-	0,3
Hydrate de sabinène	1062	-	0,1	-	-	-	-
Terpinolène	1075	-	-	0,2	-	0,4	1,0
<i>p</i> -Cyménène	1090	-	-	-	-	0,6	-
<i>trans</i> -Sabinène hydrate	1094	-	-	-	-	-	1,3
Linalool	1103	49,1	-	-	1,3	3,0	1,5
$\beta$ -Thujone	1115	-	-	-	0,3	-	-
<i>exo</i> -Fenchol	1119	-	-	-	-	2,2	-
$\alpha$ -Campholénal	1128	-	-	-	-	0,4	-
<i>cis</i> -Pinène hydrate	1139	-	0,3	-	-	-	-
Camphre	1144	-	-	-	-	-	0,8
Eucarvone	1145	-	-	-	-	2,1	-
Citronellal	1151	-	-	-	1,8	-	0,3
Pinocarvone	1160	-	-	-	-	0,4	-
Bornéol	1164	-	-	-	-	0,4	1,2
<i>p</i> -Mentha-1,5-dièn-8-ol	1168	-	0,4	-	-	-	-
Menthol	1170	-	0,3	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1183	0,3	-	-	-	4,2	2,3
$\alpha$ -Terpinéol	1186	0,3	-	-	-	5,7	-
Salicylate de méthyl	1192	0,6	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Carvéol	1220	-	-	-	0,7	-	-
Citronellol	1229	0,2	-	-	-	-	-
Nérol	1238	-	-	-	0,3	-	8,5
Néral	1262	-	-	0,4	0,6	-	24,0
Géraniol	1271	1,5	-	-	-	-	7,3

Pipéritone	1276	-	50,7	-	-	-	-
Géranial	1279	-	-	-	-	-	33,8
(E)-Anéthol	1283	0,2	-	-	-	-	-
Acétate de <i>trans</i> -sabinyle	1289	-	-	0,5	-	-	-
Acétate de menthyl	1293	-	19,3	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1305	-	-	-	0,7	-	-
Acétate de $\alpha$ -terpenyle	1344	-	0,1	-	-	-	-
Acétate de citronellyle	1352	-	-	-	0,3	-	-
Eugenol	1361	-	-	70,0	-	-	-
1-Undécanol	1372	-	0,3	-	-	-	-
$\alpha$ -Copaène	1371	-	-	-	-	0,3	-
Acétate de géranyl	1378	4,1	-	-	-	-	1,3
$\beta$ -Cubébène	1391	-	0,2	-	-	-	0,3
$\beta$ -Caryophyllène	1419	-	-	-	-	0,3	0,2
$\beta$ -Ylangène	1424	2,4	-	-	-	-	-
Acétate de cinnamyle	1436	0,2	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulène	1446	-	0,7	-	-	0,6	-
<i>trans</i> - Propanoate de carvyl	1447	-	0,3	-	-	-	-
$\gamma$ -Muuroène	1456	1,0	0,1	-	-	-	-
Germacrène- D	1484	12,4	1,0	-	-	-	0,5
$\gamma$ -Amorphène	1486	-	0,2	-	-	-	-
$\alpha$ -Muuroène	1497	2,5	0,1	5,2	-	0,3	-
$\gamma$ -Cadinène	1510	0,2	-	0,7	-	-	-
$\delta$ -Cadinène	1521	1,0	0,1	-	-	-	0,2
$\alpha$ -Cadinène	1536	-	-	-	-	0,3	-
Acétate d'eugénol	1537	-	-	16,2	-	-	-
Oxyde de caryophyllène	1587	0,5	0,1	-	-	-	-
Acetyl naphthalène	1597	-	-	0,6	-	-	-
10- <i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol	1619	-	0,1	-	-	2,0	-
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	1640	1,0	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cadinol	1653	2,1	-	-	-	-	-
(E,E)-Farnésol	1706	2,6	-	-	-	-	-
Benzoate de benzyle	1766	8,0	-	-	-	-	-
Acétate de (E,E)-farnesyle	1812	0,7	-	-	-	-	-
<b>Total %</b>		99,1	98,1	94,0	96,1	99,3	97,3

\*Légende : IRL : Indice de Retention Linéaire

### I.4.3. Compositions chimiques des combinaisons

Le tableau XIII Représente les résultats de la composition chimique des différentes formulations. Il en ressort que l'Essai 1 qui est constitué de 50 % d'HE d'*Eugenia caryophylla* a présenté pour composés majoritaires, l'eugénol 45,3 % ; le carvone 14,8 % et le linalol 9,2 %. L'Essai 2 constitué de 50 % d'HE de *Cymbopogon citratus* avait pour composés majoritaires le géraniol 28,0 % ; le néral 25,3 % et le linalol 8,8 %. L'Essai 3 constitué de 50 % d'HE de *Cananga odorata* avait pour composés majoritaires le linalol 35,8 % ; le carvone 14,8 % et le néral 7,0 %. L'Essai 4 qui est constitué de 50 % d'HE d'*Eucalyptus globulus* a présenté pour composés majoritaires, l'eugénol 14,5 % ; le linalol 11,7 % ; le carvone 11,4 % et le néral 9,4 %. L'Essai 5 qui est constitué de 50 % d'HE de *Mentha* sp cf *piperita* a présenté pour composés majoritaires, le carvone 44,3 % et le limonène 11,8 %. L'Essai 6 qui est constitué de 50 % d'HE de *Citrus sinensis* a présenté pour composés majoritaires, le limonène 23,8 % et le Carvone 24,2 %

**Tableau XIII** : Composition chimique des formulations.

Composés	IRL	Pourcentage (%)					
		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
$\alpha$ -pinène	933	1.4	1.6	0.9	6.7	4.5	4.7
Camphène	948	-	0.1	0.1	0.5	0.2	0.3
Menhyl-5-hepten-2-one	970	0.3	-	0.1	1.1	1.7	0.1
Myrcène	985	0.9	5.4	1.2	-	-	1.4
<i>p</i> -Méthylanisole	1017	0.9	0.8	2.5	0.4	0.8	-
Limonène	1028	3.8	3.5	2.1	5.5	11.8	23.8
Eucalyptol	1041	-	0.1	-	-	2.8	0.3
Oxyde de linalool	1068	-	-	0.1	-	0.2	-
Linalool	1101	9.2	8.8	37.8	11.7	7.5	6.5
<i>p</i> -Mentha-1,5-dièn-8-ol	1118	0.3	0.3	-	1.4	-	-
Bornéol	1138	0.2	0.3	-	2.9	0.8	1.5
$\alpha$ -Terpinène	1165	0.4	0.6	0.6	3.8	1.1	1.3
Carvéol	1188	0.9	0.4	1.5	1.8	-	1.9
Géraniol	1222	1.1	28.0	1.4	11.8	-	5.8

Carvone	1246	14.8	4.7	14.8	11.4	44.3	24.2
Néral	1267	5.2	25.3	7.0	9.3	5.0	4.4
Eugénol	1373	45.3	6.9	4.8	14.5	8.9	10.5
Acétate de géranyle	1379	-	1.0	2.4	1.1	0.7	-
$\alpha$ -Copaène	1405	-	0.1	-	-	-	-
$\beta$ -Caryophyllène	1428	6.0	1.6	2.1	2.8	1.8	1.2
Acetate de cinnamyle	1443	-	-	0.3	-	-	-
$\alpha$ -Humulène	1457	0.8	0.3	0.7	0.8	0.2	-
Germacrène-D	1483	1.2	0.5	4.5	1.3	0.4	0.5
Acétate d'eugénol	1522	2.5	0.6	1.0	1.0	1.0	0.6
$\alpha$ -Cadinène	1528	-	-	1.1	-	-	-
Oxyde de caryophyllène	1587	1.1	0.4	-	0.6	0.3	0.6
Copalène	1619	-	0.3	-	-	-	-
Muurolol	1652	-	0.3	1.1	-	0.3	0.3
Farnésol	1707	-	0.3	1.8	-	0.3	0.3
<b>Total %</b>		96.3	92.2	89.9	90.8	94.6	89.9

\*Légende : IRL : Indice de Retention Linéaire

Les différentes formulations étant constituées de l'ensemble d'huiles essentielles à des proportions variées, nous avons estimé judicieux de faire ressortir un récapitulatif des composés majoritaires des huiles essentielles individuelles et de les comparer avec les composés majoritaires des formulations ainsi que leurs pourcentages. Le tableau XIV Ci-dessous représente ce récapitulatif. Il en ressort que, les proportions des composés majoritaires dans les essais diminuent comparées aux huiles essentielles individuelles. On note par exemple dans l'Essai 1 constitué de 50 % d'HE d'*Eugenia caryopylla* un pourcentage en Eugénol (composé majoritaire) de 45,3 %, par contre ce pourcentage est de 70 % dans l'HE d'*Eugenia caryopylla*. De même, le pourcentage en géranyol passe de 33,8 % dans l'HE de *Cymbopogon citratus* à 28 % dans l'essai 2 constitué de 50 % d'HE de *Cymbopogon citratus*. On note aussi dans certains cas une augmentation des proportions de certains composés majoritaires. Le néral par exemple est passé de 24 % dans l'HE de *Cymbopogon citratus* à 25,3 % dans l'Essai 2. La proportion de linalool est passée de 1,3 % dans l'HE de *Citrus sinensis* à 6,5 % dans l'Essai constitué de

50 % d'HE de *Citrus sinensis*. Le tableau XIV nous présente également le carvone, un composé nouveau présent dans tous les Essais et absent dans les HEs individuelles. Dans l'Essai 5 composé de 50 % d'HE de *Mentha* cf *pipèrita*, le composé majoritaire retrouvé a été le carvone 44,3 % qui semble avoir substitué la pipéritone présente dans l'HE de *mentha* sp cf *pipèrita* et absente dans l'Essai 5.

**Tableau XIV** : Tableau comparatif des composés majoritaires et pourcentages des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles.

HEs	Composés majoritaires	Pourcentage %	Combinaisons	Composés majoritaires	Pourcentage %
<i>Eugenia caryophylla</i>	Eugénol	70	<b>Essai 1</b>	Eugénol	45,3
	Acétate d'eugénol	16,2		Carvone	14,8
	$\beta$ -Caryophyllène	5,2		Linalol	9,2
		$\beta$ -Caryophyllène		6	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Géranial	33,8	<b>Essai 2</b>	Géranial	28
	Néral	24		Néral	25,3
	Nérol	8,5		Linalol	8,8
	Géranol	7,3		Eugénol	6,9
	Terpinen-4-ol	2,3		Carvone	4,7
	Camphore	1,2			
<i>Cananga odorata</i>	Linalol	49,1	<b>Essai 3</b>	Linalol	35,8
	Germacrène D	12,4		Carvone	14,8
	Benzoate de benzyle	8		Néral	7
	p-Méthyle anisole	7,6			
<i>Eucalyptus globulus</i>	$\alpha$ -Pinène	35,6	<b>Essai 4</b>	Eugénol	14,5
	Eucalyptol	16,6		Géranial	11,8
	$\alpha$ -Terpinéol	5,7		Linalol	11,7
	Terpinène-4-ol	4,2		Carvone	11,4
	Linalol	3		Néral	9,3
<i>Mentha</i> sp cf <i>pipèrita</i>	Pipéritone	50,7	<b>Essai 5</b>	Carvone	44,3
	$\beta$ -Phéllandrène	21		Limonène	11,8
	Acétate de méthyle	19,3		Eugénol	8,9
	Myrcène	1,5		Linalol	7,5
<i>Citrus sinensis</i>	Limonène	88,2	<b>Essai 6</b>	Carvone	24,2
	Citronellal	1,8		Limonène	23,8
	Linalool	1,3		Eugénol	10,5
	Myrcène	1,2		Linalol	6,5

### I.5. Résultat de l'évaluation de la formation de biofilm *in vitro* par les isolats bactériens

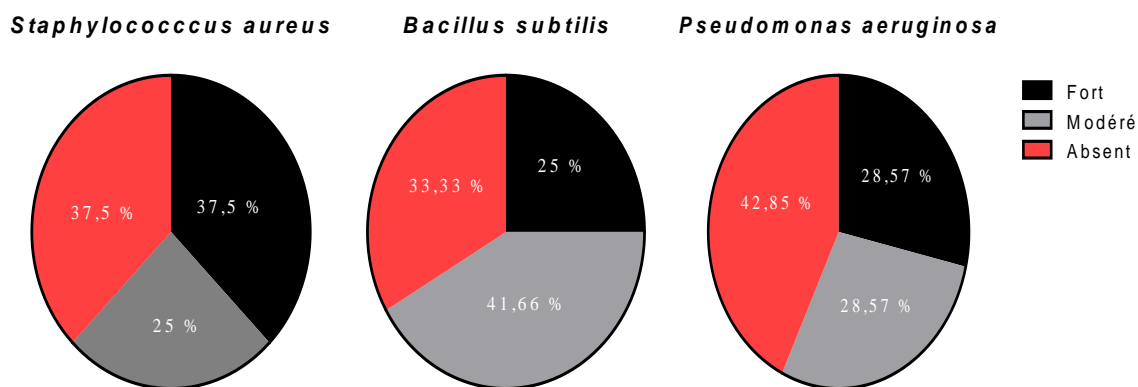
L'évaluation de l'aptitude des isolats à former les biofilms a été réalisée sur les isolats bactériens choisis pour la réalisation des tests antimicrobiens. Il s'agit de 12 isolats de *Bacillus subtilis*, 8 isolats de *Staphylococcus aureus* et 7 isolats de *Pseudomonas aeruginosa*.



La capacité des souches à former un biofilm a été évaluée par deux méthodes différentes, la méthode qualitative RCA et la méthode quantitative TCP.

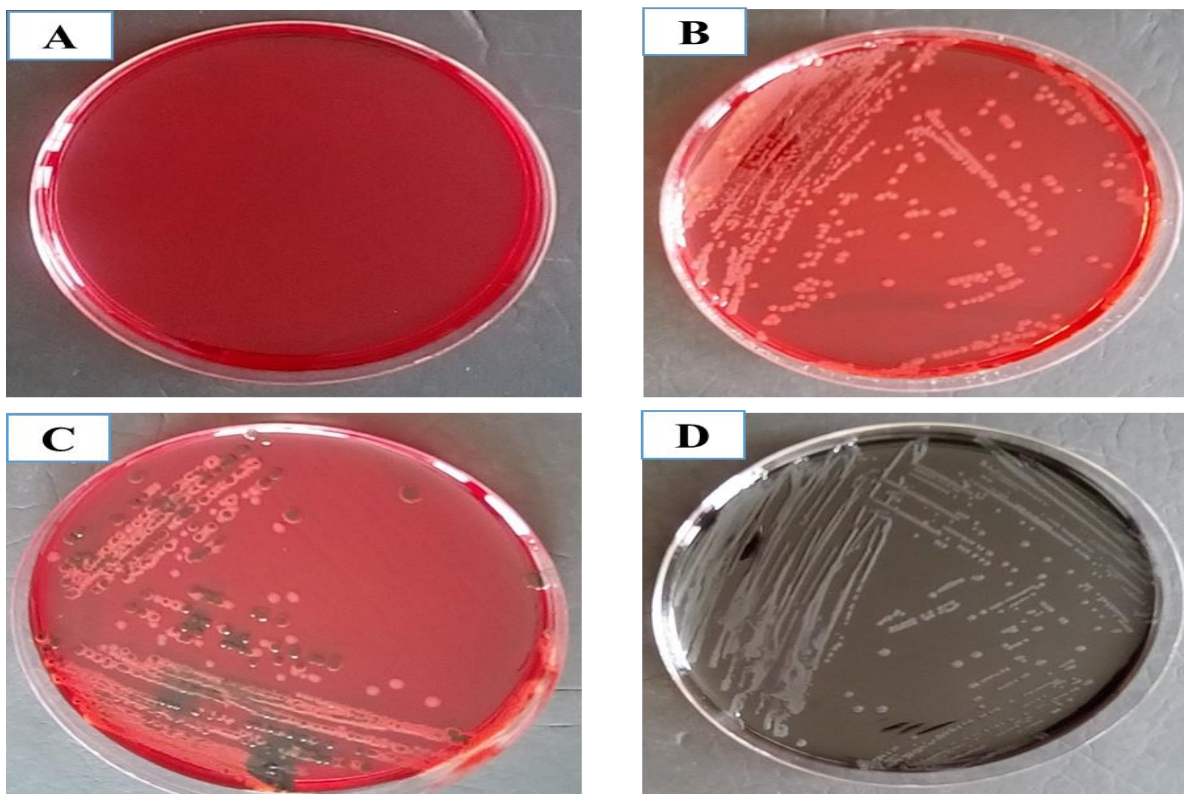
### I.5.1. La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La recherche de la production de slime par la méthode de RCA (Figure 60) a révélé que sur 12 isolats de *B. subtilis*, 03 étaient fortement formateurs de biofilms (25 %), 05 étaient moyennement formateurs de biofilms (41,66 %) et 04 isolats étaient non formateurs de biofilms (33,33 %). Sur 08 isolats de *S. aureus*, 03 étaient fortement formateurs de biofilms (37,5 %), 03 étaient moyennement formateurs de biofilms (37,5 %) et 02 isolats étaient non formateurs de biofilms (25 %). Sur 07 isolats de *P. aeruginosa*, 02 étaient fortement formateurs de biofilms (28,57 %), 02 étaient moyennement formateurs de biofilms (28,57 %) et 03 isolats étaient non formateurs de biofilms (42,85 %).



**Figure 60** : Formation de biofilms par la méthode RCA

La figure 61 ci-après montre l'aspect des colonies formatrices et non formatrices de biofilms sur milieu Rouge Congo Agar. En A nous avons l'aspect du milieu RCA coulé en boîte de Pétri, les colonies non formatrices de biofilms représentées en B ont une coloration rouge, les colonies intermédiaires ou moyennement formatrices de biofilms ont un centre noir et des contours rouges et les colonies fortement formatrices de biofilms quant à elles ont une coloration noir sur milieu RCA.



A : Milieu RCA ; B : Non formatrice de slime ; C : Formation intermédiaire D : Fortement formatrice de slime

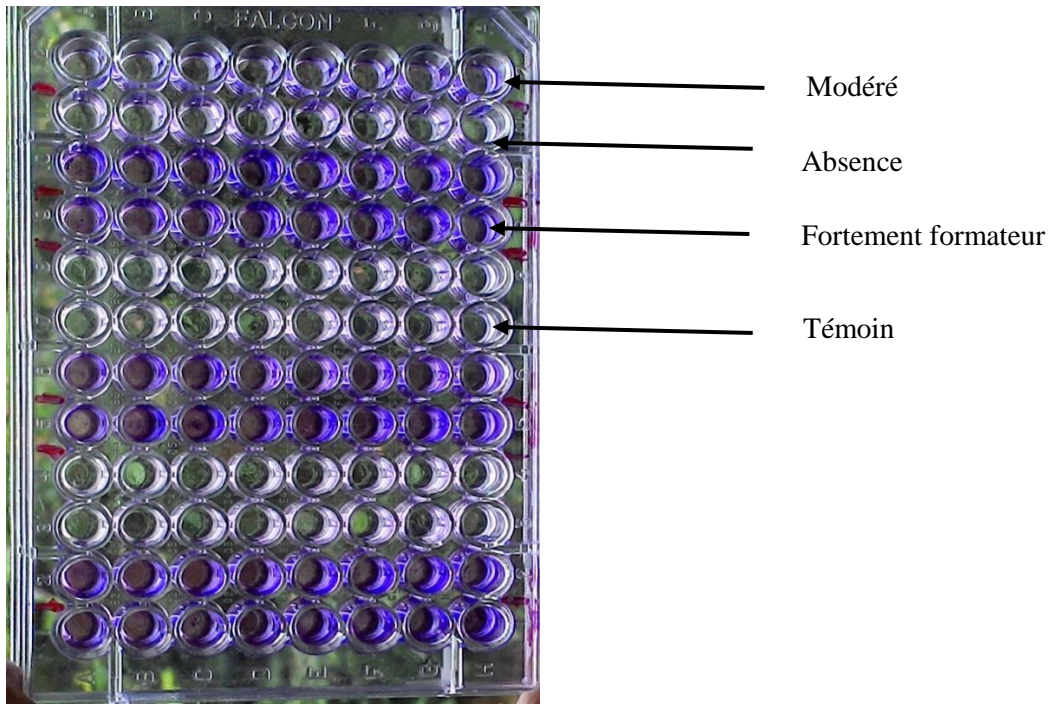
**Figure 61** : Production de slime par *Staphylococcus aureus* sur milieu rouge congo agar

### I.5.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

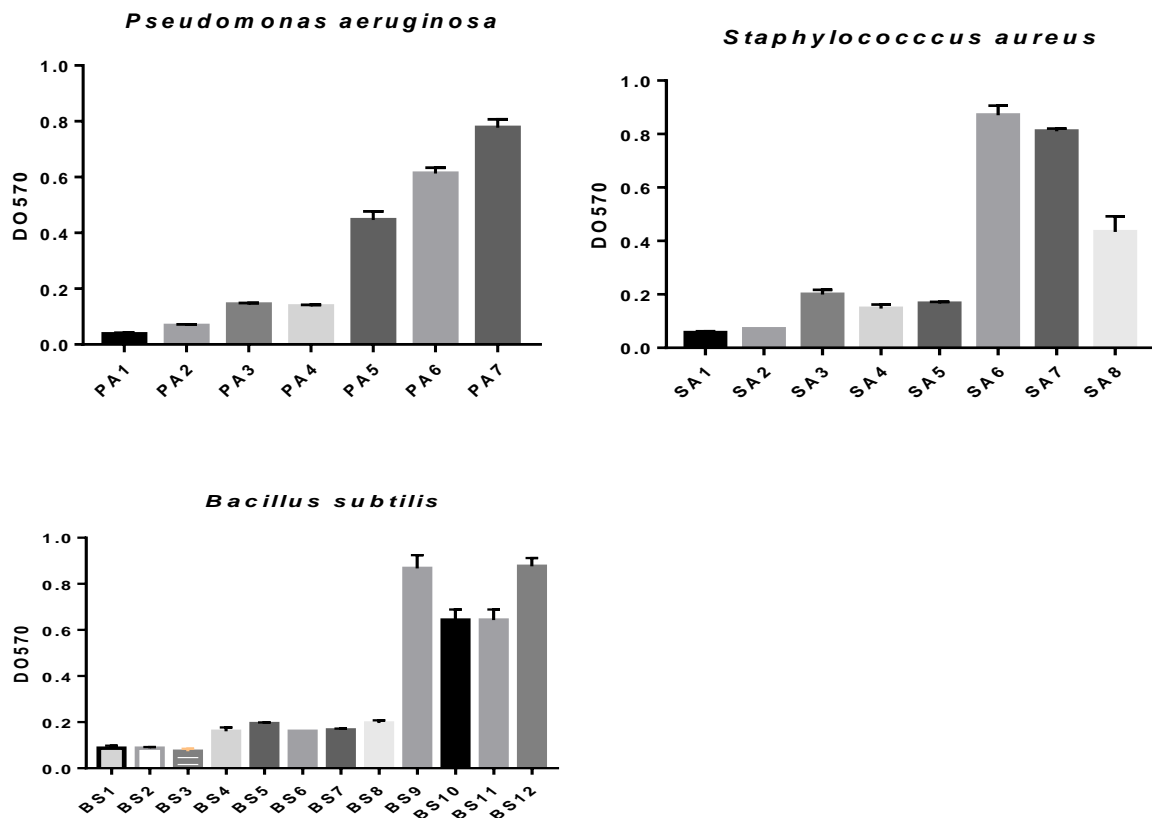
La détermination quantitative de la formation de biofilm par les différents isolats utilisés a été réalisée par la technique sur microplaques TCP. Après 24 heures d'incubation à 37 °C sur polystyrène, la formation des biofilms a été exprimée en absorbances mesurées à 570 nm du colorant incorporé par les cellules formant des biofilms. Avec des valeurs de  $DO_{570}$  (moyenne, écart-type) qui varient entre  $0,04 \pm 0,0$  et  $0,87 \pm 0,03$ .

La figure 63 montre que trois isolats de *S. aureus* étaient fortement formateurs de biofilm, deux moyennement formateurs et trois non formateurs de biofilms. Pour les isolats de *B. subtilis*, 4 étaient fortement formateurs de biofilm, 5 moyennement formateurs et 3 non formateurs de biofilms. Concernant *P. aeruginosa*, 2 isolats étaient fortement formateurs de biofilm, deux moyennement formateurs et trois non formateurs de biofilms.

La figure 62 nous présente l'aspect des biofilms formés en microplaque après coloration au cristal violet.



**Figure 62** : Photographie de la formation de biofilm sur microplaque



\*Legende : PA : *Pseudomonas aeruginosa* ; SA : *Staphylococcus aureus* ; BS : *Bacillus subtilis*

**Figure 63** : Formation de biofilm par la méthode TCP

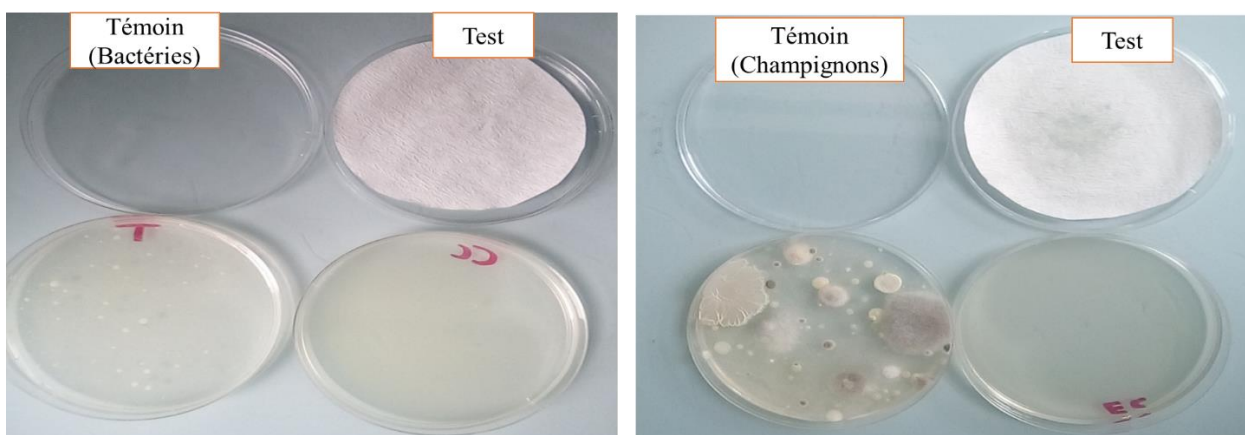
## I.6. Résultats de l'activité antimicrobienne

Dans cette partie, il a été question de démontrer une activité de base bactéricide, ou fongicide et sporicide des HEs tel que recommandé par la norme française ISO 782 sans tenir compte des conditions d'usage.

Pour se faire, l'effet des HEs obtenues à partir de six plantes issues de la pharmacopée Camerounaise a été évalué sur les trois isolats bactériens les plus représentés dans la BC-UYI et la BIFC à savoir : *B. subtilis* ; *S. aureus* et *P. aeruginosa* (chacun de ces isolats ayant présenté une forte capacité à former des biofilms), ainsi que sur deux moisissures (*Aspergillus niger* et *Penicillium sp*) et une levure (*Candidat albicans*).

### I.6.1. Effet des huiles essentielles sur les microorganismes après prélèvement direct

Après la mise en contact des microorganismes prélevés de la BC-UYI par tapotage des poussières et par sédimentation au contact des HEs en phase vapeur et liquide, on a noté un effet inhibiteur des huiles essentielles sur le développement des microorganismes. En effet, les boîtes de Pétri exposées aux huiles essentielles ont présentés dans la plupart des cas une inhibition complète de la croissance des bactéries et des champignons contrairement aux boîtes témoin où la croissance était normale. La figure 64 illustre le résultat obtenu pour cette expérience. Les boîtes de Pétri à gauche représentent les boîte témoin où on a prélevé les microorganismes puis incubé sans les exposer aux HEs, on observe une croissance normale des microorganismes. Les boîtes à droite représentent les boîtes test où après prélèvement, les microorganismes ont été exposés à l'HE de *Cymbopogon citratus*. Dans ce cas on note une inhibition complète de la croissance des microorganismes qui se sont déposés dans la boîte de Pétri.



**Figure 64** : Effet des HEs en phase vapeur et en phase liquide sur les microorganismes de la BC-UYI après prélèvement direct

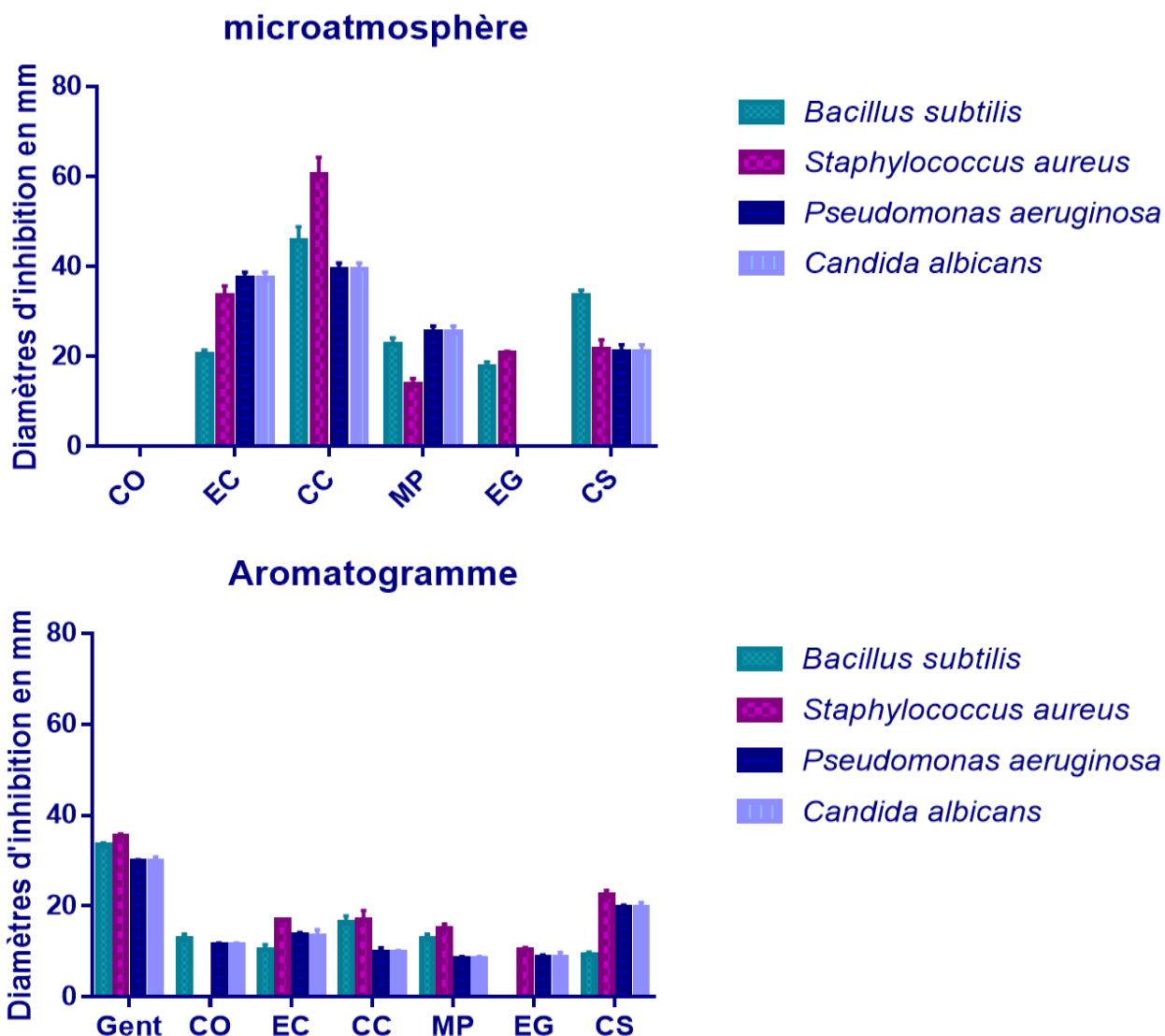
## I.6.2. Sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles

L'évaluation de la sensibilité des HEs sur *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* a été faite par deux méthodes : la méthode de microatmosphère, pour mettre en évidence l'effet inhibiteur de la fraction volatile des HEs et par la méthode d'aromatogramme pour mettre en évidence l'effet inhibiteur de la fraction liquide des HEs. Le pouvoir antimicrobien des HEs a été obtenu par la mesure du diamètre d'inhibition en (mm). L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al (2009)**. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (d) en cinq classes :

- Très fortement inhibitrice  $d \geq 30$
- Fortement inhibitrice  $21 \text{ mm} \leq d \leq 29 \text{ mm}$
- Modérément inhibitrice  $16 \text{ mm} \leq d \leq 20 \text{ mm}$
- Légèrement inhibitrice  $11 \text{ mm} \leq d \leq 16 \text{ mm}$
- Non inhibitrice  $d \leq 10 \text{ mm}$

La figure 65 représente les résultats des tests de sensibilité en microatmosphère et en aromatoigramme. La présence de zones d'inhibition après incubation a révélé l'activité des HEs sur les microorganismes testés. Il a été noté qu'en microatmosphère, les zones d'inhibition allaient de  $0,0 \pm 0 \text{ mm}$  à  $60,33 \pm 4,04 \text{ mm}$ , alors que par la méthode des aromatoigrammes ces diamètres variaient de  $0 \pm 0 \text{ mm}$  à  $22,33 \pm 1,15 \text{ mm}$  pour les HEs et de  $29,66 \pm 0,57 \text{ mm}$  à  $35,33 \pm 0,57 \text{ mm}$  pour l'antibiotique de référence.

En microatmosphère, l'HE la plus active était celle de *C. citratus* avec des diamètres d'inhibition de  $35,33 \pm 3,05 \text{ mm}$  ;  $45,66 \pm 3,21 \text{ mm}$  et  $60,33 \pm 4,04 \text{ mm}$  sur *B. subtilis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* respectivement. L'HE la moins active était celle de *C. odorata* qui n'a présenté aucune activité sur tous les isolats utilisés. Par ailleurs, la méthode des aromatoigrammes a révélé que l'HE la plus active était celle de *C. sinensis* avec des diamètres de  $9,33 \pm 0,57 \text{ mm}$  ;  $22,33 \pm 1,15 \text{ mm}$  et  $19,66 \pm 0,57 \text{ mm}$  sur *B. subtilis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* respectivement.



\*Légende : Gent : Gentamicine ; CO : *Cananga odorata* ; EC : *Eugenia Caryophylla* ; CC : *Cymbopogon citratus* ; MP : *Mentha sp cf piperita* ; EG : *Eucalyptus globulus* ; CS : *Citrus sinensis*

**Figure 65** : Diamètres d'inhibition des HEs par les méthodes de microatmosphère et d'aromatogramme

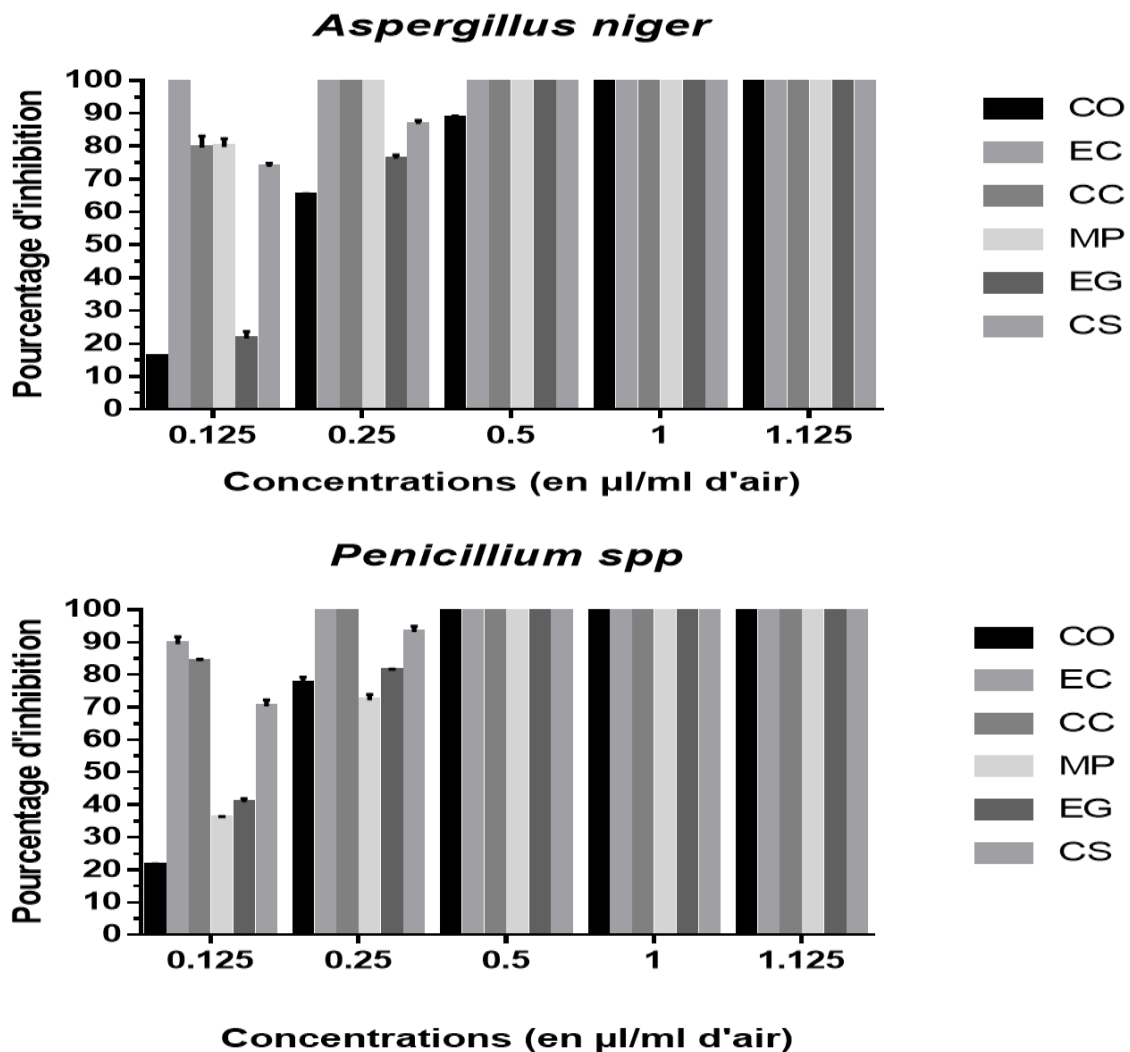
### I.6.3. Paramètres d'inhibition de la croissance radiale des moisissures

Ces tests ont été réalisés dans le but de déterminer les concentrations minimales d'HEs capables d'inhiber la croissance fongique dans un volume d'air précis (CMI). Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'air. La concentration minimal fongicide a été déterminée par transfert des disques mycéliens à partir des boîtes de Pétri ou l'inhibition est complète dans un nouveau milieu Sabouraud dépourvu d'HEs.

### I.6.3.1. Pourcentages d'inhibition

La figure 66 représente les Pourcentages d'inhibition (moyenne  $\pm$  écart type\*) de la croissance mycélienne d'*A. niger* et *Penicillium sp* en fonction de la concentration des HEs.

Les résultats reportés dans la figure 66 montrent que toutes les HEs testées ont inhibé complètement la croissance mycélienne de *penicillium sp* et d'*A. niger* à la CMI égale à 0,5  $\mu$ L/mL d'air (10  $\mu$ L/disque) mis à part l'HE de *C. odorata* qui a présenté un pourcentage d'inhibition de  $88.40 \pm 0.24$  sur *Aspergillus niger* à cette concentration.



\*Légende : CO : *Cananga odorata* ; EC : *Eugenia Caryophylla* ; CC : *Cymbopogon citratus* ; MP : *Mentha sp cf piperita* ; EG : *Eucalyptus globulus* ; CS : *Citrus sinensis*

**Figure 66** : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des moisissures

### I.6.3.2. Paramètres d'inhibition de la croissance radiale des moisissures (CMI, CMF)

Les résultats de concentration minimal inhibitrice (CMI), et de concentration minimal fongicide ont été regroupés dans le tableau XV ci-après.

Les CMI de la croissance radiale des moisissures variaient de 0,125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  à 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  et les CMF de 0,125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  à 1,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . L'HE d'*Eugenia caryophylla* a présenté la meilleure activité avec les plus faibles concentrations inhibitrices sur les deux isolats fongiques testés.

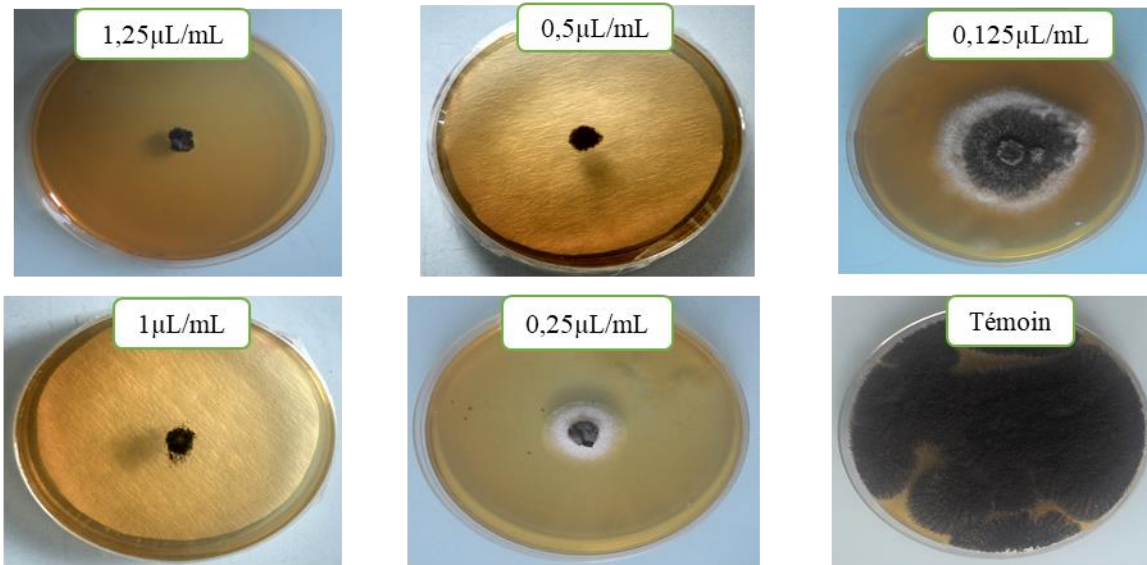
**Tableau XV** : Paramètres d'inhibition (CMI, CMF en  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'air) en microatmosphère

Huiles essentielles	Isolats	CMI (en $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air)	CMF (en $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air)
<i>Cananga odorata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1	ND
	<i>Penicillium sp.</i>	0.5	ND
<i>Eugenia caryophylla</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0.125	0.125
	<i>Penicillium sp.</i>	0.25	0.25
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0.25	0.5
	<i>Penicillium sp.</i>	0.25	0.25
<i>Mentha sp cf piperita</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0.5	1
	<i>Penicillium sp.</i>	0.5	1
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0.5	1
	<i>Penicillium sp.</i>	0.5	ND
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0.5	1.25
	<i>Penicillium sp.</i>	0.5	1.25

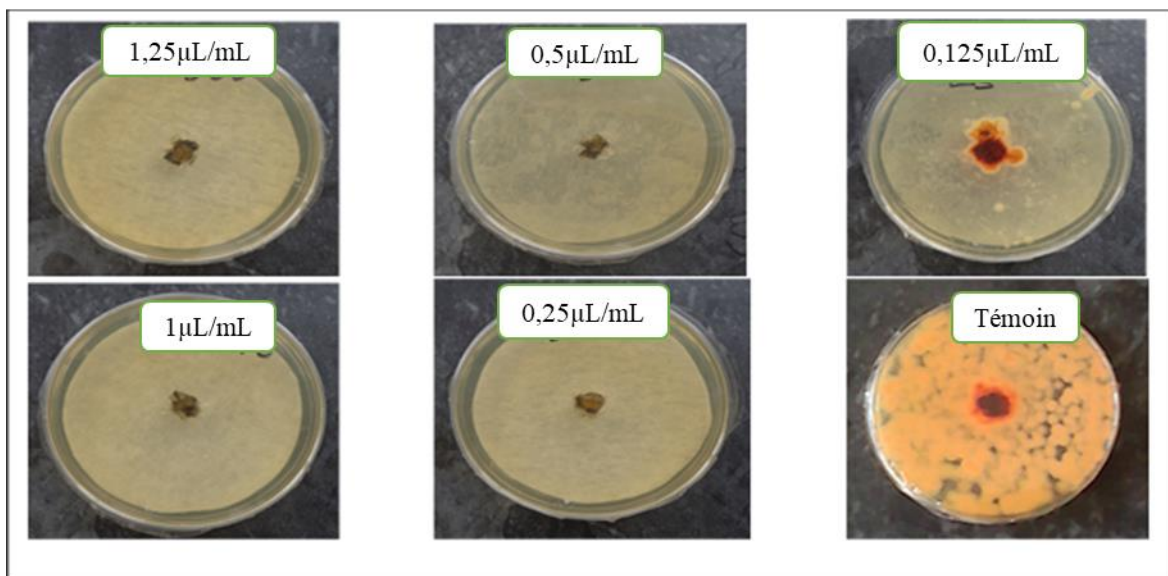
La figure 67 ci-dessous illustre les résultats observés lors de la détermination des paramètres d'inhibition en microatmosphère de l'HE de *Mentha sp cf piperita* sur *A. niger* et de l'HE de *Cymbopogon citratus* sur *penicillium sp.* On note sur cette image une inhibition complète de la croissance d'*A. niger* à partir de la concentration de 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'air (CMI). Cette concentration est de 0,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'air sur *penicillium sp.*



### *Aspergillus niger*



### *Penicillium spp*



**Figure 67** : Photographie pourcentage d'inhibition de l'HE de *Mentha sp cf pipérита* sur *A. niger* et de l'HE de *Cymbopogon citratus* sur *penicillium sp*

#### **I.6.4. Paramètres d'inhibition des HEs et des combinaisons en milieu liquide (CMI, CMB, CMF)**

Les paramètres d'inhibition d'HEs et des combinaisons pouvant inhiber la croissance des microorganismes isolés de la BC-UYI ont été déterminés sur les formes planctoniques (forme libre) des bactéries et des champignons et sur les formes sessiles (biofilm) des bactéries par la méthode de microdilution en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits.

#### **I.6.4.1. Paramètres d'inhibition (CMI, CMB, CMF) des huiles essentielles sur les cellules planctoniques**

En ce qui concerne les paramètres d'inhibition des HEs sur les cellules planctoniques, les résultats sont représentés dans le tableau XVI ci-après. Il ressort du tableau XVI que toutes les HEs testées ont présenté une activité sur l'ensemble des microorganismes utilisés avec des CMIs allant de 0,04 à 6,25 mg/mL sur les isolats bactériens. Ces concentrations allaient de 0,01 mg/mL à 0,03 mg/mL pour la Gentamicine<sup>®</sup>. Les HEs de *E. caryophylla*, *C. cinensis* et *C. citratus* ont présenté un effet bactéricide sur tous les isolats bactériens utilisés. Pour les isolats fongiques, les CMIs variaient de 0,04 à 6,25 mg/mL pour les HEs et étaient de 0,03 mg/mL pour la Nystatine<sup>®</sup> sur l'ensemble des isolats fongiques. Dans l'ensemble, l'HE d'*E. caryophylla* a présenté une meilleure activité sur les cellules planctoniques avec une bactéricidie absolue (CMI = CMB) sur l'ensemble des isolats bactériens et un effet fongicide sur les isolats fongiques testés.

#### **I.6.4.2. Paramètres d'inhibition (CMI, CMB, CMF) des combinaisons sur les cellules planctoniques**

Le tableau XVII ci-après représente les paramètres d'inhibition CMI, CMB et CMF des combinaisons sur les cellules planctoniques. Les CMIs variaient de 0,04 à 3,125 mg/mL pour les isolats bactériens et de 0,04 à 6,25 mg/mL pour les isolats fongiques. On note que les combinaisons d'HEs ont présenté une activité plus intéressante que les HE testées individuellement. La majorité des combinaisons ont montrés un effet bactéricide et fongicide caractérisé par les rapports CMB/CMI compris entre 1 et 2 ( $1 \leq \text{CMB/CMI} \leq 2$ ) pour les bactéries, résultat identique pour les champignons.

**Tableau XVI :** Paramètres d'inhibition des huiles essentielles sur les cellules planctoniques

Isolats microbiens	Paramètres d'inhibition (mg/mL)	Gentamicine®/ Nystatine®	<i>Cananga odorata</i>	<i>Eugenia caryophylla</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Mentha sp cf piperita</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Isolats bactériens</b>								
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>CMI</b>	0.03	6.25	0.39	0.19	1.56	0.78	0.39
	<b>CMB</b>	0.03	ND	0.39	0.19	3.125	6.25	0.78
	<b>CMB/CMI</b>	1	ND	1	1	2	8	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>CMI</b>	0.01	0.78	0.09	0.04	1.56	0.39	0.04
	<b>CMB</b>	0.01	3.125	0.09	0.04	3.125	1.56	0.09
	<b>CMB/CMI</b>	1	4	1	1	2	4	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>CMI</b>	0.03	6.25	0.39	0.39	6.25	0.78	0.39
	<b>CMB</b>	0.03	ND	0.39	0.78	ND	6.25	0.78
	<b>CMB/CMI</b>	1	ND	1	2	ND	8	2
<b>Isolats fongiques</b>								
<i>Candida albicans</i>	<b>CMI</b>	0.03	3.125	0.04	0.09	1.56	3.125	0.19
	<b>CMF</b>	0.03	ND	0.09	0.19	6.25	ND	0.78
	<b>CMF/CMI</b>	1	ND	2	2	4	ND	4
<i>Aspergillus niger</i>	<b>CMI</b>	0.03	6.25	0.19	0.39	3.125	1.56	0.39
	<b>CMF</b>	0.03	ND	0.39	0.39	6.25	12.5	1.56
	<b>CMF/CMI</b>	1	ND	2	1	2	8	4
<i>Penicillium sp</i>	<b>CMI</b>	0.03	6.25	0.19	0.19	3.125	0.78	0.39
	<b>CMF</b>	0.03	ND	0,39	1,56	ND	12.5	6.25
	<b>CMF/CMI</b>	1	ND	2	8	ND	16	16

\*Légende : CMI: Concentration Minimale Inhibitrice; CMB: Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Fongicide ; ND= Non Déterminé

**Tableau XVII** : Paramètres d'inhibition des combinaisons sur les cellules planctoniques

Isolats microbiens	Paramètres d'inhibition (mg/ml)	Gentamicine®/ Nystatine	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
<b>Isolats bactériens</b>								
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>CMI</b>	0.03	0.19	0.09	1.56	0.78	1.56	0.09
	<b>CMB</b>	0.03	0.19	0.09	6.25	1.56	3.125	0.09
	<b>CMB/CMI</b>	1	1	1	4	2	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>CMI</b>	0.01	0.04	0.04	0.78	0.19	1.56	0.04
	<b>CMB</b>	0.01	0.04	0.04	1.56	0.19	1.56	0.04
	<b>CMB/CMI</b>	1	1	1	2	1	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>CMI</b>	0.03	0.19	0.39	3.125	0.78	1.56	0.19
	<b>CMB</b>	0.03	0.39	0.39	ND	1.56	3.125	0.39
	<b>CMB/CMI</b>	1	2	1	ND	2	2	2
<b>Isolats fongiques</b>								
<i>Candida albicans</i>	<b>CMI</b>	0.03	0.04	0.04	0.78	0.78	0.78	0.19
	<b>CMF</b>	0.03	0.04	0.09	1.56	1.56	1.56	0.39
	<b>CMF/CMI</b>	1	1	2	2	2	2	2
<i>Aspergillus niger</i>	<b>CMI</b>	0.03	0.09	0.19	6.25	1.56	0.39	0.39
	<b>CMF</b>	0.03	0.19	0.39	ND	12.5	0.39	0.78
	<b>CMF/CMI</b>	1	2	2	ND	8	1	2
<i>Penicillium sp</i>	<b>CMI</b>	0.03	0.19	0.19	1.56	0.39	0.78	0.39
	<b>CMF</b>	0.03	0.39	0.78	3.125	1.56	1.56	3.125
	<b>CMF/CMI</b>	1	2	4	2	4	2	8

\*Légende : CMI: Concentration Minimale Inhibitrice; CMB: Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Fongicide ; ND= Non Déterminé

#### **I.6.4.3. Paramètres d'inhibition (CMIB, CMEB) des huiles essentielles et des combinaisons sur les biofilms bactériens**

Les bactéries étant présentes dans leur écosystème principalement sous forme sessile (biofilm) qui est une forme de résistance aux antibiotiques et aux désinfectants, il a été jugé important d'évaluer l'activité antibiofilm des HEs et des combinaisons et les résultats sont consignés dans le tableau XVIII. Il ressort de ce tableau que les Concentrations Minimales Inhibitrices des Biofilms variaient de 0,19 à 6,25 mg/mL pour les HEs et de 0,19 à 3,125 mg/mL pour les combinaisons. Les combinaisons comme pour les cellules planctoniques ont présenté de meilleures activités sur les biofilms que les HEs prises individuellement. Dans certains cas les biofilms étaient 8 fois plus résistants aux HEs comparé aux cellules libres. Nous avons par exemple la CMI de l'HE d'*Eucalyptus globulus* qui est passé de 0,78 mg/mL sur la forme planctonique de *Bacillus subtilis* à 6,25 mg/mL sur le biofilm de la même bactérie

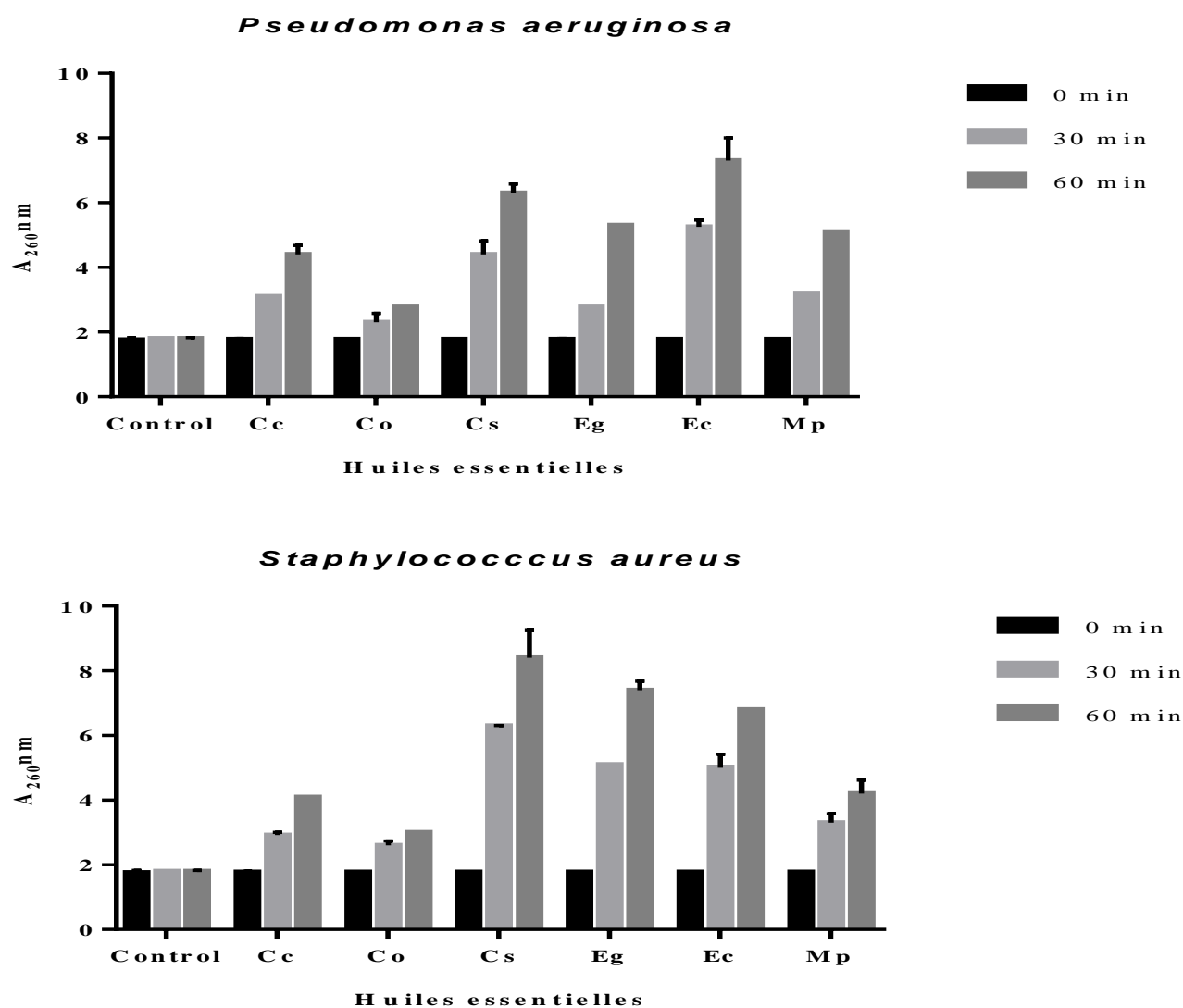
**Tableau XVIII** : Paramètres d'inhibition des huiles essentielles sur les biofilms

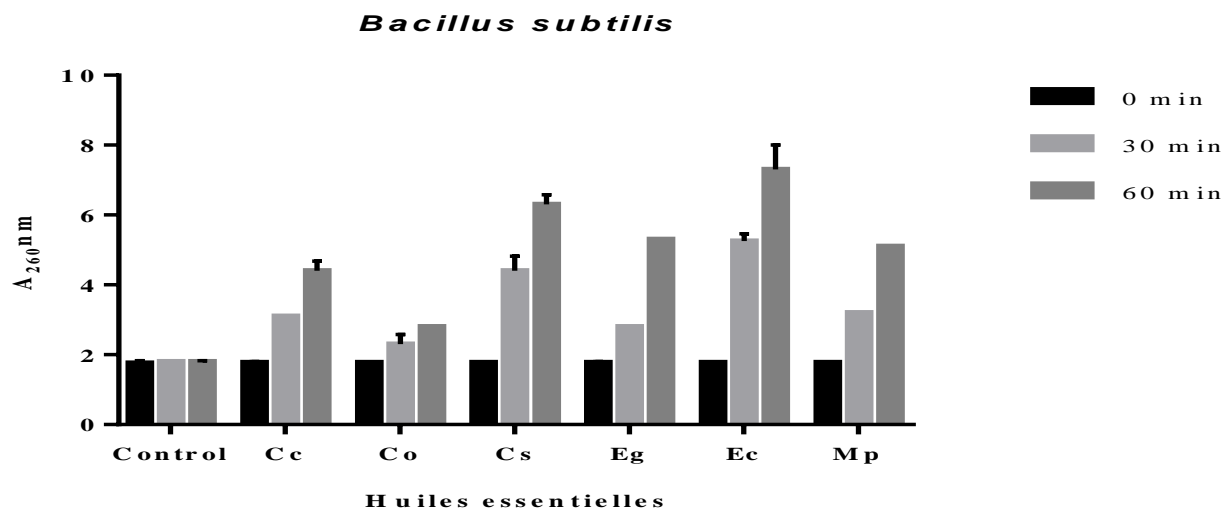
Isolats microbiens	Paramètres d'inhibition (mg/ml)	Gentamicine®	<i>Cananga odorata</i>	<i>Eugenia caryophylla</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Mentha sp cf piperita</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Citrus sinensis</i>
<b>Huiles essentielles</b>								
<i>Bacillus subtilis</i>	CMIB	0.1	ND	0.78	0.39	6.25	6.25	0.78
	CMEB	0.1	ND	0.78	0.78	12.5	ND	0.78
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMIB	0.06	3.125	0.19	0.19	3.125	1.56	0.19
	CMEB	0.1	12.5	0.19	0.19	6.25	6.25	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMIB	ND	ND	0.39	1.56	ND	3.125	0.78
	CMEB	ND	ND	0.39	1.56	ND	ND	3.125
<b>Combinaisons</b>								
Isolats micrbiens	Paramètres d'inhibition (mg/ml)	Gentamicine®	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
<i>Bacillus subtilis</i>	CMIB	0.1	0.19	0.19	3.125	1.56	6.25	1.56
	CMBB	0.1	0.39	0.19	ND	3.125	ND	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMIB	0.06	0.09	0.19	3.125	0.39	1.56	0.19
	CMBB	0.1	0.09	0.19	12.5	0.78	3.125	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMIB	ND	0.39	0.39	ND	1.56	1.56	0.39
	CMBB	ND	0.39	0.39	ND	3.125	3.125	0.78

## I.7. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries

### I.7.1. Libération du matériel cellulaire absorbant à 260 nm

La fuite des biomolécules intracellulaires (ADN, ARN) à travers la membrane plasmique des bactéries a été déterminée pour évaluer l'effet des HEs sur la membrane des bactéries mises au contact de ces HEs. Après avoir suivi la libération de biomolécules intracellulaires après 0 ; 30 et 60 minutes, la figure 68 représentant les résultats pour cette expérience, elle montre que toutes les HEs testées dans cette étude ont un effet lytique sur la membrane cellulaire de toutes les bactéries utilisées après 30 min d'exposition. Les dommages causés à la membrane des bactéries par les HEs ont été marqués par une augmentation de l'absorbance à 260 nm par rapport au contrôle sans HEs, ce qui implique une lyse de la membrane ainsi que la libération de biomolécules (ADN, ARN) dans le milieu extracellulaire.





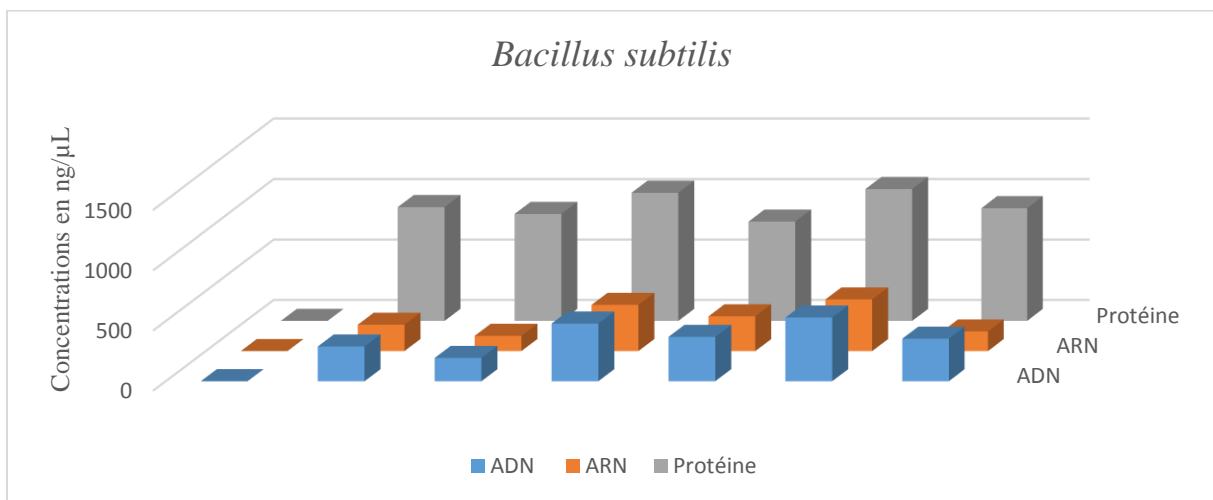
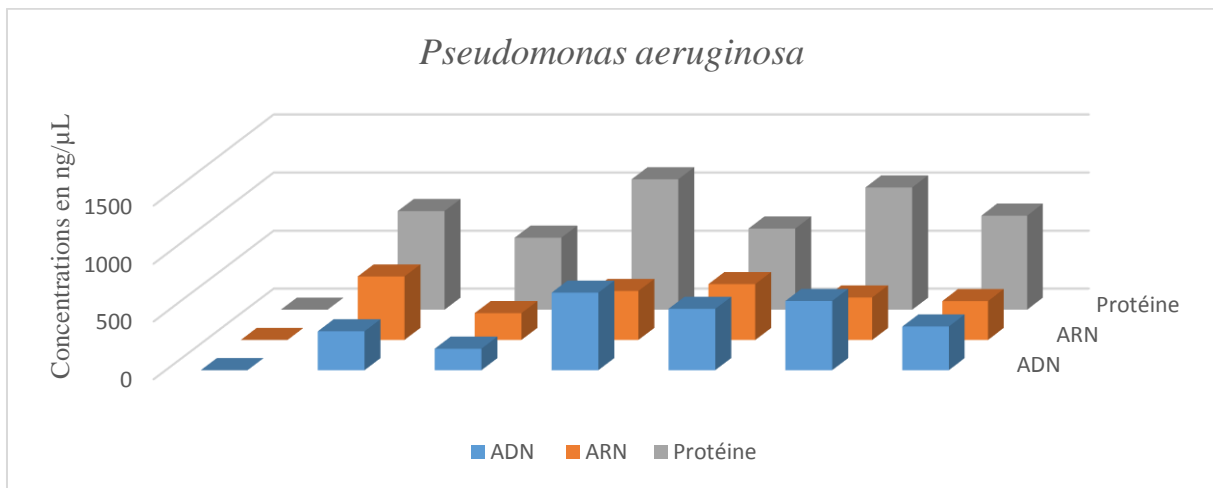
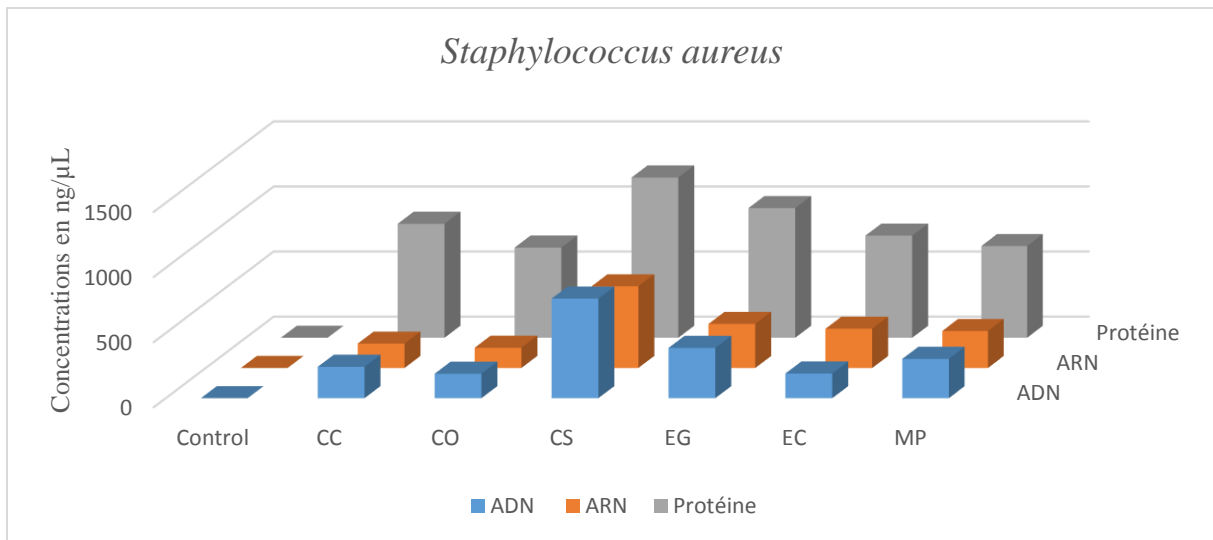
Légende : cc : *Cymbopogon citratus* ; co : *Cananga odorata* ; cs : *Citrus sinensis* ; eg : *Eucalyptus globulus* ; ec : *Eugenia caryophylla* ; mp : *Mentha sp cf piperita* ;

**Figure 68** : Effet des HEs de *C. citratus*, *C. odorata*, *C. sinensis*, *E. globulus*, *E. caryophylla* et *M. sp.cf piperita* sur la libération du matériel cellulaire des bactéries absorbant à 260

### I.7.2. Quantification des biomolécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire

Pour confirmer l'effet des HEs sur la membrane des bactéries testées, une quantification des biomolécules intracellulaires (ADN, ARN et Protéines) libérées dans le milieu extracellulaire a été réalisée grâce au Nanodrop 1000. Les résultats sont présentés par la figure 69 ci-dessous. On y remarque qu'au niveau du contrôle composé de bactéries non exposées aux HEs aucune biomolécule intracellulaire (ADN, ARN et protéines) n'a été retrouvée dans le milieu extracellulaire. Les concentrations du matériel intracellulaire libérées par les cellules bactériennes exposées aux HEs variaient de  $185,7 \pm 2,75$  ng/ $\mu$ L à  $764,1 \pm 3,46$  ng/ $\mu$ L pour l'ADN,  $126,5 \pm 2,33$  ng/ $\mu$ L à  $626,6 \pm 17,25$  ng/ $\mu$ L pour l'ARN et  $692,2 \pm 6,22$  ng/ $\mu$ L à  $1231 \pm 2,52$  ng/ $\mu$ L pour les protéines. Sur toutes les bactéries exposées aux différents HEs, les HEs de *Citrus sinensis* et d'*Eugenia caryophylla* ont causé des dommages plus importants aux différentes bactéries. Ceci se matérialise par l'induction de la sortie d'une plus grande quantité du contenu intracellulaire.





Légende : CO : *Cananga odorata* ; EC : *Eugenia Caryophylla* ; CC : *Cymbopogon citratus* ; MP : *Mentha sp cf piperita* ; EG : *Eucalyptus globulus* ; CS : *Citrus sinensis*

**Figure 69** : Quantification des biomolécules intracellulaires (ADN, ARN et Protéines) dans le milieu extracellulaire

## I.8. Résultats sur l'activité désinfectante des désinfectants à base d'huiles essentielles

### I.8.1. Cinétique de la formation de biofilm après 240 heures

La formation du biofilm sur les coupons d'acier inoxydable s'est réalisée sur une période de 240 heures, les cellules bactériennes et fongiques ayant adhéré aux coupons étaient dénombrées toutes les 48 heures. La figure 70 nous présente la cinétique de formation du biofilm après 240 heures. Il ressort de cette figure que, pour toutes les bactéries ainsi que pour l'isolat de *Candida albicans*, le nombre de cellules ayant adhéré aux coupons augmente avec le temps et atteint un minimum de 6 log après 240 heures d'incubation.

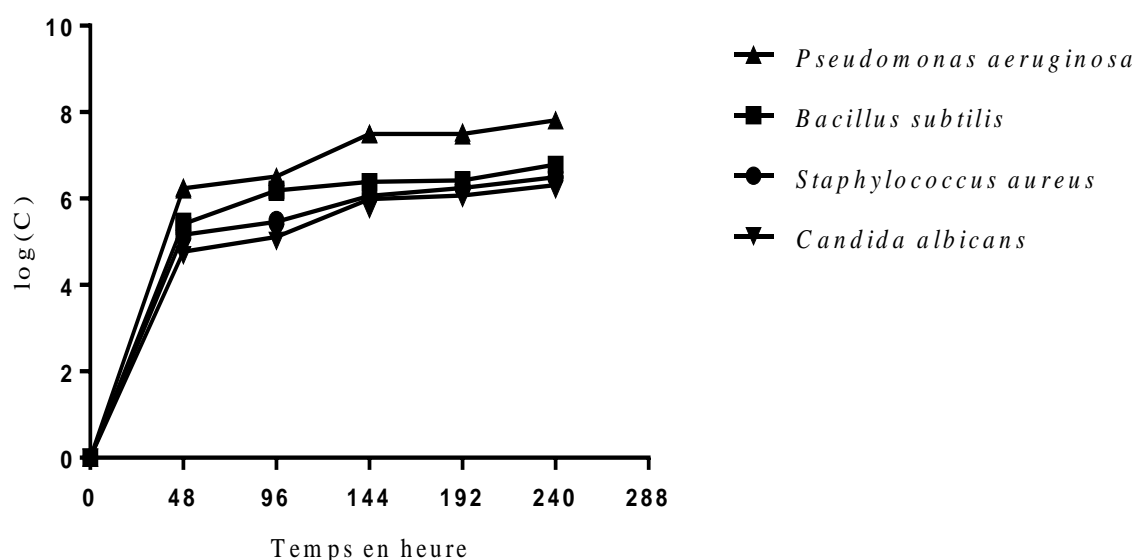


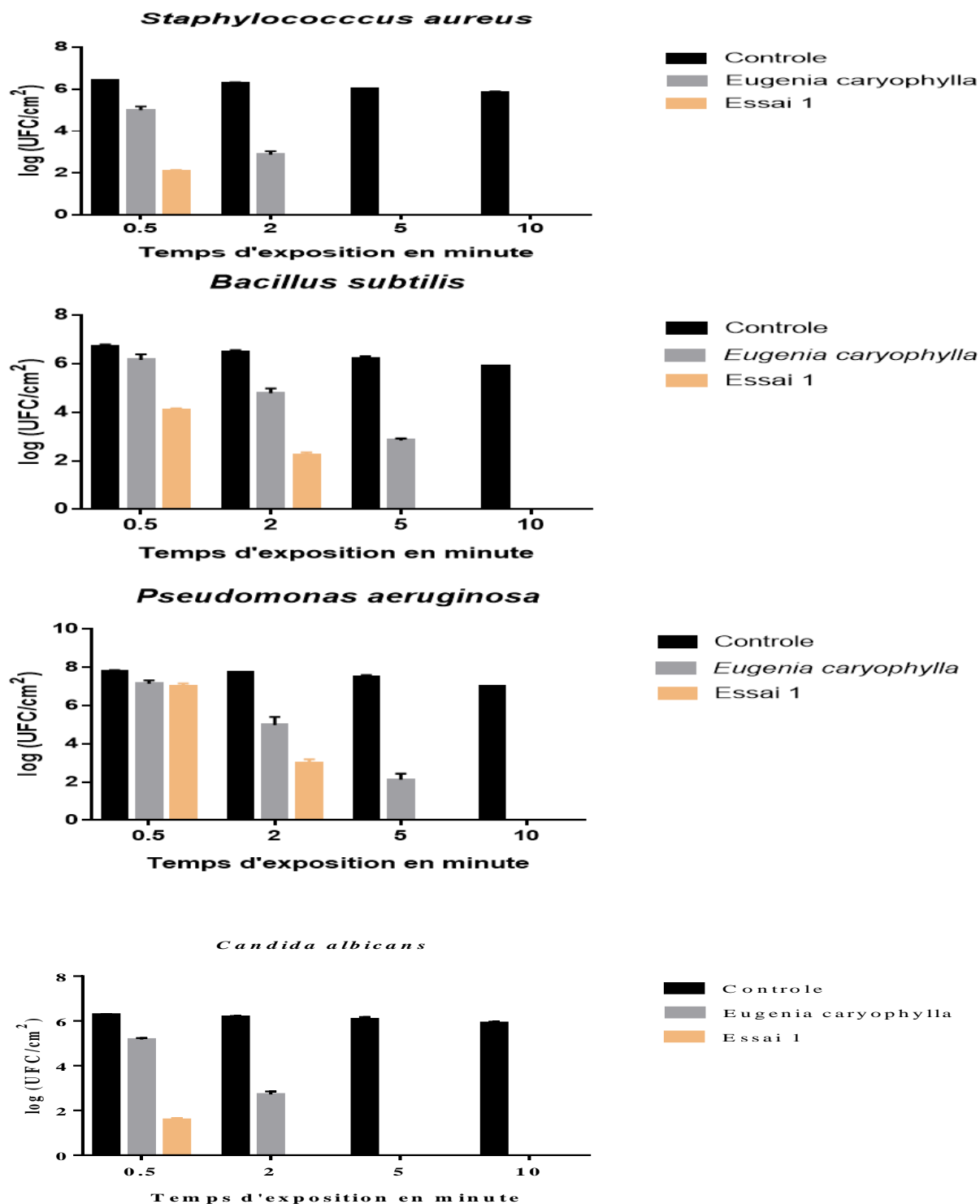
Figure 70 : Cinétique de la formation de biofilm après 240 heures

### I.8.2. Traitement des coupons avec les solutions désinfectantes

Après 240 heures nécessaires à la formation d'un biofilm mature, les coupons ont été traités par immersion dans les solutions désinfectantes pendant 30 secondes, 2 minutes, 5 minutes et 10 minutes. Les résultats pour chaque isolat microbien sont représentés par la figure 71.

On note sur cette figure que, à partir de 30 secondes, le désinfectant à base de l'essai 1 induit une réduction significative de la densité du biofilm sur l'ensemble des isolats. Un temps de contact de 5 minutes lui est nécessaire pour éliminer tout le biofilm qui s'est formé après 10 jours et ce pour tous les isolats testés. Le désinfectant à base de l'HE d'*Eugenia caryophylla* a présenté une meilleure activité sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, 5 minutes de

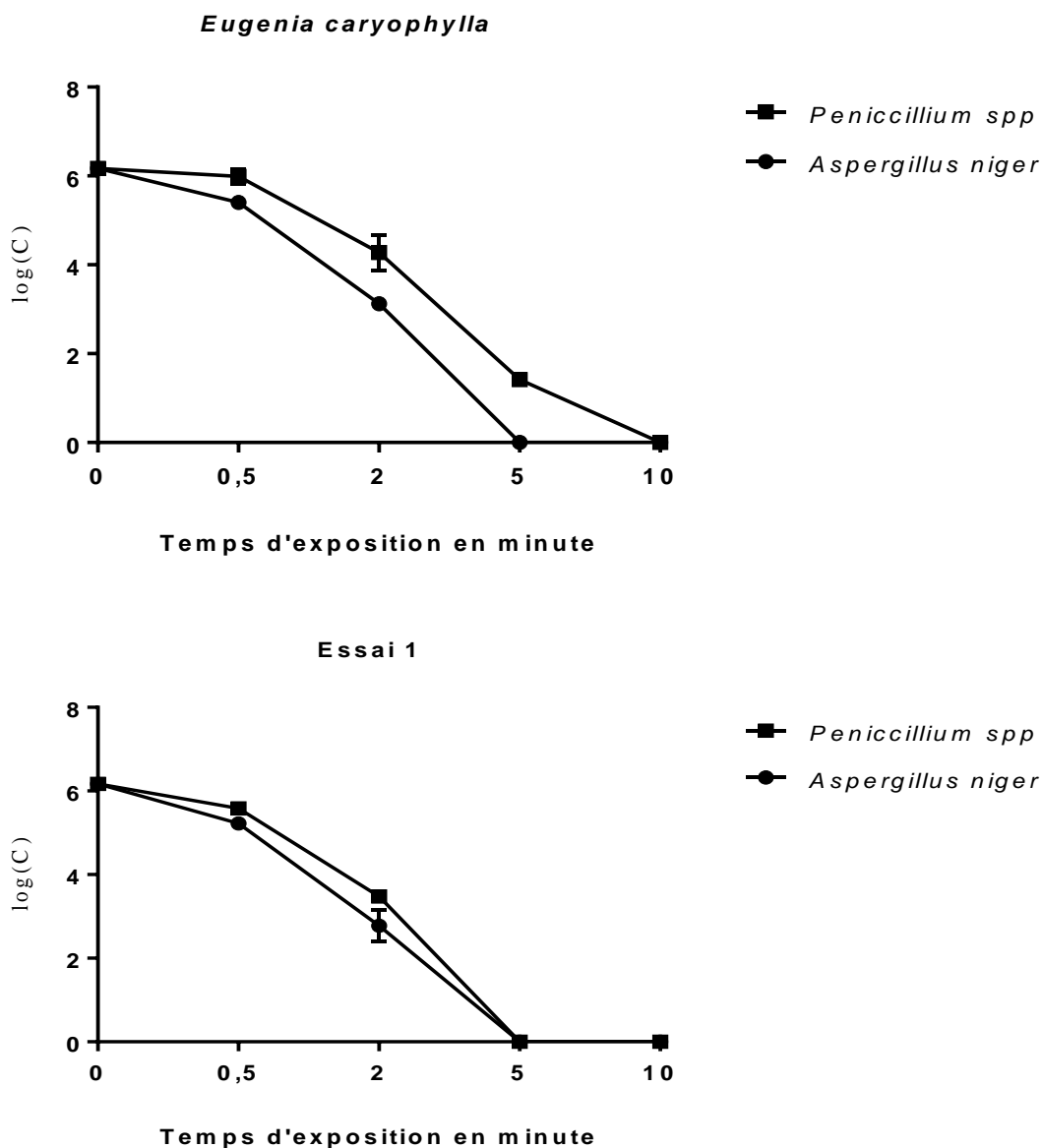
temps de contact ont suffi pour éradiquer complètement le biofilm formé par ces deux isolats. Par contre sur les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, il a fallu un temps de contact de 10 minutes.



**Figure 71** : Action des désinfectants formulés sur les biofilms des différents isolats

### I.8.3. Cinétique de létalité des désinfectants sur les moisissures

L'action des désinfectants formulés sur les moisissures a été évalué par mesures de la cinétique de létalité de ces solutions désinfectantes après leur mise en contact avec les spores d'*A niger* et *Penicillium sp* pendant 0.5 ; 2 ; 5 et 10 minutes. La figure 72 représentant les résultats pour les désinfectants formulés à base d'HE d'*Eugenia caryophylla* et de l'Essai 1. Cette figure nous montre que l'isolat d'*Aspergillus niger* a été plus sensible au désinfectant à base d'HE d'*Eugenia caryophylla* avec une létalité complète observée à 5 minutes de temps de contact. Le même effet a été observé sur *Penicillium sp* mais après 10 minutes de temps de contact. Pour le désinfectant à l'Essai 1, un temps de contact de 5 minutes a été nécessaire pour inhiber la croissance des deux isolats fongiques



**Figure 72 :** Cinétique de létalité des désinfectants sur les moisissures

## II. DISCUSSION

### II.1. Isolement et identification des microorganismes de la BC-UYI

Les contaminations microbiennes au sein des bibliothèques et archives sont devenues au fil du temps une préoccupation grandissante. A cet effet, l'évaluation de la diversité microbienne à travers des contrôles microbiologiques est recommandée, afin d'avoir une connaissance sur les potentiels agresseurs biologiques, de préserver la santé des usagers et prévenir la dégradation des collections.

L'échantillonnage effectué dans l'air, sur les surfaces et sur les livres a permis d'isoler 173 microorganismes dont 44 % d'isolats bactériens et 56 % d'isolats fongiques dans la BC-UYI et 66 microorganismes dont 32 % d'isolats bactériens et 68 % d'isolats fongiques dans la BIFC. La prédominance des isolats fongiques comparés aux isolats bactériens s'expliquerait par le fait que la bibliothèque héberge d'importantes sources de matières organiques tels que le papier, qui constituent un milieu idéal à la croissance des champignons car il contient de la cellulose. Ces résultats concordent avec les travaux de **Hempel *et al.*, (2014)** ayant effectué une revue sur les contaminations microbiennes au sein des bibliothèques et salles d'archives a reporté la présence de bactéries et de champignons à des pourcentages moyens de 37,5 % et 62,5 % respectivement.

Les concentrations microbiennes obtenues dans l'air intérieur varient entre  $917 \pm 147$  et  $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup> pour la BC-UYI et entre  $424 \pm 29$  et  $631 \pm 56$  pour la BIFC. Conformément à la classification de la Commission européenne relative aux normes sanitaires pour les locaux non industrielles (500-2000 UFU/m<sup>3</sup> : degré de pollution élevé), l'air de la bibliothèque centrale de l'université de Yaoundé I constitue un risque pour la santé des usagers (**European Communities Commission, 1993**).

D'un point de vue statistique, les concentrations microbiennes obtenues dans la BC-UYI sont nettement plus élevées que celles obtenues dans la BIFC ( $p \leq 0,05$ ). Cette différence s'expliquerait par la présence à BIFC d'un système de régulation climatique permettant de limiter toute invasion microbienne (**Roulet, 2004**).

Les concentrations bactériennes de l'air prélevé en matinée dans toutes les salles d'étude de la BC-UYI ne sont pas significativement différentes ( $p \leq 0,05$ ) de celles de l'après-midi. Ceci s'expliquerait par la faible densité des occupants durant les heures de collecte. Par contre, la concentration bactérienne de l'air prélevé en après-midi dans la salle d'étude du sous-sol est significativement plus élevée ( $p \leq 0,05$ ) que celles des autres salles d'étude. En effet, les usagers séjournent plus à ce niveau malgré les conditions d'hygiène déplorable. Des études similaires

ont révélé que la présence de bactérie dans l'air est associée à la présence du personnel au sein des espaces clos (**Meadow et al., 2014**). L'absence de différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les concentrations bactériennes de l'air prélevé au niveau des armoires à livre en zone obscure et en zone éclairée est en accord avec les travaux de **Cauliez, (2011)**, qui a montré que les bactéries se développent aussi bien dans l'obscurité qu'à la lumière et leur prolifération est favorisée par la chaleur et l'humidité (au moins 65 % d'humidité relative).

Les concentrations fongiques de l'air prélevé en matinée dans les salles d'étude du sous-sol et du rez-de-chaussée sont significativement plus élevées ( $p \leq 0,05$ ) que celles de l'après-midi. En effet, les conditions environnementales et l'absence de système de climatisation peuvent expliquer cette différence observée. L'on ne saurait affirmer si l'activité humaine aurait une influence sur les concentrations fongiques. Car certains travaux suggèrent que la plupart des champignons présents dans l'air ne sont pas d'origine humaine (**Soto et al., 2009**). La différence significative ( $p \leq 0,05$ ) observée entre les concentrations fongiques de l'air prélevé en après-midi dans les salles d'étude du sous-sol et du rez-de-chaussée et celles des niveaux 1 et 2 pourrait être due à certains facteurs environnementaux tels que l'humidité et température en plus de la présence de poussière et de matières organiques qui fournissent des nutriments nécessaires à la croissance des champignons (**WHO, 2009**). L'absence de différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les concentrations fongiques de l'air prélevé au niveau des armoires à livres en zones obscure et en zone éclairée est en désaccord avec les travaux de **Cauliez, (2011)**, qui ont reporté que la lumière est l'un des facteurs favorables à la croissance des champignons.

Les résultats des concentrations microbiennes obtenus sur 25 cm<sup>2</sup> de surfaces prélevées varient de 200 ± 0 à 5000 ± 282 UFC/cm<sup>2</sup> et de 40 ± 0 à 600 ± 53 UFC/cm<sup>2</sup> respectivement pour la BC-UYI et la BIFC. Ces concentrations sont inférieures à celles obtenues par **Ulla, (2008)** sur les surfaces des cuisines d'une école (0.25 à 15 × 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup> et 0.25 à 44 × 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup> respectivement). Toutefois, les concentrations microbiennes sur les tables d'étude et les armoires à livre du sous-sol de la BC-UYI montrent des concentrations élevées par rapport à celles des autres niveaux. De même, les concentrations microbiennes obtenues au niveau des surfaces de la BC-UYI sont supérieures à celles obtenues dans la BIFC. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de poussière présente au-dessus des surfaces au moment des prélèvements était abondante dans la BC-UYI comparé à la BIFC d'une part, et plus abondantes au niveau du sous-sol de la BC-UYI comparé aux autres niveaux de prélèvement. En effet, la poussière organique abrite de nombreux microorganismes (**Talon, 1999**).

L'identification des isolats bactériens de l'air révèle essentiellement la présence de bactéries Gram + (81 % et 100 % pour la BC-UYI et la BIFC respectivement). Ces résultats s'apparentent à ceux de **Ghosh et al., (2013)**, qui ayant travaillé sur l'estimation des bioaérosols dans l'environnement intérieur dans la bibliothèque universitaire de New Delhi a constaté que les Bactéries Gram+ étaient dominantes. Cette prédominance de Bactérie Gram + serait liée à la structure de leur paroi. En effet, celles-ci ont une paroi plus résistante et certaines produisent des spores qui leur confèrent une résistance accrue aux variations des conditions environnementales (**Goyer et al., 2001**). Les genres bactériens identifiés dans l'air des deux bibliothèques incluent *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus*. A de fortes concentrations, ces bactéries saprophytes peuvent causer de nombreuses pathologies. C'est le cas de *Bacillus cereus* qui, grâce aux enterotoxines produites, sont responsables d'intoxication alimentaire de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique) (**Logan et al., 2006**). Les bactéries du genre *Staphylococcus* et *Micrococcus* sont généralement localisées au niveau de la peau et des muqueuses humaines, suggérant ainsi que la plupart des contaminations bactériennes de l'air intérieur dérivent de la présence humaine (**Fekadu et al., 2014**). Leur présence est un bon reflet de l'activité humaine dans les locaux (**Meunier et al., 2005**). L'espèce *Staphylococcus aureus* identifiée a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales. En dehors du genre *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus*, le genre *Rhodococcus* a été décrit dans le présent travail. Aucune étude sur les contaminations microbiennes de l'air intérieur des bibliothèques ne révèle la présence de cette bactérie. Toutefois, *Rhodococcus* est naturellement présent dans la poussière du sol, et cause des maladies respiratoires, digestives et articulaires.

Concernant les champignons identifiés dans l'air, les moisissures étaient plus élevées que les levures. Parmi les principaux genres figurent *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*, reconnus comme pathogènes opportunistes pour l'homme et souvent associés aux manifestations cliniques suivantes : asthme, rhinite, allergies et conjonctivites (**Schwab et al., 2004**). On retrouve une certaine concordance avec les études de **Borrego et al., (2012)** qui reportent la présence de *Penicillium* et *Aspergillus* dans les bibliothèques. Les spores émises par ces moisissures ont une paroi sèche, ce qui facilite leur dispersion dans l'air et cela pourrait aussi expliquer leur prédominance au lieu de prélèvement (**Goyer et al., 2001**). La présence de *Trichosporon* serait due à l'occupation humaine. Bien que cette levure soit responsable des infections superficielles et profondes de la peau (**Colombo et al., 2011**).

L'identification des isolats bactériens issues des surfaces inclue les espèces *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* qui étaient prédominants aussi bien sur les surfaces de la BC-

UYI que sur celles de la BIFC. La présence de ces genres sur les surfaces pourrait être due soit à leur résistance naturelle dans l'environnement par la formation de biofilms au niveau des surfaces (**Talon, 1999**). En similitude avec ces résultats, **Meunier, (2005)**, reporta les genres *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp* et *Enterobacter cloacae* sur les surfaces hospitalières.

Les isolats fongiques identifiés au niveau des tables d'études, des armoires et des murs indiquent que les champignons les plus identifiés sur les surfaces sont les moisissures. Les principaux genres étaient *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* et *Cladosporium sp*. Ces résultats présentent des similitudes avec ceux de **Hempel et al., (2014)** qui révèle que *Penicillium* et *Aspergillus* sont plus fréquents au niveau des surfaces et des livres. Parmi les nombreuses études réalisées sur la thématique "moisissures-matériaux", les recherches menées par **Beguin et Nolard** entre novembre 1981 et avril 1992, dans 130 habitations belges, ont montré que *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, sont les espèces fongiques les plus couramment rencontrées sur les murs et surfaces horizontales présentant une contamination fongique visible (**Beguin et al., 1995**).

Les résultats de l'identification des isolats bactériens des livres révèlent la présence de *Bacillus sp* (57 %), *Staphylococcus sp* (28 %) et de Bacilles Gram + non sporulés (14 %). Des ressemblances avec l'étude de **Borrego et al., (2012)** ont été observées. En effet, celui-ci a reporté que le genre *Bacillus* (80 %) est prédominant sur les documents. D'après la littérature, certaines espèces du genre *Bacillus* possède des propriétés cellulolytiques, protéolytique et amylolytique leur permettant ainsi dégrader les documents (**Aktuganov et al., 2007 ; De Paolis et al., 2008**). La présence du genre *Staphylococcus* sur les livres pourrait s'expliquer par la présence humaine et la capacité à vivre à l'état de saprophyte.

S'agissant des isolats fongiques identifiés dans les livres, le genre *Aspergillus* était prédominant. Cependant, d'autres genres ont été identifiés à de faibles pourcentages, à savoir : *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Chrysonilia* et *Rhodotorula*. **Tiano (2002)** souligne que les principaux genres fongiques isolés dans cette étude utilisent la cellulase pour contaminer et dégrader le papier des documents. En particulier les genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizopus* sont cellulolytiques d'où leur présence sur les livres. L'étude menée par **Borrego, (2012)** au sein des archives historiques de Cuba et d'Argentine confirme nos résultats. Le genre *Rhodotorula* retrouvé dans cette étude a été décrit par **Gartshore en 2003** comme un agent de dégradation des plastiques, pouvant être retrouvé dans la nature (**Wirth et al., 2012**).



## II.2. Rendement d'extraction et composition chimiques des huiles essentielles et des combinaisons

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des échantillons végétaux ont présentés des rendements variant de 0,04 % pour l'HE de *Mentha* sp cf *pipérита* à 1,70 % pour l'HE d'*Eugenia caryophylla*. Ces résultats montrent que la proportion en HE présente dans une plante varie non seulement d'une famille botanique mais aussi d'une espèce à une autre (**Oussou et al., 2009**).

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a montré que les composés majoritaires étaient principalement des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés.

Les composés majoritaires retrouvés dans l'HE de *Cymbopogon citratus* (Le géraniol (33,8 %), le néral (23,8 %), le nérol (8,5 %)) utilisé dans cette étude sont en accord avec les études antérieures qui on reportés le citral (géraniol + néral) comme étant le constituant majoritaire de cette HE. En effet, les travaux de **Nyegue et al. (2017)** sur l'HE de *C. citratus* récolté dans la région du centre Cameroun ont révélé le géraniol (49,2 %), le néral (34,3 %) et le myrcène (5.9 %) comme étant les composés majoritaires. De même, les travaux de **Ndoye, (2001)** ont montrés que les HEs de *C. citratus* obtenues à partir de deux phénotypes de deux régions du Cameroun (Lomié and Longsimbi), avaient une composition similaire en citral que le phénotype retrouvé à Batourie.

L'analyse de l'HE de *Mentha* sp. cf. *pipérита* a révélé que les composés majoritaires étaient la Pipéritone (50,6 %),  $\beta$ -Phellandrène (20,9 %) et l'Acetate de menthyl (19,3 %). La Pipéritone a également été retrouvé par **Nyegue et al. (2014)** comme composé majoritaire des feuilles fraîches de *Mentha* sp. cf. *pipérита* récolté au Cameroun. Plusieurs études dans différents pays décrivent le Menthol comme étant le composé majoritaire de l'HE de *Mentha* sp. cf. *pipérита*, ce qui nous permet de supposer que le chémotype utilisé dans notre étude est similaire à celui de **Nyegue, (2014)** et différent de ceux retrouvés dans la revue de littérature. Cette différence dans la composition chimique peut être dû à l'origine géographique de la plante (**Mohammedi, 2006**).

Les HEs des plantes du genre *Citrus* sont caractérisées par la présence majoritaire en Limonène. C'est le cas des échantillons de zeste de *C. sinensis* récoltés en chine par **Tao, (2014)** qui a trouvé un pourcentage en limonène de 77.5 %. Les composés majoritaires de l'HE de *Citrus sinensis* récolté en Ouganda et au Rwanda étaient le limonène (87.9 et 92.5 %), myrcène

(2.4 and 2.0 %) La composition chimique de l'HE de *C. cinensis* analysées dans ce travail, à la forte teneur en limonène (88,2 %) est similaire à ces précédentes analyses.

Les travaux effectués sur les boutons floraux du giroflier récoltés dans les pays à forte production tels que le Madagascar, l'Indonésie et le Zanzibar montrent que les HEs sont majoritairement constituées d'eugénol (80 - 90 %), du  $\beta$ -caryophyllène (5 - 12 %) et d'acétate d'eugénol (5 - 10 %). On note également la présence du  $\alpha$ -humulène et de l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène (Goetz and Ghedira, 2012). Nyegue *et al.* (2014) ont présenté des compositions semblables d'un échantillon de plante récolté au Cameroun dont les composés majoritaires ont été l'eugénol (80,0 %),  $\beta$ -caryophyllène (8,3 %), et l'acétate d'eugénol (6,7 %). Ces compositions sont similaires à celle obtenue dans ce travail où, le profil chimique majoritaires l'Eugenol (70 %), l'Eugenol acetate (16.2 %) et le  $\beta$ -Caryophyllène (5,2 %) est maintenu.

Les composés majoritaires de l'HE d'*Eucalyptus globulus* sont l' $\alpha$ -pinene (49.3%), eucalyptol ou 1,8-cineole (23.0%) and  $\alpha$ -terpineol (5.7%). L' $\alpha$ -pinene, compose majoritaire obtenu dans cette étude est le même que celui reporté par Nyegue *et al.*, (2017). Par ailleurs, certaines études réalisées en Taiwan, Uruguay, Algérie, Burundi, Congo, Australie et Tunisie reportent le 1,8-cineole comme étant le composé majoritaire de l'HE des feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Derwichl, 2013).

Après analyse de la composition chimique des combinaisons, pratiquement les mêmes composés sont retrouvés dans toutes les combinaisons à des proportions différentes selon l'HE majoritaire dans la combinaison. Ceci s'expliquerait par le fait que toutes les combinaisons sont constituées de l'ensemble des six HEs. Dans l'Essai 5, combinaison constitué de 50% d'HE de *Mentha sp cf piperita* on note une absence de la pipéritone composé majoritaire de l'HE de *Mentha* mais plutôt la présence du carvone en majorité qui a également été retrouvé dans toutes les autres combinaisons. En effet le carvone a une structure proche de la pipéritone et semblerait provenir d'une interconversion de celle-ci après association entre les HEs.

### II.3. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* par les isolats bactériens

L'aptitude des isolats bactériens à former les biofilms a été évaluée par deux méthodes : la méthode qualitative de RCA et la méthode quantitative de TCP. Plus de 50 % des isolats de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis* ont présenté une aptitude à former les biofilm. En générale, Toutes les bactéries résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm (Nagant, 2013). 62,5 % des isolats de *S. aureus* ont présentés une aptitude à former les biofilms

par les deux méthodes. Ces résultats concordent avec les travaux de **Kara en 2014** qui a montré que 56,8 % des isolats de *S aureus* isolés des sondes urinaires avaient une aptitude à former des biofilms. De même **Arciola et al., (2001)** rapportent que 60,8 % des *S. aureus* isolés des cathéters produisaient un slime bactérien.

*Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative sont les germes les plus fréquemment responsables d'infection sur corps étrangers tel que les cathéters, les valves cardiaques et les sondes urinaires. Leurs facteurs de virulence majeure est la capacité à produire une matrice extracellulaire et constituer un biofilm ; ce qui rend extrêmement difficile le traitement clinique (**Fitzpatrick et al., 2002**).

57,14 % et 66,66 % des isolats de *P. aeruginosa* et *B. subtilis* produisaient du slime sur milieu RCA, pourtant ces pourcentages étaient de 74,42 % et 74,99 % respectivement par la méthode TCP. Selon plusieurs auteurs la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm in vitro La détection du biofilm par les méthodes TCP semblent plus fiables que celle du rouge Congo. Nos résultats concordent avec ceux de **Khadidja, (2017)**, où ils montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques. L'étude de **Knobloch et al., (2002)** suggèrent que le dépistage par le rouge congo ne peut être recommandé pour évaluer la formation de biofilm pour les isolats de *K. pneumoniae*

Le biofilm est important dans la pathogénie de *B. subtilis*, car il lui permet de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de constituer un réservoir, notamment dans les hôpitaux et de résister aux antibiotiques et aux désinfectants. Il est directement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et les infections sur matériel (**Méar, 2014**).

La pathogénicité des infections à *S. aureus* est liée à sa capacité à coloniser les tissus de l'hôte, à proliférer et à contourner le système de défense immunitaire grâce à des facteurs de virulence spécifiques tel que les facteurs d'adhésion, la production d'enzymes et de toxines (**Lowy et al., 1998**).

#### **II.4. Effet de la fraction volatile des huiles essentielles sur les isolats microbiens**

Après les tests en microatmosphère réalisés sur les bactéries et champignons dans le but montrer l'activité de la fraction volatile des HEs, nous avons noté un effet inhibiteur des constituants volatiles des HEs sur la croissance de ces microorganismes. Ceci s'expliquerait par la composition de nos HEs qui sont riches en composés antibactériens volatils comme les monoterpènes qui constitue plus de 50 % de leur composition chimique. Il a déjà été démontré

que l'activité antimicrobienne des composés volatils résulte de l'effet combiné de l'absorption directe de vapeur sur les microorganismes et de l'effet indirect via le milieu absorbant la vapeur (**Trivedi et Hotchandani, 2004**).

Plusieurs études ont montrés l'effet létal des constituants volatiles des HEs sur divers microorganismes. Nos résultats rejoignent ceux de **Pibiri, (2006)** qui a démontré dans sa thèse que les huiles essentielles testées en phase gazeuse avaient un effet mortel sur deux souches, *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, même à petites doses.

Les résultats obtenus de l'effet de la fraction volatile des six huiles essentielles utilisées dans le cadre de notre travail sur la croissance mycélienne d'*A. niger* et *Penicillium sp* font état d'une inhibition complète de la croissance radiales des moisissures par toutes les HEs à des CMI allant de 0,125 à 1 µl/ml d'air. En effet, le caractère volatile et hydrophobe des HEs les rend plus absorbables par le mycélium fongique que par la gélose, ce qui favorise leur action. Ce comportement peut être dû, d'une part, à la nature lipophile du tissu fongique et d'autre part à la forte teneur en eau dans la gélose (**Edris et Farrag, 2003 ; Schroder et al., 2017**). Les résultats obtenus dans cette étude se rapproche des travaux de **Laghchimi et al., (2014)** qui a démontré un effet létal des HEs de *Lavandula multifida* sur *Alternaria sp.* et *Penicillium expansum* avec des CMI de 0.25 et 0.5 respectivement. De même, il a été montré que la fraction volatile des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* inhibe fortement la croissance du mycélium *Penicillium roquefortii* (**Surviliené et al.,, 2009**). **Sharma et al., (2006)** ont montré que la vapeur de l'HE de *Citrus sinensis* a une action fongicide sur 3 agents pathogènes de la pomme à savoir *Penicillium expansum*, *Ulocladium chartarum* et *Alternaria mali*.

## **II.5. Effet de la fraction liquide des huiles essentielles sur les microorganismes**

Les tests de dilution sont des tests fiables, largement acceptées et prometteurs pour déterminer la sensibilité d'un organisme aux inhibiteurs. La méthode de micro dilution est considérée comme le «gold standard» (**Lang et Buchbauer, 2012**). C'est une méthode quantitative qui permet de déterminer la CMI et permet de comprendre l'efficacité de l'huile essentielle (**Varela et al., 2009, Lang et Buchbauer, 2012**). L'une des caractéristiques les plus problématiques des huiles essentielles étant leur volatilité, la technique de micro dilution permet de contourner ce problème car elle permet une évaporation moindre du fait du mélange de l'huile essentielle dans le bouillon (**Cos et al., 2006**).

Les HEs testées dans le cadre de cette étude ont présenté de bonnes activités en milieu liquide avec des CMI allant de 0,04 à 6,25 mg/mL tant sur les isolats bactériens que sur les fongiques. Les HEs de *C. citratus* et *E. caryophylla* ont présenté un effet bactéricide sur l'ensemble des isolats testés. En effet, La bactéricidie de l'HE de *C. citratus* serait lié à sa proportion élevée en citral (57,8 %). Son mode d'action sur la cellule bactérienne repose sur l'inhibition du métabolisme et la prolifération cellulaire par fixation aux protéines enzymatiques et à l'ADN, d'où la mort de la bactérie (**Dorman et Deans, 2000 ; Moni, 2013**). D'après les travaux de **Vimal et al., (2013)**, le citral est bactéricide sur *S. aureus* ; *S. typhi* ; *Escherichia coli* ; *Shigella dysenteriae* et *Proteus mirabilis* a des concentrations d'ordre de 1 et 2 mg/mL. Ce qui justifierait la bactéricidie observée sur les trois souches utilisées.

La meilleure activité observée avec l'huile essentielle d'*E. caryophylla* est attribué à sa composition chimique riche en eugénol 70 % qui est un composé phénolique. En effet, L'activité antimicrobienne de la famille de composés phénoliques est due à leur structure (noyau aromatique lié au groupement hydroxyle dans différentes positions). Cette structure leur permet de former des liaisons hydrogène avec les groupes-SH dans les sites actifs des enzymes cibles, ce qui entraîne la désactivation de ces enzymes dans les champignons (**Ultee et al., 2002**). Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamines des protéines membranaires de la cellule microbienne en provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite de contenus intracellulaires (**Lopez-Malo et al., 2005**).

Cependant, la valeur d'une huile essentielle tien à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (**Laghchimi et al., 2014**).

## **II.6. Effet des combinaisons sur la croissance microbienne**

Les HEs obtenues dans ce travail ont été combinées proportionnellement de façon à avoir dans chaque combinaison, une huile essentielle majoritaire à 50 %. L'activité antimicrobienne de chaque combinaison a été déterminée et comparé à l'HE majoritaire dans la combinaison.

On note que les combinaisons d'HEs ont présenté une activité plus intéressante que les HE testées individuellement sur les bactéries, les champignons et les biofilms, avec réduction considérable des CMI sur l'ensemble des isolats microbiens. La majorité des combinaisons ont

montrés un effet bactéricide et fongicides caractérisé par les rapports CMB/CMI = 1 ou 2 pour les bactéries et CMF/CMI = 1 ou 2 pour les champignons.

Hormis l'utilisation d'huiles dans des huiles de support, la plupart des huiles essentielles sont utilisées dans des mélanges ou des combinaisons de deux huiles ou plus (**Kaloustian et Hadji-minaglou 2012**). Ces mélanges sont considérés comme un art dans lequel les huiles sont soigneusement sélectionnées et combinées avec l'intention de guérir de manière holistique l'individu «tout entier» en fonction de ses symptômes. L'objectif du mélange est de créer un effet thérapeutique synergique lorsque la combinaison d'huiles essentielles est supérieure à la somme de l'huile individuelle (**Harding, 2008**). La valeur bénéfique de la synergie est notoire et utilisée depuis l'antiquité (**Van Vuuren et Viljoen, 2011**). La synergie peut être obtenue si les composés de l'huile peuvent affecter des sites cibles différents, ou ils peuvent interagir les uns avec les autres pour augmenter la solubilité, améliorant ainsi la biodisponibilité (**Wagner, 2006, Suliman et al., 2010**).

L'objectif est de mettre au point un traitement à plusieurs cibles pour réduire la mutation de l'agent pathogène et retarder ainsi le développement de la résistance. La formulation combinée peut également réduire la toxicité et les effets secondaires indésirables en diminuant la dose requise (**Cottarel et Wierzbowski, 2007, Inui et al., 2007**).

## **II.7. Paramètres d'inhibition (CMIB, CMEB) des huiles essentielles et des combinaisons sur les biofilms bactériens**

Les huiles essentielles et combinaisons ont présentés des activités intéressantes sur les biofilms bactériens avec des CMIBs allant de 0.19 et 6.25 mg/mL pour les HEs et de 0.19 à 3.125 mg/mL pour les combinaisons, malgré une résistance de ceux-ci compte tenu de leur réputation de récalcitrants aux antimicrobiens conventionnels.

Il est connu que les biofilms microbiens sont difficiles à éradiquer par les agents antimicrobiens standards, tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012 ; Kirmusaoğlu, 2016**). Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les HEs sont avérées très efficaces vis-à-vis des biofilms microbiennes, où elles peuvent agir de plusieurs façons (**Punitha et al., 2014 ; Géssica et al., 2018**). D'après **Niu et Gilbert (2004)**, les HEs à faible concentration inhibent la formation des biofilms bactériens par plusieurs mécanismes. Notamment, l'activation des gènes de réponse contre-stress qui à leur tour diminuent la production des polysaccharides extracellulaires (le constitue majoritaire de l'EPS). En plus, les HEs peuvent interagir avec les protéines des surfaces

bactériennes ce qui inhibe leur fixation et du coup, la formation du biofilm. En outre, les HEs ont la particularité d'agir directement sur des biofilms déjà formés, contrairement à la majorité des agents antimicrobiens. D'après **Niu et Gilbert (2004)**, les HEs ont la possibilité d'éradiquer les biofilms microbiennes par solubilisation de leur matrice extracellulaire. D'autres auteurs indiquent que les HEs sont aptes de diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm et de la déstabiliser, en raison de leur forte propriété antimicrobienne intrinsèque (**Roy et al., 2018 ; Ngongang et al., 2019**).

## **II.8. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries**

Compte tenu du grand nombre de groupes de composés chimiques présents dans les HEs, il est fort probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme spécifique, mais qu'il existe plusieurs cibles dans la cellule. Une caractéristique importante des HEs et de leurs composants est leur caractère hydrophobe, qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, de perturber les structures et de les rendre plus perméables. Des fuites d'ions et d'autres contenus cellulaires peuvent alors se produire et provoquer la mort d'une cellule bactérienne (**Burt, 2004 ; Bajpaj et al., 2017**). C'est dans ce sens que nous avons évalué l'effet des différentes HEs utilisées dans le cadre de ce travail sur l'intégrité de la membrane des bactéries sélectionnées justifiant l'inhibition de leur croissance. Toutes les HEs ont présenté un effet lytique sur la membrane des différentes bactéries entraînant la sortie du matériel génétique qui a été quantifié grâce au Nanodrope 1000. Comme mentionné précédemment, la lyse cellulaire par les HEs se justifierait par leur nature lipophile. Contrairement à la majorité d'antibiotiques qui sont de nature hydrophiles, les HEs ont la capacité de traverser la membrane plasmique des bactéries et ainsi occasionner un désordre structural fatal pour la bactérie (**Bajpaj et al., 2017**).

## **II.9. Activité désinfectante des désinfectants à base d'huiles essentielles**

L'effet des désinfectants formulés a été testé sur un groupe varié de contaminants microbien (bactéries Gram positif et Gram négatif, levures et moisissures) à différents temps de contact. D'une manière générale, les résultats obtenus nous permettent d'estimer à 5 minutes, le temps nécessaire pour une désinfection totale d'une surface renfermant une charge microbienne allant jusqu'à  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> à l'aide du désinfectant à l'Essai 1. Le contrôle sans HEs n'a présenté aucune réduction significative du biofilm formé sur plaque d'acier inoxydable

avec le temps ( $p < 0.05$ ). L'activité intéressante de ce désinfectant est sans doute liée à son principe actif qui est une combinaison proportionnelle de six HEs (Essai 1). Ceci se justifierait par la présence dans cette combinaison des composés chimiques tels que l'Eugénol (45,3 %), le Carvone (14,8 %) et le Linalol (9,2 %) dont l'activité antimicrobienne a déjà été démontrée (Nyegue *et al.*, 2017)

Les travaux de recherche sur l'activité antimicrobienne et antibiofilm des HEs dans le sens de leur utilisation comme désinfectants sont peut nombreux. Néanmoins, Oliveira, (2010) a décrit l'effet de *Cymbopogon citratus* et de *Cymbopogon nardus* sur le biofilm de *Listeria monocytogenes* formé sur l'acier inoxydable. La réduction du biofilm était de 44 à 72 % sur les biofilms formés après 240 heures. Valeriano *et al.* (2012) ont montré que les désinfectants formulés à partir des HEs de *Mentha piperita* et de *Cymbopogon citratus* pouvaient réduire significativement le biofilm vieux de 10 jours formé par *Salmonella enteritidis* sur acier inoxydable après 10 minutes de temps de contact. À 20 minutes de temps de contact, la réduction était de 100 % pour les deux désinfectants. Santos *et al.*, (2014) quant à eux ayant travaillé sur l'effet des désinfectants formulés à partir des HEs de *E. caryophylla* et *Thymus vulgaris* ainsi que de leur combinaison sur les biofilms de *Staphylococcus aureus* formés sur acier inoxydable ont montré que après 10 minutes, le désinfectant à l'HE de *Thymus vulgaris* a inhibé complètement le biofilm formé par *Staphylococcus aureus*. Pour le désinfectant à base de la combinaison, un temps de contact de 5 minutes a suffi pour éradiquer tout le biofilm formé par *Staphylococcus aureus* après 240 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cadre de notre travail où un temps de contact de 5 minutes pour le désinfectant à base de l'Essai 1 a été nécessaire pour éliminer les biofilms formés par tous nos isolats sur acier inoxydable.

Les normes françaises relatives aux procédés de désinfection de surfaces par voie aérienne recommandent une réduction microbienne d'au moins 6 log pour les surfaces en acier inoxydable (AFNOR, 2014), ce qui a été le cas pour les désinfectants formulés dans le cadre de ce travail. En outre, selon Lelieveld *et al.*, (2003), un désinfectant approprié devrait avoir les caractéristiques suivantes: activité à large spectre, résistance à l'environnement (pH, dureté de l'eau, présence de matière organique), non toxique et facilité d'utilisation. La réputation d'innocuité attribuée aux HEs dû à leur utilisation à de faibles doses, en plus des activités antimicrobiennes démontrées dans cette étude nous permet de penser que les désinfectants formulés à partir de ces HEs sont appropriés pour la désinfection des surfaces et de l'air.



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

### I. CONCLUSION GENERALE

Au terme de notre étude dont l'objectif général était de formuler un désinfectant à base d'huiles essentielles efficace contre les bioaérosols et les contaminants de surface, nous pouvons tirer les conclusions suivantes.

- ✚ L'environnement intérieur de la BIFC avait un niveau de pollution intermédiaire avec des concentrations microbiennes dans l'air comprises entre  $424 \pm 29$  et  $631 \pm 56$  UFC/m<sup>3</sup> d'air, contrairement à la BC-UYI où le niveau de pollution était élevé avec des concentrations microbiennes comprises entre  $917 \pm 147$  et  $2241 \pm 109$  UFC/m<sup>3</sup> d'air, ce qui représente un danger pour les occupants. Huit genres bactériens au total ont été identifiés contre treize genres fongiques. Les bactéries du genre *Bacillus* (45 % et 53 %) et *Staphylococcus* (23 % et 19 %) respectivement pour la BC-UYI et la BIFC étaient les plus fréquentes dans les deux bibliothèques ainsi que les champignons du genre *Aspergillus* (24 % et 29 %) et *Penicillium* (17 % et 22 %) respectivement pour la BC-UYI et la BIFC.
- ✚ Les composés majoritaires retrouvés dans les combinaisons ainsi que leurs proportions étaient différents de ceux des HEs prises individuellement. Les combinaisons ont présentés de meilleures activités que les HEs avec une réduction des CMI. Malgré la résistance des biofilms, les combinaisons ont présentées de bonnes activités antibiofilms avec des CMIBs comprises entre 0.09 et 3.125 mg/mL. Toutes les HEs ont présenté un effet lytique sur la paroi et la membrane des bactéries testées entraînant la sortie du matériel intracellulaire.
- ✚ Une désinfection complète peut être considérée avec le désinfectant à base de l'Essai 1 après un temps de contact de 5 minutes

## II. PERSPECTIVES

Le présent travail au vu des résultats obtenus, nous permet de faire un grand pas vers l'exploitation de notre biodiversité pour la production des biens et des services. En respect de la réglementation relative aux Désinfectants de Surfaces par Voie Aérienne (DSVA) pour des raisons de mise sur le marché du désinfectant formulé, nous nous proposons dans un futur proche de :

- ✚ Faire un suivi épidémiologique des différentes pathologies des bibliothécaires
- ✚ Compléter l'identification des isolats microbiens à travers leur caractérisation moléculaire.
- ✚ Réaliser des tests d'efficacité en condition réelle.
- ✚ Réaliser des tests de stabilité du désinfectant retenu
- ✚ Réaliser des tests de tolérance oculaire du désinfectant retenu.
- ✚ Réaliser des tests de tolérance cutanée du désinfectant retenu

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abed E.Y. (2014).** Assessment of Indoor Microbial Quality of Science Laboratories at Three Universities in Gaza City. Master of Science in Environmental Sciences. The Islamic University – Gaza – Palestine, 89p

**Adams R. P. (2012).** Identification of essential oils by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectroscopy. 4<sup>th</sup> Edition *Allured Publishing Corporation Carol Stream*. 698p

**AFNOR** (Association Française de Normalisation) (2007). Huile essentielles, Echantillonnage. *Normes internationales NF ISO 2212 du 20 mai NFT 75 A*. 16p

**AFNOR** (Association Française de Normalisation) (2009). Procédés de DSVA, détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide et sporicide : Norme française NF T 72-281. 30p

**AFSSAPS** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) (2008). Recommandations relatives aux critères de qualités des huiles essentielles 18p.

**Aktuganov G.E., Galimzyanova N.F., Melent'ev A.I. and Kuz'mina L.Y. (2007).** “Extracellular hydrolases of strain *Bacillus sp.* 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls,” *Microbiology*, 76(4): 413–420.

**Alnnasouri M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France. 179p

**Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. (2015).** Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. 5(7): 127-139

**Avoseh O., Oyedeji O., Rungqu P., Nkeh-Chungag B., Oyedeji A., (2015).** Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. *Molecules* 20: 7438–7453.

**Awad H. et Mawla H.A. (2012)**, Sedimentation with the Omeliansky Formula as an Accepted Technique for Quantifying Airborne Fungi, *Polish Journal of Environmental Studies*. 21(6): 1539-1541.

**Babii C., Mihalache G., Bahrin L.G., Neagu A-N., Gostin I., Mihai C.T., Sarbu L-G., Birsa L.M., Stefan M. (2018)**. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. *PLoS One*, 13 (4): 10-28

**Bajpai V.K., Shukla S., Paek W.K., Lim J., Kumar P., Kumar P., Na M. (2017)**. Efficacy of (C)-Lariciresinol to control bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 804-811

**Bansod, S., Rai, M., (2008)**. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, 3: 81–88.

**Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Obame L.C. et Ilboudo AJ, Franz C. (2011)** Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 18: 1070-1074.

**Behlou I., Gilmore M.S. (2008)**. Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases. *Archive of Ophthalmology*, 126: 1572-1581.

**Bellifa S. (2014)**. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen. 92p

**Belmaziz M. et Djalal F. (2017)**. Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de Master, Université Abdelhamid, Algérie. 99p

**Beloin C., Roux A., Svanborg C. (2005)**. *Escherichia coli*, biofilms. *Current Topic in Microbiology Immunology*, 322: 249-289.

**Benini C., Danflous J-P., Wathelet J-P., Du Jardin P. et Fauconnier M-L., (2010)**. *L'ylang-ylang [Cananga odorata (Lam.) Hook.f. & Thomson]*: une plante à huile essentielle méconnue dans une filière en danger, *Biotechnology Agronomy Society Environment*, 14 (4): 693-705

**Berche P. (2003).** Bactériologie générale. *Édition paris France*. 89p.

**Björkroth M. et Müller B. (2000).** "Pollution from Ducts: What is The Reason, How to Measure it And How to Prevent it?" *Healthy Buildings*, Espoo (SF), SIY Indoor Air Information Oy.

**Bluyssen, P.M. et Cox C. (2003).** "Why, when and how do HVAC-systems pollute the indoor environment and what to do about it? The European AIRLESS project." *Building and Environment* 38: 209-225.

**Borrego S., Lavin P., Perdomo I., Gómez de Saravia S. and Guiamet P., (2012).** Determination of Indoor Air Quality in Archives and Biodeterioration of the Documentary Heritage. *ISRN Microbiology*. 10p

**Bossou, A.D., Mangelinckx, S., Yedomonhan, H., Boko, P.M., Akogbeto, M.C., De Kimpe, N., Avlessi, F., Sohounhloue, D.C.K., (2013).** Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasit Vectors* 6: 337-354

**Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Kouakou G., N'guessan Y.T., Costa J. and Casanova. (2006).** Combined analysis of cymbopogon giganteus Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and 13-NMR. *Compte rendu de Chimie*. 99: 164-168.

**Boudih S. (2011).** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Thèse de Doctorat soutenue à l'Université Paris Est, France. 184p

**Boukhenoufa A, (2014).** Identifications microbiologiques, biochimiques, biotechnologique et moléculaire (PCR- ITS- RFLP) des levures issues du cépage *sultanine* de la commune d'Ain Merane (Wilaya de Chlef). Mémoire de Master, Université Abdelhamid, Algérie. 79p

**Bousbia N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, Institut National Agronomie, Alger (Algérie) 162p

**Branger A., Richer M., Roustel S. (2007).** Microbiochimie et alimentation. Edition Educagri, Dijon. 343p

**Bünger J., Schappler-Scheele B., Hilgers R. and Hallier E. (2007).** A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(4): 306-312.

**Burin M.P.C. (2002).** Les biofilm. Thèse de doctorat de l'école national Vétérinaire d'Alford, France. 136p

**Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 223-253.

**Cai Y., Wang R., An M.M. (2010).** Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and quorum sensing. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 37-41

**Caillaud D., Annesi-Maesano, Bennedjai, Bex V., De Blay F., Charpin D., Dalphin J.C, Fabre C., Garans M., Joyeux M., Meunier O., Mouilleseaux A., Neukirch F., Nolard N., Ravault N., Reboux G., Robine, Roquebert M.F. (2006).** Contaminations fongiques en milieux intérieurs diagnostic effets sur la sante respiratoire conduite à tenir, *CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE France*. 10(18) : 38-40.

**Campanac C. (2002).** Biofilms bactériens, intérêt dans l'évaluation de l'activité détergent, approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. Thèse, Université Paul Sabatier ; Toulouse, France. 212p

**Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. (2002).** Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 46(6): 1914-1920

**Cauliez N. (2011).** Les facteurs de dégradation des documents d'archives. *Archives nationales*. 14: 5-6.

**CCLIN (Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales) (2000).** Antiseptiques et désinfectants. 87p.

**Chahrazed Boudaoud. (2010).** Détection des pollutions dans l'air à l'intérieur des bâtiments. Thèse de Doctorat de l'Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen, Algérie. 75p

**Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005).** Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*, 61(3) : 225-230.

**Chasseur C., Nolard N. (2003).** Les champignons de l'habitat. *CSTC magazine*. 1-15p.

**Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.N., Hebraud M. (2002).** *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and environmental microbiology*. 68(2): 728–737

**Chen Y., Wu J., Xu Y., Fu M. and Xiao G. (2014).** Effect of second cooling on the chemical components of essential oils from orange peel (*Citrus sinensis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 62: 8786–8790.

**CLSI. (Clinical Laboratory Standards Institute) (2006).** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals-Approved standard-Third edition – CLSI document M11-A7- *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA, USA. 8-18p

**CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (2008).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Clinique*, 30-41p.

**CLSI. (Clinical Laboratory Standards Institute) (2011):** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, USA*. 13-24p

**CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (2012).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard **M27-A9**, Wayne. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Clinique*, 32: 12-28p.

**Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1): 1-17.

**Colombo A.L., Padovan A.C.B. and Guilherme M.C. (2011).** Current Knowledge of *Trichosporon sp.* and Trychosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(4): 682-700.

**Cos P., Vlietinck A.J., Van den Berghe D. and Maes L. (2006).** "Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'". *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

**Cottarel G. and Wierzbowski J. (2007).** "Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy". *Trends in Biotechnology*, 25: 547-555.

**Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L. (2001).** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 9: 492-499

**Crabos J. (2013)** mycoses cutanées à l'officine : Etude sur des populations en milieu confiné  
Thèse de l'université de Limoges, France. 102p

**Daddi O.S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Thèse de doctorat : Université Paris Sud XI, France. 169p

**De Billerbeck G. (2000).** "Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." Thèse de l'Institut national polytechnique de Toulouse, France. 236p.

**De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort, France. 147p

**De Paolis M.R., Lippi D. (2008).** Use of metabolic and molecular methods for the identification of a *Bacillus* strain isolated from paper affected by foxing, *Microbiological Research*. 163: 121-131.

**Derwich E., Benziane Z., Taouil R., Senhaji O., Touzani M. (2010).** Aromatic Plants of Morocco: GC/MS. Analysis of the Essential Oils of Leaves of *Mentha piperita*. *Advence Environmental Biology*, 4(1): 80-85.

**Derwich<sup>1</sup> E., Benziane Z., Chabir R., Bouseta A. (2013).** Antifungal activity and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) leaf oil analysis of essential oils extracted from *eucalyptus globulus* (myrtaceae) of north centre region of Morocco, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7(19): 1157-1162.



**Desjardins et Conklin P. (2010)** : D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiment*. 22(45): 2565-2578

**Djelloul D.S. (2010)**. Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen, Algérie. 66p

**Djuidje C.I.A. (2018)**. Profil microbiologique d'un milieu à grande fréquentation : Cas de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I. mémoire de Master de l'Université de Yaoundé I, Cameroun. 78p

**Dorman H.J.D et Deans. S.G. (2000)**. "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiologie*, 88: 308-316.

**Douwes, J., Thorne P., Pearce N., and Heederik D. (2003)**. Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47: 187-200.

**Droguet (2016)**. Identification bactérienne. Université Laval. Québec, Canada. 58p

**Drolet D., et Beauchamp G. (2012)** Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail. 150p

**Dufresne P. (2018)** Identification des moisissures d'intérêt médicale. Laboratoire de santé publique Québec, 59p

**Dupont H. (2000)** .Infections à staphylocoques. Conférences d'actualisation (scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR. 447-463p.

**Edris, A.E., Farrag, E.S. (2003)**. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung*, 47: 117-121

**Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A., (2015)**. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicine* 13: 321–337.

**Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I.M., (2016)**. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters* 38(6): 1015-1024

**Elyajouri A. (2012).** Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie –Rabat. 177p

**Espinal P., Marti S., Vila J. (2012).** Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 80: 56-60.

**Espinasse F., Pageb B., Cottard-Boulea B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*. 426: 51-63

**Etienne O. (2004).** Développement d'interfaces a propriétés antimicrobiennes par la fonctionnalisation de multicouches de polyelectrolytes .Thèse de doctorat : Université Louis Pasteur Strasbourg d'Odontologie. 169p

**Fauchère J.L., Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Editions Paris, ellipses, rue Bague 75740 Paris cedex 15. 165p.

**Fekadu H.S. and Melaku M.A. (2015).** Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries, Department of Environmental Health Science and Technology, College of Public Health and Medical Science, Jimma University, Ethiopia, *Ethiopian Journal of Health Science*, 25(2): 117-22

**Fekam B.F. (2004).** Huiles essentielles d'annomacées camerounaise : Analyse chimique, activité antioxydantes et antispasmodiales. Thèse en biochimie Université de Yaoundé I. 102-176p.

**Fitzpatrick F., Humphreys H., Smythy E., Kennedy C.A., O'Gara G.P. (2002).** Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Hospital Infection*. 42: 212-218.

**Franchomme P., Jallois R., Penoel D. (2011).** Aromathérapie exactement (Encyclopédie de l'utilisateur thérapeutique des extraits aromatique). Eds Roger Jollois; 21-74; 190-245; 347-434

**François A., 2009.** Brochure de recommandation et de conseil : moisissure prévention et lutte. *Archives générales du Royaume*, 22p

**Franz, A.R., Knaak, N., Fiuza, L.M., (2011).** Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira Entomologia* 55: 116–120.

**Gartshore J. (2003).** Biodegradation of plasticizers by *Rhodotorula rubra*. *Environnemental Toxicology and Chemistry*, 22(6): 1244-1251.

**Genty D., Baker A. et Wokal B. (2001).** Intra and inter annual growth rate of modern stalagmites. *Chemical geology*, 176: 191-212

**Géssica A.C., Fernanda C.P. Rossatto<sup>1</sup> W., Paula F., Brandelli A., Paula A. Frazzon<sup>1</sup> and Motta<sup>1</sup> A. (2018)** Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Annals of the Brazilian Academy of Science*. 90(1): 73-84

**Ghosh, B., Lal, H., Kushwaha, R., Hazarika, N., Srivastava, A., Jain, V.K. (2013).** Estimation of bioaerosol in indoor environment in the university library of Delhi. *Sustain. Environmental Research*. 23 (3): 199–207.

**Goetz P. and Ghedira K. (2012).** Phytothérapie anti-infectueuse. *Edition Springer*, France 382p

**Goyer, N., Lavoie J., Lazure L. et Marchand G. (2001).** Les bioaérosols en milieu de travail : Guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST)*. Guide techniques. 72p

**Grasteau A. (2011)** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Université de Montréal Faculté de médecine vétérinaire. 126p

**Gupta A.K., Ahmad I., Summerbell R.C. (2002).** Fungicidal activities of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against clinical strains of *Aspergillus* and *Candida* species. *Medical Mycology*, 40: 201–208

**Hadacek F. et Greger H., (2000).** Testing of antifungal natural product Methodologies Comparability of result and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11: 137-147.

**Harding J. (2008).** The Essential Oils Handbook. London, UK: Duncan Baird Publishers Ltd, 288p

**Heederik, D., and Mutius V.E. (2012).** Does diversity of environmental microbial exposure matter for the occurrence of allergy and asthma: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130: 44-50.

**Hempel M., Rakhra V., Rothwell A., and Duri Song. (2014).** Bacterial and fungal contamination in the library setting: a growing concern? *Environmental Health Reviews*. 57(1): 9-15.

**Hend A.H. (2009).** Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular Markers. *The Open Biotechnology Journal*, 3: 103-107

**Hou W., Sun X., Wang Z. (2012).** Investigative Ophthalmology & Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 9 (53) : 5624-5631.

**INRS (2014).** Les espaces confinés, assurer la sécurité et la protection de la santé des personnels intervenants. *Edition INRS 6184*. 28p

**INSPQ (Institut National de Santé Publique du Québec), (2002).** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. 159p

**Inui T., Wang Y., Deng S., Smith D.C., Franzblau S.G. and Pauli G.F. (2007).** "Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical". *Journal of Chromatography*, 51(11): 211-215.

**Ito A., Taniuchi A., May T., Kawata K., Okabe S. (2009).** Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 75(12) : 4093-4100.

**Joffin J. et Leyral P. (2005).** Microbiologie Technique 1: Dictionnaire des techniques, 3<sup>ème</sup> Edition CRDP Aquitaine. 97-203p.

**Joseph B., Otta S.K., Karunasagar I., and Karunasagar I. (2001).** Biofilm formation by *Salmonella sp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 367-372.

**Jovanovic S., Felder-Kennel A., Gabrio T., Kouros B., Link B., Maisner V., Piechotowski I., Schick K.H., Schrimpf M., Weidner U., Zöllner I. et Schwenk M.I. (2004).** Indoor fungi levels in homes of children with and without allergy history. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207: 369-378.

**Kalemba D. et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry*. 10: 813-829.

**Kaloustian J. et Hadji-minaglou F. (2012).** La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie (Entre science et tradition pour application médical raisonnée). Collection phytothérapie pratique ; *Edition Springer*, Paris. 162p

**Kaplan J.B., (2010),** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, 89(3): 205-215.

**Kara T.I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie. 98p

**Kavanaugh N. L., Ribbeck K. (2012).** Selected anti-microbial essential oils eradicate *Pseudomonas sp* and *Staphylococcus aureus* biofilm. *Applied environmental biology*. 78(11): 4057-61.

**Kemegne G.A., Nyegue M.A., Kamdem S.S.L, Etoa F-X. et Menut C. (2018).** *Mangifera indica* Bark Essential Oil: Chemical Composition and Biological Activities in Comparison with Aqueous and Ethanol Extracts. *Natural Product Cominicaions*, 13(7): 791-918.

**Khadidja B. (2017)** Evaluation de la capacité des souches de *Staphylococcus spp* à former des biofilms dans l'industrie laitière, Mémoire de l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, Algerie. 68p

**Khalilzadeh P. (2009).** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse. 297p

**Kirmusaoğlu S. (2016).** Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm embedded microorganisms. In: Dhanasekaran D, Thajuddin N, editors. *Microbial Biofilms—Importance and Applications*. Croatia: Intech. 189-209p.

**Klein G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne. 204p

**Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Rhode H., Mack D. (2002).** Evaluation of different detection methods for biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 19: 101-106.

**Kpoviessi S., Bero J., Agbani P., Gbaguidi F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin B., Accrombessi G., Frédéric M., Moudachirou M., Quetin-Leclercq J., (2014).** Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*. 151: 652–659.

**Kuchma S.L., Connolly J.P., O'toole G.A. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(4): 1441-1454.

**Kuhn, D.M., and Ghannoum M.A. (2003).** Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clinical Microbiology Revue*, 16: 144-72.

**Laghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak A. et Costa J. (2014).** Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme. *Journal of material environment and science*, 5: 1770-1780

**Lang G. and Buchbauer G. (2012).** "A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 13-39.

**Lecellier A. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Université de Reims Champagne-Ardenne. 26-27p.

**Lehotay S.J. et Hajslova (2002).** Application of gas chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 21: 686-697.

**Lelieveld H.L.M., Mostert M.A., Holah J., White B. (2003).** Hygiene in food processing. Boca Raton: CRC Press. 26p

**Liesse I.J-M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France. 226p

**Logan N.A. and Rodriguez D.M. (2006).** *Bacillus sp.* and related Genera. S.H. Gillespie, & P.M. Hawkey (Eds.), Principles and Practice of Clinical Bacteriology (2nd ed.). West Sussex, England, UK: John Wiley and Sons Ltd. 139-158p

**Lopez-Malo A., Alzamora S.M. and Palou, E. (2005).** *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and natural occurring antimicrobial compounds *International Journal of Food Microbiology*. 99: 119-128.

**Machado M., Pires P., Dinis A.M., Santos-Rosa M., Alves V., Salgueiro L., Cavaleiro C., Sousa M.C., (2012).** Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Experimental Parasitology*. 130: 223–231.

**Manvitha K., Bidya B. (2014).** Review on pharmacological activity of *Cymbopogon citratus*. *International Journal of Herbal Medicine*, 1(6): 5-7.

**Marchal M. (2010).** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, France. 194p

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24(1): 25-29.

**Meadow JF., Altrichter AE., Kembel SW., Kline J., Mhuireach G., Moriyama M. (2014).** Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air*, 24(1): 41-48.

**Méar J-B. (2014).** Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France. 82p

**Meheust D. (2012).** Exposition aux moisissures en environnement intérieur : méthodes de mesure et impacts sur la santé. Santé publique et épidémiologie. Thèse soutenue à l'Université Rennes 1, France. 167p

**Meunier O., Hernandez C., Piroird M., Heilig R., Steinbach D., Freyd A. (2005).** Prélèvements bactériologiques des surfaces : importance de l'étape d'enrichissement et du choix des milieux de culture. *Annal de Biologie Clinique*, 63(5): 481-499.

**Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïde de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse d'obtention du diplôme de Magistère. Université Abou Bakr Belbaïd Tlemcen, Algérie. 105p.

**Moni E., Nyegue M., Ndoyé F. Fl., Voundi ., Essia Ngang J.J., Etoa F-X. et Menut C., (2013).** Profil chimique et tests antibactériens de neuf huiles essentielles et leurs combinaisons sur les bactéries responsables sur les diarrhées infantiles. *15ème Symposium Phyt'Arôme*. Grasse 7, 8 et 9 Juin.

**Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E., Roura S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. 38: 565-570

**Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D. et Roussis V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpènes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1): 143-148

**Nagant C. (2013).** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France. 162p

**Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., et Kelmani Chandrakanth R. (2010).** Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Bioscan*; 5(4): 563-566

**Nasr R., AbuShady H., Hussein H., (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of *Staphylococci*, *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13: 269–274.

**Ndoyé F.M-C. (2001).** Evaluation des propriétés anti radicalaires et anti oxydantes des huiles essentielles aromatiques, tropicales en province Est du Cameroun. Thèse de doctorat troisième cycle, Université de Montpellier II. 319p

**Ngongang T.D, Nyegue M.A, Djondji M.F., Ngonsu K.H., Moni N.E.D.F. and Etoa F-X (2018)** Assessment of four essential oils against bacterial species isolated from patients with oral infection. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences*. 6(2): 44-57.

**Ngongang T.D, Nyegue M.A., Moni N.E.D.F. et Etoa F-X. (2019).** Effect of five essential oils on cell release membrane and biofilm formation of clinical bacterial isolated from oral infection. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2): 28-35

**Nieguitsila A. (2008).** Evaluation de l'aérocontamination dans les environnements intérieurs. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII VAL de MARNE. 14-30p



**Niemeier R.T., Sivasubramani S.K., Reponen T. et Grinshpun S.A. (2006).** Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 3: 262-273.

**NIST:** National Institute of Standards and Technology. Web Book of Chemistry: Standard Reference Database. Number 69. [Accessed 02 jul 2017-16 set 2017].

**Niu C. et Gilbert E.S. (2004).** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied environmental biology*. 70(12): 6951-6.

**Normand A-C., Ranque S., Carole Cassagne C., Jean Gaudart, Kanko J.G. Sallah. (2016).** Comparison of Air Impaction and Electrostatic Dust Collector Sampling Methods to Assess Airborne Fungal Contamination in Public Buildings. *Annals of Occupational Hygiene*, 60(2): 161-175.

**Nostro A., Sudano Roccaro A., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F. et Blanco A.R. (2007).** "Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Journal of Medical Microbiology*. 56 (4): 519–523.

**Noudogbessi J-P., Gary-Bobo M., Adomou A., Adjalan E., Alitounou G.A., Avlessi F., Garcia M., Sohounhloe DC.K. et Menut C. (2014).** Comparative chemical study and cytotoxicity activity of *Uvariadendron angustifolium* essential oils from Benin. *Natural Product Communication*. 9: 261-264.

**Nyegue M.A, Moni N.E.DF, Ndoyé F.M-C, Etoa F-X. et Menut C. (2017).** Bioactivity of essential oils from medical plants of Cameroon and their combinaison against infant diarrhea induced by bacteria. *African Journal of Traditional and Complementary Alternernative Medecine*, 6 : 27-37.

**Nyegue M.A. (2006).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles de quelques plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : Évaluation de leurs activités anti radicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Thèse de Doctorat en cotutelle entre les Universités de Yaoundé I et de Montpellier II. 194p

**Nyegue M.A., Ndoyé F.M-C, Riwom E.S, Hockmeni T.C, Etoa F-X, Menut C. (2014)** Chemical composition of essential oils of *Eugenia caryophylla* and *Mentha sp cf piperata* and

their in vitro antifungal activities on six human pathogenic fungi. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 11(6): 40-46

**O'Toole, G.A. and Devey, M.E. (2000).** Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 847-867

**Oliveira M.M.M.D., Brugnera D.F., Cardoso M.D.G., Alves E., Piccolo R.H. (2010).** Disinfectant action of *cymbopogon sp* essential oil in different phase of biofilm formation by *listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food control*, 21: 549-553

**Omeliansky, V.L. (1940).** Manual in Microbiology. USSR academy; of sciences, Moscow, Leningrad. 13-19p

**OMS (2016).** Pollution de l'air intérieur des habitats et la santé. Aide- mémoire N°292. <http://ww.int/entity/mediacentre/fctsheets/fs292/fr/index.html>. Site consulté le 9 Juin 2017.

**OMS (2020).** Estimation de la mortalité due à la COVID-19 : document d'information scientifique, 31 Août 2020 4p

**Othman, S.N.A.M., Hassan, M.A., Nahar, L., Basar, N., Jamil, S., and Sarker, S.D. (2017).** Essential oils from the Malaysian Citrus (Rutaceae) medicinal plants. *Medicines* 3: 13.

**Oussou K. R., Yolou S., Boti J. B., Guessennd K. N., Kanko C., Ahibo C. et Casanova J., (2008).** Étude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24: 94-103

**Oussou K.R., (2009).** Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 241p.

**Palazzolo E., Laudicina V.A., and Germanà M.A. (2013).** Current and potential use of Citrus essential oils. *Current Org.-anic Chemistry*. 17: 3042–3049

**Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D., Dixit S.N (1982).** Fungitoxic and phytotoxic property of the essential oil of *hyptis suaveolens*, *Journal of Plant Diseases and Protection*. 89: 344-349.

**Pecastaings S. (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France. 233p

**Perrin C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France. 311p

**Pibiri M.C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation moyen des huiles essentielles. Thèse des sciences de polytechnique Fédérale de Lausanne Suisse. 161p

**Pinto S.C., Leitão G.G., Oliveira D.R., Bizzo H.R., Ramos D.F., Coelho T.S., Silva P.E., Lourenço M.C and Leitão S.G. (2009).** Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* *Natural Product Communication*; 4(12): 1675-1678,

**Punitha T., Moorthy K., Vijayalakshmi P., Vinodhini R., Saranya S., Bhuvaneshwari M., Kanimozhi C. (2014)** *in vitro* antibacterial activity of essential plant oils against biofilm forming methicillin resistant *staphylococcus aureus*. 7: 0974-2441

**Rabiai M. (2014).** Étude physicochimique et évaluation de l'activité biologique d'une huile essentielle et l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* de la région M'Sila m »moire de master Université de M'Sila, Algerie. 71p

**Rajash B., Rattan LI (2008).** Essential of medical microbiology. 4th edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 415–439p.

**Reboux G. (2006).** Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46(3): 208-212

**Reboux G., Piarroux R., Mauny F., Madroszyk A., Millon L., Bardonnnet K. and Dalphin, J.C. (2001).** Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7): 1534-1539.

**Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de doctorat, université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 9-23p

**Rocchi. (2014).** Relations entre profils microbiologiques de l'environnement intérieur et maladies respiratoires infectieuses et allergiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche Comte, France. 101p.

**Roquebert M.F., Bury E., Cazenobe A. (2002).** « Étude des moisissures dans une réserve de bibliothèque ». *Bulletin des bibliothèques de France (BBF)*, 6: 84-88.

**Rossoni, E.M.M. et Gaylarde C.C. (2000).** Comparison of sodium hypochlorite and *Salmonella sp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64 : 367-372.

**Roulet, C-A. (2004).** "Qualité de l'environnement intérieur et santé dans les bâtiments" *Collection gérer l'environnement*, PPUR Lausanne, Suisse. 368p.

**Roy R, Tiwari M, Donelli G, Donelli V. (2018)** Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1): 522-554

**Saha P. et D'Mello P. M. (2004).** A review of medicinal uses and pharmacological effect of *Mentha piparita*. *Natural product Radiance*. 3(4): 214-221.

**Samoisy A.K., Mahomoodally F., (2016).** Ethnopharmacological appraisal of culturally important medicinal plants and polyherbal formulas used against communicable diseases in Rodrigues Island. *Journal of Ethnopharmacology*. 194: 803–818.

**Sarkic A. et Stappen I. (2018).** Essential oils and their single compounds in cosmetics- A critical reviews. *Cosmetics*. 5: 114-136

**Sartoratto A., Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C.T. et Rehder V.L.G. (2004).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34(4): 1517-1520.

**Sauer K., Camper A.K., Eherlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriol.* 184: 1140-1154

**Sautour M., Sixt N., Dalle F., L'Ollivier C., Fourquenet V., Calinon C., Paul K., Valvin S., Maurel A., Aho S., Couillault G., Cachia C., Vagner O., Cuisenier B., Caillot D. et Bonnin A. (2009).** Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Science of the Total Environment*, 407: 3766-3771.

**Schroder T., Gaskin S., Rossa K. and Whiley H (2017)** Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 23(3): 181–186

**Schwab C., Hosokawa M., McGeer P.L. (2004).** Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Experimental Neurology*. 188: 52-64

**Seaforth C., Tikasingh T., Gupta M., St Rose G., (2008).** A study for the development of a handbook of selected Caribbean herbs for industry. 125p

**Sharma N., Tripathi A. (2006)** Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(6): 587-593.

**Sokovic M.D, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, van Griensven L JLD. (2009).** Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14: 238-249.

**Soto T., Lozano M., Vicente-Soler J., Cansado J., Gacto M. (2009).** Microbiological survey of the aerial contamination in urban areas of the city of Murcia, Spain. *Annual of Biology*, 31: 7-13

**Souhila B et Nafaa B (2007).** Détermination « *in vitro* » du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'*Eucalyptus*, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Thèse de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie 126p

**Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003).** Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*, 50(1): 15-27.

**Sritabutra D., Soonwera M., (2013).** Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). *Asian Pacific Journal Tropical Diseases*. 3: 271–276.

**Stanley N.R., Britton A.R., Grossman A.D., Lazazzera B.A. (2003).** Identification of catabolites repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays, *Journal of Bacteriology*, 185(6): 1951- 1957.

- Stepanovic S., DraganaVukovic D., Dakic I. (2000).** A modified microtiterplate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175–179.
- Strang T. et Kigawa R. (2009).** La lutte contre les ravageurs des biens culturels. L'Institut canadien de conservation, *Bulletin technique* n°29. 48p
- Su H-J., Chao C.J Chang H-J Wu P.C. (2006).** The effect of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric environment*, 41: 1230-1236
- Sulimanv S.F., van Vuuren, and Viljoen A.M. (2010).** "Validating antimicrobial combination therapy in African traditional medicines-a case for *Artemisia afra*". *South African Journal of Botany*, 76: 655-661
- Survilienė E., Valiuškaitė A., Snieškienė V., Stankevičienė A. (2009).** Effect of essential oils on fungi isolated from apples and vegetables. Scientific Works Of The Lithuanian Institute Of Horticulture And Lithuanian, University Of Agriculture, *Sodininkyst Ir Darininkyst*, 28: 227-234.
- Talon D. (1999).** The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *Journal of Hospital Infection*, 43: 13-17
- Tao N., Jia L., and Zhou H. (2014).** Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 153: 265–271.
- Teagasc. (2008).** Standard Operating Procedure for Microbiological Examination for Checks of Cleaning and Disinfection in Meat Establishments. *Agriculture and Food Development Authority*. 1-8p.
- Tiano P. (2002).** Biodegradation of Cultural Heritage: Decay, Mechanisms and Control Methods. Seminar article. New University of Lisbon, Department of Conservation and Restoration. 37p.
- Tiwari M., Dwivedi U.N., Kakkar P., (2010).** Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2913–2919.
- Tofiño-Rivera A., Ortega-Cuadros M., Galvis-Pareja, D., Jiménez-Rios H., Merini L.J., Martínez-Pabón M.C., (2016).** Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils

on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacol.* 194: 749–754.

**Toure D. (2015)** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d’Ivoire. Université Felix Houphoet Boigny, Côte d’Ivoire, 153p

**Trivedi N.A, Hotchandani S.C. (2004).** A study of the antimicrobial activity of oil of Eucalyptus. *Indian Journal of Pharmacology* 36: 93-94.

**Ulla L. (2008)** Characterization of microorganisms in indoor environments. Publications of the National Public Health Institute. 116p

**Ultee A., Bennik M.H.J. and Moezelaar, R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 1561-1568.

**Valeriano C., Oliveira T.L.C, Carvalho S.M., Cardoso M.G, Alves E., Piccoli R.H. (2012).** The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella entericaserotype Enteritidis* S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control,* 25: 673-677

**Van Vuuren S.F. and Viljoen A.M. (2011).** "Plant-based antimicrobial studies - Methods and approaches to study the interaction between natural products". *Planta Medica,* 77: 1168-1182.

**Varela N.P., Friendship R., Dewey C. and Valdivieso A. (2008).** "Comparison of agar dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms". *The Canadian Journal of Veterinary Research,* 72: 168-174.

**Voundi O.S., Nyegue M., Bougnom B.P. and Etoa FX. (2017).** The Problem of Spore-Forming Bacteria in Food Preservation and Tentative Solutions. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance,* 6: 139-145.

**Voundi O.S.H, (2017).** Etudes des huiles essentielles des plantes pour le contrôle des spores de *Bacillus* dans les produits alimentaires, Thèse de Doctorat Ph.D, Université de Yaoundé I, Cameroun, 160p

**Wagner H. (2006).** "Multitarget therapy-the future of treatment for more than just functional dyspepsia". *Phytomedicine,* 13: 122-129.

**Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T., Thubthimthed S., (2005).** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia* 76: 233–236.

**WHO (2000).** "Air Quality Guidelines for Europe" WHO Regional Publications, European Series Copenhagen, 273p.

**WHO. (2009).** Guidelines for indoor air quality, dampness and mould publications, *WHO Regional Office for Europe*, Available at: [www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0017/43325/E92645.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf).

**WHO. (2011).** Environmental burden of disease associated with inadequate housing. *Summary report*. 13p

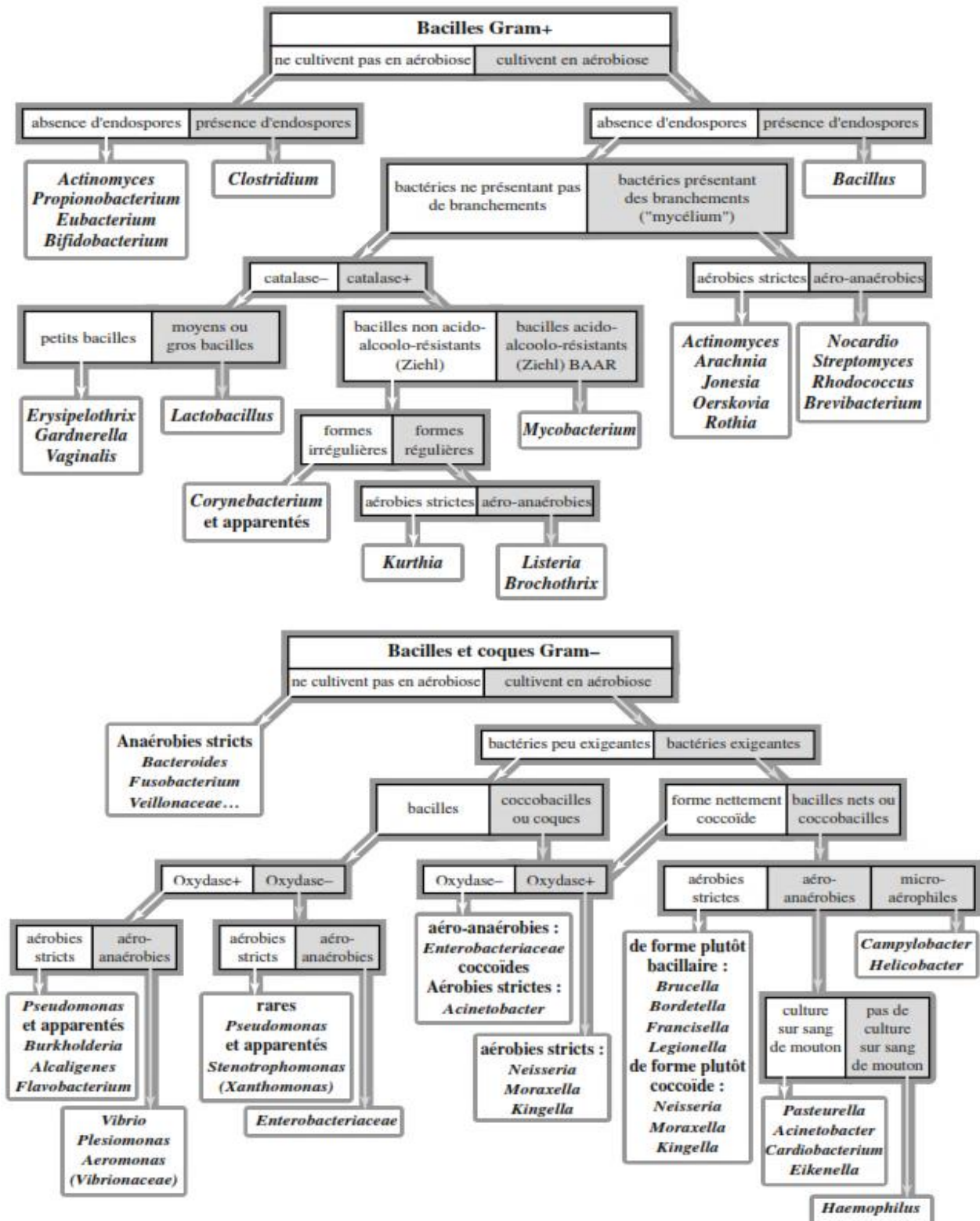
**Wirth F. et Goldani L.Z. (2012).** Epidemiology of *rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012: 465717.

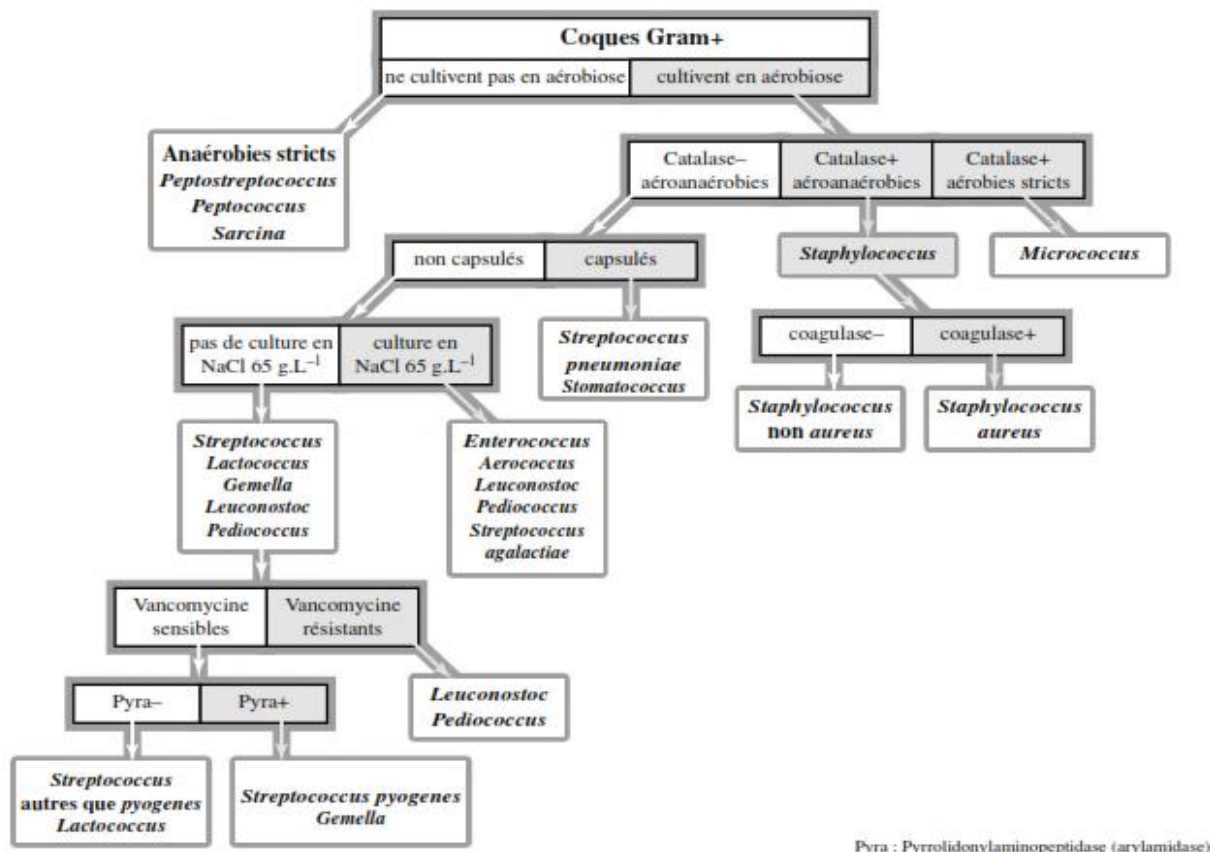
**Xu G.M. (2016).** Relationships between the regulatory systems of *quorum sensing* and multidrug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 16(7): 958-973



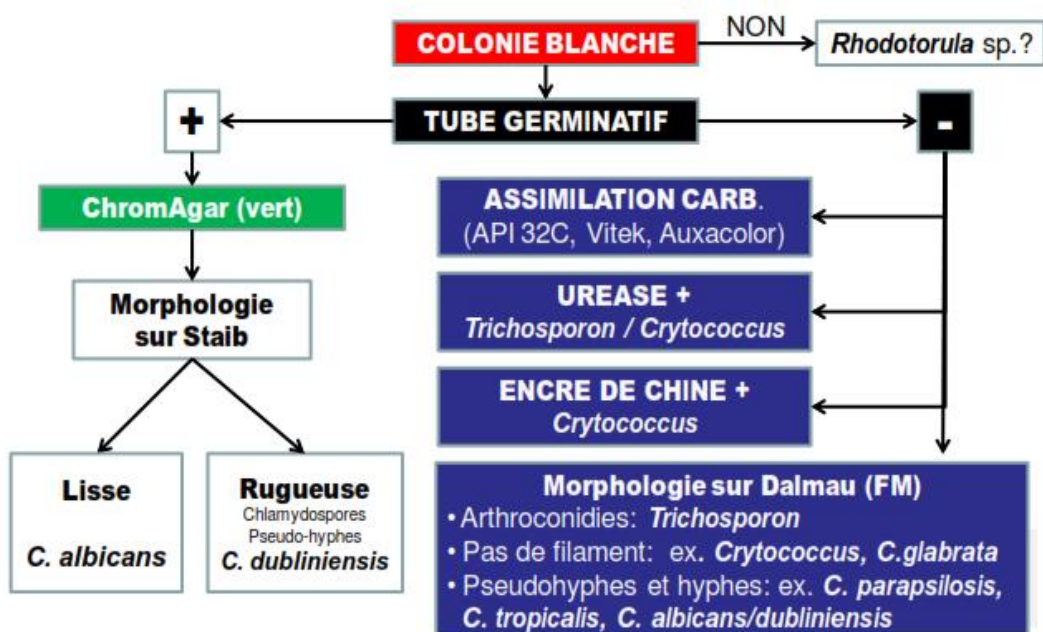
## ANNEXES

Annexe 1: Schémas d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens (Joffin et Leyral, 2005).





Annexe 2 : Schéma d'identification des levures (Dufresne, 2014)

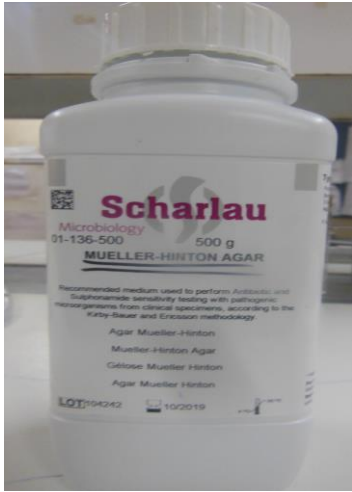




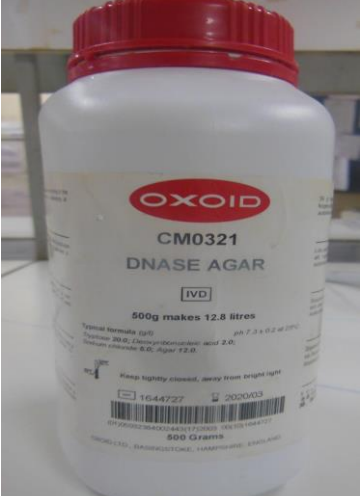
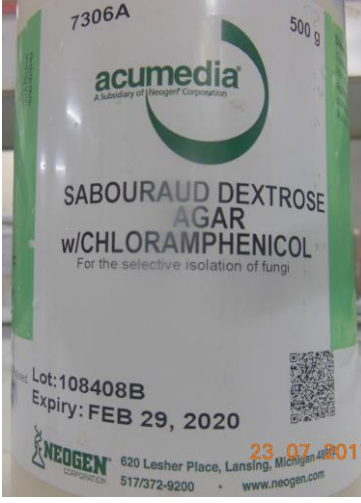
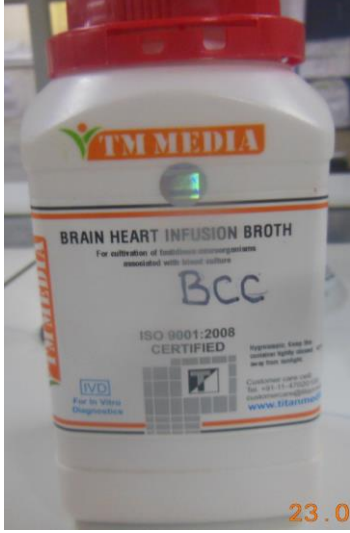
**Annexe 3** : Tableau de lecture des plaques API 20E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	REACTIONS-ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βDGalactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge - orangé
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>CIT</u>	trisodium citrate	utilisation du CITrate	vert pâle - jaune	bleu-vert – bleu
<u>H2S</u>	sodium thiosulfate	production d'H2S / H2S production	incolore - grisâtre	dépôt noir - fin liseré
<u>URE</u>	Urée	UREase	Jaune	rouge - orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	Jaune	Marron – rougeâtre
IND	L-tryptophane	production d'INDole	JAMES-immédiat	
			Incolore-vert pâle-jaune	rose
	sodium pyruvate	production d'acétoïne	incolore - rose pâle	rose - rouge
	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	Absence de diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation - oxydation (GLUcose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation - oxydation (MANnitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	fermentation - oxydation (INOsitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	fermentation - oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	fermentation - oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	fermentation - oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	fermentation - oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	fermentation - oxydation (AMYgdaline)	bleu - bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	fermentation - oxydation (ARABinose)	bleu - bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)	cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	
Réduction des nitrates tube GLU	potassium nitrate	production de NO2 réduction au stade N2	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min	
			Jaune	rouge



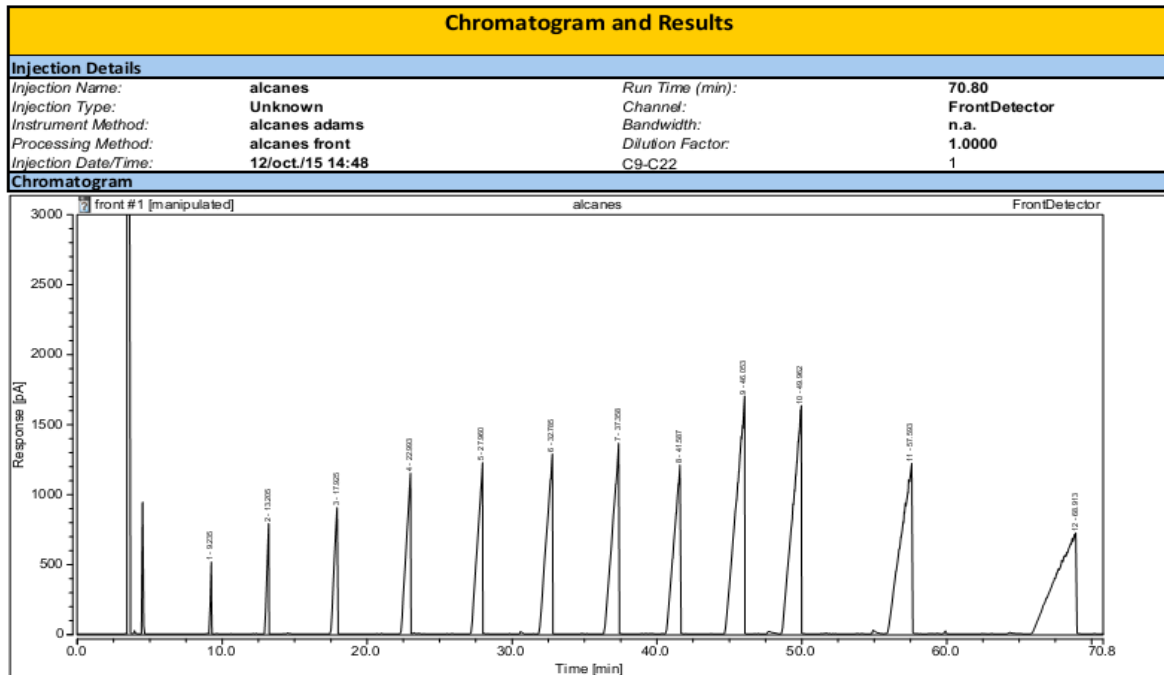
**Annexe 5 : Composition chimique de quelques milieux de cultures**

Milieux de culture	Composition chimique (g/l)	Illustrations
<p><b>Mueller Hinton</b> (Scharlau, Espagne)</p>	<p>Peptone..... 17,5 Beef infusion solids.....2.0 Starch .....1.5 Agar .....17.0 Final pH 7.3 ± 0.1 at 25°</p>	
<p><b>Eosin Methylene Blue Agar</b> (Oxoid, Angleterre)</p>	<p>Peptone .....10.0 Lactose .....10.0 Di-potassium hydrogen phosphate.2.0 Eosin Y.....0.4 Methylene blue.....0.06 Agar.....15.0 pH 6.8 ± 0.2 at 25°C</p>	
<p><b>Mannitol Salt Agar</b> (Titan Biotech, India)</p>	<p>Sodium chloride.....75.00 Agar.....15.00 Proteose peptone.....10.00 D-Mannitol.....10.00 Beef extract.....1.00 Phenol red..... 0.025 pH 7.4 ± 0.2 at 25°C</p>	

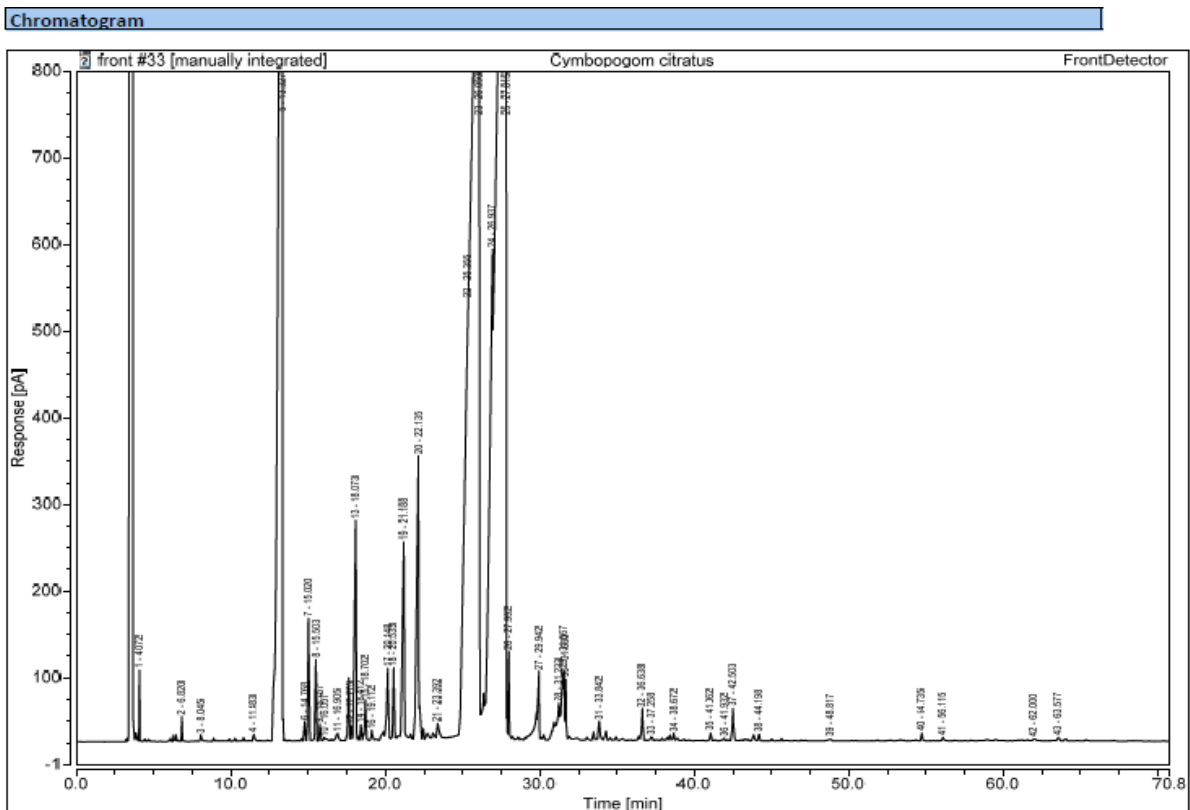
<p><b>Dnase</b> (Oxoid, Angleterre)</p>	<p>Tryptose.....20.0 Deoxyribonucleic acid.....20.0 Sodium chloride.....5.0 Agar.....12 pH 7.3 ± 0.2 at 25°C</p>	
<p><b>Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol</b> (Acumedia, Michigan)</p>	<p>Enzymatic Digest of Casein.....5.00 Enzymatic Digest of Animal Tissue.5 Dextrose.....40 Chloramphenicol .....0.05 Agar.....15 Final pH 5.6 ± 0.2 at 25°C</p>	
<p><b>Brain Heart Infusion Broth</b> (Titan Biotech, India)</p>	<p>Beef heart infusion from.....250.00 Calf brain infusion from.....200 Proteose peptone.....10 Sodium chloride.....5.00 Di-sodium phosphate.....2.50 Dextrose.....2.00 pH 7.4 ± 0.2 at 25°C</p>	

## Annexe 6 : chromatogrammes des huiles essentielles et combinaisons

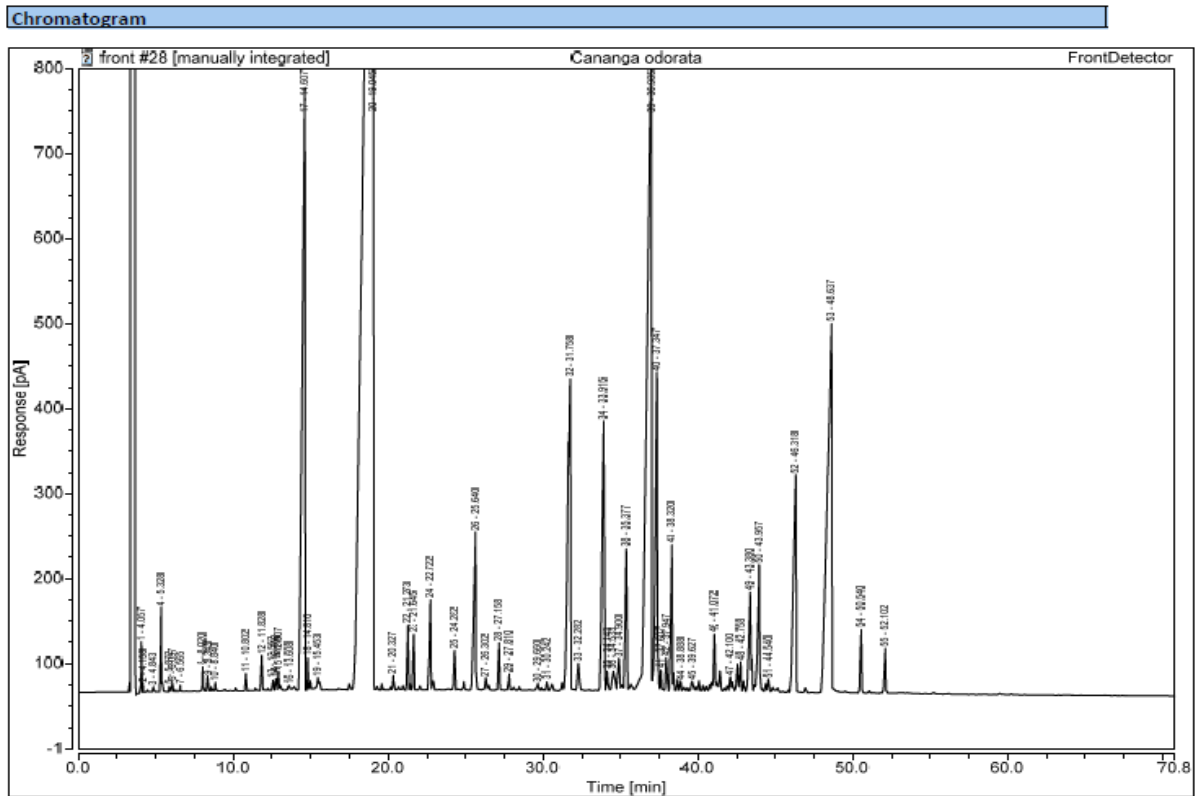
### ➤ Chromatogramme des alcanes a C9.....C18, C20, C22.



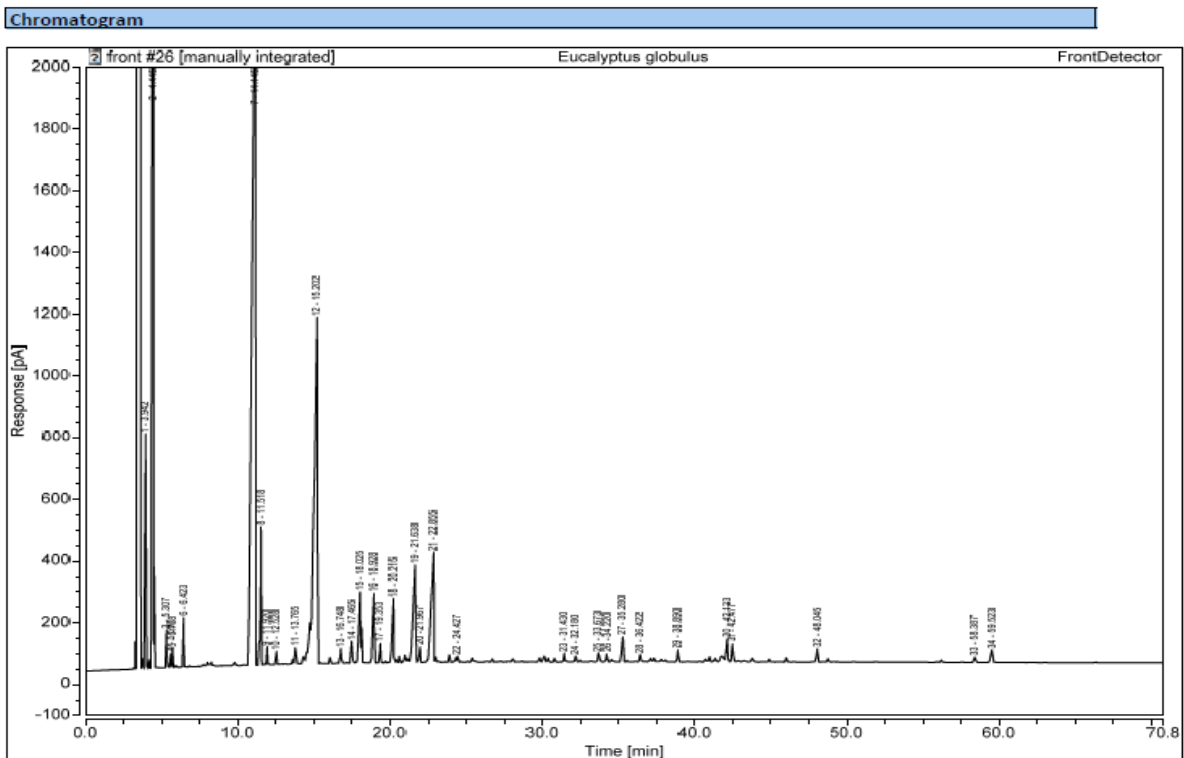
### ➤ Chromatogramme de *Cymbopogon citratus*



➤ Chromatogramme de *Cananga odorata*

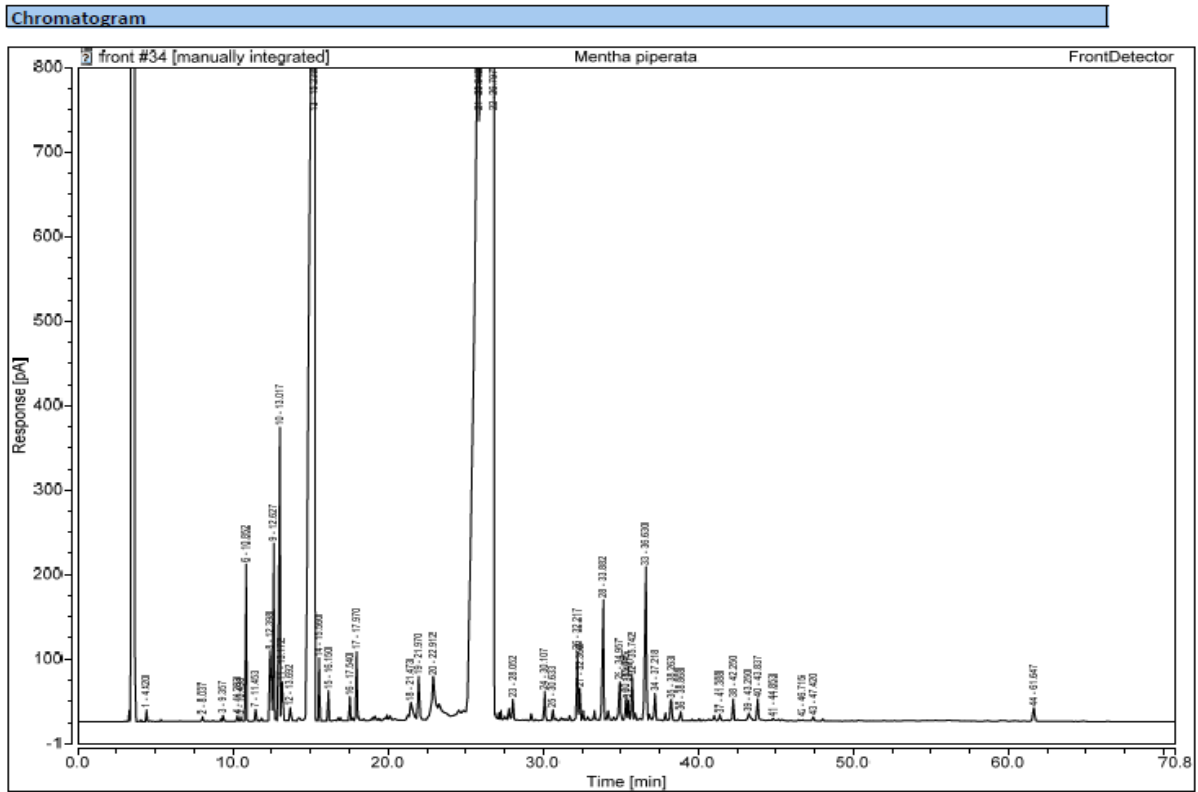


➤ Chromatogramme d'*Eucalyptus globulus*

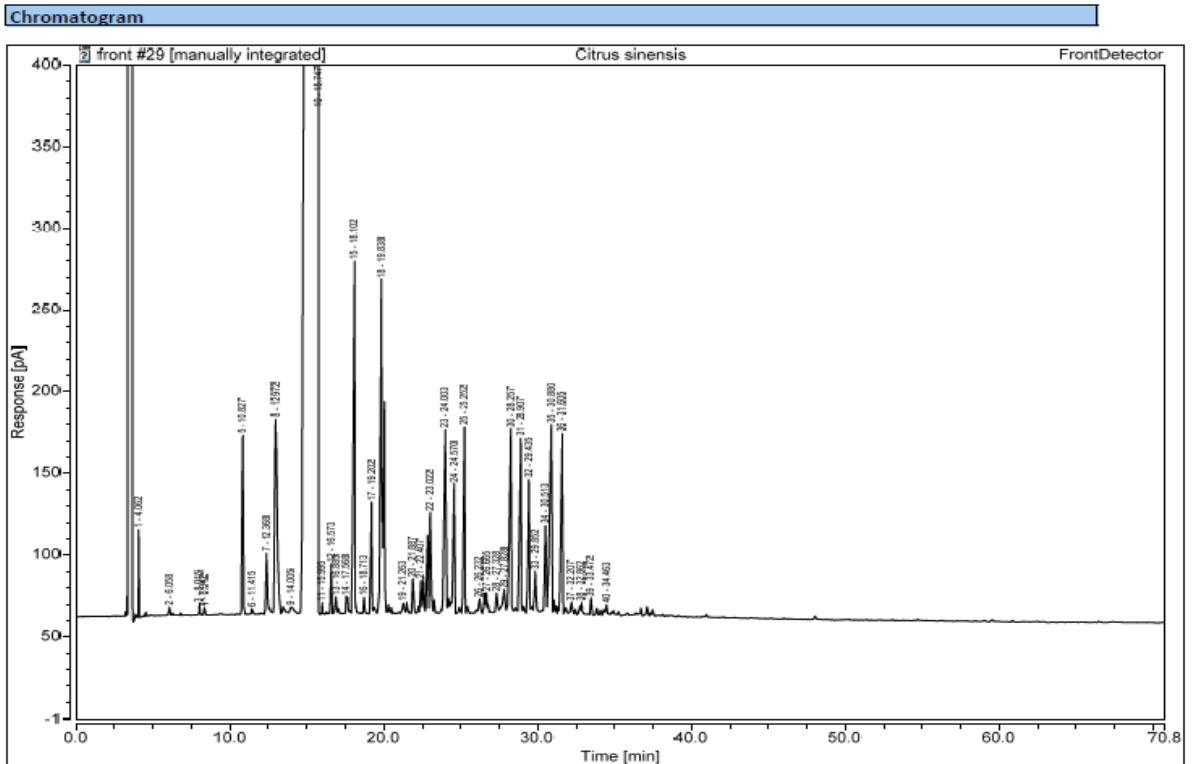




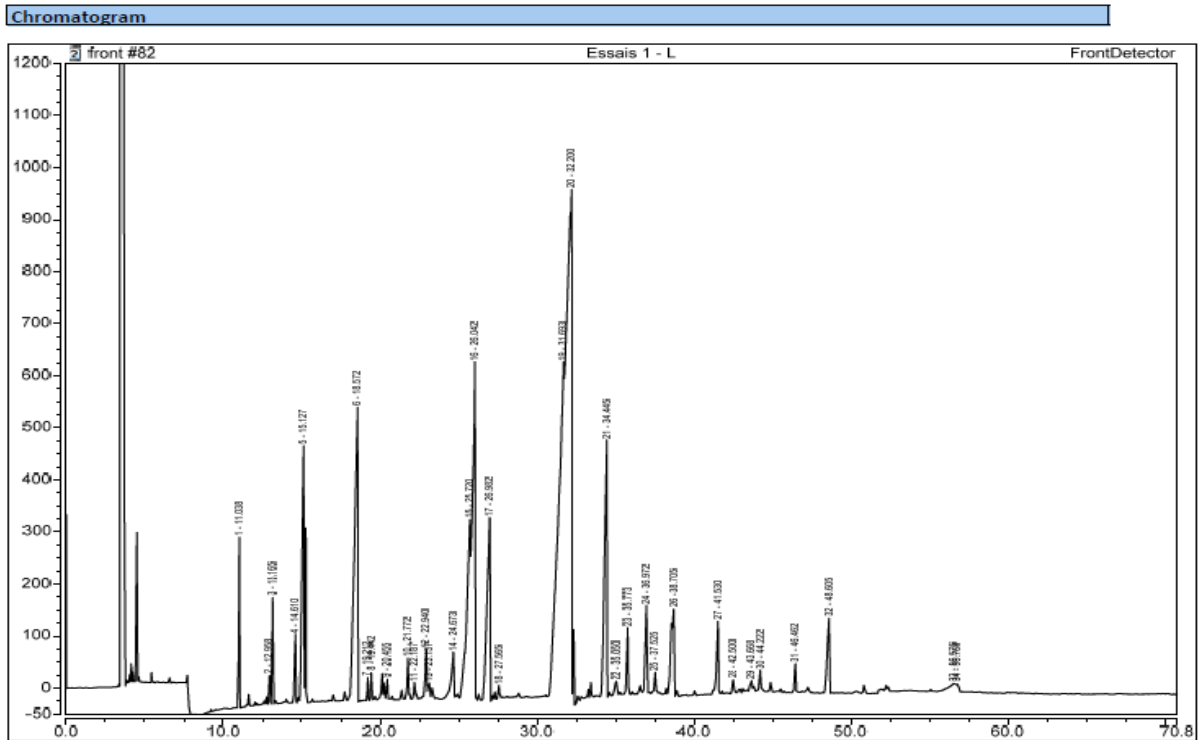
➤ Chromatogramme de *Mentha sp cf pipéríta*



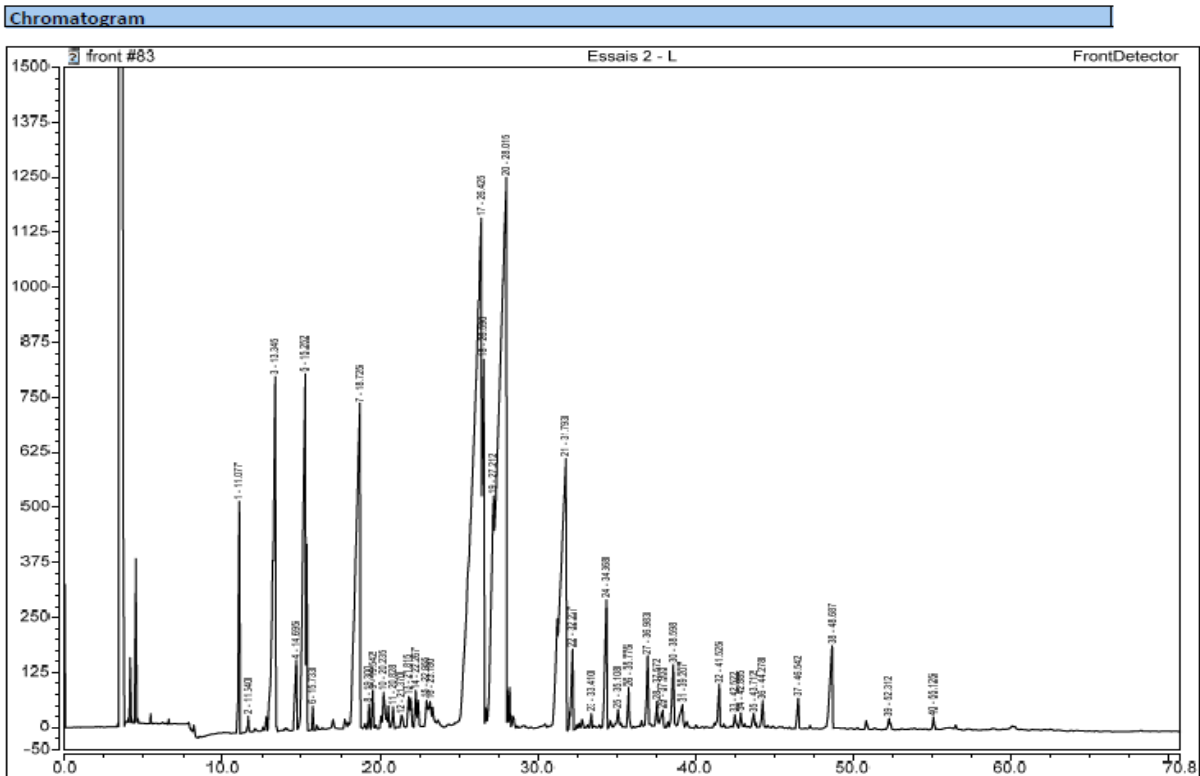
➤ Chromatogramme de *Citrus sinensis*



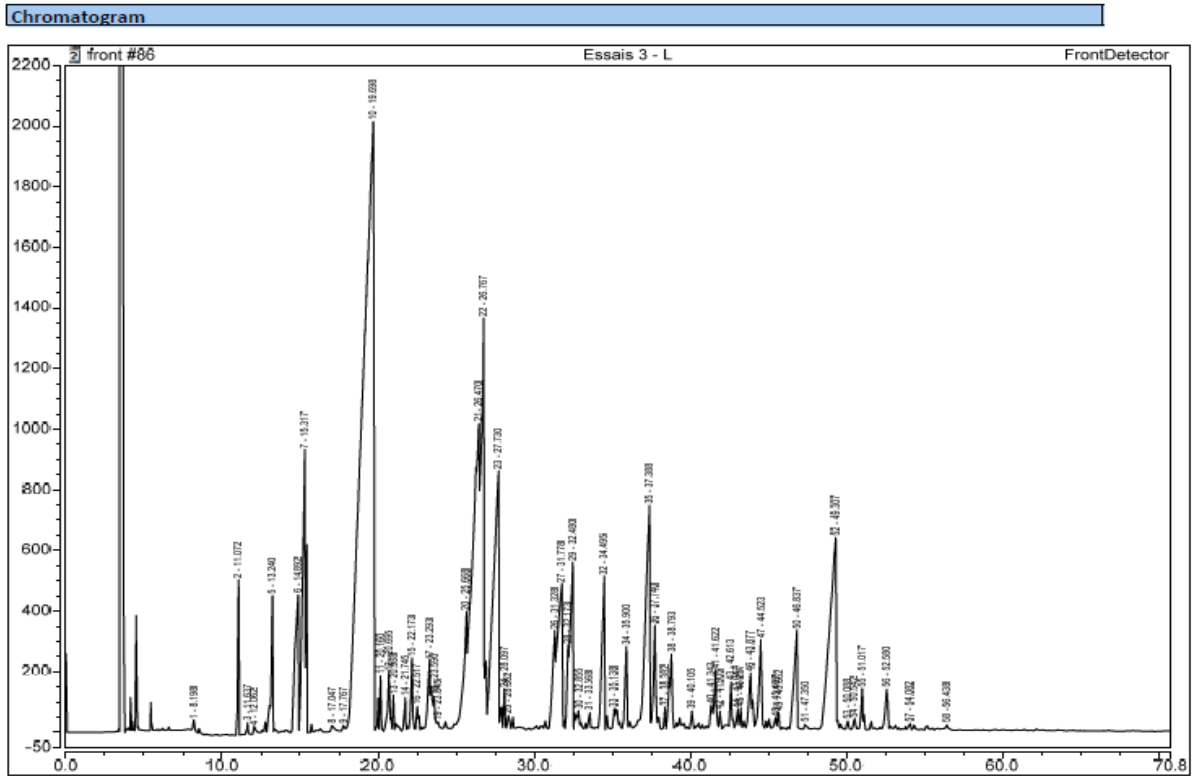
➤ Chromatogramme de l'Essai 1



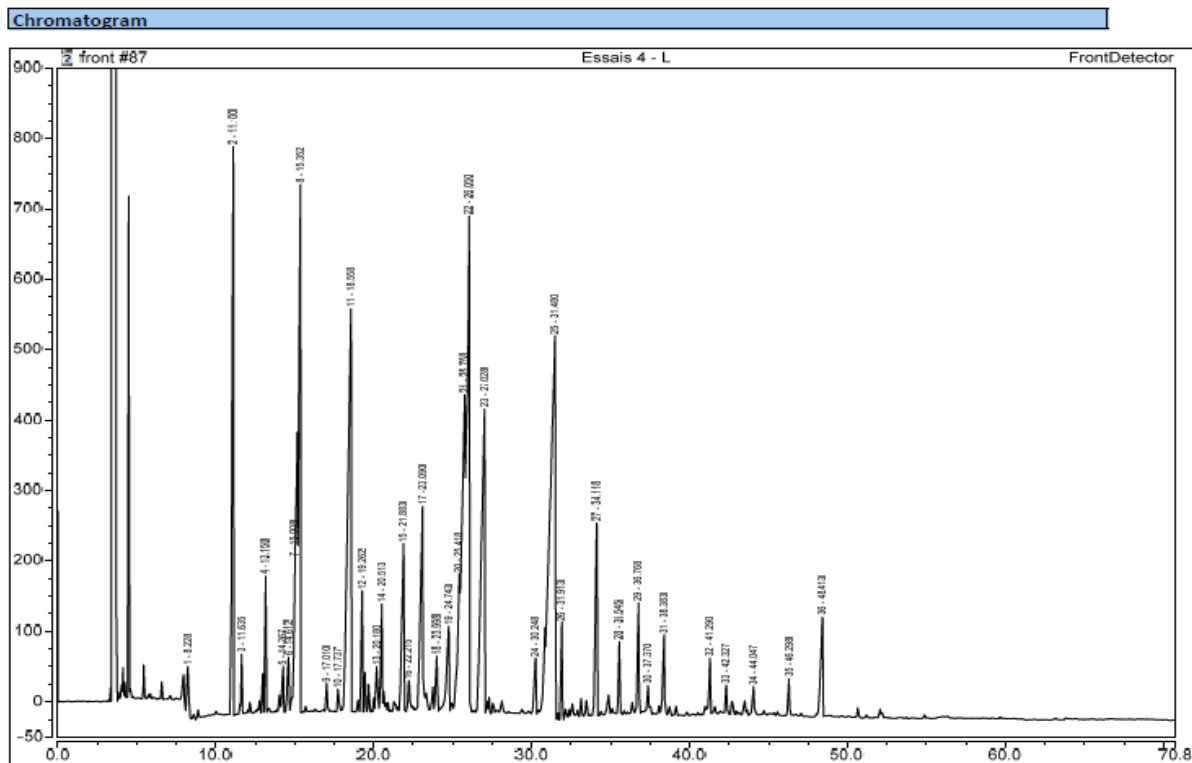
➤ Chromatogramme de l'Essai 2



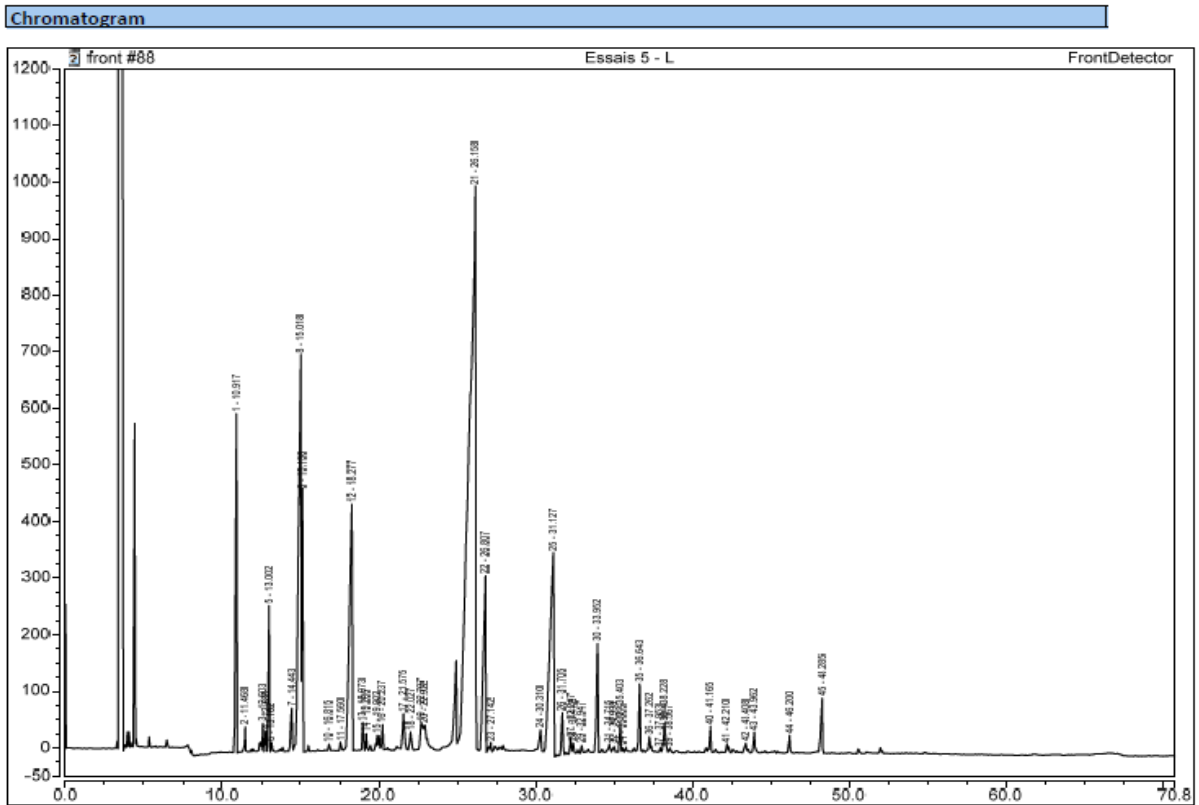
➤ Chromatogramme de l'Essai 3



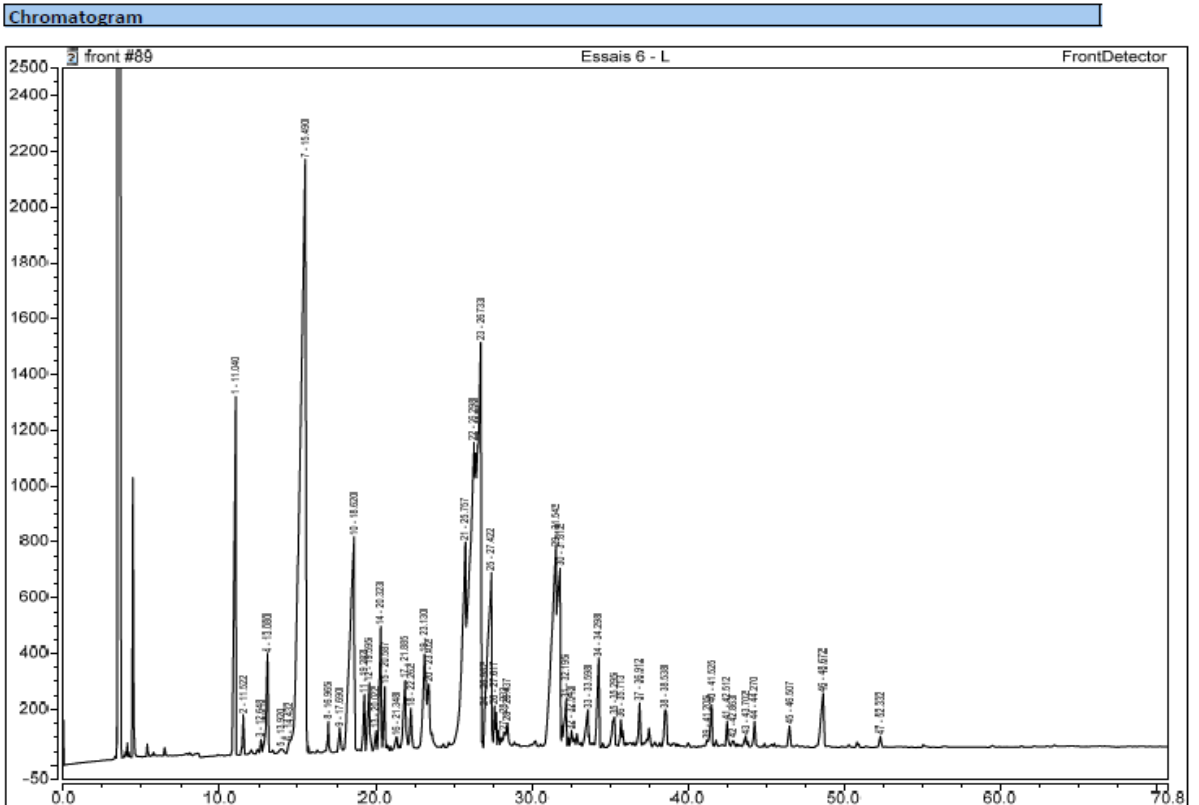
➤ Chromatogramme de l'Essai 4



➤ Chromatogramme de l'Essai 5



➤ Chromatogramme de l'Essai 6



## Annexe 7 : Autorisations de recherche obtenues

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE



CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DE YAOUNDE  
UNIVERSITY HOSPITAL CENTER YAOUNDE

Tél. 231 21 03 / 231 25 66 Fax 231 25 67

DIRECTION GENERALE  
DIRECTION MEDICALE ET TECHNIQUE

REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace – Work – Fatherland  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

14 MARS 2017

N° 762 AR/CHUY/DG/DGA/DMT

### AUTORISATION DE RECHERCHE

Le Directeur Général du CHUY autorise **Monsieur KENGNE GOUNMADJE Landry**, étudiant en Microbiologie à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, à mener ses travaux de recherche au CHUY, sur le thème « **Contribution à la lutte contre les contaminants microbiens des locaux et des collections des Bibliothèques au moyen d'huiles essentielles : cas de la Bibliothèque Centrale de l'Université de Yaoundé I** ».

Ces travaux s'effectueront au CHUY, sous la supervision de Madame le Professeur GONSU KAMGA Hortense.

Copie :

- DG (ATCR)
- DGA
- PR GONSU
- B/STAGE
- CHRONO



LE DIRECTEUR MEDICAL ET TECHNIQUE

*Prof. Oudou Njoya*

ENTRE :

L'INSTITUT FRANÇAIS DU CAMEROUN,  
127, avenue du Président Ahmadou Ahidjo, B.P. 513 YAOUNDE - CAMEROUN,  
Tél : +237 222 22 09 44 / Mail : [info.yde@ifcameroun.com](mailto:info.yde@ifcameroun.com)  
représenté par Monsieur Nicolas FRELOT, en sa qualité de Directeur ;  
et dénommé « l'IFC » dans ce qui suit,

et  
KENGNE GOUNMADJE Landry  
Etudiant  
Domicilié(e) à Yaoundé  
Tel : +(237) 698 17 27 71 / Mail : [landryken12@yahoo.fr](mailto:landryken12@yahoo.fr)  
et dénommé(e) ci-après « COCONTRACTANT »

**Préambule** : Etant préalablement exposé que dans le cadre de ses travaux de thèse portant sur le thème :  
« Contribution à la lutte contre les contaminants microbiens des locaux et des collections des bibliothèques au  
moyen d'huiles essentielles » Monsieur KENGNE GOUNMANDJE Landry a adressé une demande au Directeur  
de l'Institut français du Cameroun le 5 juin 2019 pour la réalisation d'une étude microbiologique des locaux de la  
médiathèque de l'IFC Yaoundé.  
La Direction de l'IFC donne son accord au demandeur sous réserve de ce qui a été arrêté et convenu ci-après :

**ARTICLE 1<sup>er</sup> : OBJET DU CONTRAT**

Le présent contrat a pour objet de définir les conditions et les modalités de la réalisation de l'étude microbiologique des locaux de la médiathèque de l'Institut français du Cameroun, Antenne de Yaoundé. La dite étude se fera par échantillonnage des microorganismes au sein de la médiathèque les jeudis 29 septembre, 3, 10 et 17 octobre 2019 de 9 h à 10h30.

**ARTICLE 2 : OBLIGATIONS DE CONFIDENTIALITE DU COCONTRACTANT**

Le cocontractant s'engage à assurer la confidentialité des résultats. Ainsi, ils ne seront exploités que dans le cadre de sa thèse.

Toute autre exploitation pourra donner lieu à des poursuites de la part de l'IFC.

**ARTICLE 3 : COMPETENCE JURIDIQUE**

En l'absence de règlement à l'amiable, les tribunaux camerounais sont désignés pour connaître de tout litige entre LE CONTRACTANT et l'IFC-Yaoundé relatif à l'interprétation ou à l'exécution du présent contrat.

Pour être valide, le présent contrat doit être signé ci-dessous et paraphé par le cocontractant et l'IFC, avant le début de la prestation.

Fait à Yaoundé le 20/09/ 2019 en quatre (4) exemplaires originaux, un pour le producteur, deux pour l'organisateur et un pour la Trésorerie générale de l'IFC.

**LE CONTRACTANT,**

Ajouter la mention « Lu et approuvé »  
en lettres manuscrites

Landry KENGNE GOUNMADJE

**LE DIRECTEUR DE L'IFC,**

Par délégation de signature, la Directrice déléguée

Kristell DORVAL

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
The University of Yaounde I  
\*\*\*\*\*

BIBLIOTHEQUE CENTRALE  
Central Library  
\*\*\*\*\*

B.P. 1312 Yaoundé Tél./fax : (237)22.06.47.28  
[Bibliotheque@uyi.uninet.cm](mailto:Bibliotheque@uyi.uninet.cm)



REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Republic of Cameroon  
\*\*\*\*\*

Paix - Travail - Patrie  
Peace - Work - Fatherland  
\*\*\*\*\*

[biblio.centrale.uyi@gmail.com](mailto:biblio.centrale.uyi@gmail.com)

Le Conservateur en chef

Yaoundé, le 17 JAN. 2014

N° 003 /UYI/BC/CC



Monsieur Landry KEGNE GOUNMANDJE  
Etudiant Master II Biochimie

Objet : Prélèvement des microorganismes  
à la BC-UYI.

Monsieur,

J'accuse bonne réception de votre demande d'autorisation de prélèvement de microorganismes dans l'enceinte de la BC-UYI, je vous remercie de l'intérêt que vous portez à notre Centre, et par la même, vous manifeste mon accord.

Je profite de cette opportunité pour demander une collaboration plus structurée avec votre encadreur et vous-même. En effet, notre environnement possède beaucoup des microorganismes, tant à l'extérieur qu'à l'intérieur. La grande diversité de moisissures présentes dans les bibliothèques peuvent être nocives, tant pour les collections que pour les humains, car elles ont la capacité de se développer sur et à l'intérieur de la plupart des matériaux qu'elles utilisent comme source nutritive, les matériaux organiques étant les plus vulnérables.

Aussi souhaiterions-nous profiter de votre exercice académique pour établir le profil référentiel des microorganismes à la BC-UYI.

Dans l'espoir d'une collaboration fructueuse, recevez Monsieur, mes vœux les meilleurs pour l'année 2014.



Le Conservateur en chef

Dr Marie-José ESSI

CC : Monsieur le Recteur