

École Supérieure d'Arts Appliqués du canton de Neuchâtel

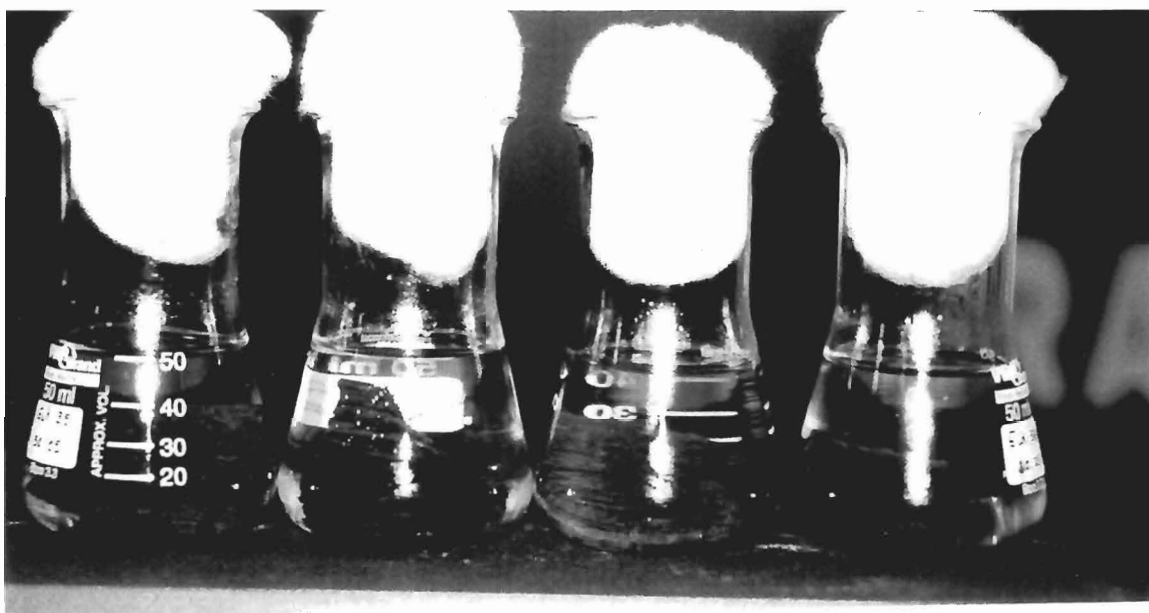
Filière des Hautes Écoles Spécialisées de conservation-restauration, spécialisation
archéologie-ethnographie

Esther Jacquemettaz

Mentor : François Straub, chercheur indépendant et professeur de biologie à
l'ESAA, La Chaux-de-Fonds

Sujet de diplôme:

**Étude de l'action d'huiles essentielles contre le développement
microbien dans les bains au polyéthylène glycol 400 à 15 %, utilisés
pour le traitement des bois archéologiques gorgés d'eau**



4 octobre 2000

Remerciements

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide complice de mon mentor : Monsieur François Straub, ni l'aide précieuse de Monsieur Michel Aragno et ce, à un moment décisif du travail.

Je remercie aussi pour leur collaboration la Pharmacie Pillonel, et plus particulièrement Monsieur Pillonnel pour ses conseils sur les huiles essentielles.

Je remercie également Monsieur le directeur du Lycée Blaise Cendrars d'avoir bien voulu m'accueillir dans les locaux du laboratoire de biologie pendant quelques mois. Je remercie d'ailleurs toutes les personnes travaillant au sein de cet espace de leur accueil et de leur aide.

Je remercie les différents restaurateurs avec qui j'ai pu discuter de la problématique des bains de traitement des bois gorgés d'eau, merci à Claude Michel pour m'avoir donné du bois archéologique.

Enfin je remercie tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à faire de ce travail.

Sommaire

Introduction	page 1
--------------------	--------

Chapitre 1 : Traitement de conservation-restauration des bois gorgés d'eau

<u>1.1- Le bois : des glucides et de l'eau.....</u>	page 3
1.1.1- La cellulose.....	page 4
1.1.2- Les hémicelluloses.....	page 4
1.1.3- La lignine.....	page 4
1.1.4- La biodégradation du bois.....	page 5
<u>1.2- Les bois archéologiques gorgés d'eau.....</u>	page 5
1.2.1- L'hydrolisation enzymatique du bois archéologique gorgé d'eau.....	page 6
<u>1.3- Pourquoi traiter le bois archéologique ?.....</u>	page 6
1.3.1- Qu'est-ce que le polyéthylène glycol (PEG)?	page 7
1.3.2- Méthode du PEG à saturation	page 8
1.3.3-Qu'est-ce que la lyophilisation ?	page 9

Chapitre 2 : Les microorganismes

<u>2.1- Amis ou ennemis ?</u>	page 11
<u>2.2- Patrimoine et micro-organismes.....</u>	page 13
<u>2.3- Les bactéries.....</u>	page 14
2.3.1- Caractéristiques des bactéries.....	page 15
2.3.2- Classification des bactéries.....	page 15
2.3.3- Croissance des bactéries.....	page 16
2.3.4- Dégradations bactériennes.....	page 16
<u>2.4- Les moisissures</u>	page 17
2.4.1- Caractéristiques des moisissures.....	page 17
2.4.2- Croissance des moisissures.....	page 18
2.4.3- Dégradations fongiques.....	page 19

<u>2.5- Les protozoaires.....</u>	page 19
<u>2.6- Bains de traitement ou milieux de culture ?</u>	page 19

Chapitre 3 : La lutte contre les micro-organismes dans le traitement des bois gorgés d'eau

<u>3.1- Introduction.....</u>	page 21
<u>3.2- Désinfection physique.....</u>	page 22
3.2.1- Le rayonnement gamma.....	page 22
3.2.2- La stérilisation par UV.....	page 22
<u>3.3- Désinfection chimique.....</u>	page 23
3.3.1- L'oxyde d'éthylène.....	page 23
3.3.2- Les biocides	page 23
<u>3.4- La conservation préventive.....</u>	page 24

Chapitre 4 : Des plantes aromatiques aux huiles essentielles (H.E.)

<u>4.1- Généralités.....</u>	page 26
4.1.1- Historique de l'aromathérapie.....	page 26
4.1.2 Les huiles essentielles en conservation - restauration.....	page 28
<u>4.2- Les plantes aromatiques.....</u>	page 29
4.2.1- Formation de l'essence chez les plantes	page 30
4.2.2- Structures sécrétrices des essences chez les plantes.....	page 31
<u>4.3- Méthodes d'extraction des essences.....</u>	page 31
4.3.1- Expression.....	page 31
4.3.2- Distillation à la vapeur d'eau.....	page 31
4.3.3- Extraction à l'aide de solvants organiques	page 33
<u>4.4- Les huiles essentielles (H.E.).....</u>	page 33
4.4.1- L'espèce botanique.....	page 34
4.4.2- L'organe producteur.....	page 34
4.4.3- La spécificité biochimique.....	page 35
4.4.4- Analyse et contrôle des caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles	page 35

4.5- Mise en évidence de la nature antiseptique des huiles essentielles.....	page 37
4.5.1- L'aromatogramme.....	page 37
4.5.1.1- En milieu solide.....	page 37
4.5.1.2- En milieu liquide.....	page 37
4.5.2- L'indice aromatique	page 38

Chapitre 5 : Chimie des huiles essentielles

5.1- Introduction.....	page 39
5.2- La biochimie aromatique.....	page 40
5.3- Les différentes familles biochimiques.....	page 41
5.3.1- La voie des terpènes.....	page 42
5.3.1.1- Les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$).....	page 42
5.3.1.2- Les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$).....	page 42
5.3.1.3- Les diterpènes ($C_{20}H_{32}$).....	page 43
5.3.2- La voie des phénylpropanes.....	page 43
5.4- les terpènes et phénylpropanes oxydés.....	page 43
5.4.1- Les alcools	page 44
5.4.1.1- Les monoterpénols	page 44
5.4.1.2- Les sesquiterpénols ou alcools secondaires.....	page 44
5.4.1.3- Les diterpénols ou alcools tertiaires.....	page 44
5.4.2- Les phénols.....	page 45
5.4.3- Les aldéhydes	page 45
5.4.4- Les cétones	page 46
5.4.5- Les acides et les esters.....	page 46
5.4.5.1- Les acides.....	page 46
5.4.5.2- Les esters.....	page 47
5.4.6- Les éthers (méthyl phénol).....	page 47
5.3.7- Les oxydes.....	page 47
5.4.8- Les coumarines.....	page 47

Chapitre 6 : Essais d'application d'huiles essentielles

<u>6.1-Première partie : présentation</u>	page 48
6.1.1- Problématique	page 48
6.1.2- Réflexions liées à l'application des huiles essentielles	page 52
<u>6.2-Deuxième partie : matériel et méthodes générales</u>	page 55
6.2.1- Solution de base	page 55
6.2.2- Innoculum mixte standard	page 55
6.2.3- Solution d'oligo-éléments SL 6 x 10	page 55
6.2.4- Milieux de culture	page 56
6.2.4.1- Milieu de culture non sélectif pour bactéries et moisissures	page 56
6.2.4.2- Milieu test pour bactéries et champignons cellulolytiques	page 56
6.2.5-Extrait de terre pour test de cellulolyse	page 58
6.2.6- Contenants utilisés	page 59
6.2.7- Echantillons	page 61
6.2.8- Observations	page 62
6.2.8.1- Observations à l'oeil nu	page 62
6.2.8.2- Observations sous microscope	page 62
6.2.8.3- Observations sous microscope inversé	page 65
6.2.8.4- Lecture du pH	page 66
6.2.8.5- Frottis au bleu de méthylène	page 66
6.2.9- Les huiles essentielles	page 66
6.2.9.1- Sélection des huiles essentielles	page 66
6.2.9.2- Dosage des huiles essentielles	page 67
6.2.9.3- Solubilisation des huiles essentielles	page 68
6.2.10- Le bois	page 69
6.2.10.1- Le bois frais	page 69
6.2.10.2- Le bois archéologique	page 69
6.2.11- Stérilisation	page 62
<u>6.3-Troisième partie : protocoles expérimentaux</u>	page 71
6.3.1-Essais de moisissement du bois : première tentative	page 71
6.3.2-Essai de moisissement du bois : deuxième tentative	page 71
6.3.2.1- Rencontre avec Monsieur Michel Aragno	page 71
6.3.2.2- Réalisation de la deuxième tentative	page 72
6.3.3- Essai de moisissement du bois : troisième tentative	page 73

<u>6.4- Quatrième partie : application des huiles essentielles à l'aide du protocole définitif</u>	<u>page 77</u>
6.4.1- Protocole définitif.....	page 77
6.4.2- But du protocole.....	page 77
6.4.3- Réalisation.....	page 79
6.4.4- Observation des bains expérimentaux au fil du temps.....	page 85
 <u>6.5-Cinquième partie : tests supplémentaires.....</u>	 <u>page 100</u>
6.5.1- Test de bactéries et champignons cellulolytiques.....	page 100
6.5.1.1- Réalisation du test.....	page 100
6.5.1.2- Lecture des résultats.....	page 100
6.5.1.3- Interprétation des résultats.....	page 105
6.5.2- Culture des microorganismes sur gélose inclinée.....	page 106
 <u>Discussion.....</u>	 <u>page 110</u>
 <u>Conclusion.....</u>	 <u>page 112</u>
 <u>Bibliographie</u>	
 <u>Annexes</u>	
<u>Annexe 1 : Document de Monsieur Pellecuer</u>	
<u>Annexe 2 : Indice aromatique</u>	
<u>Annexe 3 : document de Monsieur Sirodeau</u>	
<u>Annexe 4: Rapport de microbiologie</u>	
<u>Annexe 5 : Echantillons d'huiles essentielles</u>	

Introduction

La conservation des bois gorgés d'eau est un ensemble de procédés issus pour la plupart du monde de l'industrie. Ces matériaux, fragiles, uniques, détenteurs d'informations, et témoins de civilisations passées, peuvent être observés, interprétés pour partie dans l'immédiat. Toutefois, il est à prévoir que certaines informations ne seront traitées que plus tard (grâce à de nouveaux moyens technologiques), pour autant que nous prenions les options nécessaires à la bonne conservation de ces objets.

Avant d'entreprendre le traitement des bois archéologiques gorgés d'eau, on les stocke pour des raisons de place, de matériel, d'argent, d'études, etc.. Ce stockage se fait dans des bacs remplis d'eau, déionisée ou non, en chambre froide ou non, afin que le bois archéologique gorgé d'eau ne s'assèche pas. Sinon il subirait d'importantes déformations, qui rendraient caduques toutes informations, impossibles toutes lectures archéologiques ou dendrochronologiques, inutiles toutes volontés conservatives.

Pendant le stockage, le bain dans lequel se trouve le bois peut être le siège de l'apparition puis de la croissance de nombreux microorganismes.

Plus fréquemment encore c'est lors du traitement de conservation-restauration que les bains sont infestés par des microorganismes. Il faut alors, soit changer les bains régulièrement, soit ajouter des biocides qui freinent leur croissance et leur développement.

Il existe d'autres méthodes d'éradication des microorganismes mais elles ne sont pas toujours compatibles avec la conservation des bois gorgés d'eau. Le choix en est restreint. C'est pourquoi j'ai eu l'idée de tenter la désinfection des bains de traitement avec des huiles essentielles lesquelles sont des essences végétales pures qui ont un effet bactéricide et fongicide reconnu¹.

Loin de moi l'idée de révolutionner les méthodes actuelles de lutte contre les microorganismes. Toutefois ces dernières ne sont pas des plus convaincantes quant à leur efficacité.

Par ailleurs certains restaurateurs se refusent à employer des produits toxiques tant qu'il n'est pas

¹ Pellecuer Jacques, document interne de la faculté de pharmacie de Montpellier. Le document entier se trouve en annexe 1

clairement prouvé qu'ils n'ont aucun effet secondaire sur les objets traités² .

D'autres, pour des raisons écologiques et économiques ne se satisfont qu'à moitié des biocides actuellement utilisés³.

Ces différentes opinions donnent plus de poids aux procédures de recherches sur de nouveaux produits et de nouvelles méthodes de traitement.

Il va de soi que ceux-ci ne sont pas testés directement sur des objets ayant une certaine valeur, mais sur des "rebus" de fouilles par exemple.

Dans un premier temps, nous parlerons du bois archéologique gorgé d'eau et de son traitement par des bains de polyéthylèneglycol (PEG). Nous nous intéresserons aux différents microorganismes pouvant contaminer ces bains. Nous étudierons ce que sont les huiles essentielles. Nous verrons enfin les résultats obtenus au cours d'expérimentations d'huiles essentielles spécifiques dans des bains expérimentaux au PEG 400 à 15 %.

² Discussion avec Cyril Benoît, restaurateur de matériaux organiques à Fribourg

³ Discussion avec Cédric André et Claude Michel, restaurateurs de matériaux organiques respectivement à Zurich et Lausanne.

Chapitre 1

Traitement de conservation-restauration des bois archéologiques gorgés d'eau

1.1- Le bois : des glucides et de l'eau

Les plantes grâce au soleil cassent la molécule d'eau pour en tirer de l'hydrogène réduit. En assimilant du carbone minéral (CO_2 , HCO_3) elles peuvent fabriquer des sucres qui vont leur permettre de grandir.

Les sucres (ou glucides) sont des produits naturels de formule brute générale : $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$, c'est pourquoi on les appelle aussi des hydrates de carbone. Mais on préfère parler de glucides.

Le bois, matière vivante, organique (car composée essentiellement de carbone) résulte de la transformation de ces sucres en cellulose, hémicellulose, lignine, et autres produits et ce, dans l'ordre croissant du nombre de liaisons au sein de ces différentes structures. Chaque liaison supplémentaire renforce la cohésion de la structure. Donc, logiquement, devient plus résistante.

1.1.1- La cellulose

Le glucose, par condensation, forme la cellulose $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ un des principaux composants du bois, laquelle constitue les parois des cellules végétales. La cellulose (voir fig. n°1) fait partie des polysaccharides ainsi appelés car il s'agit de glucides polymérisés ne contenant que des sucres.

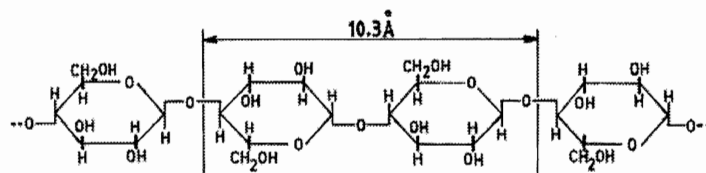


Fig. n°1 : Structure de la cellulose (S. de La Baume, 1990, p. 223).

La cellulose est un composé solide blanc alternant des zones amorphes (arrangement moléculaire non-parallèle) et des zones cristallines (molécules en couches parallèles).

L'association d'environ 40 chaînes de cellulose forme une fibre élémentaire, qui représente le diamètre le plus petit décelable en microscopie électronique, soit environ 35 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m.}$). L'association des fibres élémentaires donne naissance à une microfibrille (fig. n°2) qui mesure environ 100 à 300 Å de diamètre⁴.

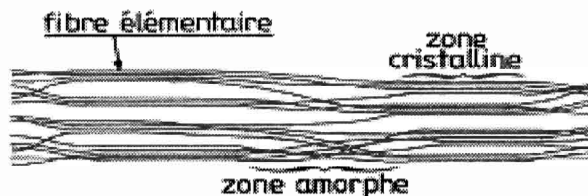


Fig. n°2 : Structure d'une microfibrille (S. de La Baume, 1990, p. 223).

1.1.2- Les hémicelluloses

On désigne par le terme d'hémicelluloses des constituants des végétaux en fait très différents de la cellulose. Ce sont des polyholosides ramifiés dont la chaîne principale peut être formée de motifs xylose, galactose, ou glucose et mannose.

Les hémicelluloses accompagnent constamment la cellulose dans la constitution des végétaux lignifiés⁵.

Elles comportent de nombreuses fonctions hydroxyles susceptibles de se lier à l'eau, mais compte tenu de leur structure amorphe, elles sont plus hygroscopiques que la cellulose⁶.

1.1.3- La lignine

La lignine est la matière qui permet à toute plante végétale de s'élever en verticalité car elle rigidifie les parois cellulaires.

Elle se différencie principalement de la cellulose par sa structure moléculaire, c'est un polymère phénolique tri-dimensionnel complexe formant une molécule réticulée irrégulièrement.

Ce qui est intéressant dans la lignine c'est la présence d'alcools aromatiques dont l'alcool paracoumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Ces trois alcools sont présents dans les

⁴ La Baume S.(de), 1990, p. 224

⁵ Arnaud Paul, 1996, p. 426

⁶ La Baume S.(de), 1990, p. 224

feuillus alors que les résineux n'ont que l'alcool conyférylique⁷.

Ce qui explique peut-être pourquoi les résineux sont plus vite dégradés que les feuillus.

Ces composés aromatiques confèrent à l'arbre une résistance aux microorganismes de son vivant.

Rien d'étonnant à ce que la lignine soit rarement dégradée par les microorganismes par la suite.

1.1.4- La biodégradation du bois

La décomposition en milieu naturel du bois ou biodégradation est en général un processus rapide (environ moins de 100 ans) qui recycle le carbone, l'hydrogène et les autres éléments constitutifs du bois, le tout en équilibre dans un écosystème. Les bois considérés comme patrimoine culturel n'y font pas exception.

La décomposition du bois en CO₂ et H₂O est favorisée par la présence de l'eau. D'autant plus si les paramètres tels que la température, le pH sont adéquats.

Les zones amorphes de la cellulose sont plus sensibles aux agents chimiques et biologiques que ne le sont les zones cristallines.

1.2- Les bois archéologiques gorgés d'eau

Dans le cas des bois que l'on retrouve lors de fouilles archéologiques, un équilibre s'est instauré entre le bois et le sol. Cet équilibre a permis le ralentissement du processus naturel de biodégradation.⁸

Trouver du bois dans un site archéologique n'est pas une constante car ce matériau organique a une forte tendance à la biodégradation, plus ou moins rapide suivant la nature des sols. Il faut savoir que la plupart des bois archéologiques qui survivent proviennent de sols dont les conditions environnantes restreignent la croissance et la prolifération de champignons. Il s'agit bien souvent d'une humidité excessive ou inversement de la sécheresse des milieux arides. Mais même avec des conditions extrêmes il arrive que certains microorganismes provoquent, lentement mais irrémédiablement des détériorations.

Des processus non biologiques comme le tassement des cellules causé par le poids de la terre ou encore la présence de sels solubles et/ou insolubles (qui font éclater les parois cellulaires) peuvent également engendrer des dégradations que nous ne décrivons pas ici car elles sortent du sujet.

⁷ Flieder F., Capderou C., 1999, p. 66

⁸ Blanchette et al , 1991, p. 3

1.2.1- L'hydrolisation enzymatique du bois archéologique gorgé d'eau

On remarque que le bois gorgé d'eau perd de sa cohésion, de son intégrité et de sa force⁹.

Pour les bois gorgés d'eau la présence de l'eau est un facteur important.

L'eau provoque des hydrolyses des hémicelluloses et de la cellulose, ce qui réduit la longueur des chaînes, libère les groupements hydroxyles qui rendent les parois cellulaires encore plus hygroscopiques. Mais surtout, la diffusion de l'eau dans les structures du bois favorisent une invasion par les microorganismes¹⁰.

La cellulose est insoluble dans l'eau, mais sa dégradation complète par voie enzymatique donne du cellobiose puis du glucose. C'est pourquoi on peut dire que le bois est "mangé" par certains microorganismes qui tirent leur énergie du glucose¹¹ (microorganismes cellulolytiques).

Les bactéries semblent être les microorganismes les plus fréquents dans les bois issus des milieux aquatiques (eau douce comme eau de mer). Il apparaît que les bois gorgés d'eau séjournant depuis une très longue période, sont beaucoup plus colonisés et attaqués par les bactéries et les champignons¹².

Les bactéries sont capables de dégrader toute sorte de substrat et dans pratiquement toutes les conditions climatiques envisageables¹³.

Tous les microorganismes ne sont pas pourvus des enzymes nécessaires à la dégradation première des tissus, dans ce cas, ils ne peuvent se développer qu'en présence des espèces qui ont la capacité d'assumer cette première dégradation biochimique, donc, la présence de différentes espèces complémentaires est très fréquente¹⁴.

1.3- Pourquoi traiter le bois archéologique ?

Nous parlons ici de bois archéologiques gorgés d'eau. Ils proviennent de fouilles aquatiques ou de terrains à forte teneur en eau, laquelle a progressivement imprégné toutes les cellules du bois, d'où le terme "gorgé d'eau".

L'eau renforce les structures du bois lorsqu'elle en sature les cavités cellulaires, leur permettant de se maintenir sans effondrement malgré les dégradations biochimiques¹⁵.

⁹ Blanchette et al, 1991, p 12-13

¹⁰ La Baume S.(de), 1990, p. 239

¹¹ Flieder F., Capderou C., 1999, p 66

¹² Blanchette et al., 1991, p 5

¹³ La Baume S.(de), 1990, p. 238

¹⁴ La Baume S.(de), 1990, p. 238

¹⁵ La Baume S.(de), 1990, p. 256

Nous ne pouvons envisager de garder les bois en permanence dans des bacs remplis d'eau, d'une part l'objet ne serait pas "lisible", par les spécialistes comme par le public, d'autre part le bois finirait par se désagréger ce qui va à l'encontre de ce que nous recherchons.

Le but du traitement est d'assécher progressivement le bois afin que ses structures internes, maintenues physiquement par l'eau dans le sol et lors de son exhumation, gardent leurs formes initiales.

Un simple séchage par évaporation est catastrophique pour les bois archéologiques gorgés d'eau.

Ceux-ci perdent leur forme générale et le travail de leur surface. Ils ne sont plus en mesure de livrer des données archéologiques, de même qu'il devient impossible de les utiliser pour une datation par dendrochronologie.

Ces pertes d'éléments sont dues à l'anisotropie du bois : l'objet ne se rétracte pas uniformément au même pourcentage, il subit des déformations évidentes et irréversibles. Pour éviter cela, il faut procéder à une consolidation des structures avant d'envisager un assèchement.

Le traitement consiste en général à associer un consolidant (traitement chimique) à un séchage contrôlé ou lyophilisation (traitement physique). Ces traitements permettent de maintenir les informations intrinsèques de l'objet ainsi que son étude par les archéologues et autres spécialistes.

Le choix d'un consolidant est dicté par différents critères. Le premier de tous étant sa solubilité dans l'eau. La solution aqueuse du consolidant peut être échangée directement avec l'eau contenue dans les cellules¹⁶. Par ailleurs le polymère doit être le plus possible sans toxicité pour l'utilisateur, et capable d'établir des liaisons avec le bois comme peut le faire l'eau.

Un des produits chimiques le plus employés est le polyéthylèneglycol (PEG), car il répond aux critères que nous venons d'évoquer.

1.3.1- Qu'est-ce que le polyéthylèneglycol ?

Les polyéthylèneglycols (PEG) sont des macromolécules issues de la polymérisation de l'oxyéthylène.

Le polyéthylèneglycol est un polyéther de formule générale¹⁷:



¹⁶ La Baume S.(de), 1990, p. 257

¹⁷ La Baume S.(de), 1990, p. 257

Il existe plusieurs poids moléculaire de PEG, nous nous contenterons ici de présenter le PEG 400 dans la mesure où c'est celui que nous avons utilisé lors des tests.

Le polyéthylèneglycol 400, appelé plus simplement PEG 400, est produit par une réaction catalysée entre l'oxyde d'éthylène et l'eau. La réaction de polymérisation est contrôlée de façon à ce que le poids moléculaire moyen soit dans une marge de 380-420. A température ambiante le PEG 400 est un liquide hygroscopique, incolore et inodore qui présente une tension de vapeur basse caractéristique (< 1 mbar) et un excellent pouvoir lubrifiant. Il est entièrement soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques à l'exception des hydrocarbures aliphatiques (hydrocarbures exempts de cycles). En présence d'air et à hautes températures le PEG 400 se dégrade. Cependant l'ajout d'antioxydants peut contribuer à améliorer sa stabilité.

Le PEG contient deux groupes hydroxyles terminaux (-OH), ce qui lui donne des propriétés similaires aux alcools.

Les polyéthylèneglycols s'emploient quotidiennement dans l'industrie, entrant dans la composition de certains pesticides comme de cosmétiques, ils servent à la production de cellophane, ils sont employés dans le traitement et la stabilisation du papier.

De façon idéale, les polyglycols doivent être stockés à une température supérieure d'au moins 5°C à leur point de congélation qui est de 6°C, mais inférieure à 35°C pour éviter les risques de dégradation. Les polyéthylèneglycols sont des produits de très faible toxicité aiguë. Ils ne provoquent aucune irritation ou sensibilisation de la peau et ne semblent pas être absorbable par celle-ci. Il faut toutefois éviter le contact avec les yeux.

Pour l'écologie il est intéressant de noter que les polyéthylèneglycols ne montrent pas de bioconcentration grâce à leur fort pouvoir de solubilité. On a estimé leur biodégradabilité à 90% après 26 jours, et actuellement on ne leur reconnaît pas de toxicité majeure ou dangereuse pour les organismes aquatiques¹⁸.

1.3.2- Méthode du PEG à saturation

Le poids moléculaire du PEG employé est fonction du degré de dégradation du bois archéologique gorgé d'eau, de façon à obtenir une consolidation optimale, déterminée par une bonne pénétration du produit¹⁹.

¹⁸ Fiche technique du PEG, droguerie Droz, La Chaux-de-Fonds

¹⁹ La Baume S.(de), 1990, p. 257

Le traitement le plus courant est une imprégnation en deux temps, cette méthode fut initiée par P.Hoffmann en 1984, 1986. Une première série de bains s'effectuent à un petit poids moléculaire (PEG 200 à 400) qui a pour but de pénétrer les structures les plus denses. Elle est suivie d'une deuxième série de bains mais avec un poids moléculaire beaucoup plus élevé (PEG 3000 à 4000)²⁰.

Bien sur, chaque restaurateur a sa manière de faire suivant ses conditions de travail, l'équipement du laboratoire de restauration, la nature du bois qu'il doit traiter.

En me rendant dans les différents laboratoires de Suisse et en discutant avec les restaurateurs en place qui traitent le matériel organique j'ai pu faire ressortir ci-dessous une méthode qui n'est pas "standardisée" mais qui est la plus proche de la réalité et du quotidien du restaurateur.

Le bois est immergé dans un bain contenant du PEG 400 (bas poids moléculaire) à 15% dans l'eau.

Quelques mois plus tard la concentration en PEG 400 est augmenté à 30%.

A ce stade là, le bois est placé dans un bain contenant du PEG 4000 (haut poids moléculaire) à une concentration de 30 %. Puis il est soit placé au congélateur puis lyophilisé soit placé dans des bains dont la concentration est augmentée.

On augmentera cette concentration petit à petit. Suivant les laboratoires elle pourra atteindre des concentrations entre 70, 90 % et parfois plus²¹.

Certains restaurateurs chauffent les bains de PEG 4000 quand ceux-ci atteignent la concentration de 60 % (température \pm égale à 50°C) afin de mieux faire diffuser les molécules de PEG dans le bois²². Il est possible aussi de combiner ces méthodes avec la lyophilisation qui est une autre méthode d'assèchement du bois.

A Lausanne, ils ont pu constater que certains des bains chauffés ne développaient pas de microorganismes, mais ils ne peuvent pas expliquer pourquoi.

Il faudrait procéder à des prélèvements, mettre en culture ces prélèvements, isoler les différentes souches qui se sont développées afin de permettre une identification des microorganismes présents. C'est donc tout un travail de microbiologie, avec techniques, méthodes et matériel adéquat qu'il faut mettre en oeuvre pour obtenir des informations cohérentes.

1.3.3- Qu'est-ce que la lyophilisation ?

La lyophilisation est une technique de déshydratation qui, après congélation, fait passer à basse pression l'eau solide (glace) à l'état vapeur sans repasser par une phase liquide²³. Les vapeurs d'eau

²⁰ La Baume S.(de), 1990, p. 258

²¹ Discussion avec Cédric André au sujet de la manière de procéder dans certains laboratoires en Allemagne.

²² Discussion avec Claude Michel à Lausanne

²³ La Baume S.(de), 1990, p. 262

sont ensuite condensées sur un piège porté à très basse température (fig. n°3).

La lyophilisation apporte un mode de séchage doux et efficace pour les bois archéologiques.

Cependant, pour assurer une congélation sans altération des structures, il est nécessaire de protéger celles-ci par un cryoprotecteur que l'on introduit par bains d'imprégnation. Actuellement, les produits les plus fréquemment utilisés sont les polyéthylèneglycols 400 et 4000 comme on l'a vu plus haut, d'où l'appellation de pré-traitement au PEG dans le cas d'une lyophilisation.

Un lyophilisateur est une cuve équipée d'une pompe à vide pour abaisser la pression et faire le vide dans la cuve. Un compresseur est relié à l'ensemble pour refroidir le "piège à froid" situé dans la cuve, constitué le plus souvent d'un serpentín en acier inoxydable.

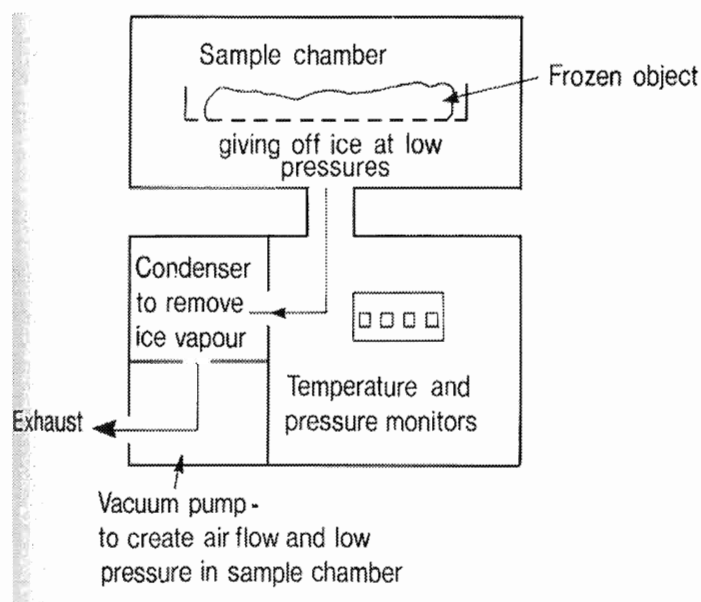


Fig. n°3 : Fonctionnement d'un lyophilisateur, in, Cronyn J.M., 1990, p. 81

Chapitre 2

Les microorganismes

2.1- Amis ou ennemis ?

Les microorganismes font partie intégrante de notre vie.

Il y en a partout, constamment. Certains sont pathogènes²⁴, (3% des bactéries sur les plusieurs milliers qui existent sont néfastes à la santé de l'homme) d'autres sont nécessaires aux cycles biogéochimiques.

L'homme a appris à se servir de certaines bactéries et moisissures pour améliorer son confort de vie dans la fabrication des fromages, des yaourts, des antibiotiques.

Ces microorganismes participent activement au maintien des équilibres planétaires car ils se nourrissent pour la plupart de matières en dégradations²⁵. Il en va ainsi depuis des millénaires.

Nombre de programmes de recherches travaillent aujourd'hui à l'utilisation de bactéries, d'algues, de protozoaires à des fins écologiques, car leur pouvoir enzymatique est si puissant et si performant qu'il pourrait bien être une solution à la pollution de la planète.

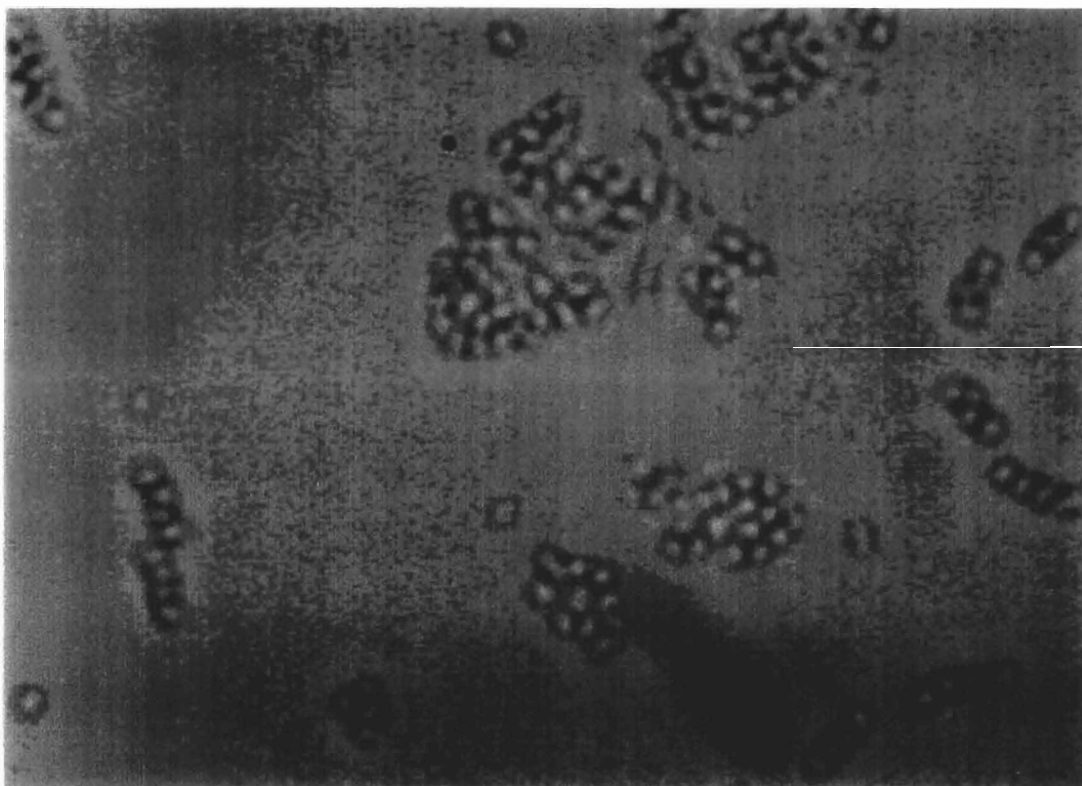
Croire que nous devons lutter contre toutes les formes de microorganismes serait une erreur et une impossibilité dans l'état actuel de nos connaissances ainsi que de notre technologie.

Il est évident que les biens culturels doivent être protégés de toutes sources de destruction. L'une d'entre elle, et ce n'est pas la moindre, est la présence de microorganismes.

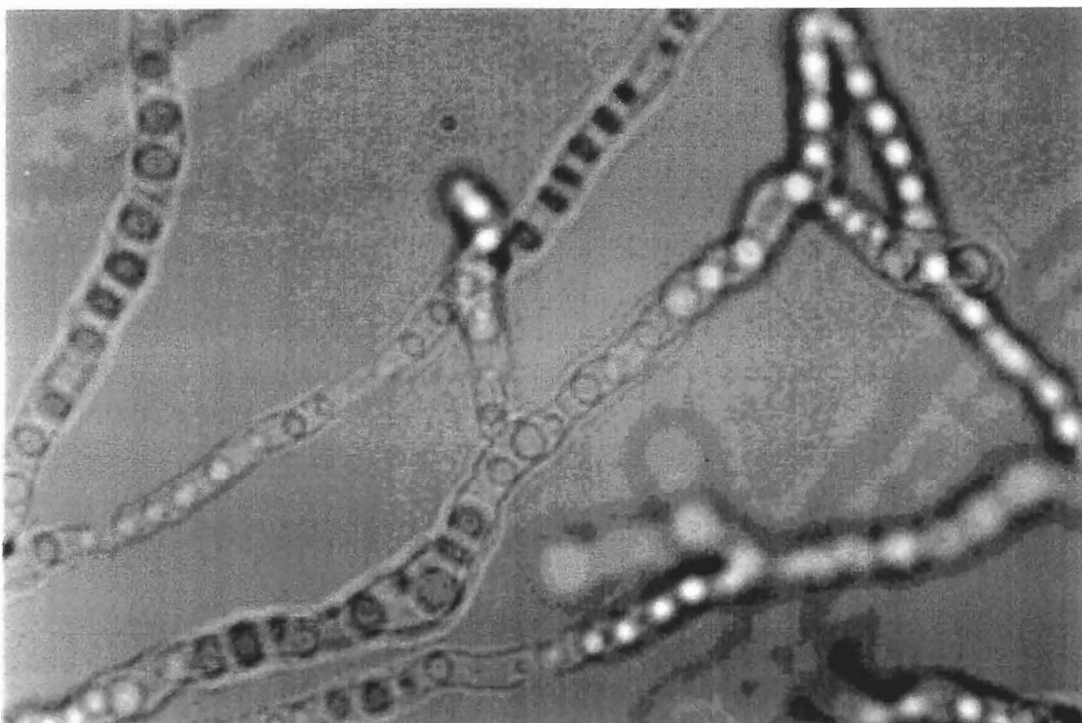
Par microorganismes, dans ce dossier, on entend son sens large : les bactéries, les moisissures, les algues unicellulaires, les protozoaires et certains autres organismes vivants, tous de taille microscopique (fig. n°4 à 6).

²⁴ Rolland Xavier et Laurence, 1997, p. 5

²⁵ Strang et Dawson, 1991, p. 1



*Fig. n°4 : Exemple de bactéries microscopiques que nous avons pu observer dans les bains expérimentaux. (prélèvement de l'échantillon n°29, observé le 14.06.00, agr. : 100 x 12,5).
Photo prise avec le microscope à vidéographe.*



*Fig. n°5 : Exemple de champignons microscopiques que nous avons pu observer dans les bains expérimentaux. (prélèvement de l'échantillon n°1, observé le 19.05.00, agr. : 100 x 12,5).
Photo prise avec le microscope à vidéographe.*

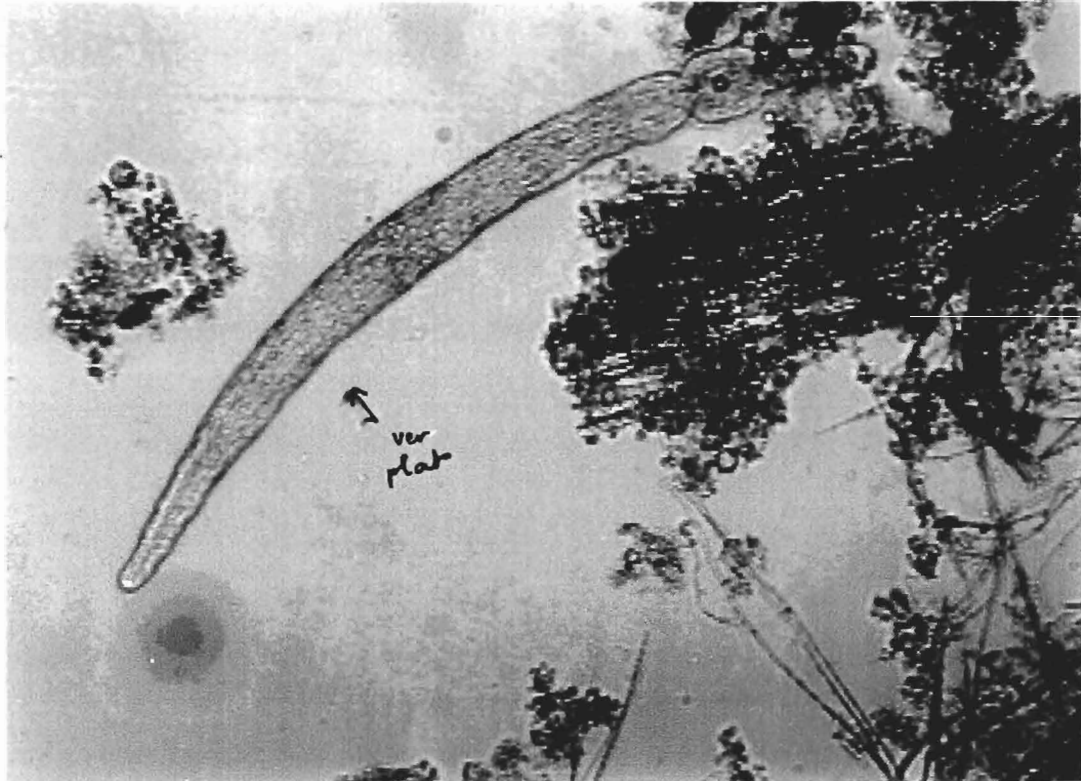


Fig. n°6 : Exemple d'organismes vivants microscopiques que nous avons pu observer dans les bains expérimentaux. (prélèvement de l'échantillon de Zurich n°02, observé le 04.07.00, agr. : 10 x 12,5). Photo prise avec le microscope à vidéographe.

2.2- Patrimoine et microorganismes

Ayant orienté mes lectures concernant les microorganismes vers des auteurs prenant en compte tant l'aspect biologique que l'aspect conservation du patrimoine, il est possible que certains paragraphes puissent faire "grincer" des dents les biologistes devant l'inexactitude (par simplification) de certains propos, et je leur demande de bien vouloir m'en excuser.

Dans le livre de Françoise Flieder et Christine Capderou l'accent est mis sur la différence de sens entre biodétérioration et biodégradation. Par biodétérioration on entend "toutes modifications physiques ou chimiques d'un matériau provoquées par l'activité d'un organisme vivant", alors que la biodégradation est définie par "l'ensemble des réactions de transformation ou de destruction des éléments constitutifs d'un matériau dues à l'action d'une ou plusieurs entités biologiques"²⁶.

²⁶ Flieder Françoise, Capderou Christine, 1998, p. 12

Bactéries et champignons sont les microorganismes que l'on retrouve le plus souvent au sein des collections organiques. Il s'agit principalement de microorganismes hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils vivent à l'état de parasites dans l'objet, qu'ils ne sont pas capables de synthétiser leurs constituants à partir de substance minérale et qu'ils leur faut donc des composés organiques desquels ils puisent l'énergie nécessaire à leur développement.

Une fois contaminés les collections et les bains de traitements posent un problème épineux à résoudre²⁷.

2.3- Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants, unicellulaires, appartenant au règne bactérien ou à celui des Protistes inférieurs ou Procaryotes (fig.n° 7).

Les Procaryotes diffèrent des Eucaryotes, ou Protistes supérieurs, par un ensemble de caractères, notamment une absence de membrane nucléaire²⁸.

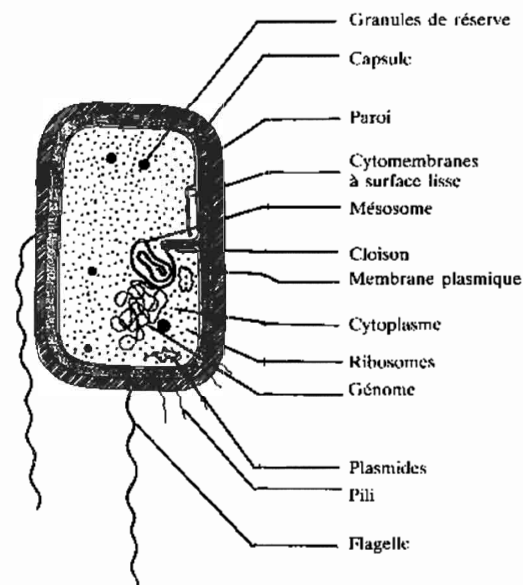


Fig. n°7 : Schéma général d'une bactérie, in, Paul Kaiser, 1988, p.30

²⁷ Strang et Dawson, 1991, p. 1

²⁸ Flieder Françoise, Capderou Christine, 1998, p. 15

2.3.1- Caractéristiques des bactéries

Les bactéries sont principalement de petite taille, en moyenne plus petites que le micromètre (μm) : de 0,45 à $1\mu\text{m}$, leur mode de division est caractéristique (scissiparité : division cellulaire)²⁹. Leur morphologie générale est utilisée comme première classification.

On distingue quatre groupes morphologiques de bactéries³⁰ :

- de forme arrondie : ce sont les coques,
- de forme allongée et droite : ce sont les bacilles ou bâtonnets,
- de forme en virgule : ce sont les vibrions,
- de forme en "S" : ce sont les spirilles ou spirochètes.

Ces formes spécifiques sont en générales maintenues car la paroi extérieure des bactéries est en principe rigide.

Ces caractéristiques de forme et de taille sont génétiquement définies. C'est ce qui permet une première identification des bactéries. Mais la forme peut cacher des adaptations physiologiquement variées, la détermination bactérienne ne peut donc pas se baser exclusivement sur les facteurs morphologiques.

2.3.2- Classification des bactéries

La classification des bactéries est complexe, et suivant les auteurs il peut y avoir des divergences. On part en principe du règne des Procaryotes subdivisé en cyanobactéries d'une part et bactéries d'autre part³¹. Il faudrait rajouter les archaebactéries³². Puis ces subdivisions sont elles-mêmes partagées en divisions au nombre de quatre. Chaque division est scindée en sections qui comprend l'ordre, la famille, le genre bactérien. N'oublions pas que chaque membre contient plusieurs espèces de bactéries.

Celles-ci sont classées en quatre sous-embranchements des Protistes procaryotes, ou, Schizomycètes³³ :

- les Eubacteria, ou bactéries vraies,
- les Mycobacteria, proches des champignons,
- les Algobacteria, affiliées aux algues,
- les Protozoobacteria, affiliées aux protozoaires.

²⁹ CD-ROM Encyclopédie Universalis, 1998, Sous "Bactéries"

³⁰ Rolland Xavier et Laurence, 1997, p. 21

³¹ Kaiser Paul, 1988, p. 28

³² Schleper Christa, Février 1999, n°317

³³ Flieder F., Capderou C., 1998, p. 18

Seuls les deux premiers sous-embranchements comportent des bactéries saprophytes hétérotrophes pouvant générer des dégradations sur les matériaux archéologiques organiques ³⁴.

2.3.3- Croissance des bactéries

Quand on parle de croissance bactérienne il ne s'agit pas d'augmentation volumétrique mais bel et bien d'augmentation numérique des bactéries. La reproduction asexuée, se fait par fission binaire ou scissiparité, donnant naissance à deux cellules filles indépendantes et de volume égal. En milieu liquide, la croissance d'une bactérie suit des lois précises, elle varie en fonction de l'espèce et des conditions environnantes³⁵.

La température est un facteur de développement déterminant pour les bactéries qui de ce fait se répartissent en trois groupes :

- développement à basse température (< 15 °C) : ce sont des psychrophiles
- développement à température élevée (>45 °C) : ce sont des thermophiles
- développement entre 15°C et 45°C : ce sont des mésophiles.

Une humidité relative supérieure à 65 % est nécessaire à leur croissance.

La croissance maximale des espèces de bactéries se fait à un pH optimal relativement précis. Au voisinage de ce pH la croissance est ralentie. Chaque espèce de bactéries à un pH et une température optimaux de croissance. Les bactéries préfèrent un pH neutre à basique pour se développer.

Les bactéries n'utilisent pas toutes les mêmes sources d'approvisionnement pour leur énergie. En fonction de ce critère on désigne les bactéries qui tirent leur énergie des sources lumineuses les phototrophes, celles qui oxydent les substances organiques : les chimiotrophes.

2.3.4- Dégradations bactériennes

Les dégradations causées par les bactéries sont dues à la production d'enzymes³⁶.

Par exemple, les bactéries qui "mangent" le bois sont appelées bactéries cellulolytiques car elles produisent des enzymes appelées cellulases qui dans un processus catabolique* dégradent chimiquement les matériaux qui contiennent de la cellulose³⁷.

J'ai pu observer ce phénomène lors du test de cellulolyse (voir chapitre 6, point 6.5.1).

³⁴ Flieder F., Capderou C., 1998, p. 19

³⁵ Kaiser Paul, 1988, p. 33

³⁶ Flieder Françoise, Capderou Christine, 1998, p. 16

³⁷ Flieder Françoise, Capderou Christine, 1998, p. 13

2.4- Les moisissures

Sous le terme de moisissures on regroupe généralement les champignons microscopiques (organismes pluricellulaires) et les levures (organismes unicellulaires)³⁸.

On reconnaît les moisissures par leur aspect velouté, parfois visible sous forme de tâches blanches ou colorées, en surface des substrats³⁹.

2.4.1- Caractéristiques des moisissures

Elles sont formées de cellules eucaryotes, qui possèdent donc des noyaux entourés d'une membrane et comportant des chromosomes⁴⁰. Leurs cellules sont plus grandes que celles des bactéries (environ 10 à 30 μm). Les moisissures sont pluricellulaires, et ne possèdent pas de chlorophylle⁴¹. Elles préfèrent un pH acide pour se développer.

Les moisissures ont un appareil végétatif ou thalle qui ne présente ni racine, ni feuille, ni tige, ni vaisseau et n'ont pas de pigments assimilateurs.

Le thalle est formé d'une multitude de filaments ramifiés qui constituent le mycélium. Chacun de ces filaments est un hyphe, cloisonné ou non, à paroi plus ou moins épaisse et structurée contenant de la chitine ou de l'hémicellulose⁴² (fig. n°8)

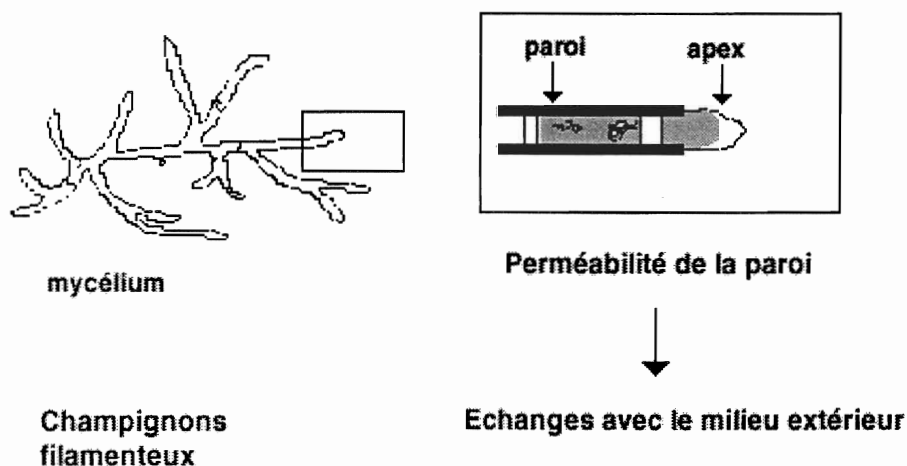


Fig. n°8 : morphologie d'un mycélium (Malala Rakotonirainy, 1999, p. 2)

³⁸ Strang et Dawson, 1991, p. 1

³⁹ Roquebert Marie-France, 1997, p. 2

⁴⁰ Roquebert Marie-France, 1997, p. 2

⁴¹ Rolland Xavier et Laurence, 1997, p. 19

⁴² Malalanirina Rakotonirainy, 1999, p. 2

2.4.2- Croissance des moisissures

Leur développement est dépendant des conditions environnantes, comme pour les bactéries. Les moisissures puisent leur énergie et les éléments nutritifs d'un substrat organique qu'elles dégradent en nutriments simples grâce à des enzymes. Les moisissures relâchent dans le milieu les déchets de leur métabolisme inutiles à la cellule : ce sont des métabolites, des mycotoxines, des pigments.

Les moisissures se reproduisent (fig. n°9) par des spores (asexuées ou sexuées) très résistantes. Ces spores très légères sont disséminées par le vent ou par les animaux. Le cytoplasme déshydraté des spores, protégé dans une enveloppe épaisse, peut rester en état de dormance ou d'hibernation pendant des mois, voire plusieurs années⁴³.

Lorsque les spores rencontrent des conditions favorables, elles germent et donnent naissance à une colonie végétative.

La germination des spores demande souvent une humidité relative (> 65%) plus élevée que sa croissance⁴⁴.

Une contamination biologique par les champignons apparaît souvent très vite et son extension est toujours rapide⁴⁵.

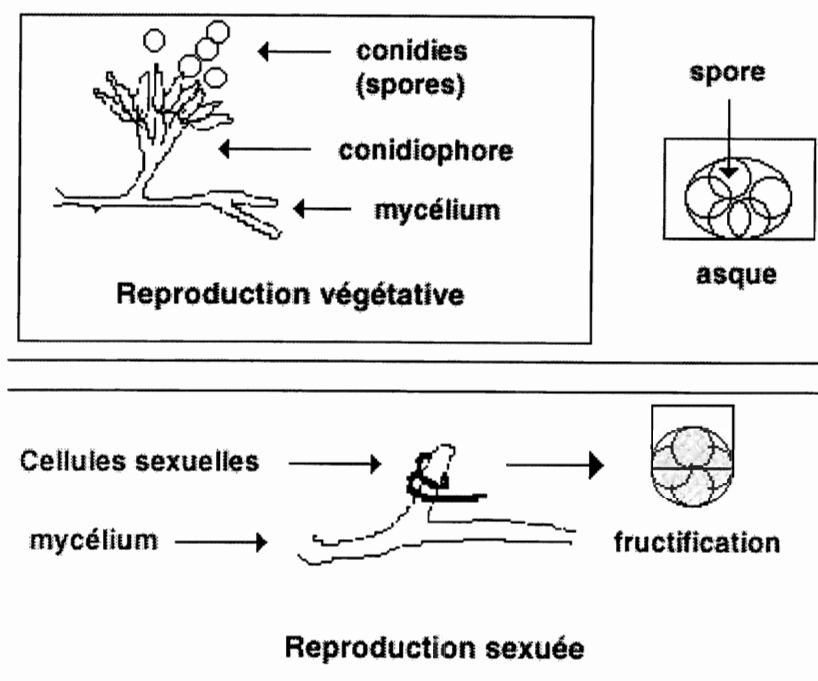


Fig. n°9 : schéma des types de reproductions des champignons filamenteux. (M. Rakotonirainy, 1999, p. 3)

⁴³ Roquebert Marie-France, 1988 p. 19

⁴⁴ Roquebert M.F., 1988, p. 18

⁴⁵ Flieder F., Capderou C., 1998, p. 114

2.4.3- Dégradations fongiques

Les biodégradations causées par les moisissures sont le fruit de ces échanges entre le substrat et les champignons. En s'appliquant de tout son mycélium sur l'hôte, le champignon crée une très grande surface d'échange⁴⁶ et devient agressif et dégradant pour le substrat organique.

L'action des moisissures peut aller de la simple coloration de surface à la dégradation totale des structures du bois en s'insinuant profondément dans le matériau et en libérant des enzymes cellulolytiques⁴⁷.

Dans les bains de traitement, les champignons se développent en surface des bois. En formant une couche superficielle plus ou moins dense, les moisissures freinent la diffusion du PEG dans les bois^{48, 49}.

2.5-Les protozoaires

Ce sont des microorganismes unicellulaires complexes. Ils ont différentes tailles et différentes formes. Ils se nourrissent de matières organiques solubles ou particulières (en particulier de bactéries ou d'algues). Ils peuvent se déplacer. Ils sont incapables d'effectuer la photosynthèse, comme les champignons.

2.6- Bains de traitement ou milieux de culture ?

Dans les bains de traitement du bois au PEG, humidité, nourriture, pH et température sont tous favorables à la prolifération des microorganismes qu'ils soient bactériens ou fongiques. Tout au long de ces traitements on voit se développer des microorganismes (bactéries, champignons, protozoaires) qui dégradent le bois.

On pourrait croire que c'est le PEG qui est dégradé.

Des études ont tenté de démontrer la dégradation du PEG par les bactéries et les champignons. Il est clair que le PEG est une source de carbone non négligeable pour les microorganismes.

Nous ne devons pas mésestimer les facultés des bactéries aérobies et anaérobies à dégrader les PEG

⁴⁶ Roquebert Marie-France, 1988, p 16

⁴⁷ Roman Agnès, 1989, p. 11

⁴⁸ Discussion avec C. André, C. Michel, C. Benoît

⁴⁹ Roman Agnès, 1989, p. 11

de bas poids moléculaire. Dans l'étude réalisée par Dean et al.⁵⁰ on voit clairement que les champignons et les bactéries dégradent le PEG. Mais ce qui est plus intéressant c'est qu'apparemment ce ne sont pas les mêmes microorganismes qui se développent suivant la valeur du poids moléculaire du PEG.

Ainsi un champignon du genre *Mucor* produit dans le PEG 600 près de deux fois la biomasse produite dans l'échantillon témoin, mais ni dans le PEG 1500 ni dans le PEG 4000.

Quand à un *Aspergillus* il produit dans tous les PEG testés le double de biomasse que dans l'échantillon témoin⁵¹.

On peut alors tenir compte du fait que le PEG est biodégradable par les bactéries mais spécialement par les champignons. Lorsqu'un bain de traitement est contaminé cela diminue la qualité et l'efficacité du traitement en cours⁵².

Dans les bains de traitement on remarque une stagnation du développement microbien quand la concentration des produits d'imprégnation est supérieure à 60%, il y a toutefois des bains qui restent contaminés tout au long du processus⁵³.

La difficulté majeure rencontrée par les conservateurs réside à maintenir l'aseptie nécessaire dans les bains de traitement.

⁵⁰ Dean L. R. et al. , 1990, p. 91

⁵¹ Dean L. R.,et al., 1990, p. 97-98

⁵² Dean L. R., et al., 1990, p. 102

⁵³ Discussion avec C. André, C.Michel, C. Benoît

Chapitre 3

La lutte contre les microorganismes dans le traitement des bois gorgés d'eau

3.1- Introduction

"La lutte contre les insectes et les champignons est complexe, car il s'agit de les détruire de façon radicale, et si possible définitive, par des méthodes qui soient inoffensives, à la fois pour l'homme, son environnement et les oeuvres"⁵⁴.

Voici posée en quelques mots la problématique qui nous occupe. Entre une simplicité théorique implacable et une réalité pratique incontournable, nous devons trouver un mode d'action bénéfique à tous. Car l'environnement c'est aussi toute une microflore et une microfaune importante pour l'équilibre écologique.

Il ne faut donc pas vouloir détruire n'importe qui, n'importe comment avec n'importe quoi.

Une phrase de Christian Bobin, romancier et essayiste, me revient en mémoire, elle s'apparente à la difficulté d'action à laquelle nous sommes confrontés : "Eclaire ce que tu aimes sans toucher à son ombre"⁵⁵.

Il y a là matière à remplir quelques vies !

Nous avons à disposition plusieurs méthodes tant chimiques que physiques pour venir à bout des infestations microbiennes. Mais elles ne sont pas toutes compatibles avec le milieu dans lequel se situe l'objet, comme avec l'objet lui-même. La sauvegarde de ce dernier, fragile, sensible à tout changement de conditions physiques brusque et intensif, à tout produit chimique pouvant altérer sa propre structure moléculaire, est notre objectif principal.

Si nous soupçonnons qu'une méthode peut l'endommager à court terme ou à long terme nous l'abandonnons ou la modifions.

⁵⁴Flieder, Capderou, 1998, p. 9

⁵⁵ Christian Bobin, "L'éloge du rien", Éditions Fata Morgana, 1990 (Essai)

3.2- Désinfection physique

La désinfection physique est préférable car elle paraît mieux adaptée au traitement des collections⁵⁶. Elle n'émet pas de vapeurs toxiques pour l'homme et l'environnement et ne risque pas de laisser dans les objets des produits résiduels pouvant être plus nocifs à long terme.

Parler de désinfection physique revient à parler de rayonnements électro-magnétiques.

Or, l'effet des rayons est cumulatif. Autrement dit la matière ne peut résorber les doses déjà reçues, et un taux supérieur à ce que la matière peut supporter, conduit à la dégradation de l'objet, dégradation irréversible que nous n'avons pas aujourd'hui la possibilité de stopper ni même de réduire.

3.2.1- Le rayonnement gamma

Des recherches de destruction de champignons cellulolytiques ont été réalisées par plusieurs personnes⁵⁷ afin de savoir si l'exposition des papiers (et par extension des bois) à des rayonnements gamma était sans danger pour les objets. La conclusion de ces travaux est sans appel : le rayonnement gamma peut être utilisé à très faible dose pour la désinsectisation alors qu'une irradiation à des doses létales pour tous les champignons cellulolytiques provoque des dégradations inacceptables⁵⁸. Confirmation de cet avis par Régis Ramière qui préconise l'irradiation à faible dosage ($\pm 500 \text{ Gy}$ ⁵⁹) pour une désinsectisation mais qui met en garde pour des doses plus fortes visant à détruire des microorganismes (il faut alors compter 18 000 Gy pour détruire les champignons cellulolytiques). Il est préférable d'agir au cas par cas⁶⁰.

Il faut noter que ces tests n'ont pas été effectués sur des matériaux organiques gorgés d'eau.

3.2.2- La stérilisation par Ultra-Violet (U.V.)

En discutant avec des restaurateurs, la stérilisation éventuelle des bains de traitement des bois gorgés d'eau par des UV a été évoquée.

Après avoir lu quelques articles⁶¹ consacrés à ce sujet, cette méthode ne m'apparaît pas des plus envisageables. Tout d'abord parce que la longueur d'onde efficace contre les champignons et les

⁵⁶ Flieder F., Capderou C., 1999, p. 114

⁵⁷ Butterfield, 1987, p. 181-191

⁵⁸ Leclerc Françoise, 1988, p. 91

⁵⁹ L'unité de dose est le Gray (Gy), l'ancienne unité, le rad, est encore souvent utilisée (1 Gy = 100 rads)

⁶⁰ Régis Ramière, 1988, p. 79-86

⁶¹ Flieder F., 1999, p. 154

bactéries est comprise entre 350 et 450 nanomètre (nm), ce qui est dangereux pour les matières organiques : dépolymérisation, décoloration. Ensuite parce que le rayonnement est stérilisant uniquement en surface, pas en profondeur. Enfin, parce que le bain est à 15 % minimum de polyéthylèneglycol, polymère sensible aux UV.

3.3- Désinfection chimique

Si la désinfection physique est peu probante, les méthodes chimiques ne le sont pas plus. Il reste très difficile de contrôler la diffusion des agents chimiques employés au sein des objets. Et ce, d'autant plus lorsque les produits et les objets restent ensemble dans un milieu confiné et pour plusieurs semaines, comme c'est le cas pour les biocides rajoutés aux bains de traitement.

3.3.1- L'oxyde d'éthylène

L'oxyde d'éthylène est la forme gazeuse du PEG. Un des produits secondaires formé par l'oxyde d'éthylène en présence de l'eau est l'éthylèneglycol. Ce dernier agit comme un activateur sur les conidies des champignons⁶². Cette remarque est importante car elle appuie l'hypothèse de dégradation du PEG dans les bains par les microorganismes.

Par ailleurs, il n'est pas possible techniquement de désinfecter des bains par ce processus.

3.3.2- Les biocides

L'emploi de biocides est une procédure répandue dans nombre d'institutions depuis maintenant plusieurs décennies.

Le biocide doit avoir un large spectre d'action, pouvoir rester efficace avec le changement de pH des bains (légère acidification), tolérer les différences de température, être compatible avec le PEG, supporter la congélation, ne pas produire de sous-produit toxique pour l'utilisateur et pour l'environnement, être compatible avec les biocides employés antérieurement⁶³.

⁶² Florian E. M.-L., 1993, p. 870

⁶³ Roman Agnès, 1989, p. 14

Pendant le stockage il arrive que le développement de microorganismes se produise, certains laboratoires ajoutent alors des biocides à l'eau des bains, il s'agit souvent :

- d'acide borique associé au Borax à une concentration de 2%, il a une action préventive.
- d'antifongiques du groupe des ammoniums quaternaires.

À ARC-Nucléart (Grenoble) les conservateurs-restaurateurs des bois gorgés d'eau ont des problèmes non seulement en bacs de stockage en chambre froide mais aussi lors du traitement. Ils ont mené des études à ce sujet il y a quelques années. Celles-ci ont montré la présence de différents types de champignons et de bactéries en raison de la variété d'enfouissement des objets. Pour ne pas à avoir à utiliser plusieurs produits différents ils ont sélectionné un biocide à large spectre d'efficacité : le Bactolyse 48⁶⁴.

Les biocides sont ajoutés dans les bains à raison de 1% à 5%, mais ils ont une action limitée dans le temps⁶⁵. De plus, nous ne savons toujours pas aujourd'hui définir s'ils ont un effet secondaire néfaste à la conservation du bois. Certains laboratoires de conservation, dans le doute n'en utilisent donc pas, préférant changer les bains dès que ceux-ci deviennent trop infestés⁶⁶.

Les biocides sont des produits toxiques, dangereux pour l'homme et l'environnement et généralement non-satisfaisants.

Ils nécessitent des protections et des précautions d'emploi spécifiques. Pour exemple les recommandations faites par Thomas Frey et Jennifer von Reis à la fin de leur article sur l'emploi de biocides en extérieur⁶⁷. Je cite : "Porter des vêtements de protection, des gants répondant aux normes en vigueur, utilisation d'un masque à cartouches spécifiques à garder pendant tous le temps d'application du produit, prendre une douche et se laver les cheveux après chaque utilisation du biocide, pour tout le personnel directement en contact avec les produits. "

3.4- La conservation préventive

Une des meilleures méthodes actuelles serait la conservation préventive : stabilisation de l'environnement dans lequel se situe l'objet, afin de pouvoir limiter, voire éliminer la croissance de microorganismes. Sans toxicité pour l'homme et pour les objets, celle-ci est respectueuse de l'environnement.

⁶⁴ Communication e-mail par Céline Bonnot-Diconne, conservateur-restaurateur, ARC-Nucléart, Grenoble

⁶⁵ Discussion avec Cédric André et Claude Michel.

⁶⁶ Discussion avec Cyril Benoît

⁶⁷ Frey Thomas, Jennifer von Reis, 1993, p. 880

Toutefois il y a des périodes dans la vie d'un objet archéologique exhumé où l'on ne peut mettre en oeuvre la conservation préventive. Ainsi, durant les différentes phases de traitement d'un objet les conditions environnementales sont fluctuantes (bains, assèchement, augmentation de la température, modification de la pression, adjonction de différents produits nécessaires au traitement). C'est bien souvent lors de ces phases, indispensables, que les conditions requises pour le développement et la germination des spores sont atteintes.

Par la suite, il y a une mise en dormance grâce justement à la conservation préventive.

Malheureusement en même temps que nous avons traité un bois gorgé d'eau dans un bain où il y a eu contamination microbienne, nous avons fabriqué une bombe à retardement.

D'autant plus que dans le domaine du microscopique un contrôle à l'oeil nu des collections n'est pas synonyme de réelle assurance d'un non développement microbien. En effet, lorsque l'on voit un thalle en pleine croissance, il est déjà trop tard.

D'abord parce que cela signifie qu'il faut intervenir avec des méthodes drastiques, dans l'urgence, sur les objets, avec tous les risques que cela comporte. Ensuite car la contamination atmosphérique s'est déjà produite, entendre par là que la sporulation a eu lieu et qu'elle est à même de recontaminer les locaux quelques temps plus tard, à la moindre défaillance du système de régulation des conditions environnementales, s'il y a une climatisation, et si il n'y en a pas à la prochaine variation climatique tout recommencera.

Tout cela pour dire que la conservation préventive ne peut pas toujours contrôler entièrement la germination de souches microbiennes. C'est pourquoi en addition à la conservation préventive il faut prévoir une méthode d'éradication des spores de champignons (si possible pendant la durée du traitement de l'objet où il est le plus exposé à la contamination), ainsi que la restriction de la croissance des champignons ⁶⁸.

⁶⁸ Florian E. M.-L., 1993, p. 872

Chapitre 4

Des plantes aromatiques aux Huiles Essentielles (H.E.)

4.1- Généralités

Il semble que les herbes (appelées "simples" au moyen-âge) furent employées dans l'alimentation ou comme remèdes et ce, sans transformation. Les plantes ont été aussi utilisées réduites en poudre, incorporées dans des décoctions, des onguents. C'est en tout cas ce que nous livre l'archéologie à travers les résidus analysés au fond de certaines poteries, ou encore la composition de résines employées dans la momification des morts en Égypte⁶⁹. Mais nous n'avons aucune certitude quand à ce qu'en faisaient les populations.

On peut supposer que leur usage n'était donc pas seulement thérapeutique mais aussi cosmétique, culinaire, religieux.

4.1.1- Historique de l'aromathérapie

Nous sommes remontés jusqu'à 40 000 ans, en Australie où l'usage de certains eucalyptus est connu mais nous ne pouvons pas définir sous quelle forme.⁷⁰

L'emploi des herbes aromatiques en tant que médecine naturelle et non plus seulement en tant que condiment nous est parvenu par les écrits de Pline l'ancien. C'est jusqu'à maintenant la source historique la plus exhaustive qui soit sur le recensement et l'usage des plantes comme méthode

⁶⁹ Colombini Maria Perla, et al., 2000, p. 19

⁷⁰ Marie Rossi, 1995, p. 11

thérapeutique.

La médecine par les plantes a été nommée la phytothérapie : l'aromathérapie en fait partie.

Étymologiquement l'aromathérapie signifie : la médecine par les odeurs (du grec *aroma* : odeurs).

Il est difficile de donner une date du début de l'emploi des huiles essentielles avec exactitude. Nous sommes face à plusieurs versions et c'est à différentes périodes et différentes cultures que l'on attribue la découverte de la distillation des végétaux afin d'en obtenir les huiles essentielles. Nous en verrons plus loin les différents procédés.

On peut penser que les Égyptiens pratiquaient déjà la distillation car on voit sur les murs d'un temple de Memphis de nombreux dessins d'alambics⁷¹ en relation avec les remèdes et posologies nécessaires à la guérison du malade. On peut alors penser que l'Orient utilisait les huiles essentielles avant l'Occident. Si l'on continue dans ce sens on s'aperçoit que ce sont les Arabes (civilisation classique arabe, qui maîtrisaient la distillation à la vapeur d'eau) qui ont amené l'emploi des huiles essentielles en Occident.

Au moyen-âge, en Europe, grâce aux Arabes, "les huiles parfumées", comme étaient nommées les huiles essentielles à l'époque, furent l'objet d'un commerce et constituèrent une monnaie d'échange.

Aujourd'hui des centaines d'huiles essentielles sont encore produites de par le monde. Les plus fréquentes sont les huiles essentielles d'anis, de basilic, de cajepout, de camomille, de cannelle, de girofle, de sarriette, et de sauge.

Nous devons le renouveau thérapeutique des huiles à un ingénieur chimiste, R.M. Gatefossé, qui sut attirer l'attention sur leur pouvoir antiseptique, pendant l'entre-deux guerres. De nombreux chercheurs lui succédèrent.

Dans les années 70, MM. Girault et Valnet vont mettre au point "l'aromatogramme", qui comme l'antibiogramme permet de sélectionner les huiles essentielles efficaces contre les germes infectieux des malades. C'est à partir de cette méthode que nous avons mis au point notre propre protocole de recherche des huiles essentielles, nous y reviendrons plus en détails ultérieurement.

Croire que l'utilisation des huiles essentielles est sans danger pour le manipulateur, est une idée fausse. L'aromathérapie est susceptible, à certaines doses de provoquer des effets secondaires graves : accidents nerveux, convulsions ou crises d'épilepsie, parfois le coma et la mort. Aussi les recommandations faites par les chimistes et les aromathérapeutes ne sont pas à prendre à la légère.

⁷¹ Abrassart Jean-Louis, 1997, p. 33

Par exemple, l'ingestion de 10 gouttes d'huile essentielle d'Hysope (*Hyssopus officinalis*) peut provoquer une crise d'épilepsie en raison de la pinocamphone (une cétone) que contient cette essence⁷².

Les huiles essentielles sont des produits chimiques complexes, contenant pour la plupart plusieurs centaines de constituants comme par exemple : phénols, alcools, aldéhydes, esters, terpènes, cétones, etc...

A ce propos il y a ceux qui préconisent de ne pas dissocier ces constituants les uns des autres, trouvant que l'action véritable est le fruit de cette synergie naturelle, d'autres, préfèrent isoler les principes actifs (par chromatographie en phase gazeuse ou liquide) et se servir uniquement des molécules connues et isolées.

Les huiles essentielles ont des pouvoirs antiseptiques, bactéricides, bactériostatiques, antibiotiques, antifongiques, antiparasitaires reconnus (tests cliniques faits sur plusieurs centaines de patients, avec différentes méthodes, par différentes équipes de cliniciens)⁷³.

Les études les plus importantes concernant l'efficacité antiseptique des huiles essentielles sont certainement celles menées par Kellner et Kobert de 1954 à 1956 : ils recensent 175 huiles essentielles et étudient leur pouvoir antiseptique vis-à-vis de 8 microbes et un champignon. Ils réussissent à isoler 21 huiles particulièrement actives dont l'huile essentielle d'Origan d'Espagne. Ils feront un lien entre l'activité antiseptique des huiles et les groupements moléculaires actifs des composants de l'huile⁷⁴.

Les huiles essentielles agissent à de très faibles concentrations, qui vont, selon l'essence et le germe, aux dilutions de 5/100 à 1/2000 ou même de 1/80 000 (1 gramme de produit pour 80 litres de liquide).

4.1.2- Les huiles essentielles en conservation - restauration.

Parler d'huiles essentielles en conservation, fait évoquer immédiatement la momification des morts dans l'Égypte ancienne. Les analyses menées à l'heure actuelle n'ont pu nous révéler lesquelles étaient employées⁷⁵. On se servait également de l'huile de cèdre pour protéger les papyrus de

⁷² Abrassart Jean-Louis, 1997, p. 20

⁷³ Belaiche P., 1979, Avant-propos

⁷⁴ Encyclopédies des médecines naturelles (EMN), tome 2, 5-C-1

⁷⁵ Colombini Maria Perla et al., 2000, pp. 19-29

l'attaque des insectes⁷⁶. Ce n'était peut-être pas seulement contre les insectes car l'huile de cèdre (probablement *Cedrus atlantica*) en plus d'être un insecticide, a pour propriété d'être un excellent fongicide⁷⁷.

Récemment des recherches *in vitro* et *in situ* de huit fongicides thermonébulisables ont été menées par le centre de recherches en conservation des documents graphiques (CRCDG). Sur ces huit fongicides quatre correspondaient aux principes actifs d'huiles essentielles. Les résultats n'ont pas été concluants pour ces principes actifs⁷⁸. Mais de nombreuses questions surgissent lors de la mise en place de cette recherche intégrant non pas les huiles essentielles pures mais seulement les principes actifs. On retrouve là les questions du sempiternel débat sur le bien-fondé ou non de l'utilisation de produits de synthèse en lieu et place de produits naturels.

D'autres recherches, toujours sur des antifongiques, ont été réalisées dans différents instituts coordonnées par l'équipe de Mr. F. Henry du Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de Thiais en France. Une partie de ces recherches portant sur l'encapsulation d'huiles essentielles antifongiques ont, d'une part, montré l'efficacité des huiles contre les bactéries et les champignons, d'autre part, que cette efficacité se trouvait être réduite du quart contre les champignons lorsque l'huile est encapsulée au lieu d'être seule⁷⁹.

Mais avant d'aller plus loin, une huile essentielle c'est quoi ? D'où provient elle ? Comment est-elle fabriquée ?

Pour répondre à ces questions il nous faut franchir les portes du phénomène de mode qui est en train de se former autour de ces substances pour aller au coeur de l'aromatologie, science qui relève tout à la fois de la biologie et de la chimie.

4.2- Les plantes aromatiques

Parmi les 800.000 espèces de plante à fleurs seule une petite partie de plantes sont capables de synthétiser des essences. On leur donne le nom de plantes aromatiques, dans la mesure où seules ces plantes dégagent une odeur plus ou moins agréable à sentir.

En fait cette odeur est un critère permettant la différenciation d'une plante aromatique d'une plante qui ne le serait pas. La présence d'une odeur caractéristique est directement liée à la production de

⁷⁶ Flieder Françoise , Capderou Christine, 1998, p. 9

⁷⁷ Walters Clare, 1998, p 58

⁷⁸ Rakotonirainy Malala et al., 1997, p. 221

⁷⁹ Henry F. et al., 1997, p. 235

molécules aromatiques en suffisance pour dégager cette odeur⁶⁰.

Ces végétaux évolués, sont actuellement répartis en une cinquantaine de famille⁶¹. Mais toutes ne sont pas utilisées en aromathérapie. Il y a plusieurs raisons pour cela, qui vont de la trop forte toxicité de certaines plantes, à leur faible rendement en huile essentielle, en passant parfois par des propriétés jugées inintéressantes à l'heure actuelle.

Donc, en dépit du nombre élevé de "plantes aromatiques", celles qui rassemblent les paramètres économiques (bonne exploitation, bon rendement), curatifs (propriétés intéressantes), technologiques (connaissances des molécules) sont en réalité peu nombreuses. C'est pourquoi on utilise généralement en aromathérapie une petite centaine d'huiles essentielles, dont seulement environ cinquante sont prescrites couramment⁶².

4.2.1- Fonctions des essences chez les plantes

Les plantes aromatiques fabriquent des essences, substances volatiles et odorantes, présentes dans tous les organes de ces végétaux.

Mais à ce stade on pourrait se demander pourquoi la plante produit des essences?

- Pour les uns il s'agit d'un système de défense et de protection contre d'éventuels parasites comme on peut en trouver dans la nature tels que des bactéries, des champignons, des insectes. Ainsi le pin sylvestre dont l'atmosphère est pratiquement stérile puisqu'on ne mesure que 1 à 2 bactéries par m³ sous l'arbre⁶³. Il faut pourtant préciser que les effluves de certaines plantes ont un effet protecteur contre certaines souches microbiennes mais pas sur toutes.

- Pour d'autres il s'agit d'un système régulateur, comme notre système hormonal qui catalyserait les réactions biochimiques et ferait circuler les informations dans les différents niveaux de la plante. Leur sécrétion est liée au stress de la plante. Ce qui explique sans doute pourquoi les plantes "sauvages" sont plus riches en essence que les plantes de cultures.

- Quant au rôle le plus connu des essences il est sans conteste d'attirer les insectes nécessaires à la fécondation de la plante.

⁶⁰ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 23

⁶¹ D. Baudoux, 1998, p. 8

⁶² Mailhebiau Philippe, 1994, p. 25

⁶³ Grégoire Jauvais, 1966, p. 39

4.2.2- Structures sécrétrices des essences chez les plantes

Les différentes parties d'une plante sont : les feuilles, les racines, l'écorce, les fruits, les fleurs, les rhizomes.

Dans toutes ces parties sont stockées les essences sécrétées par les cellules, les poils et les glandes présentes dans la plante. L'essence est stockée dans des micro-poches. Selon l'espèce tel ou tel organe contient préférentiellement des essences (voir chap. 4.4.2).

4.3- Méthodes d'extraction des essences

Afin de pouvoir utiliser les essences contenues dans les plantes aromatiques, il faut pouvoir les extraire sans les modifier ou sans dénaturer leur structure, bien que les phénomènes d'oxydoréduction soient inévitables.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction plus ou moins dommageables pour les principes actifs contenus dans les plantes. Les paramètres principaux pour exécuter ce travail sont la température, la pression, la durée du temps de chauffe et d'extraction, la pureté de l'eau employée pour la distillation.

4.3.1-Expression

Méthode simple mais limitée, car elle ne peut s'appliquer qu'aux fruits de la famille botanique des Rutacées (orange, citron, bergamote). L'expression consiste à briser mécaniquement les micro-poches qui contiennent l'essence. Le produit obtenu est appelé "essence" car il ne subit aucune transformation chimique lors de son extraction⁸⁴.

4.3.2-Distillation à la vapeur d'eau

La technique, la plus ancienne, mais aussi la plus adaptée à l'extraction de l'essence de la plante afin d'obtenir de l'huile essentielle (quantitativement et qualitativement la plus fiable) est sans conteste la distillation à la vapeur d'eau (fig. n°10).

Cette procédure n'abîme pas les molécules extraites et permet de recueillir deux produits :

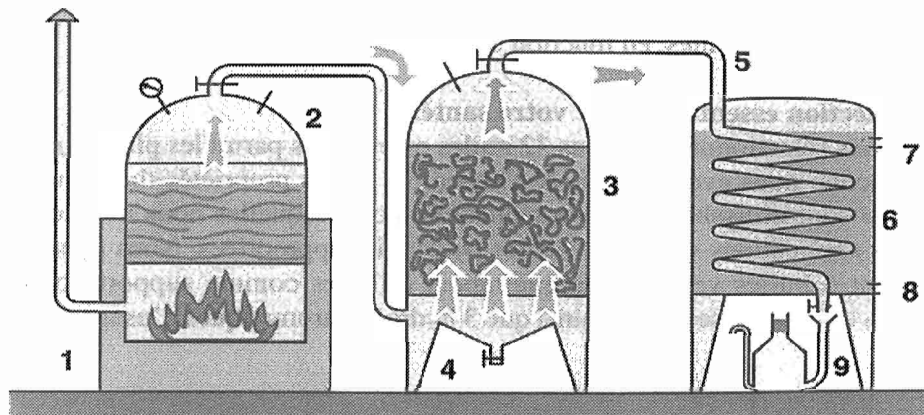
- l'huile essentielle
- l'hydrolat, qui est la forme solubilisée et beaucoup moins puissante de l'huile essentielle. L'hydrolat est composé des molécules de l'essence à faible nombre d'atomes de carbone. Ces chaînes

⁸⁴ Baudoux Dominique, 1997, p. 11

moléculaires sont très volatiles mais aussi très hydrosolubles. C'est pourquoi elles restent en solution.

Le rendement en huile essentielle est assez faible : entre 0,005 % et 10% suivant les plantes et les parties distillées.

Par exemple pour obtenir 450 grammes d'huile essentielle de Sauge il faudra distiller 225 kilogrammes de cette même Sauge.



1. Foyer - 2. Chaudière - 3. Vase à fleurs - 4. Vidange de condensation - 5. Col de cygne - 6. Réfrigérant avec serpentín 7. Sortie d'eau chaude - 8. Arrivée d'eau froide - 9. Essencier servant à la décantation de l'essence et de l'hydrolat

Fig. n°10 : Appareil à distiller à la vapeur d'eau, in, Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles, Dr Ph. Goëb, Ed.Jakin, 1999, p. 2

L'appareil à distiller, comme celui pour les fruits, s'appelle un alambic. Les appareils utilisés actuellement permettent de chauffer l'eau séparément des plantes, ce qui évite à l'huile essentielle obtenue d'avoir une odeur de brûlé et très certainement d'éviter une oxydation de ses principes actifs.

La vapeur générée par l'eau en ébullition, qui doit être la plus pure possible, imprègne et passe à travers la matière végétale. Elle libère, par effet de chaleur, l'essence contenue dans les organes de la plante. Celle-ci est dissoute puis vaporisée et enfin entraînée vers le réfrigérant. Là, il y a échange thermique entre l'eau froide du réfrigérant entourant le serpentín et la vapeur d'eau chargée en essence qui circule dans le serpentín. Progressivement la vapeur redevient liquide par condensation. En fin de distillation un essencier ou "vase florentin" recueille l'huile essentielle et l'eau (hydrolat). La densité de l'huile (inférieure à l'eau) lui permet de surnager au-dessus de l'hydrolat, et de faciliter ainsi la séparation des deux produits.

L'huile essentielle est mise en flacons de verre brun (pour la protéger de la lumière) pour qu'elle se stabilise. Cette période de repos est indispensable, elle varie en fonction de la nature de l'huile. Le temps minimum est de un mois (H.E. de lavande) mais cela peut aller jusqu'à une année pour l'H.E. de laurier. La meilleure conservation se fait en cave fraîche⁸⁵.

L'hydrolat est conservé aussi à des fins thérapeutiques ou cosmétiques.

La température et la pression doivent être les plus basses possible : environ 100°C pour une pression légèrement supérieure à 1 atmosphère. Le temps de distillation est au minimum de 1 heure mais peut augmenter jusqu'à 100 heures pour le santal (*Santalum album*), dont on distille le bois lui-même.

L'extraction à l'aide de fluides supercritiques est une des techniques d'extraction récente.

Un fluide supercritique est une substance qui n'est plus un gaz ni un liquide mais un fluide englobant les deux états. Le fluide se forme au-delà du point où deviennent égales la densité du liquide et sa vapeur maintenue sous pression. L'eau supercritique peut alors dissoudre les composés non polaires, exactement comme un solvant organique⁸⁶.

Son application est trop limitée et trop coûteuse pour être une alternative valable à la technique traditionnelle de la distillation à la vapeur d'eau⁸⁷.

4.3.3- Extraction à l'aide de solvants organiques

Ils existent des végétaux aromatiques contenant très peu d'essence, non extractible par distillation. Dans ces cas les molécules aromatiques sont extraites à l'aide de solvants organiques. Ce que l'on obtient est appelé concrètes ou absolues.

Les produits obtenus sont réservés à l'usage cosmétique ou alimentaire, mais ne peuvent être employés à des fins thérapeutiques en raison de la toxicité des solvants employés⁸⁸.

4.4- Les huiles essentielles (H.E.)

La pratique de l'aromathérapie se fonde sur des huiles essentielles de qualité, d'origine connue et confirmée et dont la composition doit être parfaitement définie.

A cet effet, en France l'Institut National Scientifique d'Aromatologie (INSA) : a établi et déposé un

⁸⁵ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 25-27

⁸⁶ Caro Paul, 1995, p. 131

⁸⁷ Baudoux Dominique, 1997, p. 13

⁸⁸ Sallé Jean-luc, 1991, p. 21

label HEBBD : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie. Il n'est pas le seul, d'autres labels ont été déposés (Biovert, Ecocert).

Ces labels sont constitués de trois critères qui définissent les caractéristiques d'origine et de composition des huiles essentielles⁸⁹ :

- l'espèce botanique,
- l'organe producteur,
- la spécificité biochimique.

4.4.1- L'espèce botanique

Dans les genres de plantes, il existe plusieurs espèces n'ayant pas les mêmes propriétés. D'où la nécessité de définir correctement l'espèce botanique. Généralement, on préfère garder la nomenclature botanique latine afin d'éviter les confusions possibles. Cette nomenclature latine est binomiale (système de Linné).

Par exemple *Lavandula* est un genre tandis que *vera*, *spica*, *stoechas*, *hybrida* sont les différentes épithètes qualificatives individualisant spécifiquement ces lavandes. L'association du genre et de l'épithète définit l'espèce botanique : par exemple, *Lavandula vera* (en français : Lavande vraie).

S'il existe plusieurs variétés il est nécessaire de préciser également. Dans le cas de la lavande vraie on a deux variétés : *Lavandula vera* variété *fragens* ou *Lavandula vera* variété *maillotte*, la première est d'origine sauvage, la deuxième de culture⁹⁰.

En aromathérapie cette dernière précision a aussi son importance pour la qualité du produit obtenu.

Il est donc indispensable d'exiger une garantie sur l'espèce ou la variété botanique ou horticole.

4.4.2- L'organe producteur

Pour les huiles essentielles distillées en plantes entières il n'est pas véritablement important de spécifier l'organe producteur de l'huile, par contre un grand nombre de plantes renferment des essences dans leurs différentes parties constitutives.

Pour exemple le *Cinnamomum zeylanicum* ou cannelier de Ceylan dont on peut extraire l'huile essentielle de feuille, d'écorce et de racines avec des propriétés différentes pour chacune d'entre elle⁹¹. La racine fournit une huile riche en camphre, la feuille renferme de l'eugénol, et l'écorce du

⁸⁹Mailhebiau Philippe, 1994, p. 32

⁹⁰ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 33

⁹¹ INSA, Septembre 1995, p. 10

cannelier donne principalement de l'aldéhyde cinnamique⁹².

4.4.3- La spécificité biochimique

Dans les années soixante, des chercheurs ont démontré qu'une espèce botanique définie élaborait des essences différentes suivant ses conditions d'existence. Ces observations sont dues à l'étude du *Thymus vulgaris* (Thym commun) de France. On s'est aperçu que le même clone pouvait donner une huile avec des composants différents selon la manière avec laquelle il est cultivé, ramassé, selon le climat, l'altitude, la nature du sol.

La précision de cette spécificité indique les composants qui vont conférer à l'huile une action thérapeutique particulière même si ils ne sont pas majoritaires dans la composition générale de cette huile⁹³.

Dans l'application des huiles il est indispensable de connaître leur spécificité biochimique lorsqu'il y a lieu, ainsi pour le Romarin, *Rosmarinus officinalis*, il en existe trois (s.b.pour spécificité biochimique) :

1- *Rosmarinus officinalis* s.b. 1,8 cinéole,

2- *Rosmarinus officinalis* s.b. camphre,

3- *Rosmarinus officinalis* s.b. acétate de bornyle, verbénone, (abv.).

L'importance de cette spécification prend toute sa dimension lorsque l'on sait que le romarin "abv" est indiqué pour le traitement des fonctions hépatiques alors que le même romarin mais cette fois-ci "camphre" est hépatotoxique.

4.4.4- Analyse et contrôle des caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles

Pour évaluer les caractéristiques des huiles essentielles il existe des mesures physiques. On prend en compte la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire et la miscibilité à l'éthanol 70%. Déterminées selon un protocole rigoureux, ces mesures sont exprimées par une fourchette (minimum-maximum), par conséquent elle ne sont pas l'exact reflet de la qualité d'une huile essentielle.

Plus fiable et plus sûre est l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Il s'agit d'un

⁹² Naves Y.R., 1949, p. 473

⁹³ INSA, Septembre 1995, p 11

processus permettant la séparation et l'évaluation de la concentration molaire des divers constituants des huiles essentielles.

Elle permet d'établir le profil chromatographique (voir fig. n°11) d'une huile essentielle et de le comparer à un profil de référence souvent défini par les différents organismes nationaux ou internationaux comme la Pharmacopée française, l'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) ou encore L'AFNOR (Association Française de Normalisation).

Cependant cette technique ne permet pas d'identifier les divers composés. Pour cela il faut coupler la CPG à un spectromètre de masse (SDM)⁹⁴.

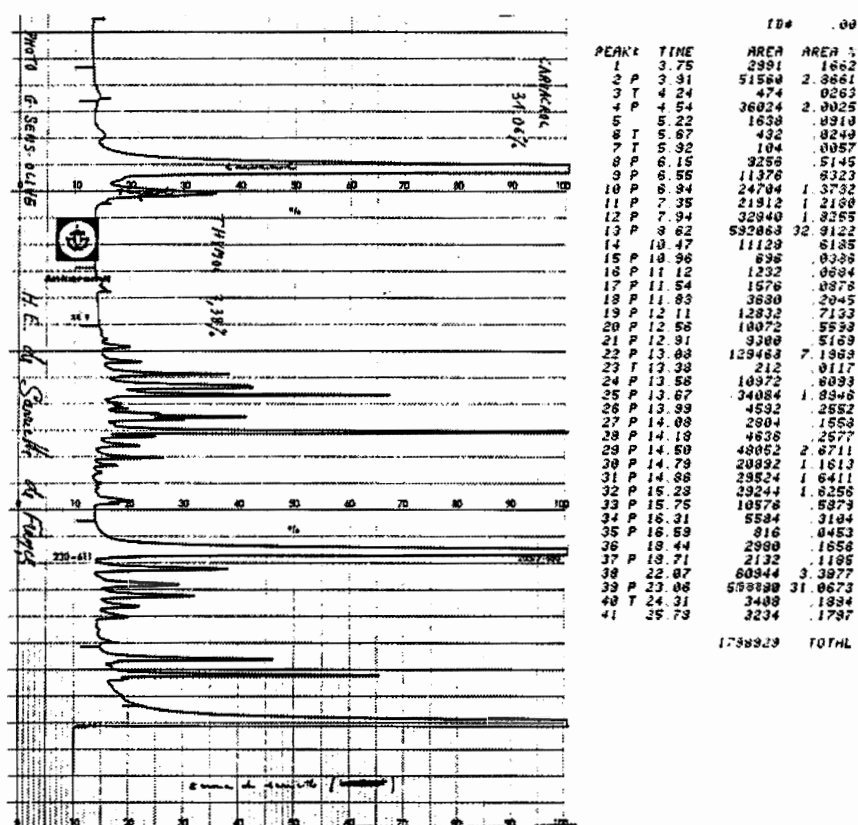


Fig. n°11 :
Chromatographie en phase gazeuse d'H.E. de Sariette de France
- thymol 3,38 %
- carvacrol 31,06 %
in, L'aromatogramme, Paul Belaiche, 1979, p. 159

⁹⁴ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 553

4.5- Mise en évidence de la nature antiseptique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont principalement antiseptiques, désintoxiquantes et revitalisantes (ce dernier aspect nous intéresse peu dans le domaine de la conservation mais il peut être important en thérapie), elles sont anti-virales, anti-microbiennes et anti-putrides.

Les huiles essentielles agissent en bloquant certaines fonctions métaboliques du germe, comme l'arrêt de la croissance et de la reproduction (action bactériostatique, fongistatique) pour aboutir à la lyse (action bactéricide, fongicide) si l'inhibition se poursuit. En effet, toute cellule vivante, qu'elle soit humaine végétale ou microbienne doit croître et se diviser pour vivre. Tout blocage de cette division cellulaire entraîne la cytolyse⁹⁵.

4.5.1- L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Le principe est identique à l'antibiogramme, utilisé en laboratoire d'analyse pour sélectionner l'antibiotique efficace contre le germe cultivé.

4.5.1.1- En milieu solide

On travaille en boîte de Pétri sur des colonies microbiennes déjà développées. On y installe des pastilles imprégnées d'huiles essentielles. On place le tout un certain temps à l'étuve à 37,5 °C (température du corps). La lecture des résultats se fait en relevant la distance du halo d'inhibition périphérique à la pastille. Ce halo d'inhibition se mesure en millimètres autour du papier imprégné d'huile essentielle. Il permet d'établir l'efficacité antiseptique de l'huile testée⁹⁶.

L'absence de halo indique l'inactivité de l'huile sur le germe⁹⁷.

4.5.1.2- En milieu liquide

En milieu médical l'aromatogramme en phase liquide est un complément de l'aromatogramme en milieu solide. En effet, en phase solide, sur disque papier et gélose, on peut voir favorisée la diffusion de certaines essences à travers le milieu gélifié au détriment de certaines essences qui ne diffusent

⁹⁵ Belaiche P., 1979, p. 11

⁹⁶ Belaiche P., 1979, p. 22

⁹⁷ Baudoux D., 1997, p. 23

pas. Pour solubiliser les huiles dans le milieu liquide certains auteurs ont employé des solutions alcooliques, mais celles-ci ont interféré dans l'obtention des résultats du fait de leur propriété antiseptique. C'est donc vers des agents émulsionnants ou tensio-actifs que s'est porté le choix des cliniciens. suite à plusieurs recherches les Tween 20 et 80 apparaissent comme les émulsionnants sélectifs des huiles essentielles⁹⁸.

En phase liquide l'aromatogramme est fiable et reproductible, ce qui n'est pas toujours le cas de l'aromatogramme en phase solide⁹⁹.

A l'aide de l'aromatogramme en milieu liquide, on recherche la concentration minimale d'inhibition (C.M.I) en ajoutant progressivement au milieu de culture l'huile essentielle testée¹⁰⁰.

4.5.2- L'indice aromatique

L'indice aromatique d'une huile essentielle est le rapport entre le diamètre, exprimé en millimètres, du halo d'inhibition obtenu par un aromatogramme en milieu solide et celui d'une huile essentielle idéale et fictive dont l'action germicide serait maxima dans 100% des cas.

Le calcul de l'indice aromatique est expliqué en annexe 2, pour ceux que cela intéresse.

Il faut retenir que plus l'indice aromatique se rapproche de 1, plus l'essence est germicide. L'huile essentielle d'Origan d'Espagne peut atteindre le chiffre 1 dans certains cas.

L'indice aromatique a permis une classification des huiles en trois groupes :

- les huiles essentielles germicides majeures (Tableau 1),
- les huiles essentielles germicides médiums,
- les huiles essentielles de terrain¹⁰¹ (il peut arriver que suivant le terrain du patient une huile soit inopinément germicide majeure).

L'indice aromatique permet de visualiser le pouvoir antiseptique des huiles par un simple chiffre.

Mais attention, l'indice aromatique reste un indice, il ne nous donne qu'une indication et exprime une tendance qu'il faut ensuite confronté à des tests.

Tableau 1 : Indices aromatiques moyens des essences germicides majeures

H.E d'origan d'Espagne	0,88
H.E.Thym	0,71
H.E. Cannelle de Ceylan	0,69
H.E. Girofle	0,51
H.E. Sarriette	0,45

⁹⁸ Pellecuer, p. 3

⁹⁹ Belaiche P. , 1979, p. 36

¹⁰⁰ E.M.N., 6-C-1

¹⁰¹ Belaiche P. 1979, p.101-110

Chapitre 5

Chimie des huiles essentielles

5.1- Introduction

Une huile essentielle est une association de molécules organiques, et ses comportements sont régis par les lois de la chimie organique. On parle de biochimie aromatique.

“L’aromaticité” terme utilisé à l’origine pour caractériser l’odeur forte de certaines molécules benzéniques (fig. n°12), a depuis pris le sens d’une stabilité exceptionnelle de ces molécules hydrocarbonées cycliques ou polycycliques par rapport aux molécules analogues à chaînes ouvertes.

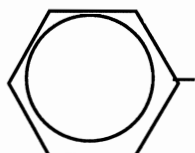


Fig. n°12 :

Structure benzénique : les trois double liaisons carbone-carbone sont représentées par un cercle (schématisation de la résonance).

Cette notion de cycle est très importante pour le sujet qui nous occupe. En effet, nous avons vu dans la description du polyéthylèneglycol, que celui-ci était soluble dans tous les solvants organiques à l'exception des hydrocarbures ne présentant pas de formes cycliques. Ce qui nous amène au constat que toute huile essentielle comportant plusieurs cycles est miscible dans le PEG.

Il est indispensable de connaître les propriétés des fonctions organiques constituant une huile essentielle, car ce sont ces propriétés là qui confèrent aux huiles leurs vertus¹⁰¹.

¹⁰¹ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 121

A noter également que les essences aromatiques peuvent être éminemment variables dans leur composition chimique alors que deux essences issues d'espèces botaniques différentes peuvent présenter des constitutions chimiques voisines, par exemple l'essence de thym et de serpolet, extraites respectivement de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum* ¹⁰².

Enfin si on commence à comprendre la complexité chimique des huiles essentielles on ne doit pas perdre de vue qu'une huile est aussi une entité biologique dont la composition est le résultat d'une synergie vivante.

La plupart de ces composés possèdent des stéréoisomères. La forme naturelle de ces composés est optiquement active (ils dévient la lumière à droite ou à gauche), ce que nous n'arrivons pas à reproduire avec des molécules de synthèse.

Pour information une huile essentielle ne contient ni vitamines ni sels minéraux¹⁰³.

5.2- La biochimie aromatique

La biochimie des huiles aromatiques est complexe, des recherches sont en cours dans le monde entier et la connaissance de nouvelles molécules et de nouvelles propriétés évoluent constamment.

Tous ces composés et leurs isomères, forment des familles biochimiques d'après leur type de fonction (alcool, ester, acide, aldéhyde, éther, phénol). Ces familles sont le support des innombrables propriétés des huiles essentielles selon leur combinaison synergétique naturelle ¹⁰⁴.

Il est important de garder cette synergie en conservant les molécules entières agencées les unes aux autres telles que la nature le fait, sans chercher à isoler les principes actifs des huiles pour ne se servir que de quelques uns. En fabriquant des principes actifs de synthèse, on prend le risque de passer à côté de propriétés intéressantes.

La seule solution reste les essais de chaque huile à des doses différentes sur des germes pathogènes et d'en observer les réactions.

Exemple de l'essence de citron (*Citrus limonum* o.p. zestes) :

Composition chimique simplifiée :

- 95 % de monoterpènes
- 5% d'aldéhydes.
- 0,1% de coumarines

¹⁰² Belaiche P. , 1979, p. 9

¹⁰³ Abrassart Jean-Louis, 1997, p. 30

¹⁰⁴ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 27

On pourrait croire que les coumarines (esters intramoléculaires aromatiques) ne jouent pas de grand rôle et vouloir s'en séparer, mais en faisant cela on enlève une action thérapeutique fondamentale de l'essence de citron à savoir la propriété d'être fluidifiant sanguin ou plus exactement d'être anticoagulant.

5.3- Les différentes familles biochimique

Les végétaux aromatiques élaborent des molécules spécifiques selon deux voies de biosynthèses principales. La première est la voie des terpènes qui porte le nom générique de terpénoïdes, composés chimiques complexes. La seconde est la voie des phénylpropanes.

On trouve aussi dans les huiles essentielles, en faible quantité, des alcools, des aldéhydes, des acides à très courtes chaînes carbonées (inférieures à dix carbones) ainsi que des composés soufrés et azotés.

Il existe un système commun d'écriture des molécules (convention passée entre les chimistes pour permettre la lisibilité des molécules sans avoir à en écrire tous les atomes comme dans le cas de l'écriture développée). C'est ce qu'on appelle l'écriture commune (fig.n°13). Les différentes représentations moléculaires qui vont suivre dans ce chapitre feront référence à cette écriture ou à l'écriture simplifiée.

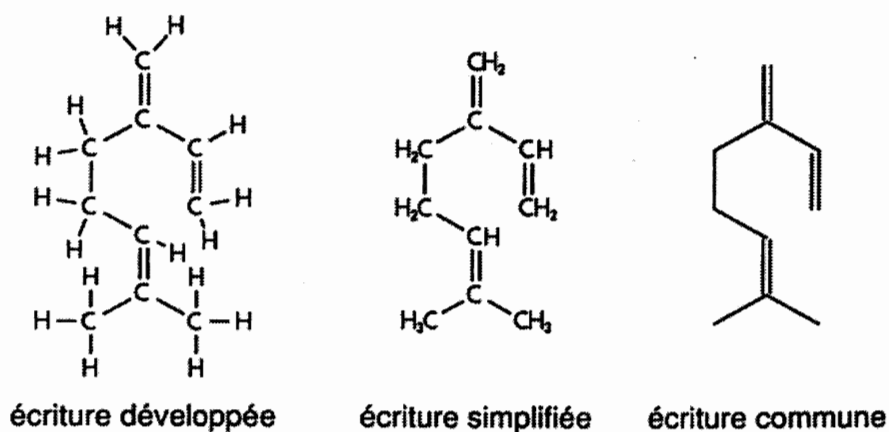


Fig.n°13 : Références d'écritures des schéma moléculaires, in, La nouvelle aromathérapie, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 554

5.3.1- La voie des terpènes^{105, 106, 107}

Au sens strict, les terpènes sont des hydrocarbures. Tous les composés terpéniques se présentent structuralement comme des polymères de l'isoprène qui est une molécule composée de cinq atomes de carbone et de huit atomes d'hydrogène (C₅H₈).

5.3.1.1- Les monoterpènes (C₁₀H₁₆)

Deux unités d'isoprène assemblées forment un monoterpène (fig n°14). Ils sont antiseptiques, bactéricides. Ils sont généralement les constituants odorants des H.E.

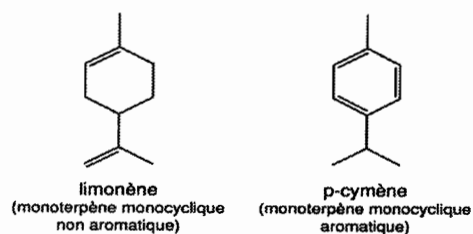


Fig.n°14 : exemples de monoterpènes, in, *La nouvelle aromathérapie*, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 554

5.3.1.2- Les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄)

Trois unités d'isoprènes, ils sont eux aussi antiseptiques et bactéricides. Ce sont des molécules complexes, il y en a qui sont acycliques, monocycliques, bicycliques (fig. n°15) ou encore tricycliques. Par contre elle donnent une couleur bleue. Des huiles essentielles qui en contiennent en grande quantité : *Lavandula vera*, *Satureja montana*, *Chamomilla matricaria*.

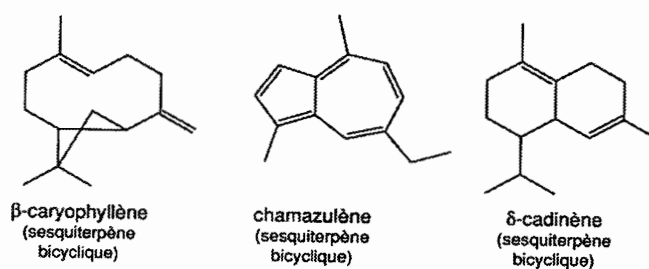


Fig.n°15 : exemples de sesquiterpènes bicycliques, in, *La nouvelle aromathérapie*, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 556

¹⁰⁵ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 554-556

¹⁰⁶ Arnaud Paul. 1996, p. 448-452

¹⁰⁷ Waters Clare, 1999, p. 22-23

5.3.1.3- Les diterpènes (C₂₀H₃₂)

Quatre unités d'isoprène, ils résistent rarement au processus de distillation à la vapeur d'eau car leur masse moléculaire est importante. Leur action est légèrement bactéricide. Certains diterpènes ont des propriétés antifongiques.

Les terpènes de 30 et 40 carbones existent dans les plantes mais pas dans les huiles essentielles. Ils ne résistent pas à la distillation¹⁰⁸.

5.3.2- La voie des phénylpropanes¹⁰⁹

Cette voie conduit à la synthèse directe de molécules oxydées.

Les molécules formées ont toutes le même enchaînement d'atomes de carbone : un cycle aromatique benzénique associé à une chaîne à trois carbones saturés : chaîne propane (fig. n°16).

Chaque fois qu'une molécule possède un benzène elle est dite aromatique. Cette appellation n'est pas liée à l'odeur mais découle de la présence de trois doubles liaisons carbone-carbone alternant avec de simples liaisons dans un cycle benzénique.

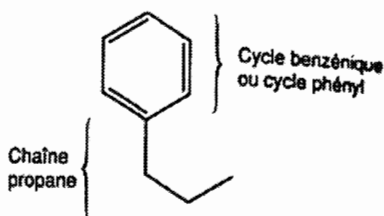


Fig.n°16 : écriture commune d'un phénylpropane, in, La nouvelle aromathérapie, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 556

5.4- Les terpènes et phénylpropanes oxydés

Lors des réactions d'oxydoréduction du métabolisme végétal, les terpènes et les phénylpropanes conduisent à la formation de diverses molécules comprenant des groupes fonctionnels spécifiques.

Ils ne sont pas tous répertoriés ci-dessous. Sont présents les plus fréquents au sein des huiles essentielles.

¹⁰⁸ Marie Rossi, 1995, p. 39

¹⁰⁹ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 555

5.4.1- Les alcools ^{110, 111, 112}

Les alcools sont des structures de base (terpènes et phénylpropanes) auxquelles s'ajoutent sur un carbone une fonction hydroxyle (-OH) par simple liaison. Ils ne faut pas les confondre avec les phénols (5.4.2). Ils ont pour propriétés d'être antiseptiques et antiviraux.

5.4.1.1- Les monoterpénols (C₁₀H₁₆O, C₁₀H₁₈O)

Parce que la fonction alcool n'est attachée qu'à un carbone on parle aussi d'alcool primaire.

Le menthol et le linalol sont des monoterpénols. Ils sont de puissants bactéricides.

Les huiles essentielles riches en monoterpénols sont parmi les moins dangereuses pour les utilisateurs (non irritantes pour les muqueuses, non dermocaustiques). *Origanum majorana* en est riche.

5.4.1.2- Les sesquiterpénols ou alcools secondaires (fig. n°17)

Ils sont fongicides, mais on ne leur reconnaît pas d'action antibactériennes. Beaucoup de recherches portent sur ces structures au sein des huiles essentielles. Ils ne sont pas toxiques.

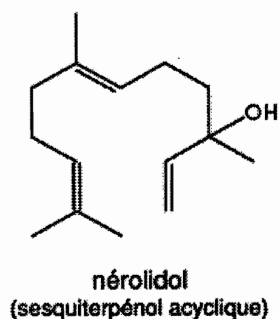


Fig.n° 17: exemple de sesquiterpénol, in, La nouvelle aromathérapie, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 558

5.4.1.3- Les diterpénols ou alcools tertiaires

Ces molécules sont lourdes et donc peu volatiles, comme pour les diterpènes, seules quelques-unes résistent à la distillation. Elles ont une structure comparable à certaines hormones humaines.

¹¹⁰ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 556-558

¹¹¹ Arnaud Paul. 1996, p. 157

¹¹² Waters Clare, 1999, p. 22-23

5.4.2- Les phénols ^{113, 114}

La fonction phénol (fig. n°18) est caractérisé par la présence d'un radical -OH fixé par une liaison simple à un cycle benzénique. Il faut faire attention car ils sont hépatotoxiques.

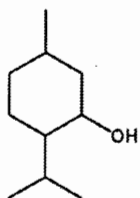


Fig.n° 18: exemple de phénol (thymol), in, *La nouvelle aromathérapie*, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 558

Dans les huiles essentielles les phénols sont plus puissants que les alcools. Ce sont de remarquable anti-infectieux (bactéricides, viricides, parasitocides).

Sur la peau, les phénols sont dermocaustiques et irritants. Le phénol, connu sous le nom d'acide phénique, a été largement utilisé comme désinfectant lors de la première guerre mondiale.

Quelques principaux phénols : Carvacrol, Chavicol, Eugénol, Thymol.

Thymus vulgaris (Thym vulgaire) en contient 35 à 45 %, *Eugenia caryophyllata* (Clou de girofle) plus de 80%.

5.4.3- Les aldéhydes

Les aldéhydes sont issus de l'oxydation d'alcools primaires.

La fonction aldéhyde est formée par une liaison double entre un atome de carbone et un d'oxygène. Le carbone doit être situé en bout de chaîne hydrocarbonée. Un atome d'hydrogène est fixé au carbone (fig. n°19).

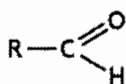


Fig.n° 19 : structure d'un aldéhyde, in, *La nouvelle aromathérapie*, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 558

Ils dégagent un arôme puissant à irritant pour les muqueuses. En aromathérapie ils présentent des propriétés similaires aux phénols (ci-dessus) et aux cétones (ci-dessous). Ils sont principalement anti-infectieux.

Comme pour les alcools, on trouve dans la composition des huiles des monoterpénals, des sesquiterpénals, des diterpénals.

¹¹³ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 556

¹¹⁴ Waters Clare, 1999, p. 22-23

5.4.4- Les cétones

La fonction cétone est formée par une liaison double entre un oxygène et un carbone au sein d'une chaîne hydrocarbonée. Il n'y a aucun atome d'hydrogène sur le carbone lié à l'oxygène.

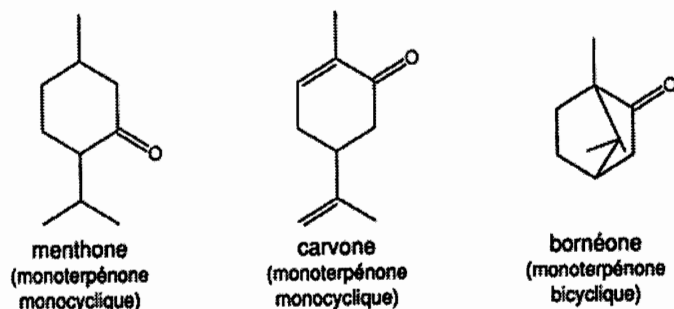


Fig.n° 20: exemple de cétones, in, La nouvelle aromathérapie, Philippe Mailhebiau, 1994, p. 558

Les cétones sont issues d'alcools secondaires. A forte dose elles sont neurotoxiques. Ils existent parfois deux fonctions cétones sur une même molécule, on parle alors de diones. Elles sont moins toxiques que les cétones.

5.4.5- Les acides et les esters^{115,116}

Ce sont des combinaisons complexes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Ils sont l'un et l'autre fongicides.

5.4.5.1- Les acides

La fonction acide est formée par la fixation de deux atomes d'oxygène sur le même carbone situé en fin de chaîne.

Un atome est fixé par double liaison, l'autre par une simple liaison, au sein d'une liaison hydroxyle..

La fonction acide est le regroupement de deux autres fonctions : cétone (=O) et alcool (-OH)

Ce sont des composants minoritaires mais très efficaces.

Huiles essentielles riches en acides : *Eugénia caryophyllata* (Clou de girofle).

¹¹⁵ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 557

¹¹⁶ Abrassart J.-L., 1997, p. 30

5.4.5.2- Les esters

La fonction ester est la combinaison biochimique entre une fonction alcool et une fonction acide.

L'acide acétique est le principal acide formant des esters au sein des huiles essentielles.

Ils ont un arôme fruité. Ils sont décongestionnants et sédatifs, et sont très bien supportés par la peau.

Gaultheria fragrantissima (Gaulthérie) en contient plus de 95 %.

5.4.6- Les ethers (méthyl phénol)¹¹⁷

La fonction ether dans les huiles essentielles est principalement due à la méthylation d'un phénol caractérisé par la fixation d'un méthyl (-CH₃) sur l'oxygène du phénol.

L'atome d'oxygène relie deux carbone : c'est un ether. Ils sont d'excellents spasmolytiques.

Ocimum basilicum (Basilic) en contient environ 91 %.

5.4.7- Les oxydes

La fonction oxyde est formée par la liaison d'un oxygène à deux atomes de carbone éloignés dans la molécule. L'oxygène se retrouve membre de la même structure. Ce sont des ethers cycliques. Les formules des oxydes sont particulières. Ils sont anti-parasitaires. Le 1,8 cinéole que contient *Rosmarinus officinalis* (romarin) cité au chapitre 4 point 4.4.3 est un oxyde.

5.4.8- Les coumarines¹¹⁸

La fonction coumarine est issue de l'esterification intramoléculaire d'une molécule acide-phénol.

C'est ce qu'on appelle un hétérocycle : une chaîne cyclique dont certains atomes ont une autre nature que le carbone. Les composés hétérocycliques sont des hétérocycles associés à des chaînes carbonées cycliques ou non.

Les coumarines sont actives même à l'état de traces. Elles sont photosensibilisantes, il ne faut donc pas les appliquer sur la peau.

¹¹⁷ Mailhebiau Philippe, 1994, p. 561

¹¹⁸ Arnaud Paul, 1996, p. 399

Chapitre 6

Essais d'applications d'huiles essentielles

(Les résultats intermédiaires qui nous ont permis de réorienter l'expérimentation tout au long du travail de diplôme ont été mis en italique afin de faciliter la lecture et la compréhension de notre cheminement)

6.1- Première partie : présentation

6.1.1- Problématique

Nous avons vu (chapitre 2, point 2.6) que les bains de traitement au PEG des bois gorgé d'eau, pouvaient devenir des milieux de culture propice à la prolifération de microorganismes.

Nous avons pu observer des bactéries, des champignons, des protozoaires, des rotifères, dans les différents prélèvements effectués à Zurich, Lausanne, Fribourg (fig n° 21 à 26 pages suivantes).

Parmi ces prélèvements (issus des bains de traitement) certains contenaient des fongicides ou des biocides.

Dans ceux-là aussi nous avons noté la présence de microorganismes ce qui, d'une part, renforce l'idée que les biocides sont un pis-aller (chapitre 3, point 3.3.2), et atteste, d'autre part des difficultés rencontrées par les restaurateurs pour maintenir l'aseptie des bains sur la durée du traitement, qui peut varier de quelques mois à plus d'une année¹¹⁹.

Tableau 2 : prélèvements de bains de traitement provenant de laboratoires.

<u>appellation</u>	<u>composition</u>
Lausanne 1	Peg 400 à 15%, cuve en traitement
Lausanne 2	Peg 400 à 15%, ancien bain
lausanne 3	Peg 400 à 15% + fongicide
Fribourg 1	Peg 15 %, bain de traitement
Zurich 01	Peg 15 %, bain de traitement
Zurich 02	Peg 15 %, bain de traitement + biocide
Zurich 03	Peg 15 %, bain de traitement

¹¹⁹ Discussion avec C. Michel, C. Benoît, C. André

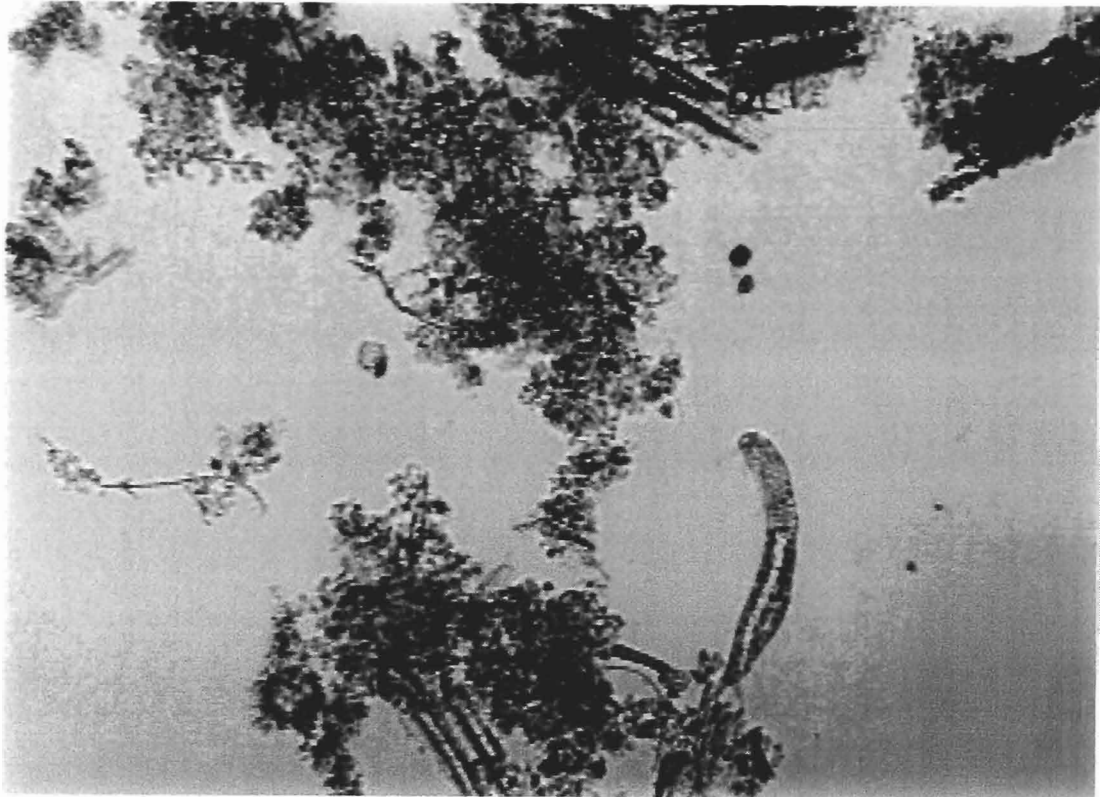


Fig. n° 21: Zurich n°01 : 10 x 12,5. Annelide, organisme multicellulaire

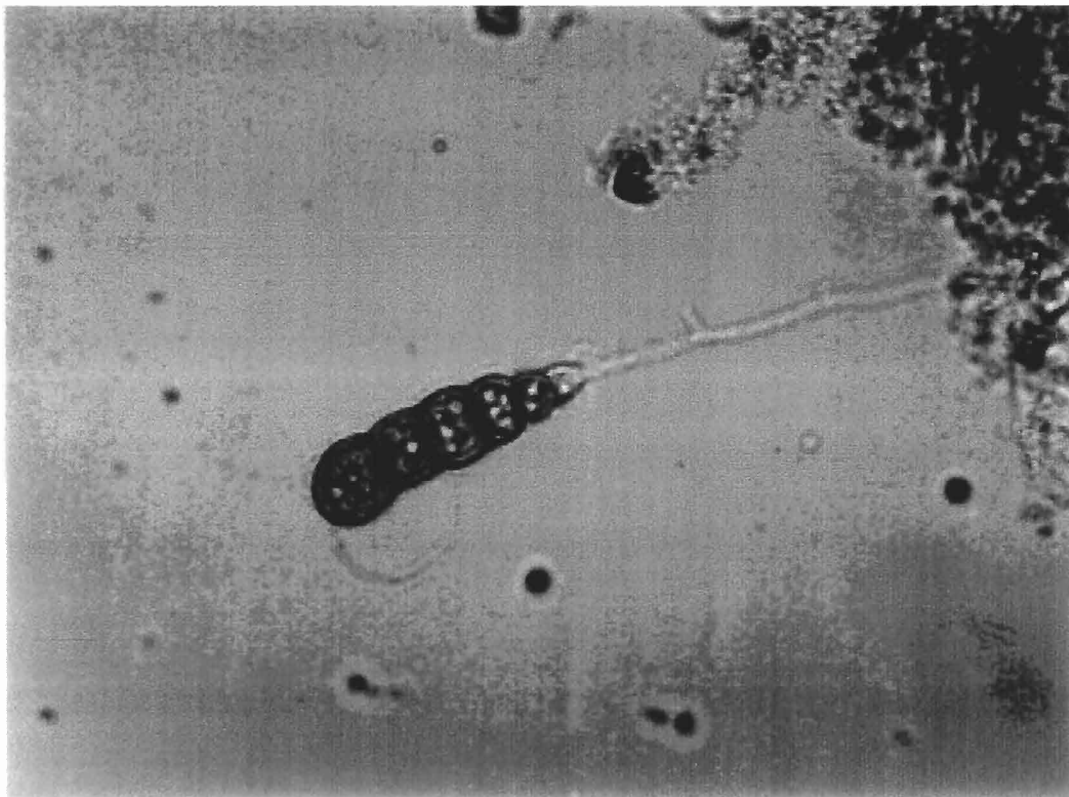


Fig. n° 22 : Zurich n°02 : 40 x 12,5. Spores en germination.



Fig. n° 23 : Zurich n°02 : 40 x 12,5. Spores .

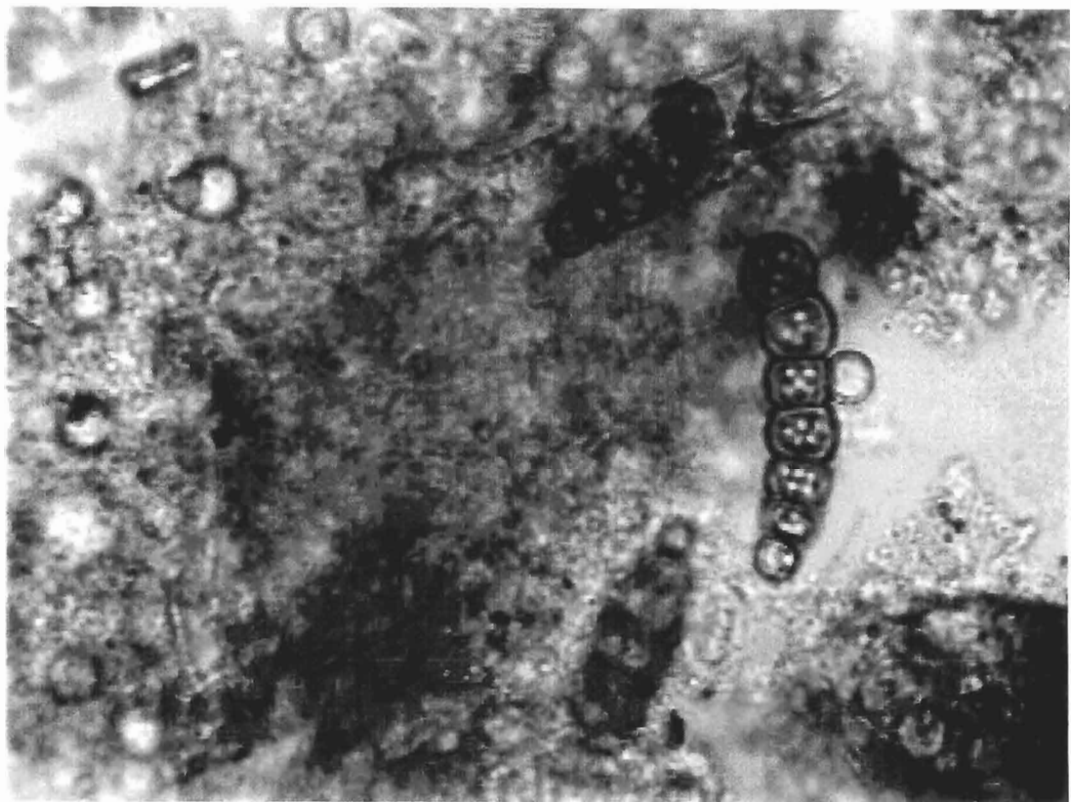


Fig. n° 24 : Zurich n°02 : 40 x 12,5. Spores en germination.

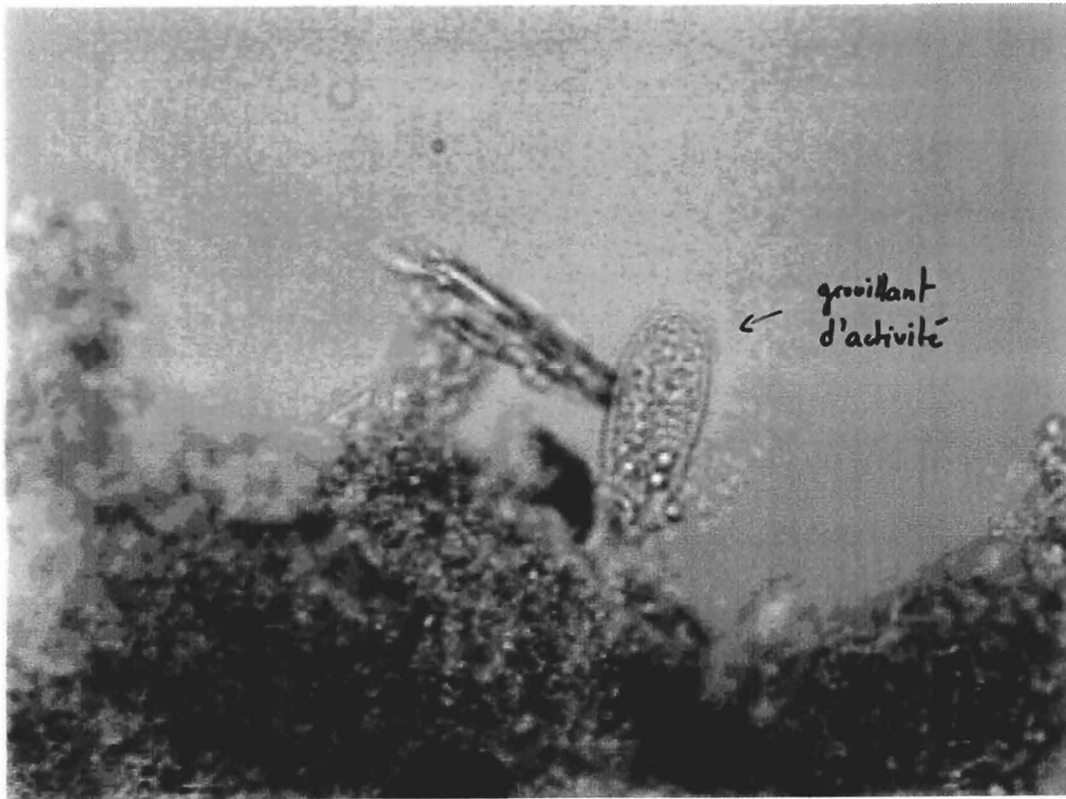


Fig. n° 25 : Zurich n° 03, 40 x 12,5 : probablement protozoaires ciliés.

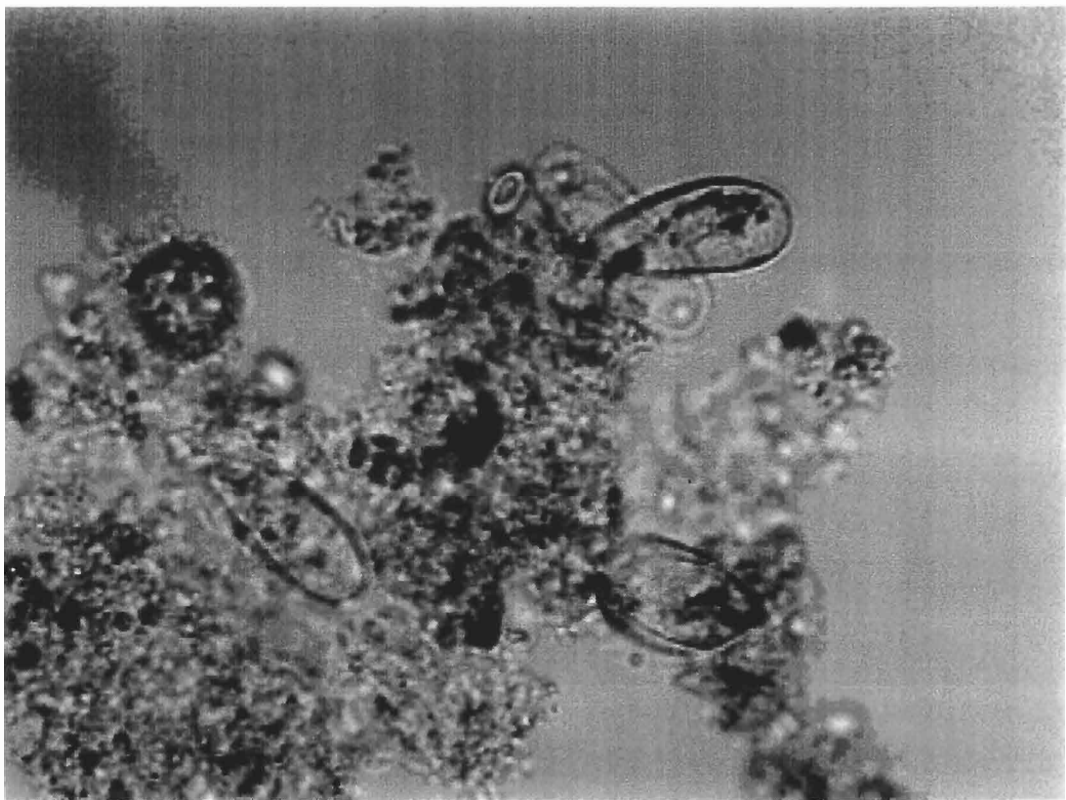


Fig. n° 26 : Zurich n° 03, 40 x 12,5 : probablement protozoaires ciliés.

En me rendant dans les laboratoires de conservation de Lausanne, Fribourg, Zurich j'ai pu constater que les bains ne sont pas -systématiquement- contaminés. Pour ceux qui le sont des biocides (Bactolyse 48 ou Microbiocide III DP) sont ajoutés à raison de 2 à 3%. Seulement, ce pourcentage doit être renouvelé environ 1 fois / mois¹²⁰.

En fonction de la durée et du volume des bains de traitement (il faut chiffrer en centaines de litres d'eau / an / laboratoire) on en arrive à des litres et des litres de biocides, qui non seulement restent confinés dans les bains avec les objets archéologiques¹²¹, mais en plus sont rejetés avec les eaux usées sans neutralisation ou filtration (ce n'est pas une critique, c'est un fait).

De plus, la contamination des bains ne permet pas de réemployer le PEG comme le font Lausanne¹²² et Grenoble¹²³. Garder un bain vierge de toute prolifération permettrait une telle récupération du PEG pour le réutiliser. Mais alors il faudrait agir de manière préventive et non curative pour que les bains ne contiennent vraiment aucun spores en dormance.

C'est alors que j'ai eu l'idée de tester l'efficacité antiseptique des huiles essentielles.

6.1.2- Réflexions liées à l'application des huiles essentielles

L'idée d'appliquer les huiles essentielles au traitement du matériel archéologique me trottait dans la tête depuis déjà un petit moment. Aussi, quand en cours de biologie, l'année dernière, nous avons testé des antibiotiques sur des souches bactériennes de l'air j'en ai profité pour tester également quelques huiles essentielles. Les résultats obtenus s'ils n'ont pas été concluants n'en ont pas été pour autant négatifs¹²⁴.

Ils nous ont permis d'orienter nos questions quant à l'utilisation protocolaire des huiles essentielles ainsi que de faire une pré-sélection des huiles ayant une activité antiseptique sur les bactéries de l'air.

Forts de cette première approche François Straub et moi-même avons du réfléchir à la façon de procéder avant de nous lancer directement dans les tests d'huiles essentielles sur le bois archéologique gorgé d'eau.

Nous avons longtemps pensé expérimenter les huiles essentielles sur des microorganismes isolés de

¹²⁰ Discussion avec C. André

¹²¹ réactions soulevées à cet effet au chap 3, point 3.3

¹²² Discussion avec C. Michel,

¹²³ Roman Agnès, 1989, p. 33

¹²⁴ le rapport de cette première expérience des huiles essentielles se trouve en annexe

bains de traitement suivant la technique de l'aromatogramme en milieu gélosé, à savoir :

- mise en boîte de Pétri du développement microbiologique de chaque échantillon et test d'une huile essentielle dans chaque boîte.

Cette méthode implique une manipulation lourde à gérer.

Elle s'éloigne des conditions réelles, et est difficilement applicable en laboratoire de conservation.

Elle ne nous indique pas une dose minimale d'inhibition.

Elle s'oriente vers une action curative des bains de traitement et non pas vers une action préventive.

Par ailleurs, à la lecture de plusieurs articles il est apparu que les propriétés des H.E. pouvaient être excellentes sur gélose mais ne rien donner une fois appliquées en milieu réel¹²⁵. Il nous a semblé plus judicieux de tester les huiles essentielles dans des dispositifs les plus proches possibles des bains de traitement des bois gorgé d'eau, à savoir :

- tester des H.E directement dans des "échantillons" (voir matériel et méthodes 6.2.3).

Cette méthode est facilement réalisable en laboratoire par les conservateurs, dans un laboratoire de fortune comme dans le plus moderne. Elle ne demande pas de connaissances approfondies ni en biologie ni en microbiologie.

Elle nous permet de voir le comportement des huiles essentielles avec le bois.

Elle rend possible la mesure de leur durée d'action dans le temps.

Elle nous donne l'occasion d'observer la transformation progressive du milieu (lent ou rapide).

Ce processus expérimental posait différents problèmes à résoudre:

- la vitesse de croissance des microorganismes,
- les méthodes d'observation à l'oeil nu,
- les méthodes d'observation sous microscope,
- les milieux de culture,
- la sélection des H.E,
- le dosage des H.E. sélectionnées
- la solubilisation des H.E. dans l'eau,
- la nature du bois employé
- la quantité du bois à ajouter
- l'observation du bois face aux H.E..

Nous avons alors contacté Monsieur Michel Aragno, professeur en microbiologie de l'Institut

¹²⁵ Belaiche P., 1979

Botanique de Neuchâtel, qui, très gentille, nous a accordé plusieurs instants afin de nous orienter dans nos recherches.

La mise au point d'un protocole pour tester les huiles sur des bois en cours de traitement n'a pas été immédiate.

Nous avons dû plusieurs fois nous adapter en fonction des conditions particulières que sont les traitements des bois archéologiques. Nous n'avons pas toujours pu appliquer les méthodes employées en microbiologie, car des facteurs particuliers comme la nature du bois archéologique, la présence de PEG dans les échantillons, le caractère lipophile des huiles essentielles, font que nous sommes obligés de trouver une méthodologie différente à celles indiquées dans les manuels d'aromathérapie^{126, 127}.

¹²⁶ Belaiche Paul, 1979, tome 1

¹²⁷ Vincent M.-C, in, .E.M.N., tome 2, C-4

6.2- Deuxième partie : matériel et méthodes générales

6.2.1- Solution de base

Pour 28 échantillons de 50 ml nous préparons 1,5 litre de solution de base. La solution de base comprend du polyéthylèneglycol 400 à 15 %, de l'eau du réseau, une solution d'oligo-éléments, un innoculum mixte standard.

Nous employons du PEG 400 à 15 % donc il nous faudra 225 ml de PEG

Dans les tests précédents on a employé une solution d'oligo-élément à 2/1000 ml.

Ici, il nous faudra donc 3 ml en tout. Puis nous rajouterons 1 ml d'innoculum mixte standard dans chaque bain expérimental lorsque la solution de base aura été répartie dans les 28 flacons.

Préparation de la solution de base

Dans un grand b cher gradué verser 225 ml de polyéthylèneglycol 400

Ajouter l'eau du réseau jusqu'à la graduation de 1,5 litre.

Mélanger à l'aide d'une baguette en verre.

Additionner les 3 ml de SL 6 x 10 (solution d'oligo-éléments).

6.2.2 Innoculum mixte standard

Il provient de la surface du sol à proximité du gymnase. Il est prélevé, ajouté à de l'eau du réseau, remu . On le laisse décanter avant de prélever à la pipette quelques millilitres situés entre la surface et le dépôt du fond du b cher, pour ensuite le répartir à raison d'un millilitre par bain.

6.2.3- Solution d'oligo-éléments SL 6 x 10

La solution d'oligo-éléments SL 6 x 10 est 10 fois plus concentrée que la solution SL 6 expliquée ci-dessous¹²⁸.

¹²⁸ Michel Aragno, 1993, annexe 9

Solution d'oligo-éléments SL 6 (d'après Pfennig)

Eau distillée	1000ml
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
Mn Cl ₂ • 4 H ₂ O	3 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
Co Cl ₂ • 6 H ₂ O	20 mg
Cu Cl ₂ • 2 H ₂ O	1 mg
Ni Cl ₂ • 6 H ₂ O	2mg
Na ₂ Mo O ₄ • 2 H ₂ O	3mg

pH de la solution : environ 3 - 4

6.2.4- Milieux de culture

Afin de réaliser les tests supplémentaires mentionnés en cinquième partie de ce chapitre il nous a fallu préparer des milieux de culture utilisés en microbiologie.

En voici les données et préparations.

6.2.4.1- Milieu de culture non sélectif pour bactéries et moisissures¹²⁹

Ce milieu est plus couramment appelé milieu au nutriment agar.

Préparation

peptones	0,5 g.
gélose	2.0 g.
Liebig	0,3 g.
Eau distillée	100 ml
Solution de soude caustique (NaOH), à 1% dans de l'eau distillée.	

- Verser l'eau distillée, les peptones et la gélose dans un bécher de 400 ml.
- Eviter de chauffer l'eau avant d'avoir dissous à froid peptones et gélose (risques de grumeaux). Puis laver le verre de montre contenant le Liebig dans la solution obtenue.
- Porter à ébullition ce bouillon nutritif pendant 5 mn. en brassant avec une baguette en verre jusqu'à dissolution complète.

Au moyen d'une pipette, ajouter goutte à goutte la solution de soude caustique à 1% en remuant et en contrôlant constamment au papier indicateur la neutralisation du bouillon (pH 7).

- Répartir le bouillon dans des éprouvettes, les reboucher.

¹²⁹ Pantillon et al., 1995

- Stériliser les éprouvettes à l'autoclave.
- Laisser refroidir les éprouvettes en les maintenant inclinée fortement.

6.2.4.2- Milieu test pour bactéries et champignons cellulolytiques¹³⁰

Préparation de la solution pour test cellulolyse

- Extrait de terre	10 ml.
- Solution d'oligo-éléments	0,5 ml
- Solution A	250 ml
- Solution B	5ml
- KNO ₃	0,25 g.
- Eau distillée	235 ml.

À part, préparer les solutions A et B comme indiqué ci-dessous, en prélever les quantités nécessaires pour la solution test cellulolyse et les ajouter au reste des ingrédients mentionnés ci-dessus.

Répartir la solution finale dans les éprouvettes (ou tubes à essais), ajouter une languette de papier filtre dans chaque tube, refermer, stériliser à l'autoclave 20 minutes à 110°C.

Solution A (préparation de 500 ml)

Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	4,5 g.
KH ₂ PO ₄	0,75 g.
NH ₄ Cl	0,5 g.
Mg SO ₄ • 7 H ₂ O	0,1 ml
SL 6 x 10	0,5 ml
Eau distillée	500ml

Dans un ballon jaugé, contenant 1/3 de l'eau nécessaire au mélange, posé sur une balance tarée à zéro, ajouter les sels les uns après les autres, laisser dissoudre, ajouter de l'eau.

Amener à quantité d'eau totale lorsque tous les sels sont dissous.

Solution B (préparation de 25 ml)

Citrate ferrique + NH ₄	12,5 g.
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	25 mg.
Eau distillée	25 ml

Procéder comme pour solution A.

¹³⁰ Pochon J., Tardieux P., 1962, pp. 76-77

6.2.5.- Extrait de terre pour test de cellulolyse¹³¹

Choisir une bonne terre de jardin. Mélanger à poids égal avec de l'eau du robinet.

Autoclaver le mélange, 1h à 130°C. Filtrer à chaud, sur une batterie de trois filtres.

On obtient un liquide de couleur ambrée. Répartir en flacons, stériliser 15 mn à 120°C.

Malheureusement nous ne sommes pas parvenus à ce résultat. Peut-être à cause de la nature de la terre, beaucoup trop argileuse. Toujours est-il que nous avons recommencé plusieurs fois la stérilisation de la terre mais à chaque fois la terre s'était gonflée de l'eau ajoutée (fig. n°27).

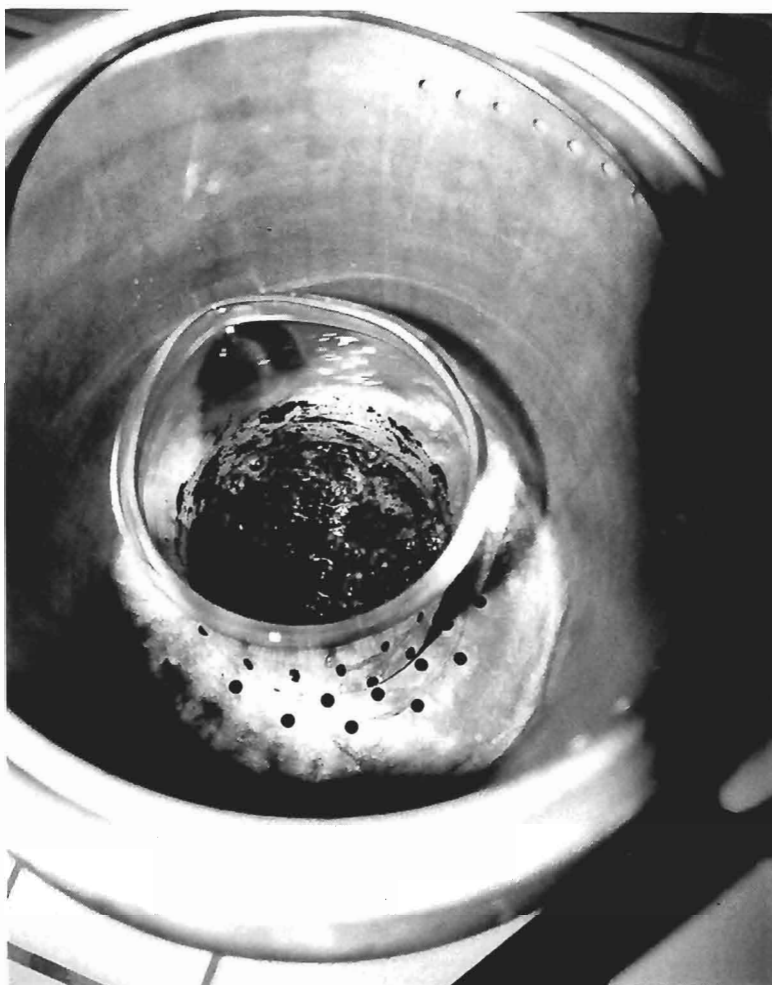


Fig. n° 27 : Essais infructueux de l'obtention d'un extrait de terre pour cellulolyse. On voit clairement la terre qui a absorbé la quasi totalité de l'eau.

En désespoir de cause nous avons fini par verser de l'eau du réseau sur la terre juste à la fin de la stérilisation. Puis nous avons filtré (fig. n°28) trois fois de suite avec entonnoir en porcelaine à fond plat (selon Büchner).

¹³¹ Michel Aragno, 1993, annexe 10



Fig. n°28 : La terre est passée dans un entonnoir Büchner relié à l'écoulement d'eau pour provoquer un appel d'air pouvant faciliter la filtration.

6.2 6- Contenants utilisés

Pour les bains expérimentaux de la série 1 nous avons employé des flacons de récupération alors que pour la série 2 nous avons utilisé des erlenmeyers pour répondre aux exigences nécessaires à une bonne observation sous microscope inversé.

- Flacons de récupérations

Un des critères à la réalisation de ce diplôme était de travailler avec des moyens réalisables dans les laboratoires de conservation-restauration d'objets archéologiques.

Nous avons donc dans un premier temps opté pour des flacons identiques (par souci de comparaison visuelle d'un bain à un autre), mais des flacons de récupération quand même (Fig. n°29).

Nous nous servons de bouteilles vides destinées au service radiologique à l'hôpital (solution spécifique), que nous pouvions avoir en assez grande quantité grâce à Monsieur François Robert, professeur de biologie au lycée Cantonal Blaise Cendrars.

Ils seront employés pour la première série.



Fig. n°29 : échantillons de la première série dans des flacons de récupération.

- Erlenmeyers

Les erlenmeyers sont des flacons en verre transparent résistant à la stérilisation, ils ont différentes contenances et différents diamètres d'ouverture. Ils sont de forme conique, le fond est plat, l'épaisseur du verre est la même partout. C'est le flacon "type" employé en laboratoire. (fig. n°30)

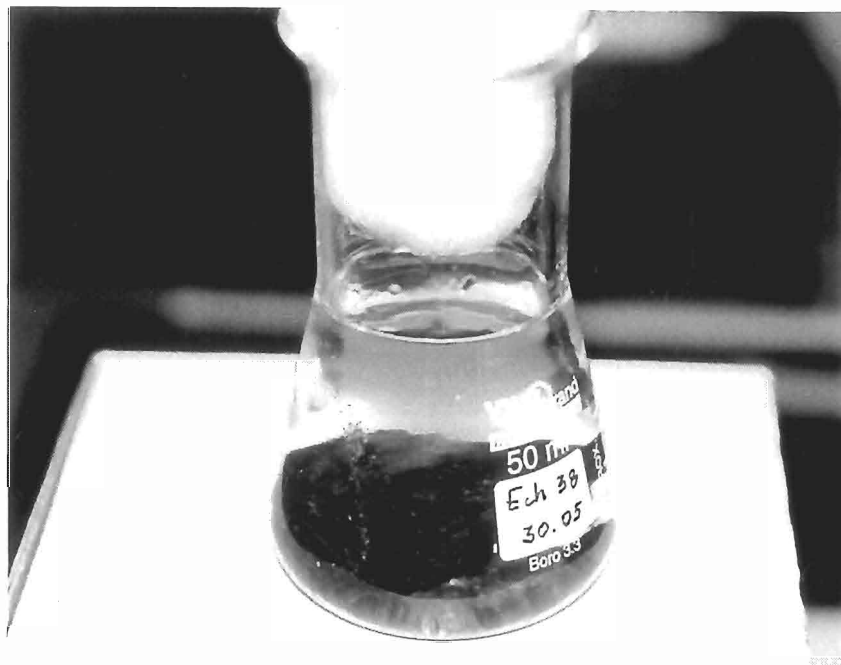


Fig. n°30 : échantillon de la deuxième série dans un erlenmeyer

6.2.7- Échantillons

Dans le dossier j'emploie le terme d'"échantillon".

C'est pour désigner un bain de traitement au polyéthylèneglycol tel qu'il est réalisé dans les laboratoires de conservation-restauration d'objets archéologiques.

Afin de tester les huiles il nous fallait un certain nombre de bains, aussi pour les comparer entre eux.

Nous avons alors "miniaturisé" les bains de traitement, d'où le terme employé d'échantillon, même si celui-ci n'est pas un échantillon au sens littéral du terme.

- Caractérisation des échantillons

Un numéro de 1 à 28 est inscrit pour la première série, n° 31 à 58 pour la deuxième série. Figure également sur chacun des flacons la date et la contenance (fig. n°31).

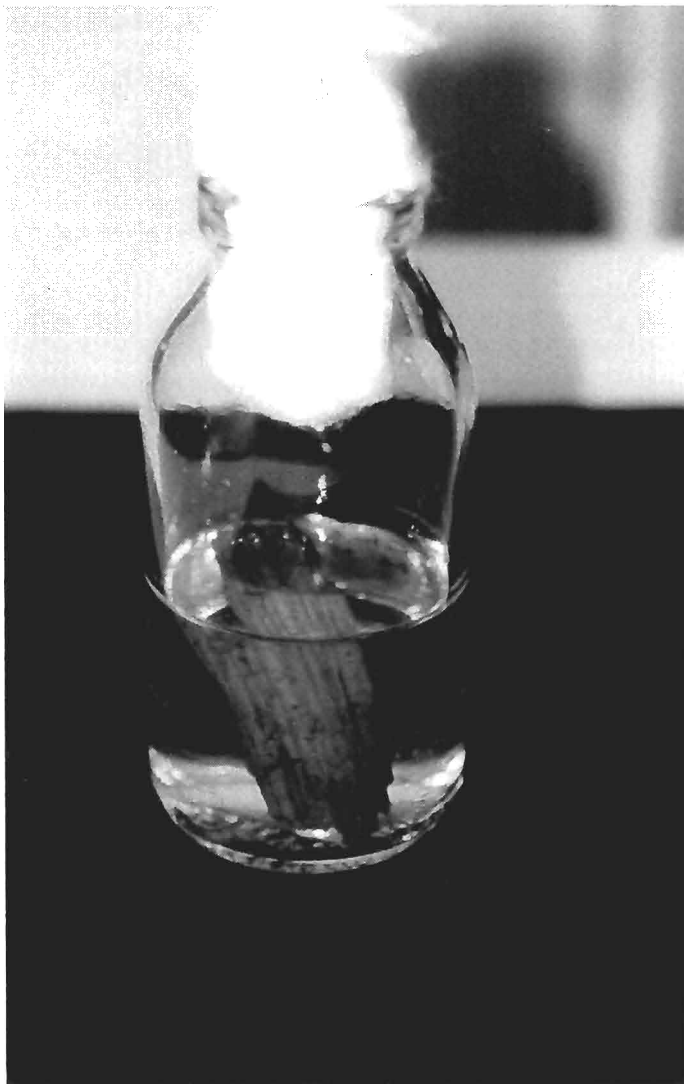


Fig. n° : 31

Un échantillon type :

- un flacon en verre transparent, pour permettre l'observation du milieu.*
- une solution au PEG 400 à 15 % avec ajout d'oligoéléments et extrait de terre, pour favoriser la pousse des micro-organismes.*
- un morceau de bois archéologique gorgé d'eau vierge de tout traitement et produit.*
- une dose définie d'huile essentielle spécifique avec ou sans émulsifiant, pour observer une éventuelle action anti-microbienne.*
- un morceau de coton non-hydrophile pour fermer l'échantillon tout en permettant à l'air de passer afin de se rapprocher des conditions non hermétiques des laboratoires de conservation.*

6.2.8- Observations

Nous voulions observer les bains expérimentaux de diverses manières. Sur les cinq procédés quatre ont été exploités. Le cinquième, la coloration au bleu de méthylène, n'a pu être utilisé à cause de la présence du PEG dans les bains expérimentaux.

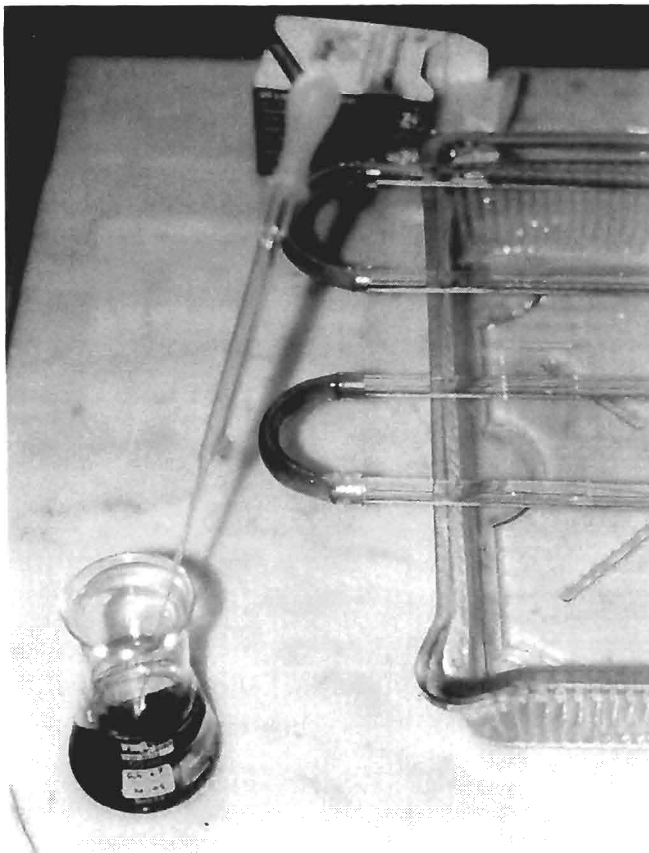
6.2.8.1- Observation à l'oeil nu

Les critères d'observation à l'oeil nu prennent en compte la couleur de la solution, l'observation du dépôt au fond du contenant, la présence d'un "voile" fongique autour du morceau de bois.

6.2.8.2- Observation sous microscope

L'observation sous microscope des prélèvements effectués dans les bains expérimentaux permet de définir s'il y a présence ou non de bactéries, de champignons, de protozoaires, de rotifères.

Réalisation d'une préparation pour observation sous microscope

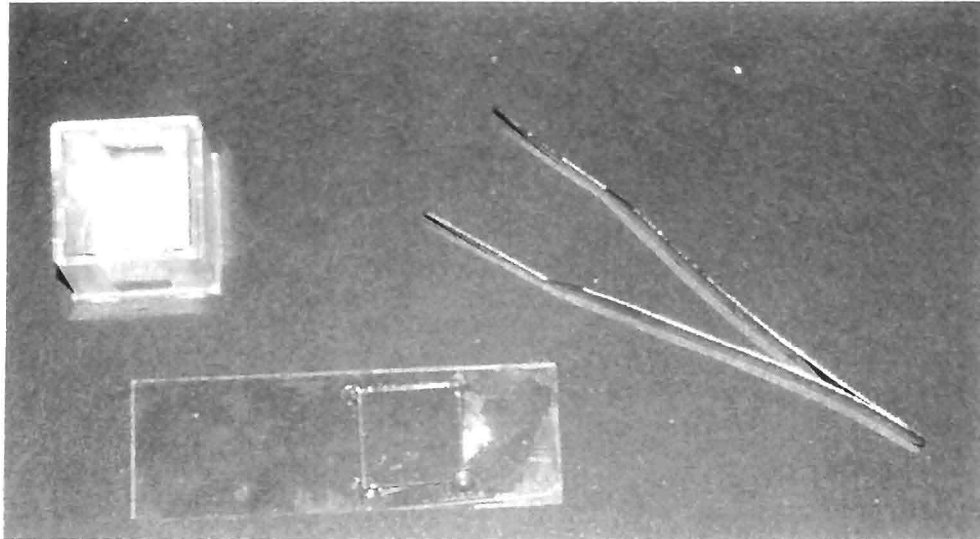


Le prélèvement d'un peu de liquide du bain expérimental se fait à la pipette Pasteur (fig. n° 32), il est déposé sur une lame porte-objet et est recouvert par une lame couvre-objet (fig. n°33). Il peut être lutté¹³² par un peu de paraffine fondue ou du vernis à ongle (par exemple du Cutex).

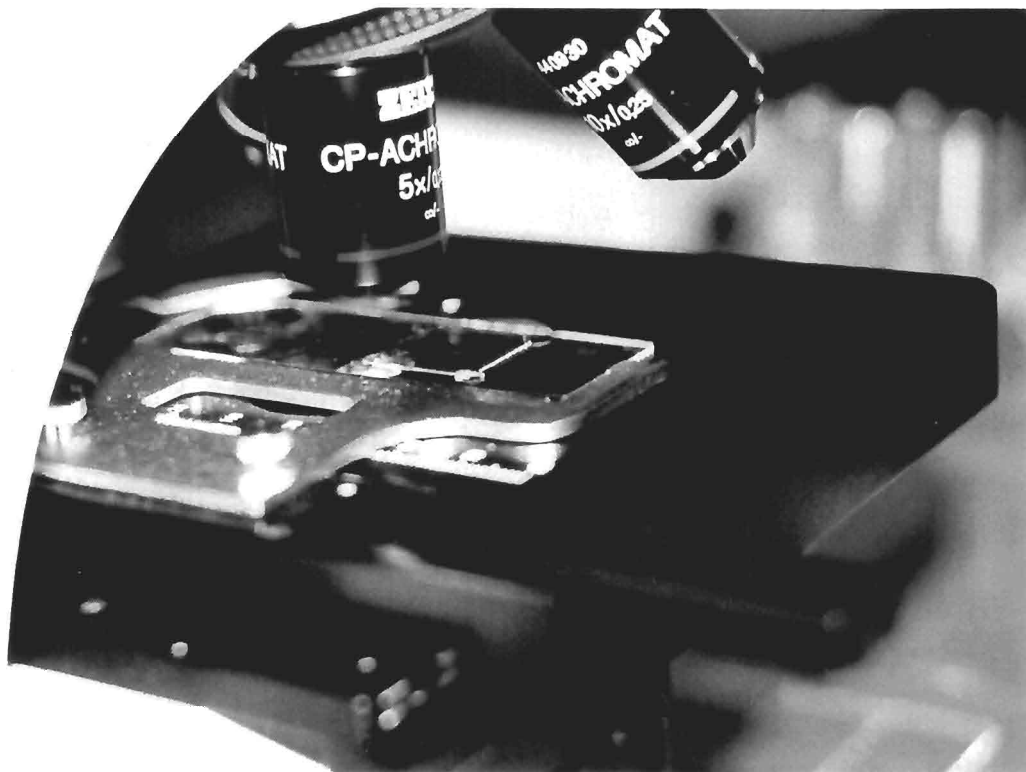
Fig. n° 32 : prélèvement à la pipette Pasteur.

Fig. n°33 : (page suivante) : prélèvement entre deux lamelles de verre et points de lutte aux quatre coins de la préparation.

¹³² Lutter : il s'agit de maintenir ensemble les deux lamelles de verre à l'aide d'une substance telle que la paraffine.



L'observation se fait à différents grossissements : 5 (objectif) x 10 (oculaires), 10 x 10, 40 x 10, 100 x 10 (fig. n° 34, ci-dessous). Pour les deux derniers grossissements il est fortement recommandé de déposer une goutte d'huile à immersion sur le dessus du couvre-objet.



Les différents types de microscopes employés pour l'observation (fig. n°32-33)

- Zeiss KF2 ICS
- Wild M11 avec prisme à dessin meopta 10x
- Leitz Dialux couplé à un vidéographe SONY UP-104



Fig. n°35 : microscopes pour observation. Au premier plan le Wild M11 qui permet de dessiner tout en observant grâce à un prisme à dessin. Au deuxième plan le microscope Zeiss KF2 ICS, et enfin à l'arrière plan on peut voir la table de réalisation des préparations pour observation sous microscope.



Fig. n° 36 : microscope Leitz Dialux à vidéographe. (de gauche à droite : imprimante, télévidéo et microscope avec camérawidéo au-dessus des oculaires).

6.2.8.3- Observation sous microscope inversé

Le microscope inversé nous permet d'observer directement le fond du contenant (emplacement le plus sujet au développement de microorganismes). On dit qu'il est inversé car le révoluer (empacement des divers objectifs) est situé sous ce que l'on observe et non pas au-dessus comme sur un microscope classique, de plus il n'est pas possible de le lever ou de le baisser. Les oculaires viennent par en-dessous et se situent au même niveau que la plaquette d'observation qui elle est modifiable en hauteur.

Les flacons de récupération de la première série des bains expérimentaux ont un fond beaucoup plus épais et concave qu'un erlenmeyer.

Par conséquent l'observation sous microscope inversé est fortement réduite.

C'est ce qui nous poussera à préparer la deuxième série de bains expérimentaux dans des erlenmeyers (fond plat, aucune démarcation entre les bords et le fond) afin de pouvoir observer les cultures au microscope inversé.

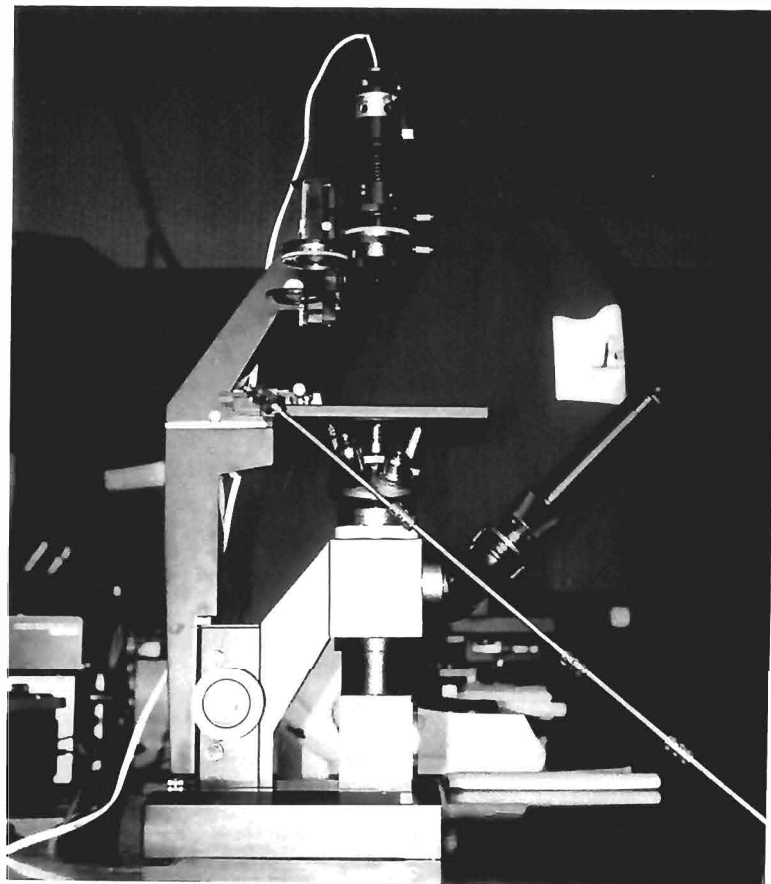


Fig. n°37 : microscope inversé.

6.2.8.4- Lecture du pH

Le pH des bains expérimentaux est relevé à l'aide du papier indicateur Merck (0 - 14)

Les restaurateurs ont pu observer dans les bains de traitements au PEG une acidification accentuée dans le temps. Cette acidification est-elle normale, ou peut-elle être imputée à l'apparition des microorganismes ? Nous avons vu au chapitre 2, point 2.4.1 que les champignons préfèrent un pH acide pour se développer.

6.2.8.5- Frottis au bleu de méthylène¹³³

- Confection d'un frottis

- Stériliser une anse de platine en passant l'extrémité 3 fois dans la flamme de gaz. Laisser refroidir.
- Prélever une colonies bactérienne (ou tout autre matériel et l'étaler en couche mince au milieu d'une lame porte-objet).
- Laisser sécher à l'air puis fixer (= tuer) en passant 3 fois rapidement le porte-objet à la flamme bleue du Bunsen (le frottis doit être tourné vers le haut).

Coloration au bleu de méthylène

- Recouvrir le frottis de solution de bleu de méthylène Loeffler pendant quelques minutes.
- Laver à l'eau du robinet puis sécher entre 2 buvards.
- Examiner à fort grossissement (avec huile à immersion de préférence).

6.2.9 -Les huiles essentielles

Nous avons choisi de tester deux huiles essentielles. Il est évident que plusieurs huiles auraient pu être testées. Nous nous sommes limités à deux pour des raisons de temps.

Ce travail de diplôme est une approche, une tentative pour voir si il n'est pas utopique d'aller plus loin dans la recherche de l'utilisation d'huiles essentielles comme antiseptique.

6.2.9.1- Sélection des huiles essentielles

Ces deux huiles n'ont pas été choisies arbitrairement :

- l'huile essentielle de laurier, *Laurus nobilis*, car nous avons obtenu avec cette huile, en boîte de

¹³³ Pantillon J., Maire J.-A., Straub F., 1995, Exp. 9

Pétri, une action positive sur une souche bactérienne de l'air¹³⁴ l'année dernière.

- l'huile essentielle de sarriette, *Satureja montana*, car le laboratoire de recherche en pharmacie médicale dirigé par Monsieur Pellecuer ayant fait de nombreuses recherches sur cette huile a démontré ces grandes capacités antiseptiques sur bactéries et champignons.

H.E. de Sarriette des montagnes (*Satureja montana*)

composition chimique simplifiée : - 35-45% de phénols (carvacrol)

- ≤ 10% de sesquiterpènes

- 40-45% de monoterpènes (cymène et terpinène)

- ≤ 7% de monoterpénols

H.E. de Laurier noble (*Laurus nobilis*)

composition chimique simplifiée : - 35-40 % d'oxydes (1,8 cinéole)

- ≤ 10 % d'esters

- 19 % de monoterpènes

- 20 % de monoterpénols

- ≤ 4 % de sesquiterpènes

- ≤ 5% d'éthers

- ≤ 2 % de sesquiterpénols

6.2.9.2- Dosage des huiles essentielles

Dans un document, aimablement, fourni par le Professeur Pellecuer, nous avons pu trouver des doses minimales inhibitrices de l'huile essentielle de sarriette sur différentes souches de bactéries.

Ce sont ces doses là qui vont nous servir pour tenter de mettre en évidence une éventuelle activité antiseptique des huiles dans nos bains expérimentaux.

Pour le laurier, il a été difficile de trouver de telles doses dans la littérature à disposition. En fait il s'agit d'une huile essentielle qui est dite à pouvoir antiseptique mineur en comparaison de la sarriette ou de l'origan ou encore de la cannelle. C'est grâce à la classification des huiles par leur indice aromatique que nous pouvons mieux cerner ce pouvoir antiseptique.

Dans le doute, mais parce que le laurier a montré une activité bactéricide dans un précédent test et aussi par souci de comparaison, nous décidons d'utiliser les mêmes quantités que celles employées pour la sarriette.

¹³⁴ rapport de microbiologie, en annexe.

6.2.9.3- Solubilisation des huiles essentielles

Pour ce qui est de la solubilisation des huiles essentielles dans les bains, après différentes lectures et discussions, se présente à nous plusieurs émulsionnants qui répondent aux deux critères suivants :

- inertes (dépourvus de toute action inhibitrices ou stimulante sur le développement des germes).
- chimiquement stable (dépourvus de toute interaction chimique avec les composants de l'essence)¹³⁵

D'après le professeur Pellecuer les émulsionnants les plus indiqués sont les groupes Mirj®, Span® et Tween® avec une nette préférence pour le Tween 20.

L'émulsion est obtenue en soumettant le mélange huile essentielle + Tween 20 + eau distillée aux ultrasons à la fréquence de 20 ke/s pendant 5 minutes.

Ne sont pas donnés les pourcentages du mélange ni la température à laquelle il doit se faire ¹³⁶.

Plusieurs aromatalogues me mirent en garde contre les ultrasons pensant que ces derniers pouvaient altérer la nature de l'huile essentielle. Je décidai alors de solubiliser les huiles essentielles dans le Tween 20 par sur agitateur magnétique.

En parallèle de cette réflexion sur la solubilisation des huiles nous avons émis deux hypothèses complémentaires quant à la nécessité d'employer du Tween 20:

- La première faisait suite à une observation sur le terrain : le développement microbien semblait se localiser principalement en surface du bain. La présence d'huile essentielle en surface du bain (sans émulsionnant) était peut-être plus efficace.
- La deuxième hypothèse concernait la structure du PEG. Puisque celui-ci possède deux groupes terminaux -OH, il est donc capable de se comporter comme un alcool. L'huile essentielle étant miscible dans l'alcool, nous nous sommes dit que l'huile pouvait de par sa nature s'associer au PEG et ainsi rendre l'emploi du Tween 20 obsolète.

Pour vérifier cela nous avons décidé d'observer parallèlement des échantillons

- Tween 20 + H.E + PEG+ bois d'une part, et
- H.E. + PEG + bois d'autre part.

Cette décision néanmoins, rajoutait une variable à l'observation des échantillons.

¹³⁵ Belaiche P., 1979, p 36

¹³⁶ Pellecuer, p 4

6.2.10- Le bois

Du bois archéologique et du bois frais ont été utilisés lors des essais de moisissements du bois.

Pour l'application des huiles essentielles dans des bains expérimentaux, seul du bois archéologique sera employé.

6.2.10.1- Le bois frais

Par souci de comparaison entre le bois archéologique et le bois non-archéologique nous avons dans les trois premières tentatives de moisissement du bois réalisé les bains expérimentaux avec du bois archéologique (ci-dessous) et du bois récent provenant de déchets de peuplier noir (feuillu) et d'épicéa (résineux).

6.2.10.2- Le bois archéologique

Il peut arriver que sur le chantier de fouilles archéologiques des biocides soient employés en aspersion sur les bois en même temps que ceux-ci sont exhumés¹³⁷.

Nous nous sommes assurés que les bois employés lors de nos expériences soient vierges de tout agent chimique pouvant fausser les données de nos résultats¹³⁸.

- Le frêne (feuillu)

Nous avons placés du bois (frêne archéologique fourni par Monsieur Werner Schor) dans de l'eau à 10 % de PEG 400. Nous avons doublé les échantillons.

Une série identique a été réalisée avec du sapin épicéa.

- Le chêne (feuillu)

Le bois archéologique utilisé pour les échantillons provient d'un même milieu d'enfouissement et d'une excavation suffisamment récente pour ne pas avoir été contaminée par des facteurs extérieurs pouvant en fausser l'étude (biocides, mélange de bois, retournement du terrain).

Le bois nous a été généreusement proposé par Monsieur Claude Michel, responsable du Laboratoire Cantonal de conservation-restauration d'archéologie de Lausanne (VD).

Il s'agit de fragments de pilotis archéologiques gorgés d'eau de la fouille de Concise, dans le canton de Vaud¹³⁹.

¹³⁷ Discussion avec C. Michel, C. André

¹³⁸ Discussion avec C. Michel et W. Schoch

¹³⁹ Discussion avec Claude Michel

6.2.11- Stérilisation¹⁴⁰

La stérilisation se fait à l'autoclave (fig. n° 38). Il s'agit d'une stérilisation à chaleur humide, 120°C pour 1 atmosphère de pression, pendant 20 à 30 minutes. Convient particulièrement à la stérilisation des milieux liquides.

Autoclaves de table (environ 10 litres) du laboratoire de biologie, lycée Blaise Cendrars.



Fig. n°38 : Autoclave : à droite face à nous le manomètre (indicateur de pression), à gauche, inclinée c'est l'indication de la température à l'intérieur de l'autoclave. A droite plaque de chauffe,

¹⁴⁰ Pantillon J. et al., 1995, stér.p.1

6.3- Troisième partie : protocoles expérimentaux

6.3.1- Essai de moisissement du bois : première tentative

Notre premier souci est de voir si des microorganismes apparaissent sur du bois humide, et en combien de temps.

Avant Noël nous avons déjà mis du bois de peuplier noir (non-archéologique) et du frêne (frêne archéologique fourni par Monsieur Werner Schoch) en conditions saturées d'humidité.

Près de deux mois plus tard nous n'observons toujours aucun développement de microorganismes.

Il nous fallait trouver une solution pour garantir le développement de microorganismes dans les échantillons. Condition sine qua non pour garantir l'efficacité ou non des huiles testées.

6.3.2- Essai de moisissement du bois : deuxième tentative

Ayant choisi de pratiquer les tests en milieu réels (bois gorgé d'eau et non pas humide), nous avons voulu savoir le temps qu'il fallait pour obtenir un développement microbien dans un échantillon, puisque nous ne disposions que de quelques mois pour mener à bien le travail de diplôme.

C'est Michel Aragno qui nous orienta.

6.3.2.1- Rencontre avec Monsieur Michel Aragno

Extrait du compte rendu de l'entretien du 09 mars 2000 avec monsieur Michel Aragno au sujet du protocole de test des bains expérimentaux avec huiles essentielles, PEG et bois gorgé d'eau.

[...]D'après Monsieur Michel Aragno nous devrions voir un développement de microorganismes dans des flacons d'eau contenant du bois archéologique en cours de traitement, avec du polyéthylène glycol (PEG) de bas poids moléculaire. Ce développement devait pouvoir être accéléré si :

- nous laissons les flacons en conditions aérobies,
- nous incubons les bains expérimentaux sur une secoueuse (agitation permanente)

- nous ajoutons une solution d'oligo-éléments pour favoriser la croissance microbienne,
- nous infectons les bains avec un inoculum mixte standard représentatif d'une biodiversité comme celle de la litière issue d'un milieu forestier.

Il préconise la réalisation de plusieurs séries d'échantillons ayant pour variables :

- soit des différentes concentrations de PEG,
- soit des conditions aérobies ou anaérobies

Si nous augmentons le nombre de variables nos résultats ne seront plus compréhensibles c'est pourquoi nous ne devons en choisir qu'une à deux, pas au-delà.

Nous pourrions alors

- *inoculer une série ayant différentes concentrations d'une huile essentielle sélectionnée*
- *inoculer un milieu au PEG à basse concentration.*

Ce travail préliminaire nous permettrait de voir ce que l'on obtient et en combien de temps. Il nous servirait également à établir des comparaisons. Ce serait un système électif pour le PEG et sélectif pour une huile essentielle.

Nous décidons de procéder à des échantillons en faisant entrer comme variable 2 huiles essentielles, chacune à des doses différentes.

6.3.2.2- Réalisation de la deuxième tentative

Nous avons placés du bois (frêne archéologique) dans de l'eau et 10 % de PEG 400.

Une série identique à été réalisée avec des morceaux d'épicéa (tableau n°2).

Nous avons doublé les échantillons et les avons placés sur une secoueuse (marque : Adolf Kühner, Bâle) en agitation permanente.

Tableau n°2 : composition des échantillons de la deuxième tentative.

<u>numéro</u>	<u>composition</u>
1.1 et 1.2	PEG 400 10% + Frêne
2.1 et 2.2	PEG 400 10% + Frêne +oligo-éléments 2/1000
3.1 et 3.2	PEG 400 10% + Frêne +oligo-éléments 2/1000 +Innoculum mixte standard
4.1 et 4.2	PEG 400 10% + épicéa
5.1 et 5.2	PEG 400 10% + épicéa +oligo-éléments 2/1000
6.1 et 6.2	PEG 400 10% +épicéa +oligo-éléments 2/1000 + Innoculum mixte standard
7.1 et 7.2	PEG 400 10%

Nous constatons la déliquescence des morceaux de bois archéologiques, de fait les cultures 1.1 à 3.2 sont toutes entièrement troubles. Et ce, quatre jours seulement après la mise en culture.

Trois semaines plus tard nous arrêtons la secoueuse.

Nous ne pouvons pas utiliser l'agitation permanente pour des bains contenant du bois d'origine archéologique.

6.3.3- Essai de moisissement du bois : troisième tentative

Nous recommençons une série identique à la deuxième tentative mais cette fois-ci sans la placer sur la secoueuse en agitation permanente (tableau n°3).

Tableau n°3 : composition des échantillons de la troisième tentative.

<u>numéro</u>	<u>composition</u>
7* et 7.1*	PEG 400 10% + Frêne
8.1 et 8.2	PEG 400 10% + Frêne +oligo-éléments 2/1000
9.1 et 9.2	PEG 400 10% + Frêne +oligo-éléments 2/1000 +Inno.mixte standard (1ml/culture)
10.1 et 10.2	PEG 400 10% + épicéa
11.1 et 11.2	PEG 400 10% + épicéa +oligo-éléments 2/1000
12.1 et 12.2	PEG 400 10% +épicéa +oligo-éléments 2/1000 + Inno.mixte standard (1ml/culture)

Quant aux nombreux essais pour faire se développer des microorganismes dans nos échantillons, ils se sont révélés tout d'abord infructueux dans le laps de temps des quelques semaines précédant les vacances de Pâques.

En date de fin avril, après observation sous microscope des différents échantillons préliminaires nous constatons une activité microbiologique dans les flacons (fig. n°39 à 42, pages suivantes), même si elle est réduite à certaines places, et n'est pas visible à l'oeil nu.

Tableau n°4 : premières observations des échantillons de la deuxième et de la troisième tentative.

<u>numéro</u>	<u>observation sous microscope</u>
1.1 et 1.2	bactéries (pH : 7)
2.1 et 2.2	bactéries (pH : 7)
3.1 et 3.2	bactéries (pH : 7)
4.1 et 4.2	rien (pH : 7)
5.1 et 5.2	champignon et bactéries (pH : 7)
6.1 et 6.2	champignon et bactéries (pH : 7)
7.1 et 7.2	champignon et bactéries (pH : 5/6)

<u>numéro</u>	<u>observation sous microscope</u>
7.1* et 7.2*	champignons et bactéries (pH : 7)
8.1 et 8.2	rien (pH : 7)
9.1 et 9.2	mycélium avec sporange , filament avec cellules rectangulaires (pH : 7)
10.1 et 10.2	champignons et bactéries dans le n°10.1 pas dans le n°10.2 (pH : 7)
11.1 et 11.2	champignons et bactéries dans le n°11.1. (pH : 7)
12.1 et 12.2	champignons et bactéries dans les deux échantillons (pH : 7)

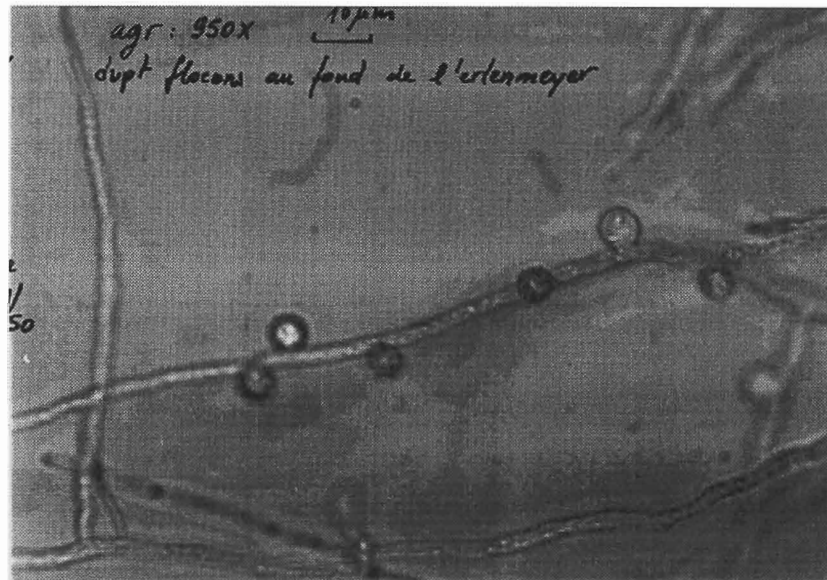


Fig. n° 39: échantillon préliminaire n°12.1.
vue sous microscope, agrandissement 40 x 12,5
culture du 24.03.00, observation le 26.04.00

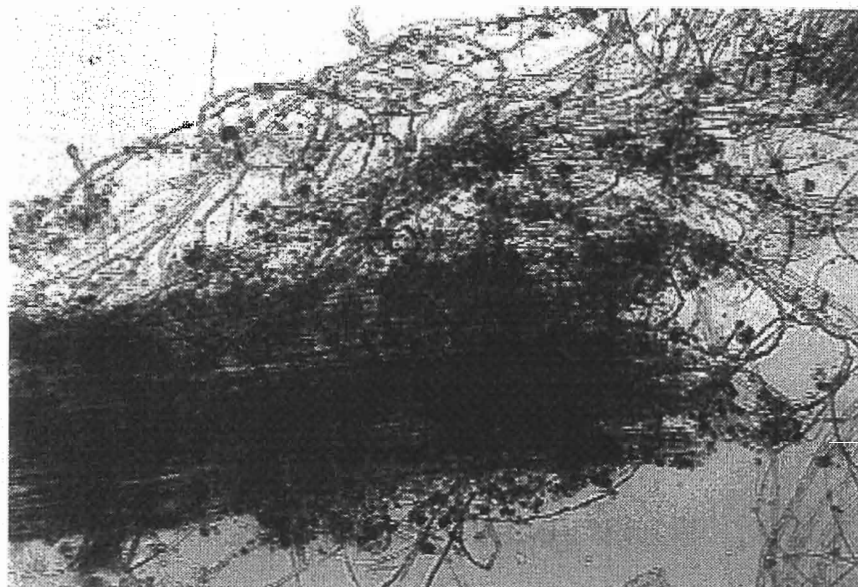
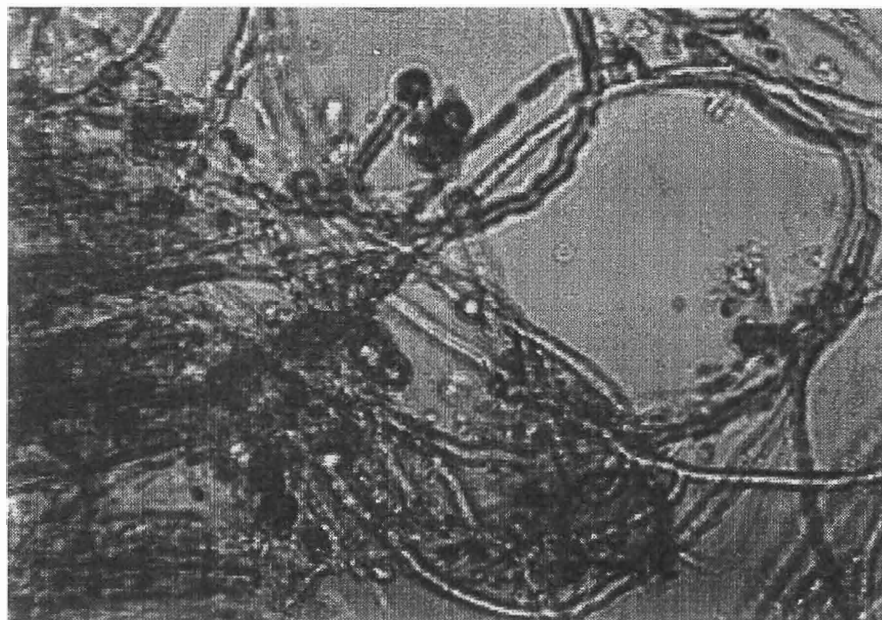
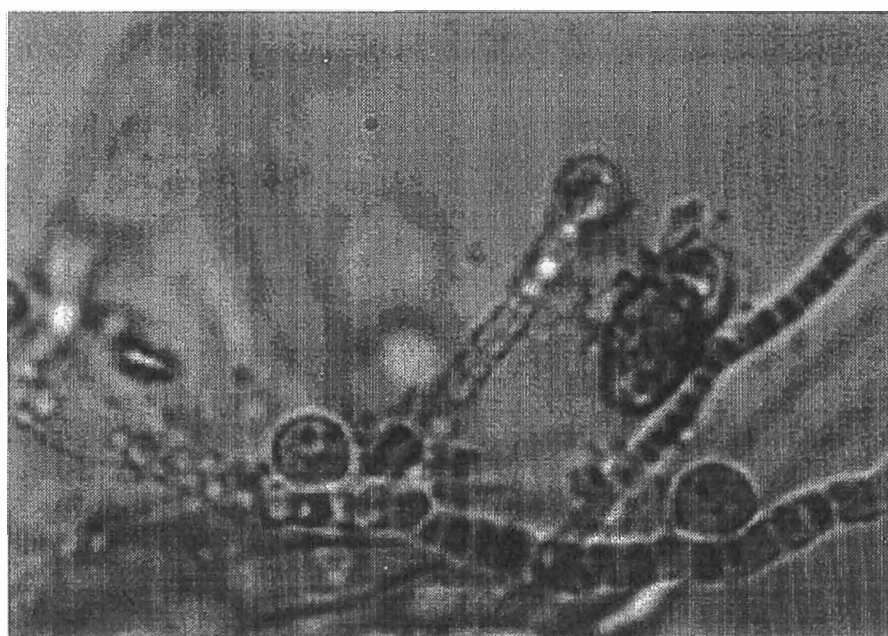


Fig. n° 40 : échantillon préliminaire n°9.2.
vue sous microscope, agrandissement 10 x 12,5
culture du 24.03.00, observation le 26.04.00



*Fig. n° 41 : échantillon préliminaire n°9.2.
vue sous microscope, agrandissement 40 x 12,5
culture du 24.03.00, observation le 26.04.00*



*Fig. n° 42 : échantillon préliminaire n°9.2.
vue sous microscope, agrandissement 100 x 12,5
culture du 24.03.00, observation le 26.04.00*

Pour l'observation des bactéries, le PEG ne permet pas d'employer des frottis au bleu de méthylène, nous devons trouver une solution palliative.

Nous pouvons donc déjà en tirer certains enseignements :

- nous devons effectivement accélérer la prolifération des microorganismes en y ajoutant oligo-éléments et inoculum mixte standard.*
- nous pouvons fractionner le bois en morceaux de quelques centimètres carré.*

6.4- Quatrième partie : application des huiles essentielles à l'aide du protocole définitif

6.4.1- Protocole définitif

Les différents tests préliminaires réalisés au lycée nous ont permis de mettre sur pied un protocole définitif de recherche de l'action des huiles essentielles dans les bains de traitement des bois gorgé d'eau au polyéthylèneglycol 400 à 15 %.

6.4.2- But du protocole

Comme il est indiqué dans le tableau A nous avons 28 échantillons (bains de traitements modèles réduits). Chacun préfigure une question de notre part répertoriée dans le tableau B.

Tableau A : composition des échantillons de la première série (1 à 28) et de la deuxième (31 à 58)

Numéro	bois	Solution de base	Extrait de terre	H.E. sarriette	H.E. Laurier	Tween 20
1		+	+			
2	+	+	+			
3	+	+	+			
4		+	+			
5	+	+	+	+		
6	+	+	+	+		
7	+	+	+	+		
8	+	+	+	+		
9	+	+	+	+		
10	+	+	+	+		
11	+	+	+	+		+
12	+	+	+	+		+
13	+	+	+	+		+
14	+	+	+	+		+
15	+	+	+	+		+
16	+	+	+	+		+
17	+	+	+		+	
18	+	+	+		+	
19	+	+	+		+	
20	+	+	+		+	
21	+	+	+		+	
22	+	+	+		+	
23	+	+	+		+	+
24	+	+	+		+	+
25	+	+	+		+	+
26	+	+	+		+	+
27	+	+	+		+	+
28	+	+	+		+	+

Tableau B : indication du n° de l'échantillon, de ce qu'il contient et de la question à laquelle nous voulons répondre.

Numéro	Intitulé	Question
1	témoin PEG	Est-ce que les microorganismes poussent dans le PEG, sans bois ?
2	témoin PEG + bois	Est-ce que les microorganismes poussent dans le PEG, avec bois ?
3	témoin PEG + bois + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le PEG + bois + Tween ?
4	témoin PEG + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le PEG + Tween ?
5	Sarriette 0,125	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,125 ?
6	Sarriette 0,125	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,125 ?
7	Sarriette 0,250	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,250 ?
8	Sarriette 0,250	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,250 ?
9	Sarriette 0,500	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,500 ?
10	Sarriette 0,500	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,500 ?
11	Sarriette 0,125 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,125 + Tween 20 ?
12	Sarriette 0,125 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,125 + Tween 20 ?
13	Sarriette 0,250 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,250 + Tween 20 ?
14	Sarriette 0,250 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,250 + Tween 20 ?
15	Sarriette 0,500 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,500 + Tween 20 ?
16	Sarriette 0,500 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans la sarriette à 0,500 + Tween 20 ?
17	Laurier 0,125	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,125 ?
18	Laurier 0,125	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,125 ?
19	Laurier 0,250	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,250 ?
20	Laurier 0,250	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,250 ?
21	Laurier 0,500	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,500 ?
22	Laurier 0,500	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,500 ?
23	Laurier 0,125 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,125 + Tween 20 ?
24	Laurier 0,125 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,125 + Tween 20 ?
25	Laurier 0,250 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,250 + Tween 20 ?
26	Laurier 0,250 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,250 + Tween 20 ?
27	Laurier 0,500 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,500 + Tween 20 ?
28	Laurier 0,500 + Tween 20	Est-ce que les microorganismes poussent dans le laurier à 0,500 + Tween 20 ?

Comme on peut le constater, notre souci principal est d'observer si il y a développement ou non de microorganismes dans une solution de traitement de base :

- quand il n'y a que la solution de base,
- quand il y a du bois,
- quand il y a du bois et du tween
- quand il y a du tween
- quand il y a des huiles essentielles et du bois,
- quand il y a des huiles essentielles du bois et du tween,

L'observation de ce développement ou de ce non-développement se fait dans le temps, à l'oeil nu, sous microscope, sous microscope inversé .

Nous espérons que les résultats obtenus répondront à nos interrogations.

Les échantillons sont doublés pour une meilleure lecture des résultats

Une seconde série d'expérimentation a été réalisée pour vérification selon exactement le même modèle (éch. 31 à 58).

6.4.3- Réalisation

Nous préparons la solution de base pour 28 échantillons de 50 ml.

Cette solution de base est répartie dans les flacons de récupération, préalablement stérilisés, à raison de 50 ml dans chaque flacon (fig. n°43 ci-dessous).



1 ml d'innoculum mixte standard pour solution de base est pipeté dans chaque échantillon.

Les deux huiles essentielles sélectionnées sont ajoutées (dosages : 0,125 mg/ml; 0,250 mg/ml; 0,500 mg/ml) dans les 12 échantillons prévus pour tester les huiles en "liberté" dans la solution.

Les deux huiles essentielles sélectionnées sont ajoutées (dosages : 0,125; 0,250; 0,500) dans les 12 échantillons contenant du Tween 20. Chacun de ces 12 flacons est placé sur un agitateur magnétique pendant 2 minutes à une puissance d'agitation de 7 pour permettre une émulsion de l'huile essentielle dans la solution (fig. n°44 page suivante).



En date du 05.05.2000, des morceaux de bois archéologique (chêne) sont glissés dans les échantillons à l'exception du n°1 et du n°4 (témoins Tableau A).

Les échantillons sont fermés par du coton non-hydrophile qui laisse passer l'air et sont regroupés dans une caisse en bois recouverte par une plaque de verre qui empêche la diffusion des huiles essentielles dans l'atmosphère (fig. n°45 ci-dessous).





Fig. n° 46 : la seconde série a été lancée près de quatre semaines plus tard à savoir le 30. 05. 2000.

Dans les figures suivantes nous pouvons voir les échantillons les uns après les autres comme ils sont référencés au tableau A. (Les photos montrent les échantillons de la deuxième série.)

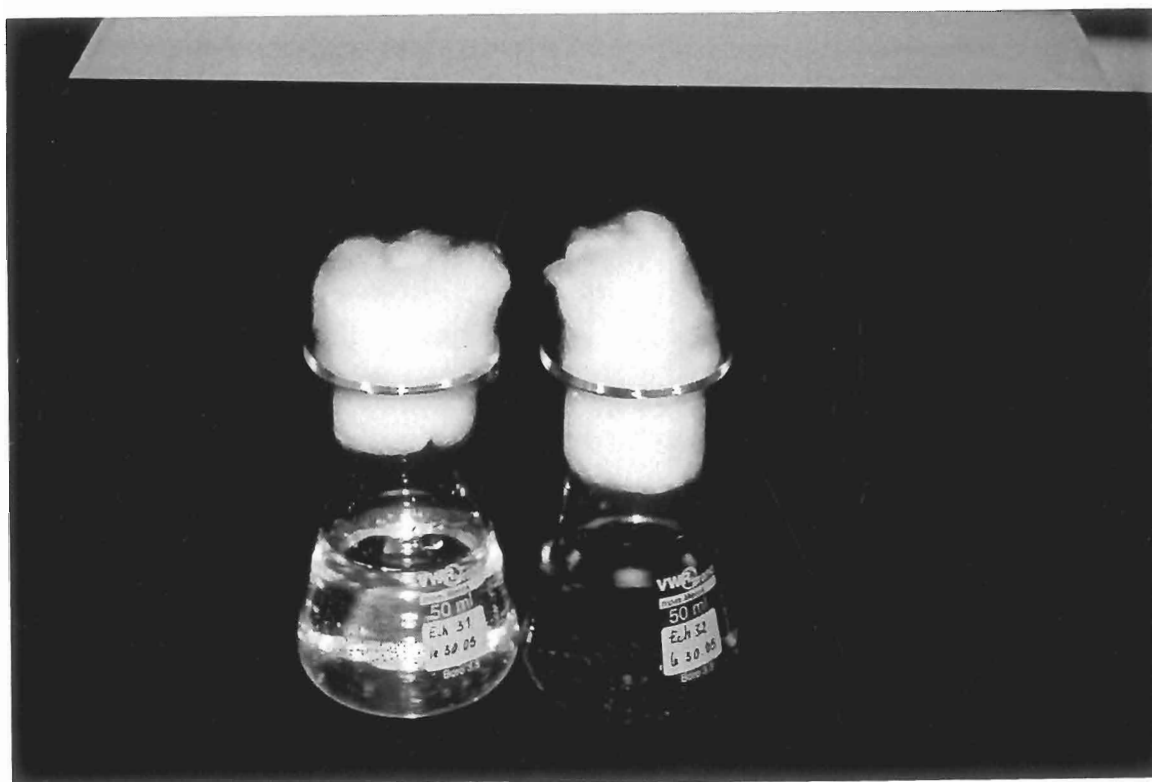


Fig. n°47 : Echantillons témoins n° 31 (PEG 400 à 15%) et 32 (PEG 400 à 15% + bois)

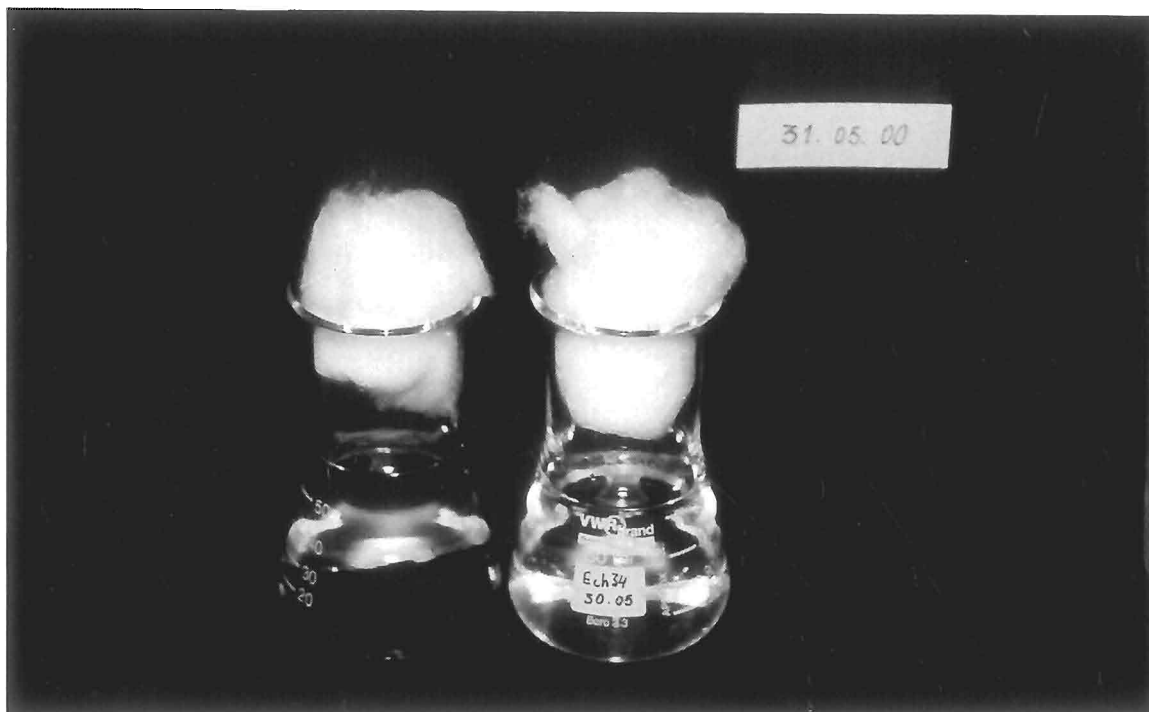


Fig. n°48 : Echantillons témoins n° 33 (PEG 400 à 15% + bois + Tween 20)
et 34 (PEG 400 à 15% + Tween 20)



Fig. n°49 : Echantillons témoins n° 35 et 36 (PEG 400 à 15% + bois + Sarriette dose 0,125) à
gauche et à droite n° 41 et 42, même dose mais avec Tween 20



Fig. n°52 :Echantillons témoins n° 47 et 48 (PEG 400 à 15% + bois + Laurier dose 0,125) à gauche et à droite n° 53 et 54, même dose mais avec Tween 20. Dans les échantillons avec Tween, on perçoit légèrement un anneau au ménisque de la solution.



Fig. n°53 : Echantillons témoins n° 49 et 50 (PEG 400 à 15% + bois + Laurier dose 0,250) à gauche et à droite n° 55 et 56, même dose mais avec Tween 20. Dans les échantillons avec Tween, on perçoit mieux un anneau au ménisque de la solution.

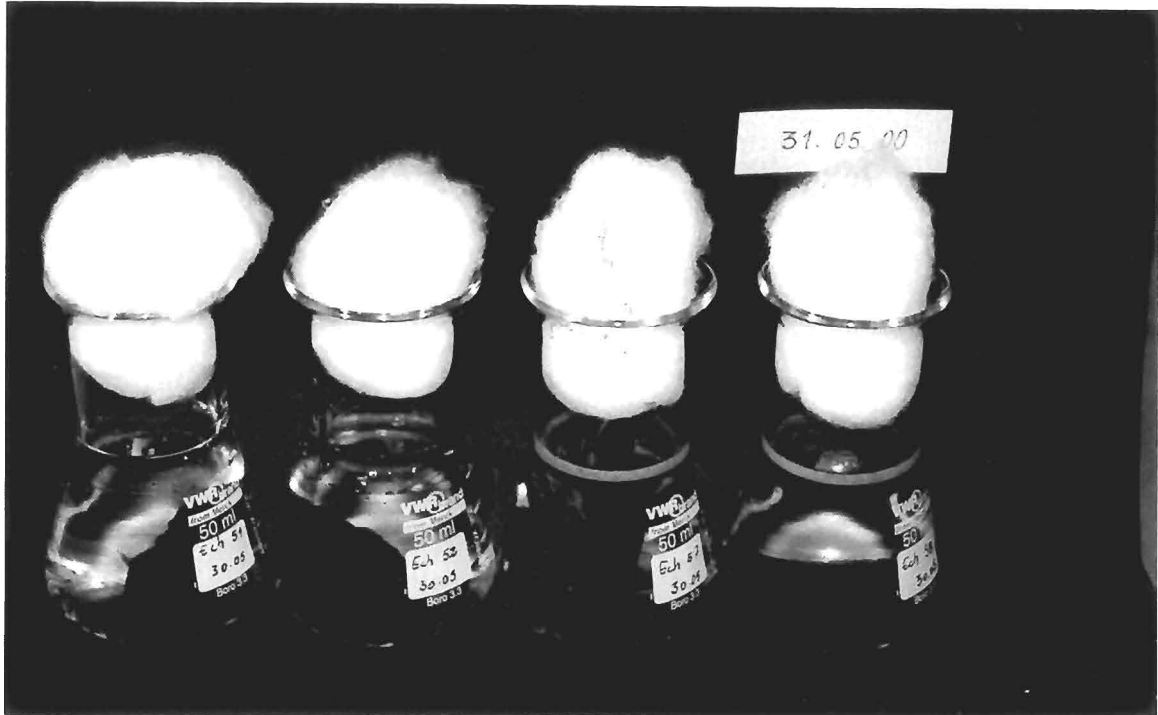


Fig. n°54 : Echantillons témoins n° 51 et 52 (PEG 400 à 15% + bois + Laurier dose 0,500) à gauche et à droite n° 57 et 58, même dose mais avec Tween 20. Dans les échantillons avec Tween, on perçoit beaucoup mieux l'anneau au ménisque de la solution.

6.4.4- Observations des bains expérimentaux au fil du temps

On peut avoir une vue globale de l'évolution de la contamination fongique des bains expérimentaux de la série 1 et 2 en observant les tableaux C et D (pages suivantes).

Les annotations qui suivent reflètent l'observation de la série 1 à l'oeil nu et sous microscope. L'observation du pH des bains expérimentaux de la série 1 est signalée dans le tableau E, celle de la série 2 dans le tableau F (Tableau E et F pages suivantes également).

Tableau C : observation de la présence (+) / absence (-) de développement fongique dans les échantillons 1 à 28, mise en culture au 05 mai 2000

N° échantillon	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8	Semaine 9	Vacances	Semaine 17
1 : témoin PEG	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+
2 : témoin PEG + bois	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+
3 : témoin PEG + bois + Tween 20	-	-	+	+	+	+	+	+	+		+
4 : témoin PEG + Tween 20	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+
5 : Sarriette 0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
6 : Sarriette 0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
7 : Sarriette 0,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
8 : Sarriette 0,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
9 : Sarriette 0,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
10 : Sarriette 0,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
11 : Sarriette 0,125 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
12 : Sarriette 0,125 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
13 : Sarriette 0,250 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
14 : Sarriette 0,250 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
15 : Sarriette 0,500 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
16 : Sarriette 0,500 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
17 : Laurier 0,125	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
18 : Laurier 0,125	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
19 : Laurier 0,250	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
20 : Laurier 0,250	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
21 : Laurier 0,500	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
22 : Laurier 0,500	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
23 : Laurier 0,125 + Tween	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
24 : Laurier 0,125 + Tween	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
25 : Laurier 0,250 + Tween	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
26 : Laurier 0,250 + Tween	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
27 : Laurier 0,500 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
28 : Laurier 0,500 + Tween	-	-	-	-	-	-	-	+	+		

Tableau D : observation de la présence (+) / absence (-) de développement fongique dans les échantillons 31 à 58, mise en culture au 30 mai 2000

N° échantillon	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Vacances	Semaine 13
31 : témoin PEG	-	+	+	+	+		
32 : témoin PEG + bois	-	+	+	+	+		
33 : témoin PEG + bois + Tween 20	-	+	+	+	+		
34 : témoin PEG + Tween 20	-	+	+	+	+		
35 : Sarriette 0,125	-	-	-	-	-		+
36 : Sarriette 0,125	-	-	-	-	-		-
37 : Sarriette 0,250	-	-	-	-	-		-
38 : Sarriette 0,250	-	-	-	-	-		-
39 : Sarriette 0,500	-	-	-	-	-		-
40 : Sarriette 0,500	-	-	-	-	-		-
41 : Sarriette 0,125 + Tween	-	-	-	-	-		-
42 : Sarriette 0,125 + Tween	-	-	-	-	-		-
43 : Sarriette 0,250 + Tween	-	-	-	-	-		-
44 : Sarriette 0,250 + Tween	-	-	-	-	-		-
45 : Sarriette 0,500 + Tween	-	-	-	-	-		-
46 : Sarriette 0,500 + Tween	-	-	-	-	-		-
47 : Laurier 0,125	-	-	-	-	+		
48 : Laurier 0,125	-	-	-	-	-		+
49 : Laurier 0,250	-	-	-	-	+		
50 : Laurier 0,250	-	-	-	-	+		
51 : Laurier 0,500	-	-	-	-	-		+
52 : Laurier 0,500	-	-	-	-	-		+
53 : Laurier 0,125 + Tween	-	+	+	+	+		
54 : Laurier 0,125 + Tween	-	+	+	+	+		
55 : Laurier 0,250 + Tween	-	+	+	+	+		
56 : Laurier 0,250 + Tween	-	+	+	+	+		
57 : Laurier 0,500 + Tween	-	-	-	-	-		+
28 : Laurier 0,500 + Tween	-	-	-	+	+		

Tableau E : Relevé du pH des bains expérimentaux de la série 1

N° échantillon	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8	Semaine 9	Vacances
1 : témoin PEG	7	7	7	7	5/6	5/6	5	5	4/5	
2 : témoin PEG + bois	7	7	7	7	6	6/7	6	6/7	6	
3 : témoin PEG + bois + Tween 20	7	6/7	7	7	7	7	6/7	6	6	
4 : témoin PEG + Tween 20	7	6/7	6/7	7	5/6	5/6	6	5	5	
5 : Sarriette 0,125	7	7	6/7	7	7	7	7	7	7	
6 : Sarriette 0,125	7	7	7	7	7	7	7	7	6/7	
7 : Sarriette 0,250	6/7	6/7	6/7	7	6	6	6	6/7	6/7	
8 : Sarriette 0,250	6/7	7	6/7	7	6	6	6/7	6	6/7	
9 : Sarriette 0,500	6/7	7	6/7	7	5/6	5/6	5/6	6/7	6	
10 : Sarriette 0,500	6/7	6/7	6/7	7	5/6	5/6	6/7	6/7	6	
11 : Sarriette 0,125 + Tween	7	6/7	7	7	7	7	6	6	7	
12 : Sarriette 0,125 + Tween	7	6/7	7	7	7	7	6	6	7	
13 : Sarriette 0,250 + Tween	7	6/7	6/7	7	6	6	7	6/7	6/7	
14 : Sarriette 0,250 + Tween	7	7	7	7	6/7	6	6	6	6	
15 : Sarriette 0,500 + Tween	7	6/7	6/7	7	6/7	6/7	7	7	6/7	
16 : Sarriette 0,500 + Tween	7	7	7	7	6	6	6	6	6	
17 : Laurier 0,125	7	7	7	7	6/7	6/7	6	6	6	
18 : Laurier 0,125	7	7	7	7	6/7	6/7	6	6	5	
19 : Laurier 0,250	7	7	7	7	6/7	6/7	6	6	6	
20 : Laurier 0,250	7	7	7	7	6/7	6/7	6	6	6	
21 : Laurier 0,500	7	7	7	7	6/7	6/7	6/7	6	6	
22 : Laurier 0,500	7	7	7	7	6/7	6/7	6/7	6/7	5/6	
23 : Laurier 0,125 + Tween	7/8	7	7	7/8	6/7	6/7	6/7	6/7	6	
24 : Laurier 0,125 + Tween	7/8	7	7	7	6/7	6/7	6/7	6/7	6	
25 : Laurier 0,250 + Tween	7/8	7	7	7	7	7	7/8	7/8	6	
26 : Laurier 0,250 + Tween	7/8	7	7	7	7	7	7	7	6	
27 : Laurier 0,500 + Tween	7/8	7	7	7	7	7	6	6	6/7	
28 : Laurier 0,500 + Tween	7/8	7	7	7	6/7	6/7	6/7	6	6	

Tableau F : relevé du pH des bains expérimentaux de la série 2

N° échantillon	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5
31 : témoin PEG	7/8	7/8	6/7	5	4/5
32 : témoin PEG + bois	7/8	7/8	6/7	7	6
33 : témoin PEG + bois + Tween 20	6/7	6/7	7	7	6/7
34 : témoin PEG + Tween 20	7	7	6/7	5	5
35 : Sarriette 0,125	7	7	7	7	6/7
36 : Sarriette 0,125	6/7	6/7	7	7	6/7
37 : Sarriette 0,250	6/7	6/7	7	7	7
38 : Sarriette 0,250	6/7	6/7	7	7	7
39 : Sarriette 0,500	6/7	6/7	7	7	6/7
40 : Sarriette 0,500	6/7	6/7	7	7	7
41 : Sarriette 0,125 + Tween 20	6/7	6/7	7	7	6/7
42 : Sarriette 0,125 + Tween 20	6	6	7	7	6/7
43 : Sarriette 0,250 + Tween 20	6/7	6/7	7	7	6
44 : Sarriette 0,250 + Tween 20	6	7	7	7	6/7
45 : Sarriette 0,500 + Tween 20	6	7	7	7	6/7
46 : Sarriette 0,500 + Tween 20	6/7	6/7	7	7	7
47 : Laurier 0,125	7	7	7	7	6/7
48 : Laurier 0,125	7	7	7	7	6
49 : Laurier 0,250	7	7	7	7	6
50 : Laurier 0,250	7	7	7	7	6
51 : Laurier 0,500	7	7	7	7	7
52 : Laurier 0,500	7	7	7	7	7
53 : Laurier 0,125 + Tween 20	6/7	6/7	7	7	7
54 : Laurier 0,125 + Tween 20	7	7	7	7	6/7
55 : Laurier 0,250 + Tween 20	7	7	7	7	7
56 : Laurier 0,250 + Tween 20	7	6/7	6/7	6/7	6/7
57 : Laurier 0,500 + Tween 20	7	7	7	7	7
58 : Laurier 0,500 + Tween 20	7	7	7	7	7

04 mai	<p>-Pendant un peu plus de quatre jours l'odeur de l'huile essentielle de sarriette et de celle du laurier seront persistantes, puis s'atténueront progressivement.</p> <p><i>Faut-il mettre en parallèle la diminution de l'odeur et la diminution de l'action antiseptique ?</i></p>
08 mai	<p>-L'émulsion semble garder une certaine stabilité dans le temps.</p> <p>-Par contre l'émulsion Tween 20+ sarriette ne permet plus l'observation à l'oeil nu dans les échantillons où la dose d'essai est la plus grande, à cause de l'opacité de la solution.</p>
12 mai	<p>-Nous avons déjà noté la trace de champignons dans l'échantillon n°4 (témoin au Tween 20sans bois), sous microscope. Les échantillons comprenant les huiles essentielles ne semblent pas présenter d'activité bactérienne ni fongique. La solution du bain est propre, transparente pour les échantillons avec H.E de laurier, légèrement jaune pour les échantillons avec H.E de sarriette.</p>
17 mai	<p>-Les échantillons restent inchangé à l'oeil nu.</p>
19 mai	<p>-Nous ne remarquons toujours rien dans les échantillons avec H.E de sarriette (n°5 à 16).</p> <p>-Un mycélium est visible sous microscope dans l'échantillon n°3 (Tween 20+ bois), dans l'échantillon n°17 (laurier à 0,125 mg /ml), ainsi que dans l'échantillon n°22 (laurier à 0,500 mg /ml).</p> <p><i>Donc quel que soit la dose de laurier elle n'est pas suffisante pour empêcher un développement fongique. Il faut , soit, ne plus faire de test avec l'huile essentielle de laurier, soit augmenter les doses, ce qui est gênant car l'extraction de l'huile essentielle du laurier est onéreuse ce qui augmente son prix de vente. Par contre on pourrait l'employer en association avec d'autres huiles essentielles.</i></p>
22 mai	<p>-Présence de champignons dans les échantillons témoins du n°1 au n° 4 (fig. n° 55 et suivantes)</p> <p>- Tous les échantillons contiennent des bactéries.</p> <p>- Nous réalisons plusieurs observations, à la suite l'une de l'autre, des échantillons qui ne sont pas encore contaminés, par souci de vérification.</p>

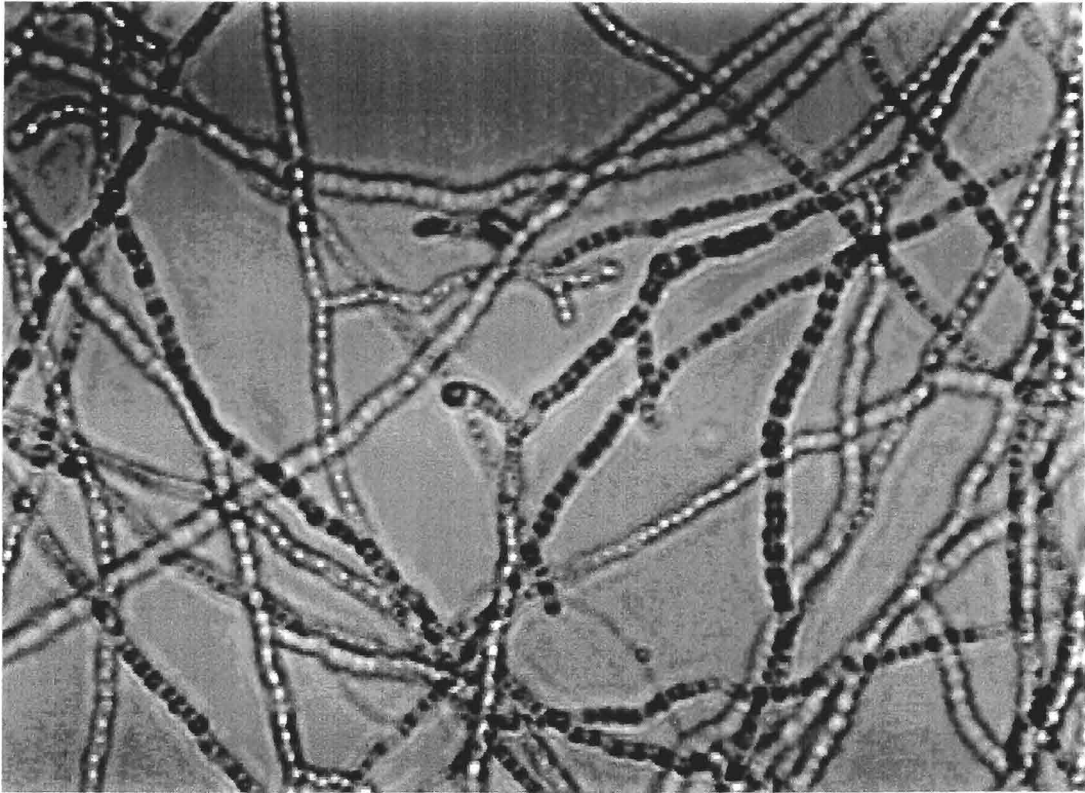


Fig. n°55 : champignon de l'échantillon témoin n°1, agr. 40 x 12,5

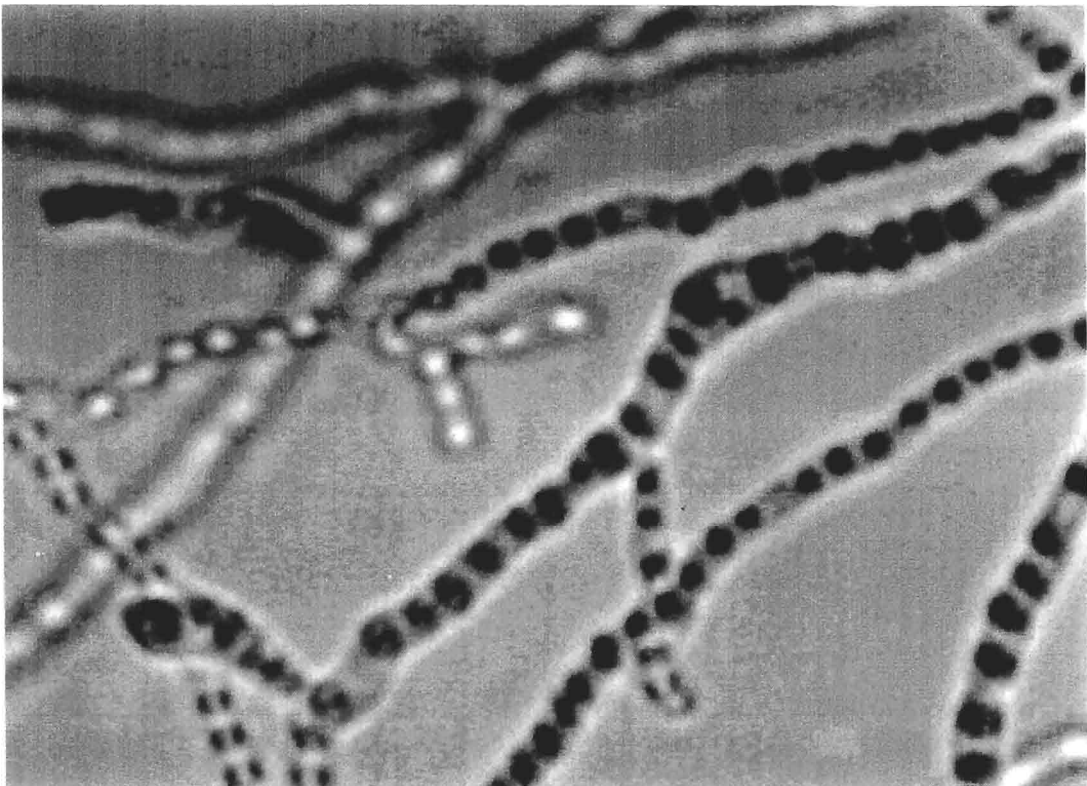


Fig. n°56 : champignon de l'échantillon témoin n°1, agr. 100 x 12,5

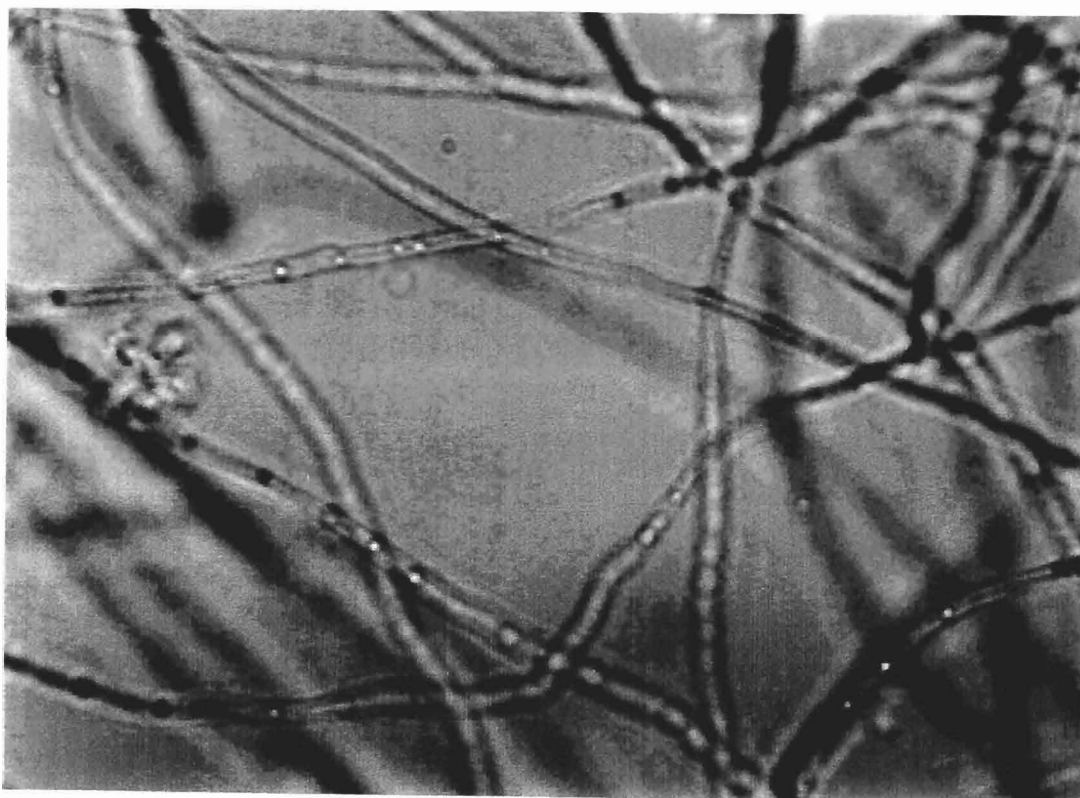


Fig. n°57 : champignon de l'échantillon témoin n°2, agr. 40 x 12,5

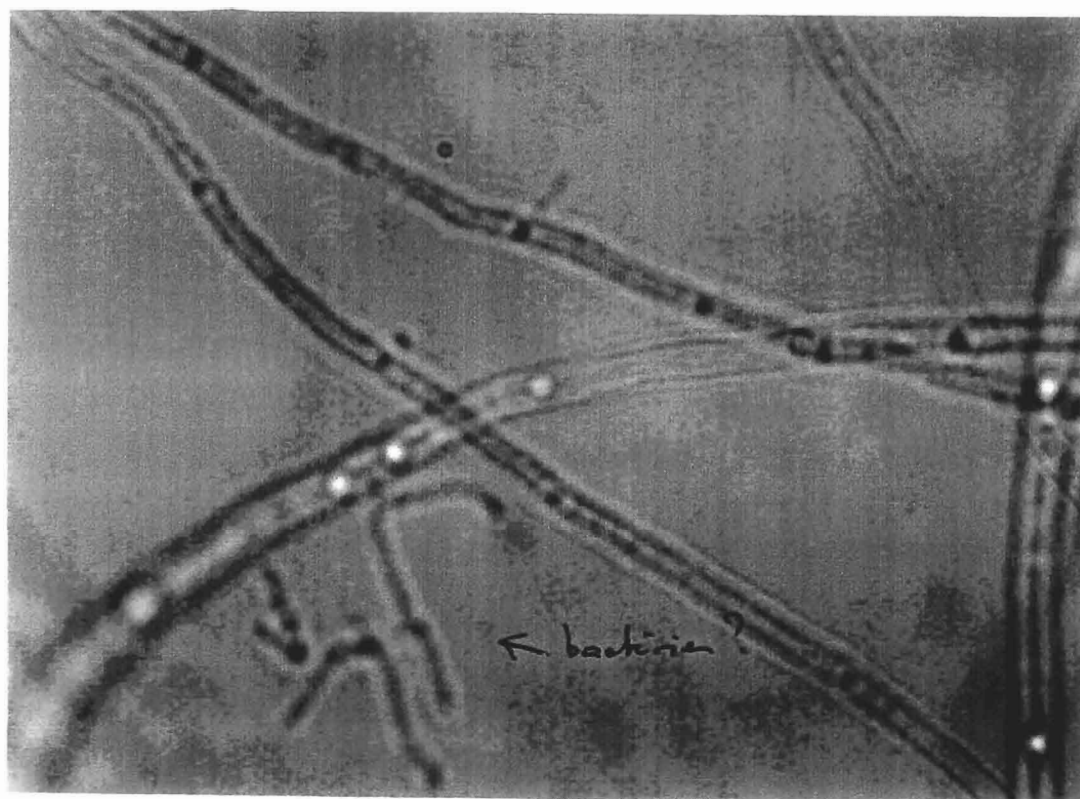


Fig. n°58 : champignon de l'échantillon témoin n°2, agr. 100 x 12,5.

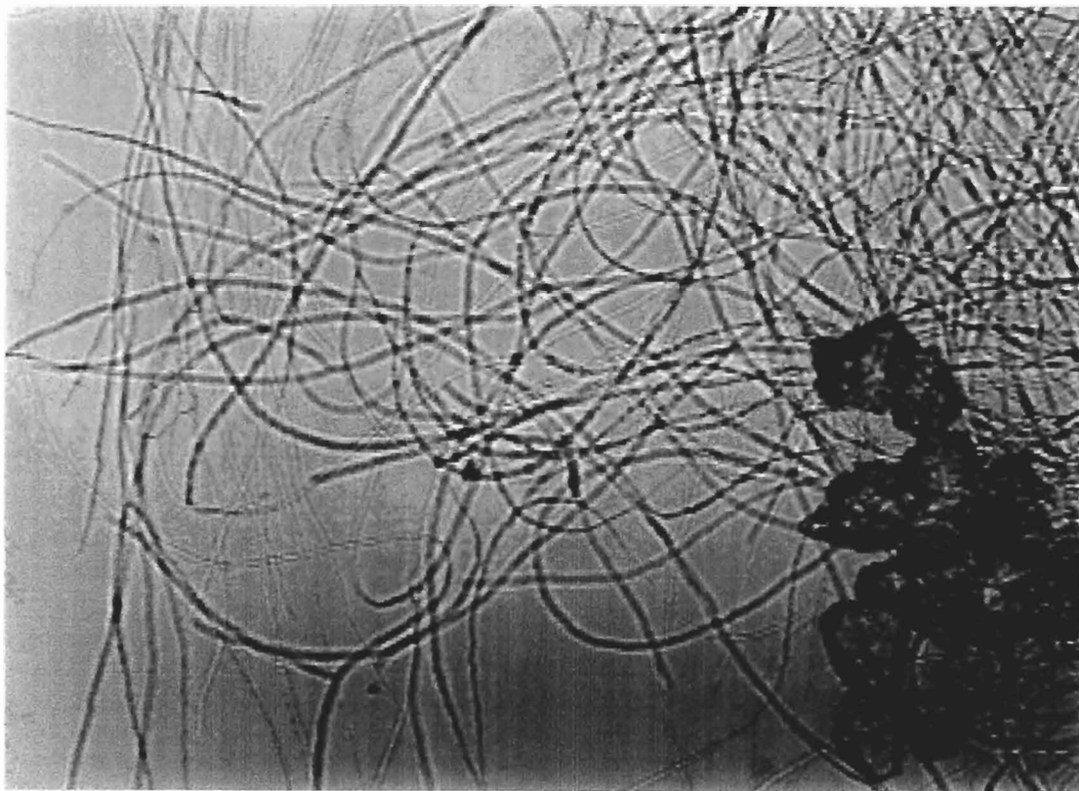


Fig. n°59 : champignon de l'échantillon témoin n°3, agr. 10 x 12,5

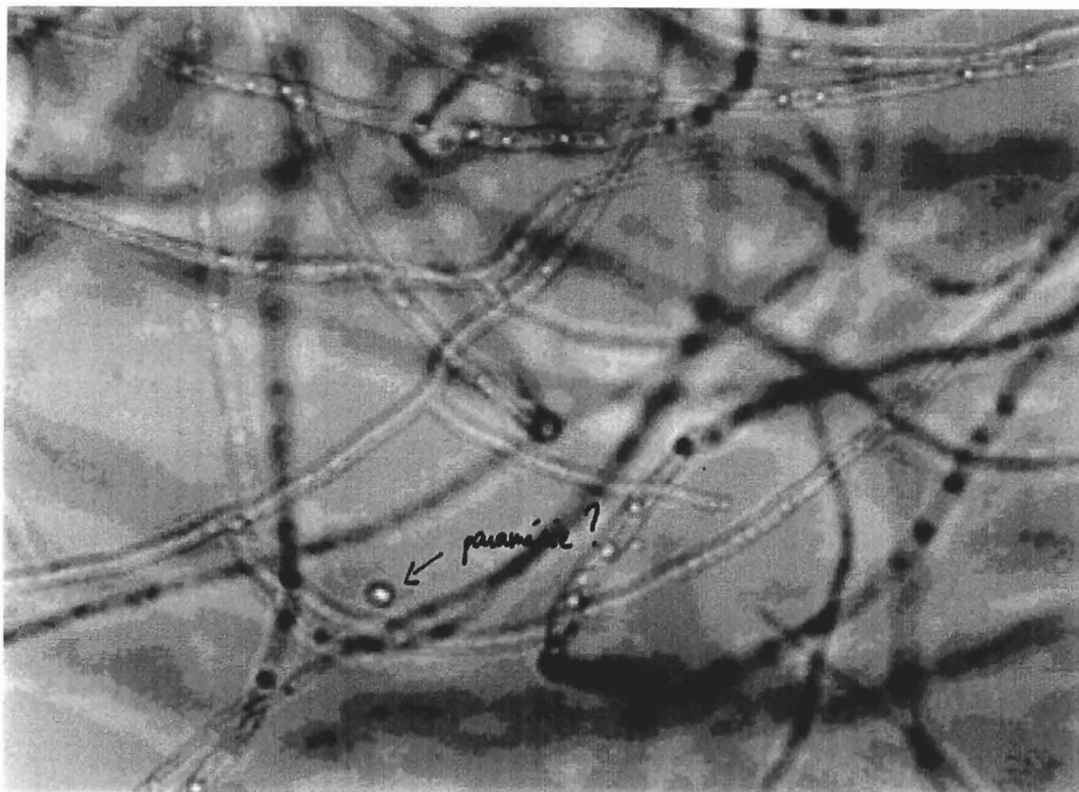


Fig. n°60 : champignon de l'échantillon témoin n°3, agr. 40 x 12,5

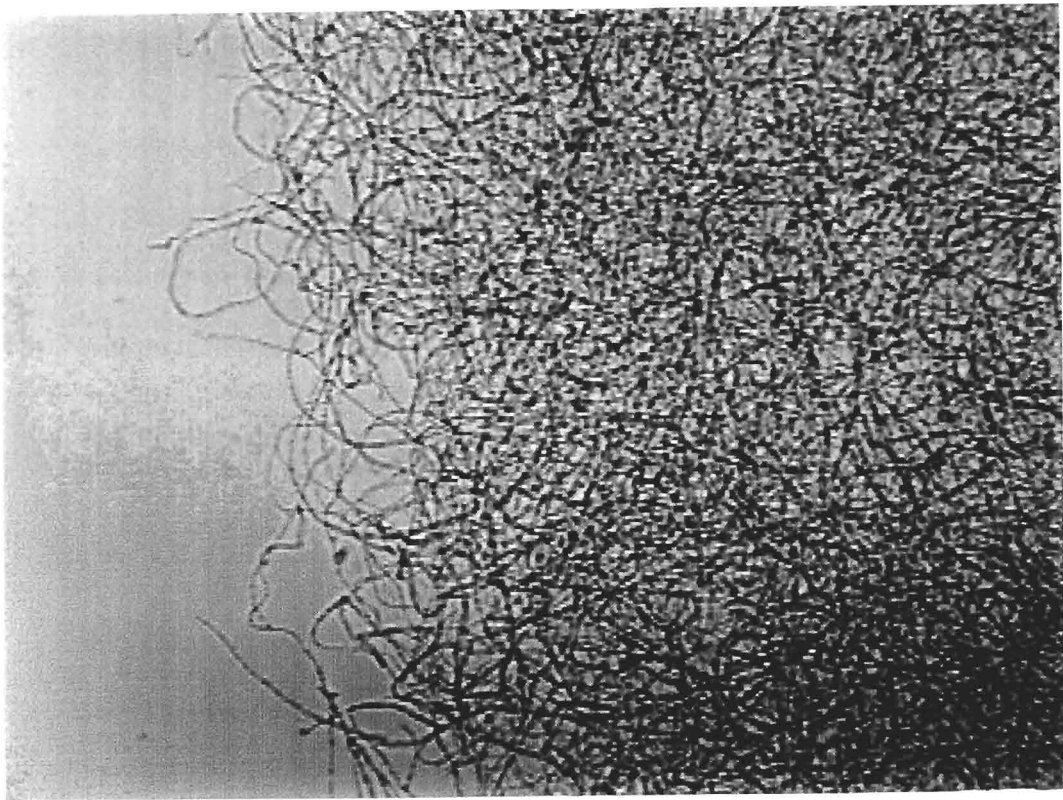


Fig. n°61 : champignon de l'échantillon témoin n°31, agr. 10 x 12,5

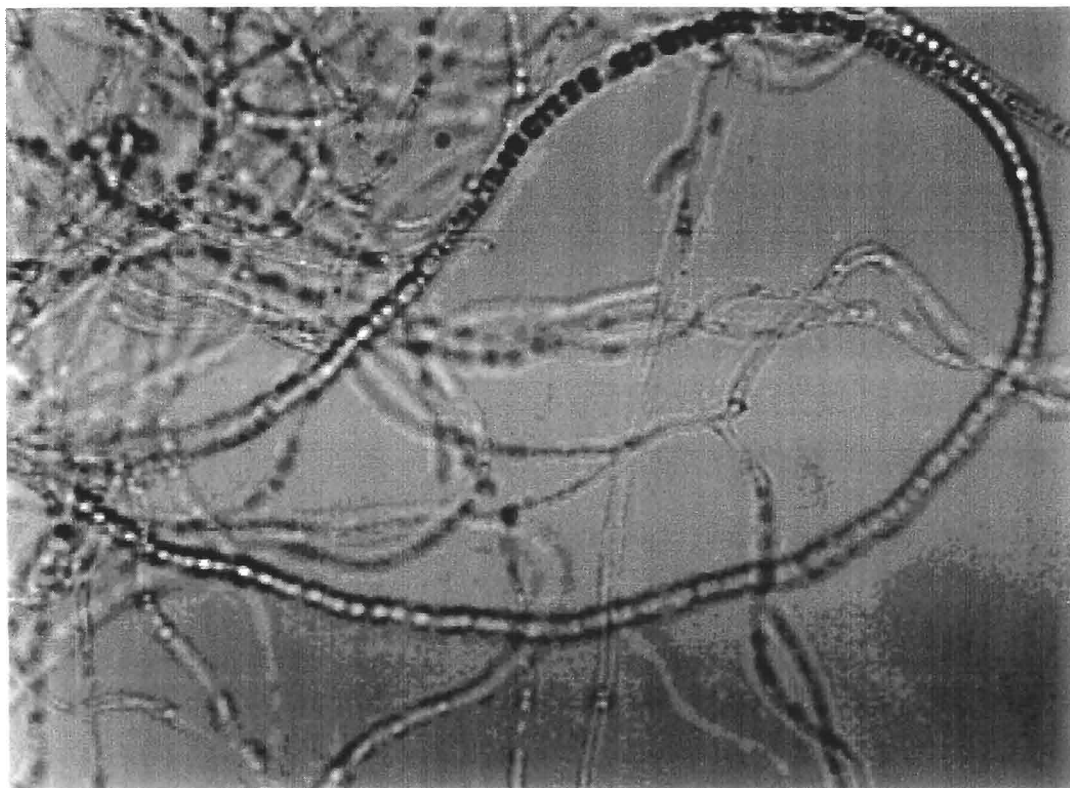


Fig. n°62 : champignon de l'échantillon témoin n°31, agr. 40 x 12,5

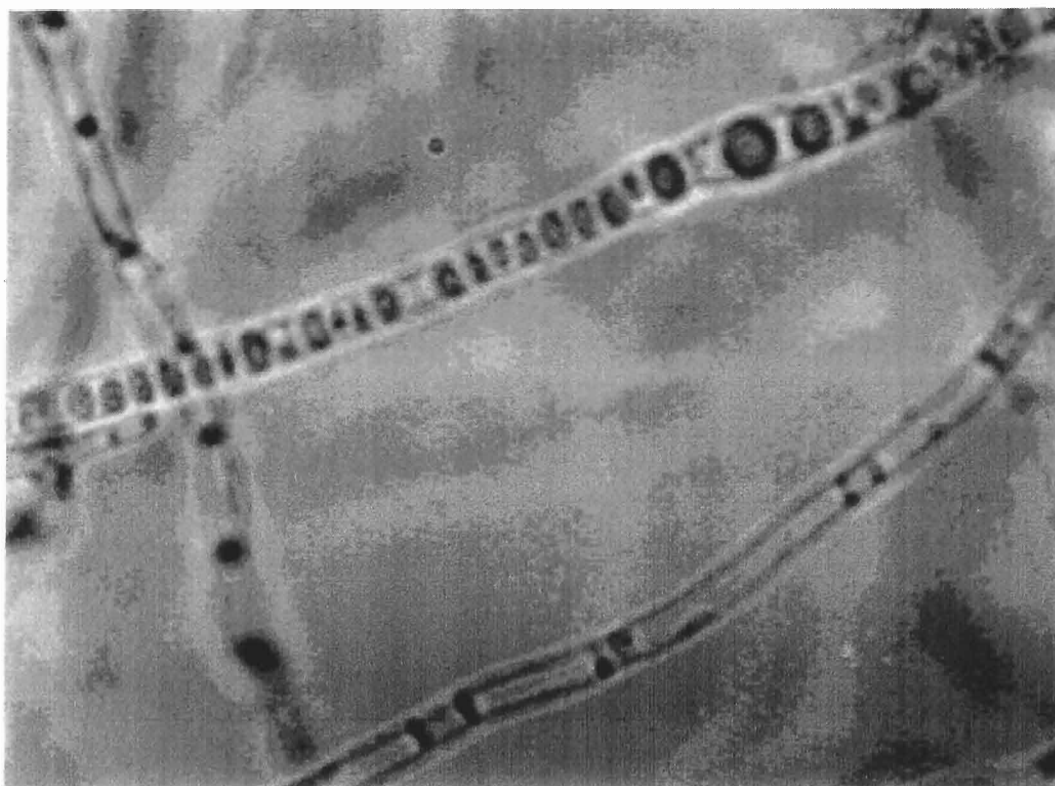


Fig. n°63 : champignon de l'échantillon témoin n°31, agr. 100 x 12,5

- Les échantillons à l'huile essentielle de Sarriette ne contiennent toujours pas de champignons vivants en croissance. Par contre il apparaît, dans plusieurs échantillons des filaments cassés aux extrémités et en train d'être dégradés par des bactéries.

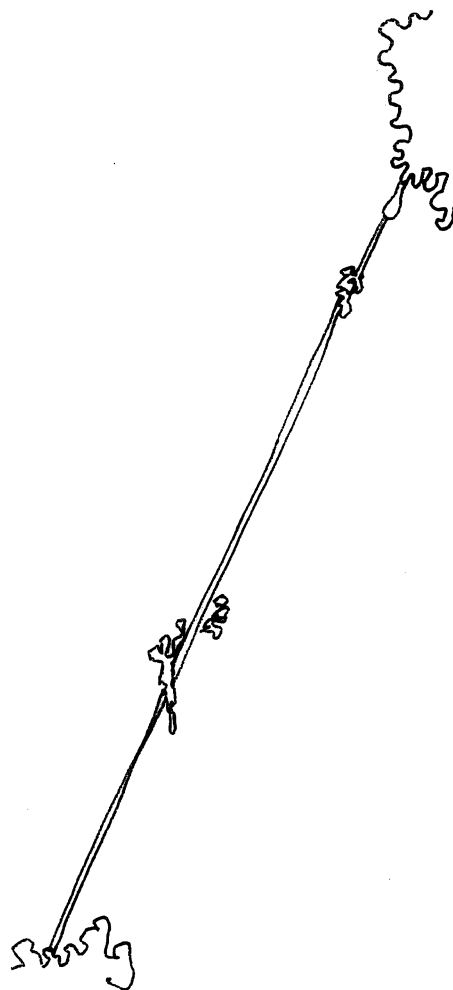
Nous nous sommes demandés s'il ne s'agissait pas de mycobactéria (chap.2, point 2.3.2), mais en regardant sous microscope plus précisément nous nous sommes aperçu qu'il s'agissait de filaments mycéliens cassés aux extrémités, donc morts et en train d'être dégradés par des bactéries (fig. n° 64 page suivante, dessin réalisé au microscope Wild M11 avec prisme méopta 10x).

Faut-il en conclure qu'il y a eu développement de champignons mais que l'huile essentielle de sarriette en a stoppé la croissance et a détruit ceux existant ?

Echantillon 6
du 05.05.00
Observé le
26.05.00

Agr 40x10

Microscope à dessin
M 11 77864

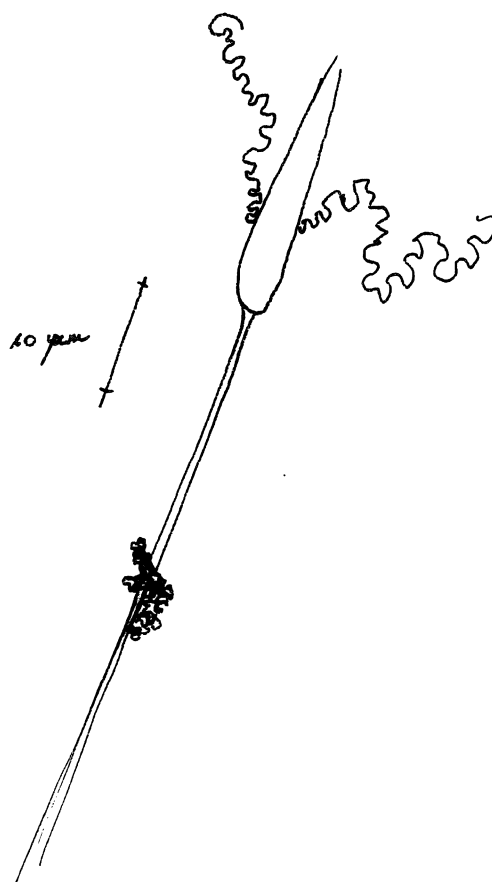


agrandissement
ci-dessous

10 µm

Echantillon 6
du 05.05.00
Observé le 26.05.00

Agr. 100x10



10 µm

-Les échantillons aux Tween 20 donnent l'impression d'avoir beaucoup plus de "débris " de bois en dépôt au fond que ceux sans tween.

Il faut donc abandonner l'idée d'émulsionner la solution avec un tensio- actif. Ce qui renforce l'idée d'employer une méthode physique pour obtenir cette émulsion.

Baisser la tension superficielle de l'eau à l'aide d'un tensio-actif a-t-elle comme effet de favoriser l'hydrolisation des couches superficielles du bois ? Si oui, il n'est pas envisageable de continuer l'emploi du Tween 20 dans un traitement conservatoire des bois archéologiques.

- | | |
|--------|---|
| 26 mai | -Nous avons toujours la présence de bactéries dans les échantillons.
-La croissance fongique dans les échantillons au laurier semble se faire au ralenti, phénomène que nous avons déjà observé l'année dernière dans les boîtes de Pétri ¹⁴¹ . |
| 30 mai | -Mise en place d'une deuxième série de bains expérimentaux identique à la première pour en vérifier les résultats. |

En résumé, après un mois d'observations, par différents procédés (6.2.8 de ce chapitre), des bains expérimentaux nous pouvons constater (tableau C):

- que les champignons poussent dans le PEG 400 à 15 % avec et sans la présence de bois,
- qu'il en est de même avec les bains expérimentaux au tween,
- que les champignons poussent dans la sarriette et le tween,
- que les champignons poussent dans le laurier avec et sans le tween, mais que cela semble pousser plus lentement dans le laurier à la dose la plus élevée.
- . que nous n'avons pas de développement fongique dans les bains expérimentaux avec la sarriette, quelque soit la dose.

Par contre dans tous les bains nous notons la présence de bactéries.

La deuxième série a été mise en place au début du mois de juin. Les résultats de la deuxième série corroborent les observations de la première série en tous points.

¹⁴¹ Rapport de cette expérience en annexe

Nous pouvons dire que 17 semaines après (pour la première série) et 13 semaines après (pour la deuxième série) il n'y a toujours pas de développement fongique dans les bains expérimentaux où nous avons testé l'huile essentielle de sarriette sans adjonction d'émulsifiant (tensio-actif).

A l'exception peut-être du bain expérimental de la sarriette à la dose la plus basse (0, 125 mg/ml) où 1 bain sur 4 est contaminé.

Dans les pages suivantes on peut voir les échantillons contaminés. En regardant bien on distingue un léger voile dans la solution. C'est ce que nous appelons développement fongique, visible à l'oeil nu.

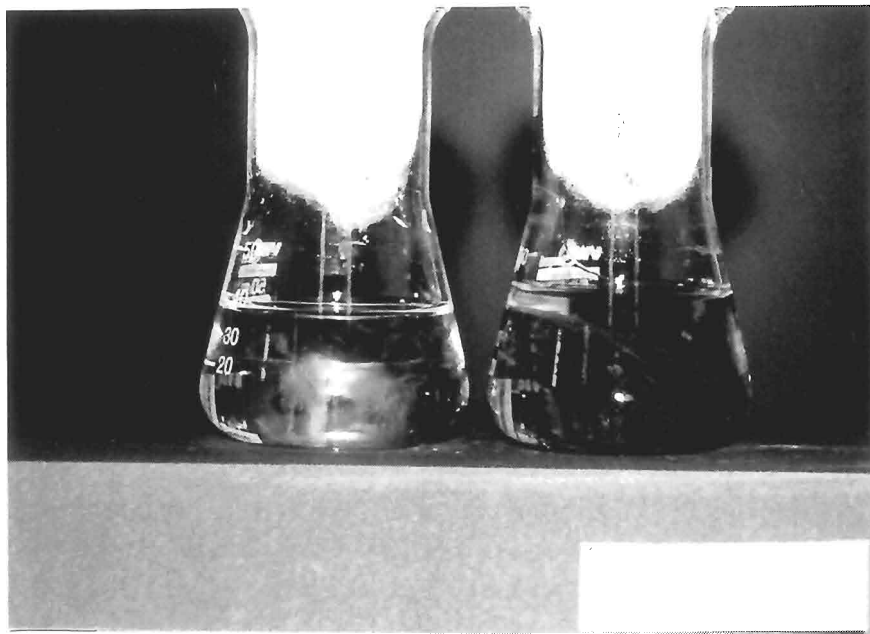
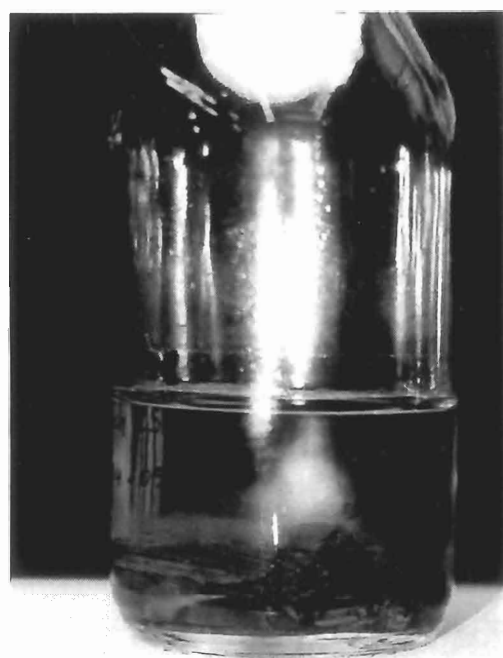


Fig. n°65 et 66 (ci-dessous) : observation à l'oeil nu des champignons présents dans les échantillons témoins n° 31, 32, 33 et 34





*Fig. n°67, 68, 69 : observation des bains à l'H.E.
de Laurier. Champignons
visibles à l'oeil nu.*



6.5- Cinquième partie : tests supplémentaires

6.5.1-Test de bactéries et champignons cellulolytiques

Il s'agit de définir si parmi les bactéries et les champignons que l'on voit dans les différents échantillons des deux séries certains sont cellulolytiques. Auquel cas ce serait dommageable pour le bois et il faudrait intervenir radicalement sur ces microorganismes.

Le principe du test est d'ensemencer les éprouvettes contenant la solution de test pour cellulolyse (6.2.2.2) avec des prélèvements issus des bains expérimentaux (première et deuxième séries) et avec des prélèvements issus des échantillons de Lausanne et Fribourg.

Les éprouvettes (milieu liquide) ne contiennent pour unique source de carbone que le papier filtre débordant le niveau liquide. Les germes cellulolytiques attaquent la fibre de papier principalement à ce niveau et finissent par l'y découper.

6.5.1.1- Réalisation du test (le 16.juin.2000)

Préparer la solution comme il est indiqué au 6.2.2.2. (fig. n°70), Stériliser les tubes avec la languette de papier filtre à l'intérieur du tube (fig. n°71).

Ensuite il vaut mieux s'installer sous une hotte à flux laminaire ce qui évite la contamination aérienne atmosphérique à l'emplacement où l'on procède à l'ensemencement des éprouvettes (fig. n°72 et 73). Pour cela on a besoin du même nombre de pipettes stériles que l'on a de prélèvements à tester.

On inocule dans chaque éprouvette un prélèvement en évitant de toucher le papier filtre. On referme l'éprouvette après avoir passé l'embout à la flamme.

Toutes les éprouvettes étant inoculées on les place dans une étuve (fig. n°74) à 27°C pendant trois semaines.



Fig. n°70 : préparation de la solution pour le test de cellulolyse.



Fig. n°71 : Stérilisation des tubes à essais avec le papier filtre avant l'ensemencement.

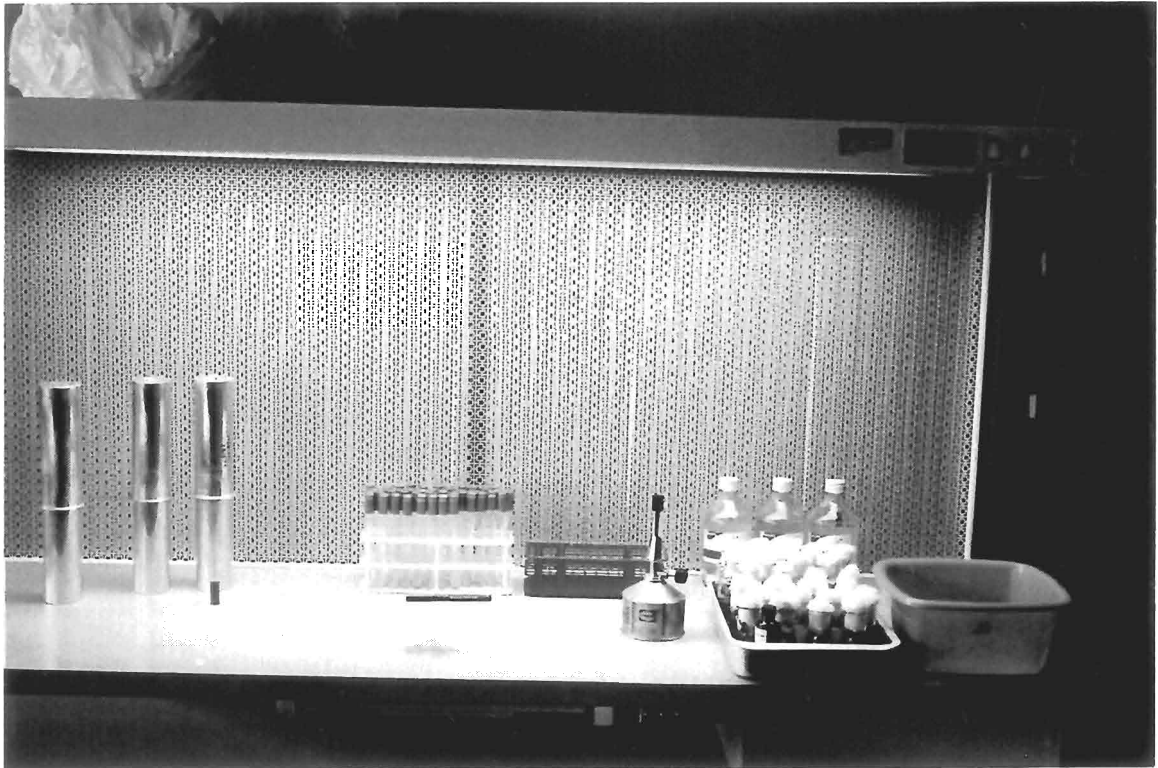


Fig. n°72 : hotte à flux laminaire, de gauche à droite : boîtes contenant les pipettes stériles, milieu de culture, porte-éprouvettes, bec bunsen pour passer l'embout de l'éprouvette à la flamme, échantillons dont on veut faire un prélèvement, bassines de récupérations des pipettes usagées.



Fig. n°73 : Extraits de bain de traitement en Provenance de Lausanne et Fribourg.



Fig. n°74 : mise à l'étuve des éprouvettes

6.5.1.2- Lecture du test

Au bout de trois semaines, on observe à l'oeil nu si il y a ou non rupture du papier filtre. Si oui c'est qu'il a été dégradé par des germes cellulolytiques, c'est donc qu'il y en a dans le bain expérimental dont est issu le prélèvement. Si non c'est qu'il n'y a pas de présence de germes cellulolytiques.

Dans le tableau suivant on voit dans la colonne de gauche d'où sont issus les prélèvements, dans la colonne du milieu une première lecture du test qui s'est fait après trois semaines d'incubation. Quant à la colonne de droite il s'agit d'une deuxième lecture du test faite au 30 août, soit près de deux mois après la première lecture.

Tableau : Lecture du test de la cellulolyse

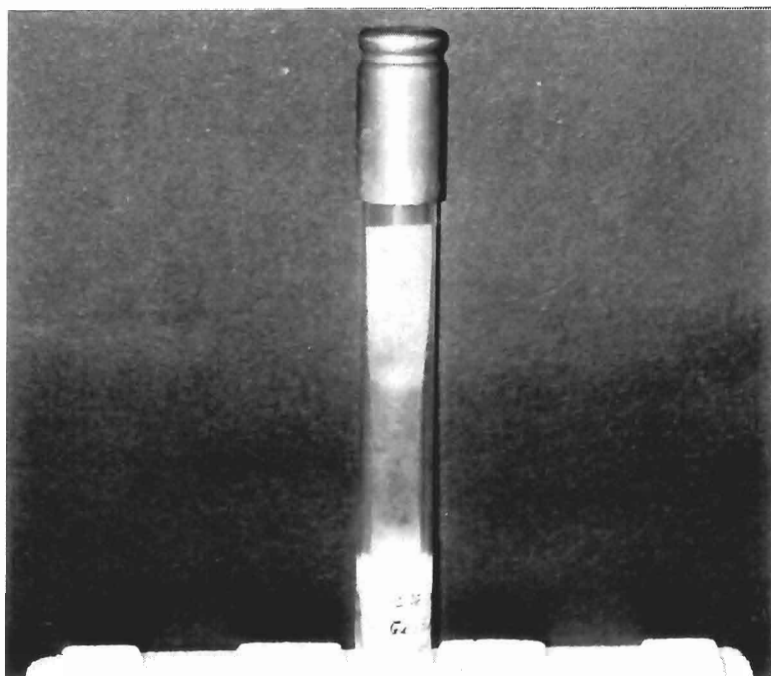
source du prélèvement	Observation au 06.07.	Obs. au 30. 08.
Fribourg	-	-
Fribourg	-	-
Lausanne 1	-	-
Lausanne 1	-	-
Lausanne 2	+	+
Lausanne 2	+	+
Lausanne 3	+	+
Lausanne 3	+	+
Ech. n°1 (témoin)	+	+
Ech. n°1 (témoin)	+	+
Ech. n°2 (témoin)	-	+
Ech. n°4 (témoin)	+	+
Ech. n°5 (Sarriette)	-	-
Ech. n°7 (Sarriette)	-	-
Ech. n°9 (Sarriette)	-	-
Ech. n°11 (Sarriette)	-	-
Ech. n°13 (Sarriette)	-	-
Ech. n°15 (Sarriette)	-	-
Ech. n°17 (Laurier)	-	+
Ech. n° 22 (Laurier)	-	-
Ech. n°24 (Laurier)	-	-
Ech. n°28 (Laurier)	-	-
Ech. n°31 (témoin)	-	-
Ech. n°32 (témoin)	-	+
Ech. n°33 (témoin)	-	+
Ech. n°34 (témoin)	+	+
Ech. n°35 (Sarriette)	-	-
Ech. n°37 (Sarriette)	-	-
Ech. n°39 (Sarriette)	-	-
Ech. n°41 (Sarriette)	-	-
Ech. n°43 (Sarriette)	-	-
Ech. n°45 (Sarriette)	-	-
Ech. n°47 (Laurier)	-	-
Ech. n°52 (Laurier)	-	-
Ech. n°54 (Laurier)	-	-
Ech. n°56 (Laurier)	-	-
Ech. n°58 (Laurier)	-	-

6.5.1.3-Interprétation des résultats

On s'aperçoit à la lecture des résultats de certaines choses. A savoir que :

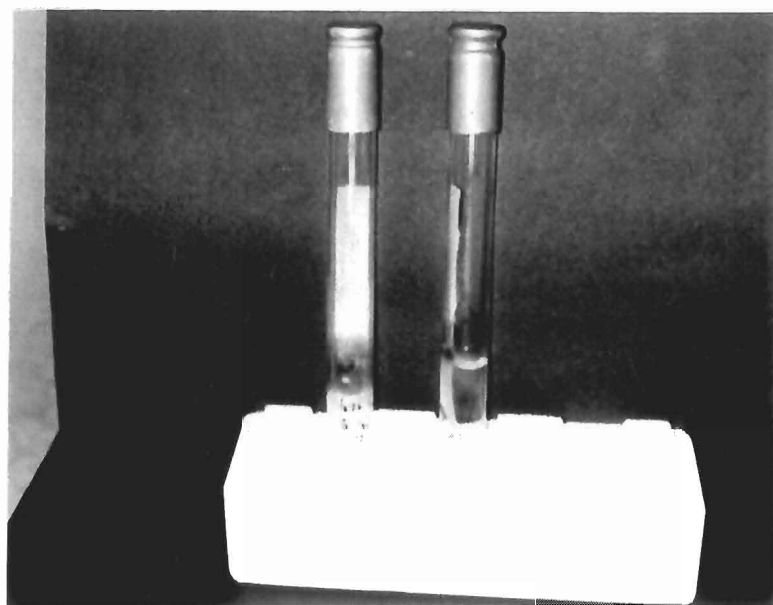
- Le plus spectaculaire est sans aucun doute le prélèvement de l'échantillon n° 4 (témoin PEG et Tween), car le papier filtre est rouge et recouvert de petits filaments (fig. n°75 ci-dessous).

Est-ce une réaction due à la présence de Tween dans l'échantillon?



- les prélèvements de Lausanne n°3 et Lausanne n° 2 montrent effectivement la croissance de champignons cellulolytiques, le papier filtre est noir, brun, déchiré et avec développement de champignons en surface de l'eau (fig. n°76, ci-dessous). Ce qui nous rappelle que le développement dans les bains de traitement des bois gorgés d'eau se situe généralement en surface.

Faut-il y voir une quelconque relation?



- On remarque aussi que dans deux prélèvements issus d'échantillons aux H.E, une goutte est venue se positionner au centre de la surface de l'eau. Ce que nous avons déjà observé pour les bains expérimentaux, plus particulièrement pour l'H.E. de sarriette. Les deux prélèvements sont issus d'échantillons ayant la même dose 0,500 + Tween 20.

Ce qui d'une part démontre que l'huile ne s'est pas entièrement volatilisée, comme on pouvait le craindre, d'autre part que même avec un agent émulsifiant il fini par y avoir dissociation. Est-ce du à une trop grande apolarité de l'huile essentielle.

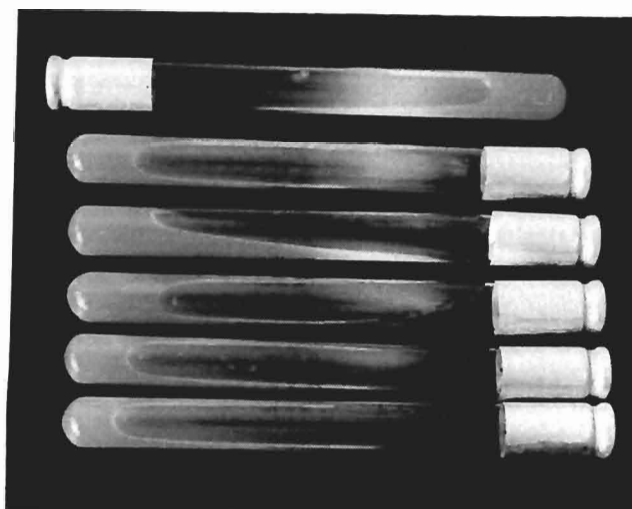
- En ouvrant l'étuve 3 semaines après la mise en place du test, nous avons pu constater une diffusion dans l'enceinte de l'étuve de l'odeur caractéristique de l'H.E. de sarriette. Puis nous avons pu constater qu'il n'y avait pas prélèvements aux H.E. positifs à la cellulolyse, même si les échantillons étaient contaminés.

On peut alors se demander une nouvelle fois si la diffusion en atmosphère n'a pas ralenti le processus. C'est pourquoi on fera une deuxième lecture (à titre indicatif) quelques semaines plus tard.

6.5.2- Cultures des microorganismes sur gélose inclinée

Nous procédons à cette mise en culture pour savoir si les microorganismes présents dans nos bains expérimentaux se cultivent facilement (nous pourrions, par la suite, réalisés des tests directs). L'observation de ce que nous obtiendrons permettra de nous donner une idée de ce qui pousse dans nos cultures.

Nous avons mis sur gélose inclinée (fig n°77, ci-dessous) dans un milieu nutritif non-sélectif : nutrient-agar des microorganismes issus de différents échantillons et contenant une pollution visible à l'oeil nu.



Quatre jours plus tard, nous pouvons observer un développement dans tous les tubes ensemencés.

Les géloses sont recouvertes de développements microbiens (fig. n°78, ci-dessous).

On observe notamment des pénicillums, des bactéries de l'air et du sol et un champignon blanc, sphérique, à l'aspect velouté.



Fig. n°78 : Quatre jours plus tard nous pouvons observer un développement dans tous les tubes. Il s'agit de bactéries et de champignons de l'air et du sol.



Fig. n° 79 : Tube de gélose inclinée ensemencé le 29.05.00 avec l'échantillon 1 bis du 05 05 00. Développement d'une bactérie de l'air (colonies fimbriées en surface de la gélose), et présence de colonies fongiques (croissance circulaire) sur la droite de l'image.



Fig. n° 80 : Tube de gélose inclinéeensemencé le 29.05.00 avec l'échantillon 7 du 09 04 00.
Développement de colonies fongiques (sur l'ensemble de la gélose).



Fig. n° 81 : Tube de gélose inclinéeensemencé le 29.05.00 avec l'échantillon 9.1 du 25 04 00.
Développement d'une bactérie de l'air (colonies fimbriées en surface de la gélose), et présence de colonies fongiques (croissance circulaire) sur la droite de l'image.

Le test nous permet de dire que les bactéries et champignons qui poussent dans nos bains expérimentaux se développent aussi sur un milieu nutritif au nutient agar. Ils sont facile à cultiver. Cela signifie que nous pourrions, lors d'un prochain travail tester sur gélose les huiles essentielles sur des colonies fongiques et bactériennes issus de nos échantillons. Cela nous permettrait également de réaliser les tests d'huiles essentielles selon une nouvelle méthode d'aromatogramme mise au point par Monsieur Jean-François Sirodeau¹⁴². Cette méthode permet non seulement de tester une quarantaine d'huiles essentielles dans le même temps, elle est rapide, simple, mais surtout, si on dispose d'une lecture chromatographique, elle définit quel est le principe actif de l'huile qui agit. On peut alors affiner notre recherche d'une huile comportant un maximum de ce ou ces principes actifs.

Savoir que les champignons se cultivent facilement nous fait envisager la possibilité d'agir curativement sur les bains alors contaminés, puisqu'ici nous ne sommes intervenus que préventivement.

¹⁴² Il m'a expliqué sa méthode par courrier. La photocopie se trouve en annexe de ce dossier

Discussion

Il y a plusieurs axes de recherches à prendre en compte et le premier, me semble-t'il, est sans doute de connaître les réactions dans le temps des produits mis en présence des huiles essentielles et ce pour répondre aux critères de réversibilité et de stabilité.

Le travail réalisé prend en compte le fait d'utiliser des huiles essentielles de manière préventive. Je n'ai à aucun moment employé ces huiles de manière curative.

C'est également un travail à envisager car il serait complémentaire du premier. Plusieurs questions me viennent à l'esprit, qui sont autant de secteurs de recherche à développer

- Lorsqu'il y a déjà des microorganismes dans un milieu, ceux-ci sont-ils plus résistants que lorsqu'ils tentent de se développer ?
- Est-ce que ce sont les mêmes huiles qui agissent ?
- Si oui, est-ce que ce sont les mêmes principes actifs qui agissent ? Si non, lesquels ?
- Si ce sont d'autres huiles qui sont efficaces pourquoi ?

Il serait aussi intéressant de cultiver sur milieu approprié les prélèvements de microorganismes provenant de Lausanne et de Fribourg, d'essayer une identification de ce qui pousse, puis des tests *in vitro* sur gélos, permettant de tester les huiles essentielles, de sélectionner celles qui donnent satisfaction.

Si l'on obtient les mêmes huiles pour des échantillons de différentes provenance cela nous donne une information supplémentaire. Si la sélection montre que ce sont des huiles différentes qui agissent d'un échantillon à l'autre alors il faudra envisager un "cocktail" d'huiles essentielles afin d'augmenter le spectre d'efficacité.

Il faudrait pouvoir définir une dose minimale curative, d'urgence en quelque sorte.

On peut dès lors envisager la possibilité de mettre sur pied un protocole de test, simple à utiliser et à lire, afin que les restaurateurs eux-mêmes, face à une prolifération subite puissent intervenir rapidement et efficacement. Si nous voulons pousser plus loin les recherches concernant l'utilisation des huiles essentielles pour leur activité antifongique et bactéricide nous devons mettre en place plusieurs pistes de recherches. Je vois déjà deux grands secteurs d'application qui sont différents mais complémentaires : à savoir :

-l'action préventive, l'action curative.

Car nous pouvons agir de manière très efficace et très rapide avec les huiles. Leurs propriétés anti-microbiennes sont efficaces 15 à 30 minutes après leur application.

On pourrait aussi envisager une sélection d'huiles essentielles pour leur activité anti-microbiennes

non plus seulement sur la croissance du thalle mais aussi pour les différents stades évolutifs de champignons maturité des conidies, dormance, germination, croissance du thalle et enfin sporulation¹⁴³

Il à été démontré que beaucoup de produits utilisés lors des traitements de conservation-restauration des objets archéologiques initiaient la croissance des spores conidiens¹⁴⁴. On est en droit de se demander comment les produits que l'on utilise, car stables chimiquement, agissent sur cette croissance ?

En fait, c'est assez simple : les produits sus-mentionnés augmentent la perméabilité et la mouillabilité des conidies, leur permettant ainsi d'engranger de l'eau et des nutriments nécessaire à leur respiration et au démarrage du cycle de croissance. D'où l'idée d'employer ces produits associés aux huiles essentielles pour en faire un cheval de Troie.

Si nous voulons développer l'emploi des huiles essentielles pour d'autres matériaux que le bois , c'est le protocole entier qui est à revoir car chaque matériau et chaque traitement qui l'accompagne change les paramètres et les données. Nous ne pouvons alors pas appliquer une recette estimant que celle-ci marchera pour tout. Ainsi la lutte contre le développement bactérien sur les métaux pose en premier lieu le problème de l'oxydation des essences au contact du métal et principalement la dégradation des phénols en contact avec le fer.

Certes, il existe des anti-oxygènes que l'on pourrait employer mais ils modifient les principes actifs des essences et c'est seulement sur la base de nombreux essais et sans généralisation que l'on peut trouver une solution¹⁴⁵ . Résoudre ce premier point permettra d'envisager une suite de la recherche ou son abandon.

¹⁴³ Florian E. M.-L., 1993, p 868

¹⁴⁴ Florian E. M.-L., 1993, p 869

¹⁴⁵ Naves Y.R., 1949, p 497

Conclusion

Devant l'ampleur de la tâche nous sommes restés très humbles.

J'ai donc pour l'instant juste montré qu'il était possible d'employer certaines huiles essentielles pures pour lutter contre les champignons qui se développent dans les bains de traitement des bois gorgés d'eau. Par contre les bactéries continuent de proliférer.

Cela peut paraître peu de travail mais six mois sont très vite passés lorsqu'il faut en même temps cerner une nouvelle méthode thérapeutique, trouver la bonne manière de l'appliquer, synthétiser la littérature, analyser les résultats obtenus, dégager les priorités, et inscrire ce travail dans une démarche plus globale de "recherche" tout en restant proche du quotidien du restaurateur.

La mise au point d'un protocole pour tester les huiles n'a pas été sans mal.

Nous avons dû plusieurs fois nous adapter en fonction des conditions particulières que sont les traitements des bois archéologiques. Nous ne pouvons pas toujours appliquer les méthodes employées en microbiologie, car des facteurs particuliers comme la nature du bois archéologique, la présence de PEG dans les échantillons, le caractère lipophile* des Huiles Essentielles, font que nous sommes obligés de trouver une méthodologie différente à celles indiquer dans les manuels d'aromathérapie

Bien entendu, nous espérons tous voir un jour une panacée, un produit miracle qui nous enlèverait beaucoup de soucis. Personnellement, je ne pense pas que cela puisse un jour être le cas.

Nous avons ou pouvons avoir à notre disposition tout un arsenal de méthodes tant physiques que chimiques, différentes et/ou complémentaires, qui chacune employée à bon escient peut servir notre cause.

Abrassart Jean-Louis.

Aromathérapie essentielle

Guy Trédaniel, Paris, 1997

Aragno Michel

Travaux pratiques de microbiologie générale

Université de Neuchâtel, Laboratoire de microbiologie, 1993, p 59, annexe 9 - 10

Arnaud Paul

Chimie organique, cours

Premier cycle universitaire, 16° edition, Dunod, Paris, 1996, pp 409-430

Baudoux Dominique

2000 ans de découvertes aromathériques pour une médecine d'avenir

D. Baudoux, pharmacien aromatologue, Belgique, 1997

Belaiche Paul

Traité de phytothérapie et aromathérapie, Tome 1 : l'aromatogramme

Maloine S.A. Editeur, 1979, Paris

Blanchette R.A., Cease K.R., Abad A.R., Sams G., Simpson E, Koestler R.J.

An Evaluation of different forms of deterioration found in archaeological wood

International Biodeterioration 28 (1991) , Elsevier science publishers Ltd., pp. 3-22

Blanchette R.A., Cease K.R., Abad A.R., Sams G., Simpson E, Koestler R.J.

Biodeterioration of archaeological wood

Biodeterioration and biodegradation 8, ed. by H.W. Rossmore, Elsevier Science publishers Ltd., 1991, pp. 385-388

Butterfield F.J

The potential long-term effects of gamma irradiation on paper

Studies in conservation, 32, 4, 1987, pp 181-191

Cloete T.E., Brozel V.S.

Microbial resistance to conventional microbicides

Biodeterioration and biodegradation 8, edited by H.W. Rossmore, Elsevier Science publishers Ltd., 1991, 501

Colombini Maria Perla, Modugno Francesca, Silvano Flora, Onor Massimo,

Characterization of the balm of an egyptian mummy from the seventh century B.C.

Studies in conservation 45 (2000), 19-29 (received september 1998)

Cronyn J.M.

The elements of archaeological conservation

Routledge, london, 1990, pp 238-261

Desnottes Jean-François

Quels antibactérien pour après-demain?

La recherche, n°314, Novembre 1998

Encyclopaedia Universalis France

Recherches effectuées sous : "Bactéries":

CD-Rom, 1998

Faure Paul

Parfums et aromates de l'Antiquité

Editions Fayard, collection Pluriel, 1987, pp 118-124; 174-178;

Flieder Françoise , Capderou Christine

Sauvegarde des collections du patrimoine : la lutte contre les détériorations biologiques

CNRS Editions , 1999.

Florian E. M.-L.

Conidial fungi (mould) activity on artifact materials. a new look at prevention, control, and eradication

ICOM Committee for Conservation, 1993, vol.II, pp 868-874

Guiraud P., Guyod B., Steiman R., Tran Q.K.

Fungistatic and fungicidal action of six biocides applied in the traitement of contaminated archaeologic wood

Cryptogamie Mycologie n°18, (2), 1997, 147-156,

Henry F., Lopes I., Bendjilali C.,Morteau S.

Encapsulation d'huiles essentielles antifongiques pour la protection des oeuvres d'art, in, La conservation : une science en évolution; bilans et perspectives.

Actes des troisièmes journées internationales d'études de l'ARSAG., Paris 21-25 Aril 1997, p 225--236

I.N.S.A

Label H.E.B.B.D.: une indispensable garantie de qualité pour les substances aromatiques

Les cahiers de l'aromathérapie, Editions Jakin, n°1, Septembre 1995

Kaiser Paul

Eléments de bactériologie appliquée, in, Patrimoine culturel et altérations biologiques, actes des journées d'études de la SFICC

Section Française de l'Institut International de Conservation, 17 et 18 Novembre 1988, pp 27-43

La Baume Sylvia (de)

Les matériaux organiques, in, La conservation en archéologie.

Edition Masson, 1990, pp. 223-270

Leightley L.E.

Present and future challenges for the development of industrial biocides

Biodeterioration and biodegradation 8, edited by H.W. Rossmore, Elsevier Science publishers Ltd., 1991, 497-498

McEntee T.C.

Government regulation of biocides (Microbicides)

Biodeterioration and biodegradation 8, edited by H.W. Rossmore, Elsevier Science publishers Ltd., 1991, 510-512

Morel philippe, Hug Béat

Découverte d'un crâne tardiglaciaire de rhinocéros laineux dans le lac de Neuchâtel, paléontologie et conservation

Bulletin de la société Neuchâteloise des sciences naturelles, n° 119, 1996, 101-110,

Mühlethaler Bruno

Conservation of waterlogged wood and wet leather

Editions Eyrolles, Paris, 1973

Nakamiya Kunichika, Ooi Toshihiko, Kinoshita Shinichi

Degradation of synthetic ater-soluble polymers by hydroquinone peroxydase

Journal of fermentation and bioengineering, vol 84, n°3, 213-218, 1997

Naves Yves-René

Les huiles essentielles, in, Traité de chimie organique tome XVI, sous la direction de V. Grignard, G Dupont et R. Locquin

Masson et Cie, editeurs, Paris, p 467- 546

Nilsson Thomas

Microbial degradation of wood. an overview with special emphasis on waterlogged wood.

Actes de la 7ème Conférence du groupe de travail Matériaux Archéologiques Organiques humides de L'ICOM-CC, Grenoble, 1998, 65-70

Otal E., Mantzavinos D., Delgado M. V., Hellenbrand R., Lebrato J., Metcalfe I., Livingston A.G.

Integrated wet air oxydation and biological treatment of polyethylene glycol-containing wastewaters

Journal Chem. Technol. Biotechnol., 1997, 70, 147-156

Pantillon Jean, Mairé Jacques-André, Straub François

Travaux pratiques de Microbiologie

Gymnase Cantonal, La chaux-de-Fonds, 1995

Pavon-Flores S.C

Gamma radiation as fungicide and its effect on paper.

Bulletin of the American Institute for Conservation, 16, 1975, pp 15-44

Pellecuer Jacques

Pouvoir Antimicrobien des huiles essentielles et ses applications

Document interne, Faculté de pharmacie de Montpellier, France

Pelt J.M., Mazoyer M., Monod T., Girardon J.

La plus belle histoire des plantes, les racines de notre vie

Editions du Seuil, Paris, 1999

Pochon J., Tardieux P.

Techniques d'analyse en microbiologie du sol

Editions de la Tourelle, Issoudun, 1962, pp.

Potel-Jehl J.D

L'usage des plantes aromatiques dans le temps. in, Le devenir des plantes utiles

Bulletin de la société Industrielle de Mulhouse, Numéro 4, 1990

Rakotonirainy M., Fohrer F., Flieder F.,

Recherches de fongicides thermonébulisables pour la désinfection des aires de stockage et des surfaces. in, La conservation : une science en évolution; bilans et perspectives.

Actes des troisièmes journées internationales d'études de l'ARSAG., Paris 21-25 Aril 1997, p 218-224

Rakotonirainy Malalanirina

La dégradation fongique dans les réserves d'archives et de bibliothèques : isolement et identification des espèces.

Centre de recherches sur la conservation des documents graphiques,
[www. culture fr./culture/conservations/fr/cours](http://www.culture.fr/culture/conservations/fr/cours), 1997

Rayner A.D.M., Boddy Lynne

Fungal decomposition of wood. its biology and ecology

ed. John Wiley & Sons Ltd., 1988, 472- 473

Rolland Xavier et laurence

Bactéries, virus et champignons

Dominos, Flammarion, Paris, 1997

Roman Agnès

Etude des facteurs de biodégradation des bois gorgés d'eau durant leur traitement de conservation. rapport de stage du 3 juillet au 31 août.

Commissariat à l'énergie atomique, Office des rayonnements ionisants, 1989

Roquebert Marie-France

Les moisissures: nature, biologie et contamination

[www. culture fr./culture/conservations/fr/cours](http://www.culture.fr/culture/conservations/fr/cours), 1997

Roquebert Marie-France

Admirables et redoutables moisissures. in, Patrimoine culturel et altérations biologiques, actes des journées d'études de la SFICC

Section Française de l'Institut International de Conservation, 17 et 18 Novembre 1988, pp 15-26

Sallé Jean-luc

Les huiles essentielles. synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie

Editions Frison-Roche, Paris, 1991

Schleper Christa

Les archaeobactéries sont parmi nous

Revue "La Recherche", février 1999, N°317.

Schoch Werner

Cours d'anatomie du bois , initiation à la détermination des bois indigènes

Support de cours donné par Monsieur SCHOCH, Octobre 1999.

Soulier Jean-Marc

Analyse et contrôle des huiles essentielles. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

Les cahiers de l'aromathérapie, Editions Jakin, n°1, Septembre 1995

Soulier Jean-Marc

Le genre Thymus, botanique des Thymus, les différentes espèces et spécificités biochimiques de Thymus

Les cahiers de l'aromathérapie, Editions Jakin, n°1, Septembre 1995

Soulier Jean-Marc, Jahu Corinne

Etude de deux familles biochimiques: Phénols et Monoterpénols

Les cahiers de l'aromathérapie, Editions Jakin, n°1, Septembre 1995

Strang Thomas J.K., John E. Dawson

Le contrôle des moisissures dans les musées

Bulletin technique n°12, Institut Canadien de conservation, 1991

Trieu-Cuot, Poyart Claire

Visite guidée au coeur de l'arsenal bactérien

La recherche, n°314, Novembre 1998

Walters Clare

Aromathérapie, le guide du bien-être

Könemann, Cologne, 1998

Annexes

Annexe 1 : document de Monsieur Pellecuer

Annexe 2 : Indice Aromatique

Annexe 3 : Document de Monsieur Sirodeau

Annexe 4 : rapport de microbiologie

Annexe 5 : Echantillons d'huiles essentielles.

Annexe 1 : document de Monsieur Pellecuer

POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES ET SES APPLICATIONS

par Jacques PELLECUER

*. Professeur de Pharmacognosie
à la Faculté de Pharmacie de Montpellier*

*. Responsable de l'Enseignement européen
de Phytothérapie et de Plantes Médicinales
à l'Université de Montpellier I - France -*

Depuis plusieurs années nous nous intéressons à la Faculté de Pharmacie de Montpellier, aux huiles essentielles et à leurs pouvoirs antimicrobiens. Le choix de cette orientation de recherche a été motivé par plusieurs raisons :

— tout d'abord parce que l'école montpelliéraine s'est toujours penchée sur ce genre de thérapeutique ;

— ensuite parce que Montpellier étant situé géographiquement au centre d'une région riche en plantes aromatiques, nous sommes, à notre avis, bien placés pour étudier l'activité antibactérienne et antifongique des essences en fonction de la biologie des espèces végétales ;

— enfin, parce que les huiles essentielles ont une place importante à tenir dans la phytothérapie moderne. N'oublions pas que le terme d'Aromathérapie a été forgé par GATTEFOSSÉ [1] pour désigner le traitement des maladies par les essences.

TECHNIQUES D'ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES [2, 3]

A l'heure actuelle l'activité antimicrobienne d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

Comparaison des méthodes classiques

La comparaison des résultats donnés par les méthodes les plus utilisées ces dernières années [4, 5, 6, 7] montre une grande diversité de mesure du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.

.../...

Le tableau I comparatif suivant illustre cette diversité dans les résultats, avec pour essence testée une essence de Thym du commerce.

TABLEAU I

Comparaison de quelques méthodes classiques de mesure
du pouvoir antibactérien

Germes test : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Techniques en milieu solide			Techniques en milieu liquide	
	Méthode des disques	Méthodes des dilutions dans l'alcool		Méthode des disques	Méthodes des dilutions dans l'alcool
		Ensemencement en surface	Ensemencement dans la masse		
Substances anti-bactériennes					
Phénol	31	1/250	1/250	1/500	1/500
Formol	84	1/16 000	1/16 000	1/16 000	1/16 000
Essence de Thym	42	1/1 000	1/1 000	1/1 600	1/800
Germe test : <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536					
Substances anti-bactériennes					
Phénol	42	1/500	1/500	1/500	1/1 000
Formol	80	1/16 000	1/16 000	1/4 000	1/8 000
Essence de Thym	41	1/1 000	1/1 000	1/800	1/3 000
	Zone d'inhibition en mm	Dose active en mg/ml			

Pour deux produits différents et pour un même germe, une méthode peut donner des activités antibactériennes identiques alors qu'une autre méthode donne des résultats différents. C'est le cas du phénol et de l'essence de Thym vis-à-vis d'*Escherichia coli*. En effet, dans la technique en milieu solide la méthode des disques indique une zone d'inhibition identique (42 mm et 41 mm) alors que dans la technique en milieu liquide, la méthode des dilutions dans l'alcool donne des résultats très différents (1/1 000 pour le phénol et 1/3 000 pour l'essence de Thym).

Enfin, nous remarquons une discordance des résultats quant à la sensibilité d'un germe vis-à-vis d'un même produit suivant les méthodes utilisées. C'est ainsi que pour la technique en milieu liquide, la méthode des disques indique que l'essence de Thym est plus active sur *Staphylococcus aureus* que sur *Escherichia coli* (1/1 600 pour le staphylocoque et 1/1 800 pour le colibacille). Alors que c'est l'inverse avec la méthode des dilutions dans l'alcool (1/800 pour le staphylocoque et 1/3 000 pour le colibacille).

Cette non équivalence dans les résultats rend donc inexacte toute comparaison et imprécise toute référence.

Certes, cette diversité de résultats provient de la différence qui existe entre les nombreuses techniques utilisées, mais surtout de l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, donc dans les milieux de cultures microbiennes.

Il était alors permis de penser que les différences obtenues dans les résultats pouvaient provenir des variations de surface de contact entre germes et produits à tester.

En effet, la dispersion de l'essence dans le milieu de culture doit être maximale, homogène, stable et constante pendant toute la durée de l'expérimentation.

C'est dans ce but que l'équipe montpelliéraine a mis au point une technique reproductible, précise dans ses résultats et de sensibilité maximale, à partir d'essais effectués sur cette même essence commerciale de Thym.

Nous utilisons pour cela l'essence sous forme d'émulsions afin d'obtenir dans le milieu de culture une répartition homogène de l'essence à l'état dispersé et en augmentant au maximum le contact germe/essence. Pour obtenir ces émulsions on peut tout d'abord s'adresser à des émulsionnants.

Choix des émulsionnants

Il a été sélectionné un certain nombre d'émulsionnants en tenant compte, certes, de leur balance hydrophile-lipophile (comprise entre 8 et 18), mais également des 2 critères suivants :

- qu'ils soient inertes : c'est-à-dire dépourvus de toute action inhibitrice ou stimulante sur le développement des germes ;
- qu'ils soient chimiquement stables donc dépourvus de toute interaction chimique avec les composants de l'essence.

Parmi les émulsionnants non ioniques utilisables, les groupes Mirj, Span et Tween semblent les plus indiqués. Cependant, seuls le Tween 80 et surtout le Tween 20 ont donné les meilleurs résultats.

Test de l'émulsion

Pour réaliser l'émulsion, le mélange huile essentielle-Tween-eau de dilution est soumis aux ultra-sons à la fréquence de 20 kb/s pendant 5 minutes. L'analyse de la taille des particules est faite au Compteur Coulter.

Les qualités de l'émulsion, c'est-à-dire sa stabilité, la finesse des particules et leur répartition, nous permettent d'appliquer aux huiles essentielles les techniques bactériologiques classiques aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide.

TABLEAU II

Mesure du pouvoir antibactérien d'une essence de Thym
par différentes méthodes bactériologiques

	Méthode des disques	Milieu liquide		Milieu solide	
		Méthode des dilutions	Essence + émulsionnant	Méthode des dilutions dans l'alcool	Essence + émulsionnant
<i>Escherichia coli</i>	1/800	1/3 000	1/4 000	1/1 000	1/4 000
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/1 600	1/800	1/6 000	1/1 000	1/6 000
Dose active en mg/ml					

Le tableau II nous montre pour l'essence de Thym, d'une part, la similitude des résultats lorsque l'on utilise l'émulsionnant et la discordance des mesures avec les autres méthodes, et d'autre part, que notre technique assure grâce à la finesse des particules dispersées une activité maximale du produit (1/4 000 pour *Escherichia coli* au lieu de 1/800).

Lorsque les mesures d'activité sont réalisées en milieu solide, nous avons vu par ailleurs que la seule utilisation des ultra-sons, en l'absence d'émulsionnants, donne aussi les meilleurs résultats.

ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DE CERTAINES HUILES ESSENTIELLES

L'étude du pouvoir antimicrobien d'un certain nombre d'essences végétales a été réalisée sur une trentaine d'espèces* aromatiques de l'embranchement botanique des Phanérogames. L'ordre des lamiales s'est révélé riche en espèces douées de propriétés antibactériennes et antifongiques.

Nous avons alors sélectionné un certain nombre de plantes, bien entendu en fonction de leur activité, mais aussi en considérant un aspect plus pratique de la question, celui, par exemple, d'une utilisation possible de l'essence dans des domaines divers : médico-pharmaceutique, alimentaire, cosmétologique... et en fonction de notre situation géographique, le midi-méditerranéen étant spécifiquement riche en lamiales.

En consultant le catalogue des spécialités pharmaceutiques, nous avons constaté que parmi les essences de Labiées, celles de Thym et de Lavande sont de beaucoup les plus utilisées. Il nous a donc semblé intéressant de tester comparativement le pouvoir antimicrobien des essences de toutes les autres Labiées sous-frutescentes de notre garrigue montpelliéraine, à savoir les essences d'Aspic (*Lavandula latifolia* Vill.), de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et de Sarriette des montagnes (*Satureia montana* L.).

Ce choix d'essences a été également guidé par le fait que ces plantes sous-frutescentes, dans le cas de leur mise en culture, peuvent être facilement récoltées par des techniques de mécanisation mises au point en Haute-Provence pour la récolte du Lavandin.

En ce qui concerne la détermination de leur pouvoir antimicrobien, nous avons recherché par la technique en milieu solide les concentrations minimales inhibitrices de ces essences sur un large éventail de souches bactériennes et de Fungi [8].

Les tableaux suivants donnent respectivement les concentrations minimales inhibitrices exprimées en mg d'essence par millilitre.

Il apparaît sur le tableau III que l'essence de Sarriette et celle de Thym agissent suivant les germes à des concentrations de l'ordre de 0,500 mg à 0,125 mg par millilitre, ce qui correspond à des dilutions au 1/2 000 et au 1/8 000. Alors que les Lavandes et le Romarin agissent à des concentrations de l'ordre de 2 mg par millilitre, ce qui ne correspond qu'à une dilution au 1/500.

(*) Essences testées : Aspic, Bergamote, Bouleau, Cajepout, Cannelle, Cédra, Cèdre, Citron, Cyprès, Eucalyptol, Eucalyptus, Eujenol, Fenouil, Géranium, Girofle, Marjolaine, Menthe, Niaouli, Pin, Romarin. Santal, Serpolet, Verveine, Thym, Sarriette, Lavande. Lavandin.

TABLEAU III

Spectre antibactérien des huiles essentielles
de quelques Labiées sous-frutescentes méditerranéennes

Germes testés	Origine des germes	Dose active en mg/ml					<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
		<i>Satureia montana</i> L.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Lavandula vera</i> D.C.	<i>Lavandula latifolia</i> Vill.	<i>Lavandin</i>	
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10240	0,125	0,250	2	2	2	1,250
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	0,125	0,500	1	1	1	1,250
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	0,125	0,500	1	0,500	1	1,250
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	0,125	0,500	1	1	0,500	2,500
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ..	ATCC 4617	0,125	0,250	2	2	1	2,500
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	0,125	0,500	0,500	0,500	1	2,500
<i>Neisseria catarrhalis</i>	IPA 151	0,125	0,125	0,250	0,500	0,250	1,250
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	IPA 105	0,125	0,125	1	1	1	1,250
<i>Haemophilus influenzae</i> ...	IP 5293	0,125	1	2	1	2	2,500
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 10537	0,250	1	2	2	2	1,250
<i>Staphylococcus epidermitis</i> .	ATCC 12228	0,250	0,500	2	2	2	1,250
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IP 5650	0,250	0,250	2	2	2	0,625
<i>Neisseria flava</i>	IP 52182	0,250	0,500	0,500	1	1	1,250
<i>Moraxella glucidolytica</i> ...	IP 54147	0,500	1	2	2	2	2,500

Pour une étude comparative d'ordre plus pragmatique, nous avons réalisé un spectre antibactérien de ces essences sur une sélection de staphylocoques sauvages provenant du Centre Hospitalier Universitaire de notre région (pus d'abcès, d'anthrax, de furoncles, de suppuration buccale, d'abcès dentaire, de cystite).

Le tableau IV montre que dans tous les cas l'essence de Sarriette a une action de 2 à 20 fois supérieure à celle des autres essences testées dans les mêmes conditions.

Enfin, le tableau V met en évidence l'action de ces mêmes essences sur un certain nombre de souches fongiques responsables de mycoses cutanées digestives ou respiratoires.

L'analyse de ce spectre montre une nette supériorité de l'essence de Sarriette sur toutes les essences testées.

ETUDE APPROFONDIE DE DEUX HUILES ESSENTIELLES

Nous avons voulu aller plus loin dans l'étude des huiles essentielles en reliant l'action antibactérienne de l'essence à la biologie de la plante.

Nous avons pour cela choisi les plantes dont les essences se sont révélées les plus actives sur les germes testés, en l'occurrence la Sarriette des montagnes et le Thym.

Etude de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

Le Thym est une espèce dont l'essence a une composition qualitative fixe mais une composition quantitative extrêmement variable.

Les travaux de J. PASSET [9] l'ont conduit à définir chez *Thymus vulgaris* L., 6 chémotypes caractérisés par la présence quasi exclusive d'un seul constituant ou par la prépondérance d'un groupe de composés qui semblent biogénétiquement liés.

1. Chémotype GERANIOL : 85 à 93 p. 100 de Géraniol et acétate de Géranyle.
2. Chémotype LINALOL : 90 à 98 p. 100 de linalol et acétate de linalyle.
3. Chémotype α -TERPINEOL : 90 à 96 p. 100 d' α -terpinéol et acétate d' α -terpenyle.
4. Chémotype CARVACROL : 75 à 80 p. 100 de Carvacrol, γ -terpinène et p-cymène.
5. Chémotype THYMOL : 50 à 65 p. 100 de Thymol, γ -terpinène et p-cymène.
6. Chémotype TRANS-THUYANOL-4-TERPINEOL-4 : 60 à 65 p. 100 des 2 composés, 10 à 15 p. 100 de Cis-myrcénol/8.

TABLEAU IV

Spectre antibactérien des huiles essentielles
de quelques Labiées sous-frutescentes méditerranéennes
sur des souches sauvages du genre *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i> souches sauvages	Origine des germes	Dose active en mg/ml					
		<i>Satureia</i> <i>montana</i> L.	<i>Thymus</i> <i>vulgaris</i> L.	<i>Lavandula</i> <i>vera</i> D.C.	<i>Lavandula</i> <i>latifolia</i> Vill.	<i>Lavandin</i>	<i>Rosmarinus</i> <i>officinalis</i> L.
Souche N° 1	Pus d'abcès	0,500	0,500	2	2	2	4
Souche N° 2	Pus d'antrax	0,250	0,333	2	2	2	2
Souche N° 3	Entérocote	0,500	1	4	4	4	2
Souche N° 4	Lymphangite	0,250	0,500	4	2	4	4
Souche N° 5	Impétigo	0,125	0,500	2	2	2	2
Souche N° 6	Furonele	0,125	0,500	2	2	2	1
Souche N° 7	Suppuration buccale	0,125	0,333	2	2	2	2
Souche N° 8	Absès dentaire	0,500	0,500	2	2	2	2
Souche N° 9	Cystite	0,250	0,333	2	2	2	2
Souche N° 10	Furonele	0,250	0,250	1	1	0,5	1

TABLEAU V

Spectre antifongique des huiles essentielles
de quelques Labiées sous-frutescentes méditerranéennes

Microorganismes testés	Dose en mg/ml					
	<i>Satureia montana</i> L.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Lavandula vera</i> DC.	<i>Lavandula latifolia</i> Vill.	<i>Lavandin</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
<i>Hansenula</i>	0,500	0,500	2	2	2	2
<i>Candida mycoderma</i>	0,500	1	2	2	2	2
<i>Candida albicans</i>	0,500	1	2	2	2	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0,500	1	4	4	2	1
<i>Saccharomyces carlbogensis</i>	0,500	1	2	2	2	4
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,250	1	1	1	1	—
<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,250	1	1	1	1	—
<i>Aspergillus niger</i>	0,250	1	1	1	1	—
<i>Geotrichum asteroides</i>	0,250	0,500	2	4	2	4
<i>Candida tropicalis</i>	0,500	1	4	2	2	2
<i>Candida pelliculosa</i>	0,500	0,250	1	1	1	2

Ces chémotypes constituent à l'intérieur de l'espèce des « races chimiques » possédant chacune un équipement enzymatique particulier, déterminé génétiquement et qui oriente la biosynthèse vers la formation préférentielle d'un constituant précis.

Notons que l'auteur considère l'origine botanique comme insuffisante pour définir une huile essentielle, car une même espèce végétale peut donner des essences de composition différente alors qu'à l'inverse, des espèces différentes peuvent fournir des essences de composition identique. Il est alors conduit à envisager une classification chimique basée sur des séquences biogénétiques, et indépendante de la systématique classique.

La fréquence de répartition des chémotypes de *Thymus vulgaris* serait due conjointement à des facteurs écologiques, notamment climatiques, et à des facteurs génétiques. Par exemple, les chémotypes 1 (Géranol), 2 (Linalol), 3 (α -Terpinéol) sont représentés en plus grand nombre en moyenne altitude entre 500 et 1 000 mètres, tandis que la zone d'élection des chémotypes 4 (Carvacrol) et 5 (Thymol) est la basse garrigue, le chémotype 6 (Trans-thuyanol-4-terpinéol-4) se situant à un échelon intermédiaire.

L'existence de divers chémotypes se traduisant par des différences considérables dans la composition de l'huile essentielle nous a donc incités à tester l'activité antimicrobienne des essences provenant de ces 6 chémotypes bien définis.

Dans le tableau VI, il apparaît que les essences 1, 2, 3, 4, 5 et 6 correspondant respectivement aux 6 chémotypes, n'ont pas les mêmes propriétés antimicrobiennes [11].

Il est à remarquer d'une façon générale que l'essence du chémotype 5 (Thymol) a la plus basse concentration minimale inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes. Par contre, il semble que ce soit le chémotype 1 (Géranol) qui possède le plus fort pouvoir antifongique.

TABLEAU VI
Action antimicrobienne des essences
des 6 chémotypes de *Thymus vulgaris* L.

Chémotypes →	1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus aureus</i> IP 54146	1	0,50	0,50	0,50	0,25	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1	0,50	0,333	0,50	0,125	2
<i>Candida albicans</i>	0,25	0,50	1	1	0,5	1
<i>Aspergillus niger</i>	0,25	1	0,50	1	0,25	1
Concentration minimale inhibitrice en mg par ml						

Etude de l'huile essentielle de *Satureia montana* L. [12] [13]

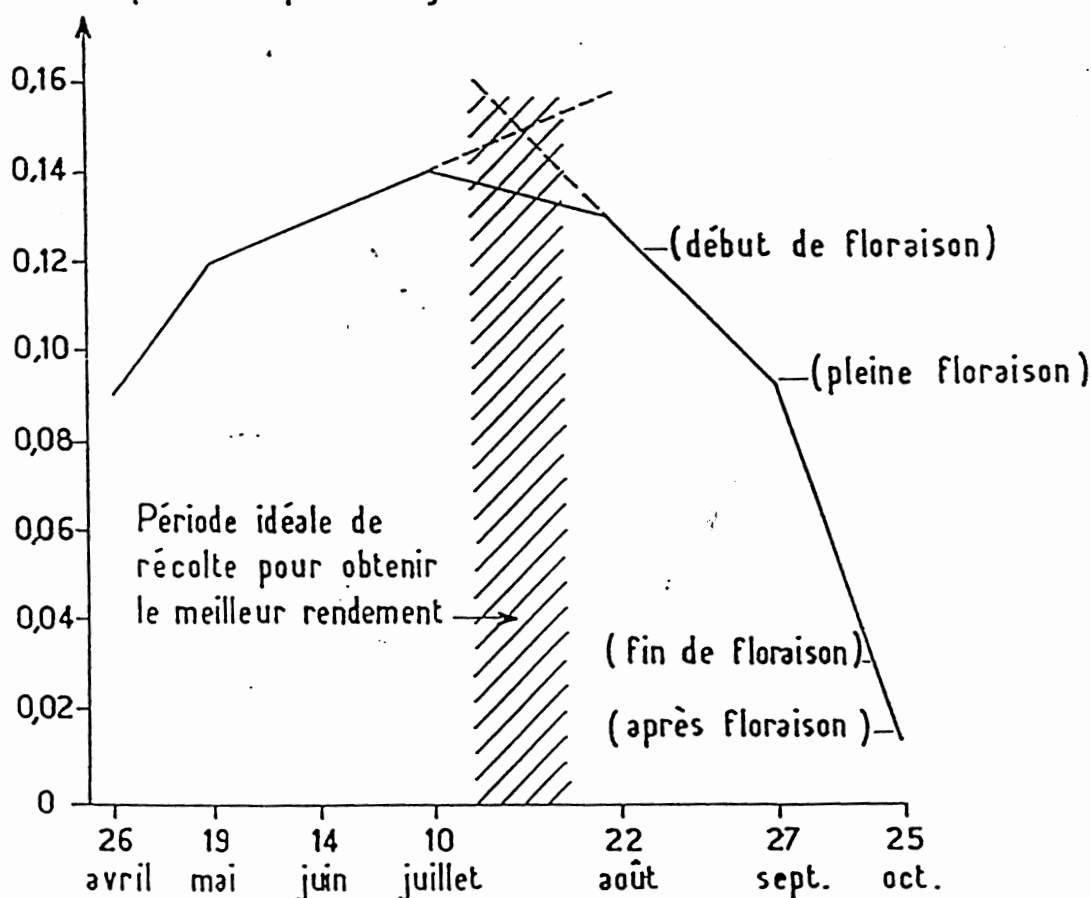
Ce genre de recherche a été élargi en prenant pour exemple l'essence de Sarriette des montagnes dont la composition chimique est beaucoup plus constante.

Rendement en fonction du cycle végétatif de la plante

Dans une station homogène chaque mois est prélevé un échantillon moyen de tiges feuillées durant le cycle végétatif de la plante.

L'extraction de l'huile essentielle est toujours réalisée dans les mêmes conditions sur environ 1,500 kg de plantes fraîches, par entraînement à la vapeur d'eau, selon la méthode préconisée par la Pharmacopée française.

Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage



GRAPHIQUE I

Rendement en huile essentielle en fonction du cycle végétatif de *Satureia montana* L.
(Station de Murles 34)

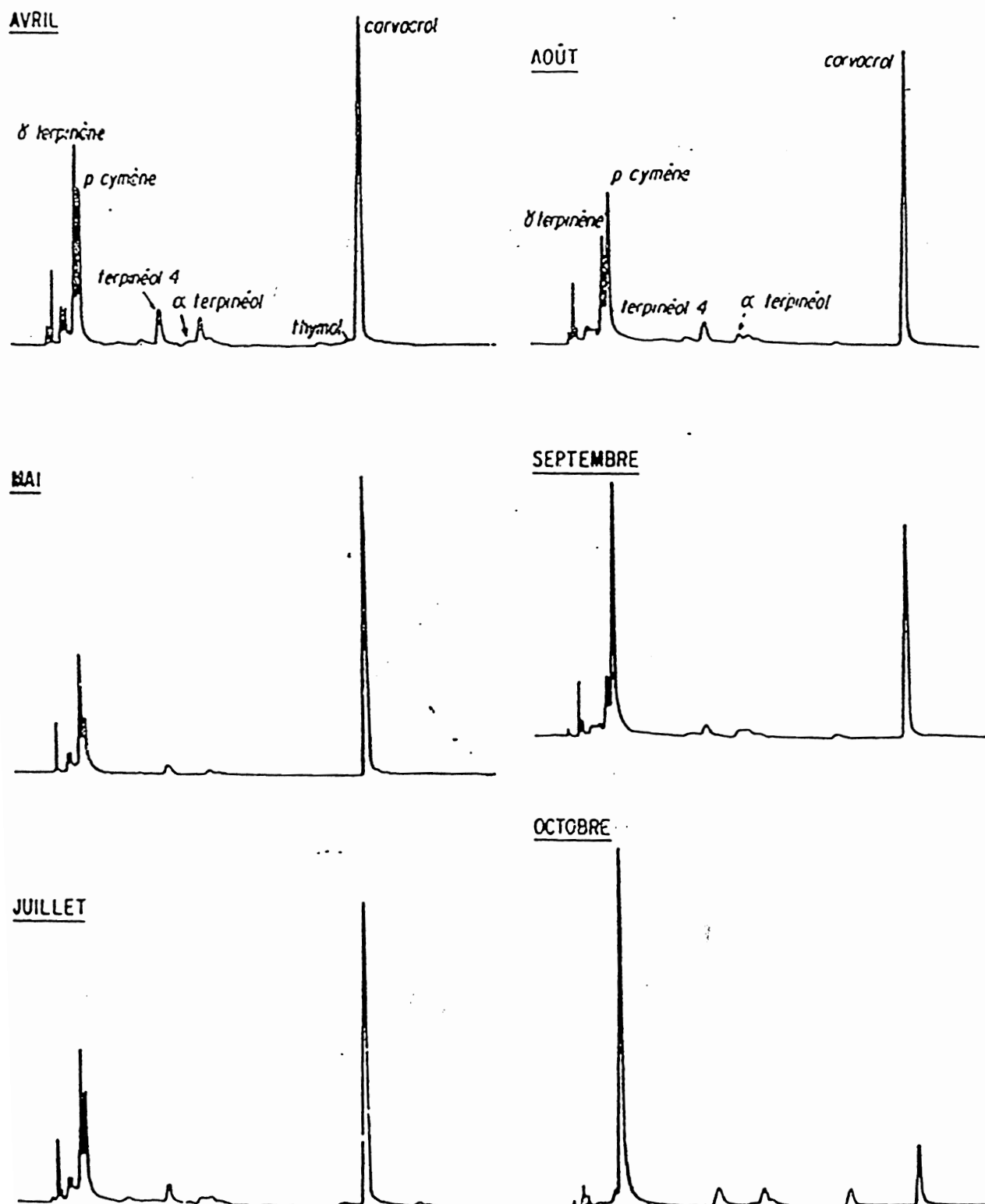


FIG. 1

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Satureia montana* L.
en fonction du cycle végétatif de la plante

Comme le montre le graphique I, le rendement en huile essentielle croît régulièrement dès le mois d'avril (date d'apparition des feuilles) et atteint son maximum à la fin du mois de juillet, ce qui correspond à la période précédant l'apparition des fleurs. Ce rendement chute ensuite très rapidement dès la floraison de la plante.

La meilleure période de récolte en vue de la distillation de l'essence se situe dans ce cas avant la floraison.

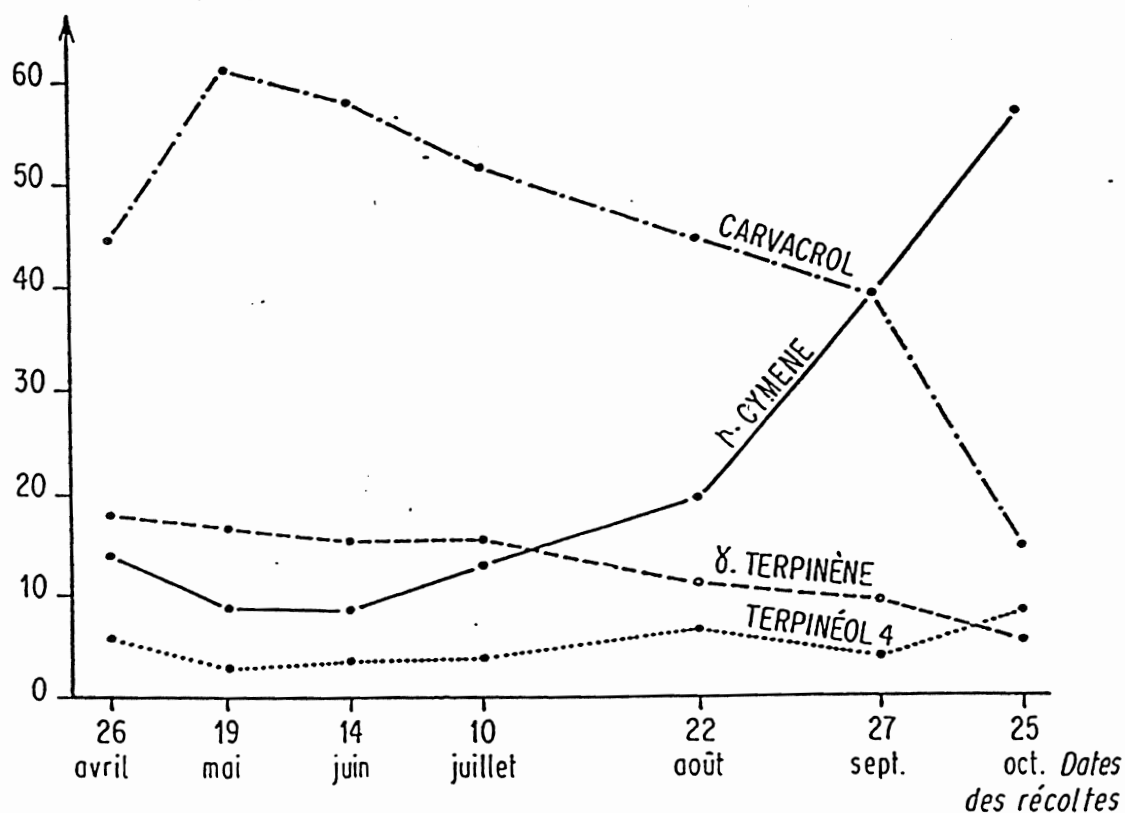
Ce type de variation saisonnière est très différent, par exemple, de celui du Romarin où le rendement est beaucoup plus régulier durant le cycle végétatif de la plante [14].

Composition en fonction du cycle végétatif de la plante

Par chromatographie en phase gazeuse, nous avons suivi la composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle au cours du cycle végétatif de la plante comme le montrent les chromatogrammes de la figure I.

En portant en abscisse les dates mensuelles de récolte et en ordonnée le pourcentage des principaux constituants, nous obtenons le graphique II.

*Pourcentage des principaux
constituants de l'huile essentielle*



GRAPHIQUE II

Variation des principaux constituants de l'huile essentielle de *Satureia montana* L. en fonction du cycle végétatif

Le pourcentage de Carvacrol augmente régulièrement au début du cycle végétatif et passe par un maximum au mois de mai. Il diminue ensuite régulièrement jusqu'au mois de septembre, mais chute brusquement au mois d'octobre.

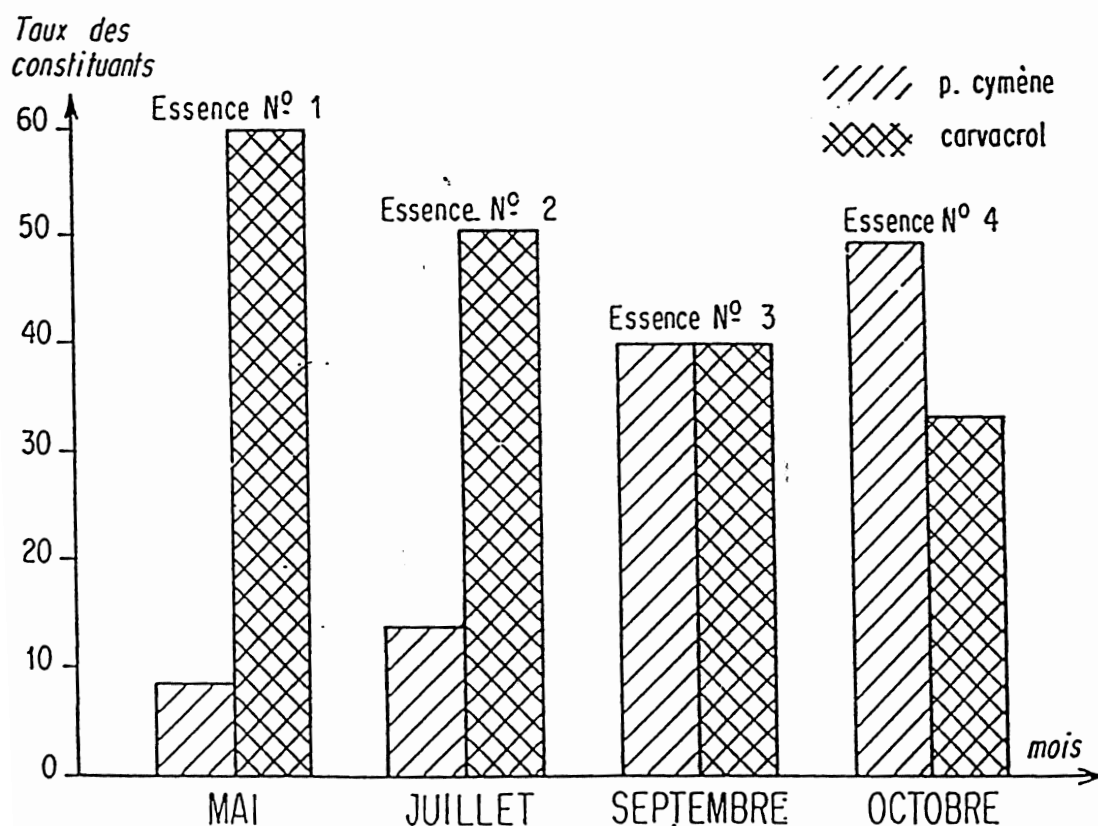
L'évolution du pourcentage de p.cymène est par contre l'inverse de celui du Carvacrol : quant au γ -terpinène, son taux diminue progressivement du printemps à l'automne.

Dans ce cas, la composition chimique de l'essence de Sarriette ressemble à celle de *Thymus vulgaris* L. (chénotype Carvacrol).

Activité antibactérienne en fonction du cycle végétatif de la plante

Nous avons ensuite étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Sarriette des montagnes au cours du cycle végétatif de la plante.

Nous avons pour cela sélectionné 4 essences en fonction des principales étapes du cycle végétatif de la plante (histogramme I).



HISTOGRAMME I

Pourcentage du p. cymène et du carvacrol de l'huile essentielle de *Satureia montana* L. en fonction du cycle végétatif de la plante

— L'essence n° 1 correspond à la récolte du mois de mai avec un fort pourcentage en Carvacrol.

— L'essence n° 2 correspond à la récolte du mois de juillet.

— L'essence n° 3 correspond à la récolte du mois de septembre, période de la floraison, avec un pourcentage égal de Carvacrol et de p.cymène.

— L'essence n° 4 correspond à la récolte du mois d'octobre avec un taux important de p.cymène.

TABLEAU VII

Spectre antibactérien de l'essence de *Satureia montana* L.
en fonction du cycle végétatif

<i>Staphylococcus</i> souches sauvages	Origine des germes	Dose active en mg/ml			
		N° 1 Récolte de mai	N° 2 Récolte de juillet	N° 3 Récolte de septembre	N° 4 Récolte d'octobre
Souche N° 1	Pus d'abcès	0,250	0,250	0,375	0,500
Souche N° 2	Pus d'anthrax	0,220	0,180	0,220	0,375
Souche N° 3	Entérocolite	0,375	0,375	0,375	0,500
Souche N° 4	Lymphangite	0,250	0,250	0,220	0,375
Souche N° 5	Impétigo	0,180	0,220	0,220	0,375
Souche N° 6	Furoncle	0,250	0,250	0,375	0,500
Souche N° 7	Suppuration buccale	0,250	0,220	0,180	0,375
Souche N° 8	Abcès dentaire	0,220	0,250	0,375	0,500
Souche N° 9	Cystite	0,250	0,155	0,220	0,375
Souche N° 10	Furoncle	0,155	0,115	0,180	0,220

Ce tableau montre que la concentration minimale inhibitrice varie au cours du cycle végétatif de la plante.

Si les concentrations actives de l'essence sont proches pour les récoltes des mois de mai et de juillet, on constate par contre une baisse sensible de cette activité à partir du mois de septembre. En particulier, on note pour l'essence provenant de la récolte du mois d'octobre, une activité 2 fois plus faible sur toutes les souches testées.

En fonction de ces résultats et de ceux du rendement en huile essentielle, il apparaît que la meilleure période de distillation de l'essence en vue de son utilisation comme antibactérien se situe avant la floraison de la plante.

Activité antibactérienne sur des germes résistants aux antibiotiques [15]

Le phénomène de résistance aux antibiotiques dont la fréquence s'accroît, rend difficile parfois les traitements antibactériens.

Nous nous sommes donc demandés si les bactéries résistantes aux antibiotiques présentaient un même degré de sensibilité vis-à-vis du pouvoir antibactérien de l'essence de Sarriette.

Ces tests ont été réalisés sur :

- des souches de collection résistant à divers antibiotiques ;
- des souches sauvages testées et résistantes ;
- des souches sauvages sensibles rendues résistantes.

TABLEAU VIII

Spectre antibactérien de l'essence de *Satureia montana* L.
sur des souches diverses résistantes aux antibiotiques

Germes testés	Origine du germe	Caractère de résistance	Dose active en mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 6454	Pénicilline	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 6455	Pénicilline Streptomycine	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 52148	Pénicilline Streptomycine Tétracycline	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 52149	Pénicilline Streptomycine Tétracycline	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 52150	Streptomycine	0,250
<i>Sarcina lutea</i>	Sauvage	100 γ de Tétracycline	0,062
<i>Bacillus subtilis</i>	Sauvage	Streptomycine	0,250
<i>Escherichia coli</i>	Sauvage	Ampicilline Colymycine	0,250
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 1		0,062
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 2		0,062
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 3	Rendus résistants à 500 γ	0,062
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 5	Virginiamycine	0,125
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 8		0,250
<i>Staphylocoque pathogène</i>	Sauvage n° 10		0,125

L'analyse des résultats du tableau VIII montre que des bactéries pathogènes résistantes à des antibiotiques tels que la Pénicilline, la Streptomycine, la Tétracycline, l'Ampicilline, la Colymycine, ont une grande sensibilité vis-à-vis de l'essence de Sarriette.

Dans certains cas, la concentration minimale inhibitrice peut même atteindre 0,062 p. 1 000, ce qui correspond à une dilution au 1/16 000, dose qui n'a jamais été obtenue dans les précédents spectres antibactériens.

APPLICATIONS DES HUILES ESSENTIELLES

Applications médico-pharmaceutiques

Les résultats probants obtenus *in vitro* et les problèmes posés sur le plan clinique par l'abus de l'antibiothérapie nous ont amenés à penser qu'une utilisation de l'essence de *Satureia montana* L. en antisepsie locale pouvait présenter un certain intérêt.

Il nous fallait donc pour cela vérifier sur l'animal deux points essentiels :

- la non-toxicité de l'essence ;
- la tolérance, c'est-à-dire l'innocuité de la forme médicamenteuse administrée.

Etude de la toxicité

Les essais de toxicité* ont été réalisés chez la souris. La détermination de la DL 50 par voie orale et par voie intraveineuse montre une très faible toxicité de l'essence de Sarriette.

Nous avons pu alors envisager la recherche de formes médicamenteuses en vue d'essais cliniques.

*Recherche de formes galéniques***

Deux formes galéniques simples, destinées à l'administration locale par voie cutanée, ont été retenues :

- la forme liquide = solution alcoolique d'essence ;
- la forme pâteuse = pommade à base de vaseline officinale comme excipient.

Essais de tolérance des préparations galéniques à base d'huile essentielle de Sarriette

Avant les essais cliniques, nous avons effectué des essais de tolérances locales des préparations galéniques à base d'huile essentielle de Sarriette.

(*) Ces essais ont été réalisés en collaboration avec M. le Professeur J.J. SERRANO.

(**) Cette recherche a été effectuée en collaboration avec M. le Professeur M. JACOB.

Ces essais ont été réalisés sur le lapin, après épilation de la région lombaire et scarification de certaines plaques épidermiques. Les préparations galéniques ont été d'une façon générale bien tolérées par la peau de l'animal à des doses très supérieures aux doses d'activité antibactérienne (environ 100 à 200 fois la dose active *in vitro*).

Essais cliniques

Les essais cliniques* ont été réalisés au C.H.U. de notre Université sur une quinzaine de sujets porteurs de dermatoses.

Nous avons distingué 5 catégories de lésions :

- les ulcères variqueux infectés et antérieurement multitraités ;
- les plaies atones et les escarres ;
- les acnés du dos, pustuleuses ou non ;
- les dermatoses infectieuses sèches et suintantes streptococciques et à germes non identifiés ;
- les mycoses à trichophyton ou non identifiées.

Les résultats de ces essais cliniques sont consignés dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Classification des résultats
obtenus au cours de l'essai clinique

	G I Ulcères variqueux 3	G II Escarres plaies atones 2	G III Acnés 4	G IV Dermatoses infectieuses 2	G V Mycoses 4
Bons résultats				2	3
Résultats moyens			2		1
Echecs	3	2	1		
Cas non interprétés			1		

Les échecs ont intéressé surtout les ulcères variqueux et les plaies atones. L'inefficacité ne surprend pas dans un domaine aussi difficile où peu de traitements locaux sont rapidement actifs.

(*) Ces essais ont été réalisés en collaboration avec M. le Docteur J. REBOUL, Chef de Clinique au C.H.U. de Montpellier.

Les échecs dans les acnés sont basés sur la récurrence des lésions dont on connaît la fréquence en l'absence d'utilisation d'un antibiotique par voie générale.

Les résultats intéressants sont retenus dans les dermatoses infectieuses et dans les mycoses.

Voici deux cas de dermatoses infectieuses :

— 1^{er} cas

Sujet de 82 ans, présentant une dermatose squameuse infectée et prurigineuse de la jambe. Pas de traitement antérieur.

La toilette avec la lotion à la Sarriette donne au bout de 3 jours de traitement la disparition des squames, une amélioration importante et aucun signe d'intolérance.

— 2^e cas

Sujet de 35 ans, présentant un sycosis de la barbe prurigineux et suintant, rebelle à une lotion antiseptique et à un traitement général par les tétracyclines.

Les applications de la lotion à la Sarriette 4 fois par jour amènent rapidement une diminution du prurit et un nettoyage des lésions dans un délai de 48 heures. Le résultat est durable.

Nous voulons éviter de tirer des conclusions trop hâtives sur un nombre de cas aussi limité et sur des préparations galéniques ne comportant qu'un seul dosage. Cependant, à l'heure où le médecin ne sait plus ou ne peut plus utiliser une pommade sans antibiotique ou sans corticoïde, cette première approche thérapeutique par un produit naturel nous paraît intéressante.

Dans les mycoses traitées, nous citerons les 3 cas suivants :

— 1^{er} cas

Sujet de 46 ans, présentant un eczéma marginé de Hebra suintant et prurigineux à trichophyton avec surinfection streptococcique.

Deux applications quotidiennes de pommade à la Sarriette amènent une disparition du prurit et un début de cicatrisation dès le 3^e jour. Les applications sont maintenues 4 jours encore.

Le résultat est durable.

— 2^e cas

Sujet de 5 ans, présentant des lésions bulleuses et prurigineuses des mains dues à un eczéma remanié par grattage.

Trois jours après l'application de pommade, il y a diminution du prurit. amélioration.

Le résultat est durable.

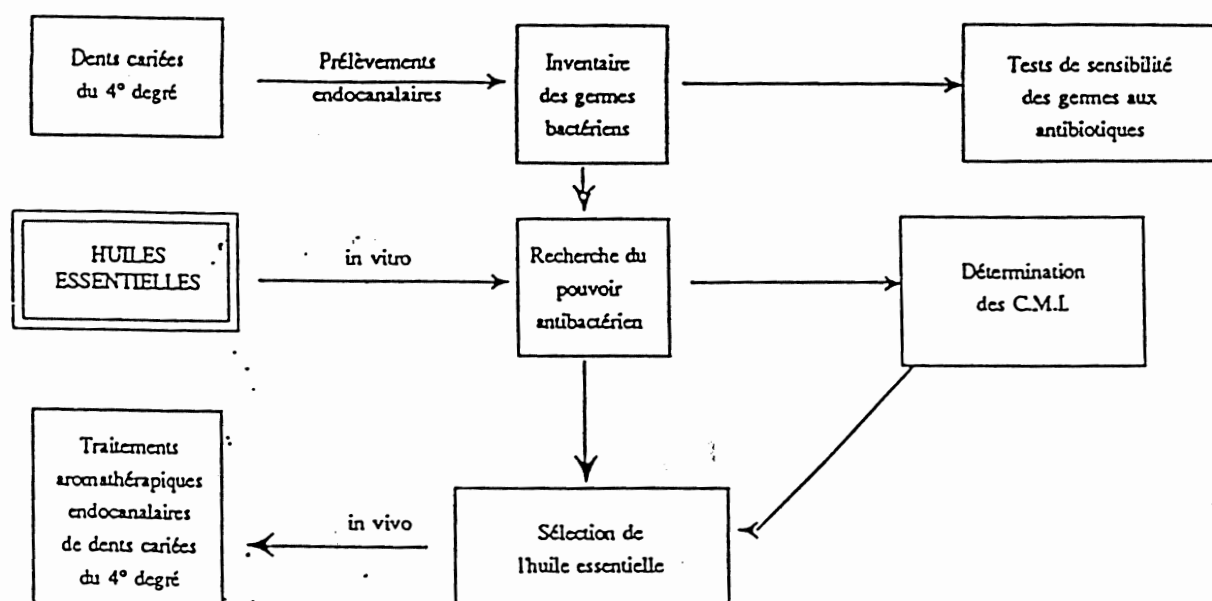
— 3^e cas

Sujet de 45 ans, présentant un intertrigo suintant périombilical à trichophyton.

L'application de la pommade à la Sarriette amène après 3 jours, l'arrêt de l'écoulement, une diminution de l'inflammation.

Le résultat est durable.

Les résultats positifs dans le cas du traitement des mycoses nous paraissent extrêmement séduisants, car les antimycosiques d'origine végétale semblent peu abondants [16].



Essais d'utilisation d'huiles essentielles en odontologie conservatrice

APPLICATION THERAPEUTIQUE EN ODONTOLOGIE

Le deuxième exemple d'application thérapeutique se situe dans le domaine de traitement aromathérapique en odontologie conservatrice (Tableau VI).

Ces essais comportent une recherche in vitro et une étude in vivo de l'action antibactérienne d'huiles essentielles de Labiées méditerranéennes sur la flore endocanalaire de prélèvements effectués au cours de traitements de dents à pulpe nécrosée.

Les prélèvements endocanalaire sont réalisés sur des sujets atteints de caries du 4^e degré, ce qui permet de faire l'inventaire des germes bactériens et de tester leur sensibilité vis-à-vis d'une douzaine d'antibiotiques à large spectre.

Parallèlement ont été évaluées la sensibilité du même éventail de germes sur ces essences ainsi que leurs concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) ce qui a permis de sélectionner l'huile essentielle de *Satureia montana* L. pour le traitement aromathérapique.

L'étude clinique réalisée par le Centre de Recherche en Odontologie de Montpellier a été effectuée sur des patients présentant des dents à pulpe nécrosée n'ayant subi au préalable aucun traitement local ou général.

Tout au cours du traitement aromathérapique local, des prélèvements endocanalaire ont permis de suivre l'évolution de la flore bactérienne. A chaque prélèvement a été noté la présence ou l'absence de douleur, de mobilité, d'œdème ou d'écoulement purulent.

Cette expérimentation effectuée in vivo confirme l'action antibactérienne de l'huile essentielle sélectionnée et montre son effet thérapeutique certain en odontologie conservatrice, à condition évidemment d'en connaître les limites.

APPLICATIONS DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE [17]

Les essences végétales nous paraissent toutes indiquées pour jouer un rôle de conservateur naturel dans l'industrie alimentaire.

C'est dans cet esprit que nous avons envisagé la possibilité d'utiliser certaines huiles essentielles pour lutter contre la flore cryptogamique se développant sur les produits alimentaires * [17].

Nous avons pour cela sélectionné trois espèces végétales couramment utilisées comme condiment : le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), le Thym (*Thymus vulgaris* L.) et la Sarriette des montagnes (*Satureia montana* L.).

Nous avons recherché, *in vitro*, l'activité de leurs essences sur la flore cryptogamique susceptible de se développer sur des laitages et des viandes, les rendant alors impropres à la consommation, tant sur le plan de la présentation et du goût que sur le plan de la toxicologie.

Notre choix s'est porté sur 17 souches cryptogamiques appartenant aux trois grands groupes suivants :

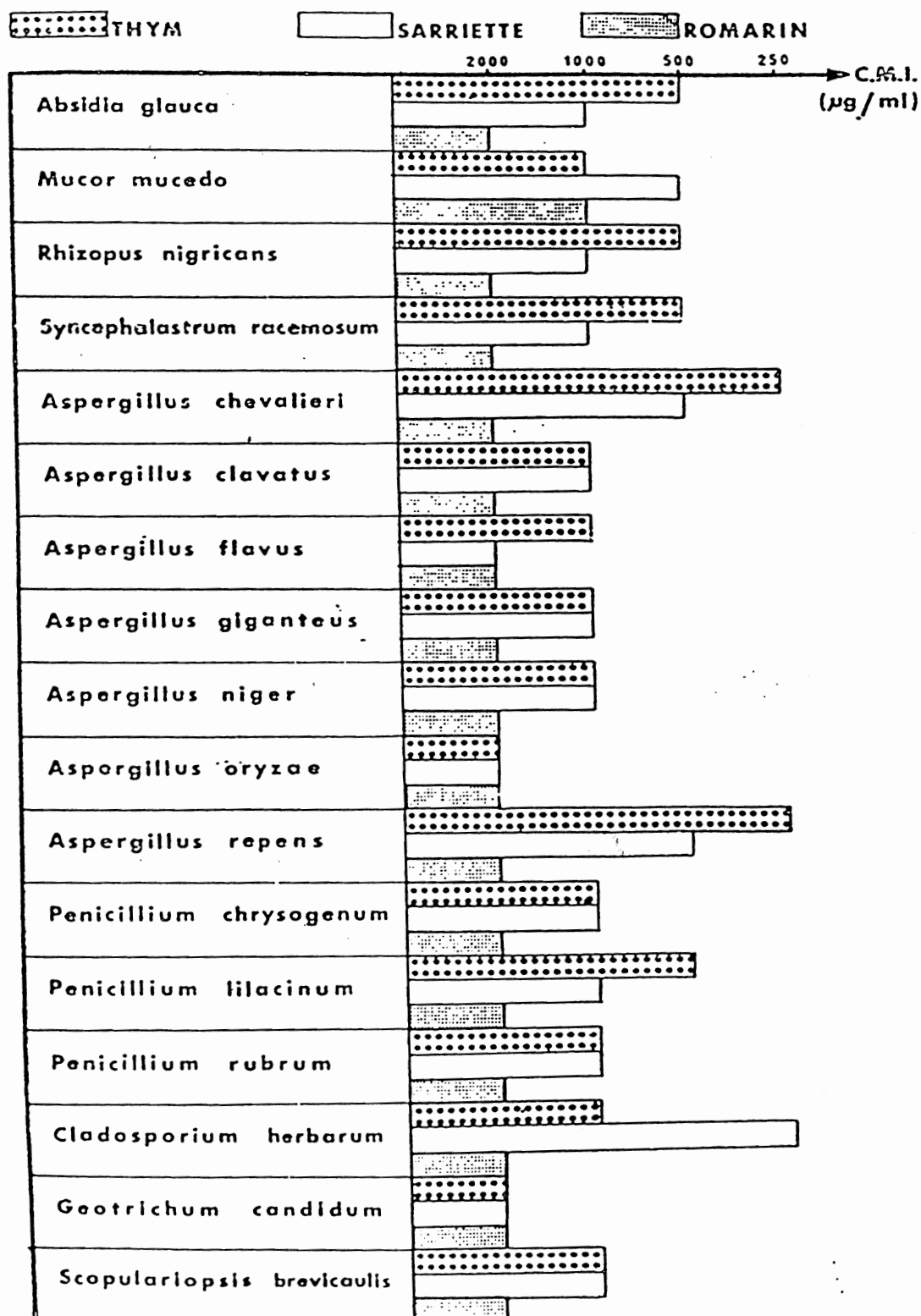
- Mucorales ;
- Aspergillacées ;
- *Fungi imperfecti*.

Le tableau X montre la concentration minimale inhibitrice des essences pour chaque souche.

(*) Ce travail a été effectué en collaboration avec les Professeurs J.L. ROUSSEL et C. ANDARY.

TABLEAU X

Spectre antifongique des essences
de *Thymus vulgaris* L., *Satureia montana* L. et *Rosmarinus officinalis* L.



Il apparaît que l'essence de Thym présente le plus fort pouvoir antifongique (250 µg/ml à 500 µg/ml). Vient ensuite l'essence de Sarriette dont l'activité en général moins élevée que l'essence de Thym a cependant une action égale à celle-ci pour 8 souches testées. Enfin, l'essence de Romarin dont l'activité antifongique est moindre.

Il est cependant à remarquer que 2 souches sont nettement moins sensibles aux 3 essences. Ce sont : *Aspergillus oryzae* et *Geotrichum candidum*.

Inversement, les 3 essences sont particulièrement actives sur *Aspergillus chevalieri* et *Aspergillus repens*.

Applications en cosmétologie

Enfin, dans le domaine de la cosmétologie, nous pensons que les essences de ces Labiées (Lavande, Sarriette, Thym, etc...) pourraient jouer un rôle de conservateur et d'antiseptique tout en assurant au produit une odeur agréable.

Nous avons ajouté à cette gamme, l'essence de Verveine (*Lippia citriodora* Lmk.), espèce de la famille des Verbénacées faisant partie de l'ordre des Lamiales, particulièrement appréciée en parfumerie.

La recherche en milieu solide de la concentration minimale inhibitrice de l'essence a montré un fort pouvoir antibactérien sur la flore de germes bactéries Gram +, et Gram —, de référence, utilisée tout au long des expérimentations précédentes (tableau XI).

TABLEAU XI

Spéctre antibactérien
d'une essence de Verveine (*Lippia citriodora* Lmk)

Germes testés	Origine du germe	Dose active en mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 52150	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP 53156	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 10537	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0,500
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	ATCC 12228	0,500
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	IP 53124	0,250
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10240	0,125
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IP 5650	0,125
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	IP A6	0,125
<i>Sarcina lutea</i>	IP Lille 1449	0,500
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	1
<i>Sarcina lutea</i> résistant à	1 000 γ tétracycline	0,500
<i>Neisseria catarrhalis</i>	IP A 151	0,125
<i>Neisseria flava</i>	IP 52182	1
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	0,125
<i>Bacillus subtilis</i> résistant à	1 000 γ streptomycine	0,250
<i>Corynebacterium Hoffman</i>	IP A 105	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 9997	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 4617	0,500
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IP 6352	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	IP 5293	1
<i>Moraxella glucidolytica</i>	IP 54147	4

CONCLUSION

Les huiles essentielles bactéricides et fongicides ont donc un champ d'action très large. Elles peuvent, compléter harmonieusement l'arsenal thérapeutique classique des antimicrobiens.

Ces essences peuvent également jouer le rôle de conservateur naturel et suppléer très souvent aux produits chimiques plus ou moins bien acceptés par le consommateur, dans le cas des produits alimentaires ou quelquefois mal tolérés par l'utilisateur dans le cas de cosmétiques.

C'est dans cet esprit que nous orientons nos recherches actuelles, aussi bien dans le domaine particulier des huiles essentielles que dans celui plus général des Plantes médicinales et aromatiques à usages pharmaceutiques [18,19,20,21].

Mais dans tous les cas, le thème général ne change pas, il a toujours pour leitmotiv "LA PLANTE AU SERVICE DE L'HOMME".

C'est la raison pour laquelle, en terminant, je livre à votre réflexion ces paroles tirées de l'Ecclésiastique, au chapitre 38 verset 4 :

*"Le Seigneur fait sortir de la terre des simples,
l'homme sensé ne les méprise pas".*

BIBLIOGRAPHIE

1. GATTEFOSSÉ R.M. — Aromathérapie. Paris, 1937.
2. ALLECRINI J., SIMÉON DE BUOCHBERG M. et MAILLOLS H. — Emulsions d'huiles essentielles. Fabrication et application en microbiologie. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1973, 33, fasc. 1, 73-86.
3. ALLECRINI J. et SIMÉON DE BUOCHBERG M. — Une technique d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. *Prod. Prob. Pharm.*, 1972, 27, 891-897.
4. VINCENT J.G. et VINCENT V.N. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, 55, 162.
5. MOREL A. et ROCHAIX A. — *Parfum. mod.*, 1925, 18, 261-269.
6. SARBACH R. — Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. *Thèse Doct. Univ.*, Rennes, 1962.
7. MARUZZELLA J.C. and SICURELLA N.A. — Antibacterial activity of essential oil vapors. *J. am. pharm. Ass.*, 1960, 49, 692-694.
8. PELLECUER J., ALLECRINI J., SIMÉON DE BUOCHBERG M. et PASSET J. — Place de l'essence de *Satureia montana* L. dans l'arsenal thérapeutique. *Pl. Méd. Phyt.*, 1975, tome IX, n° 2, 99-106.
9. PASSET J. — *Thymus vulgaris* L. Chémotaxonomie et biogénèse monoterpénique. *Thèse Univ. Pharm.*, Montpellier, 1971, 153 p.
10. GRANGER R. et PASSET J. — *Thymus vulgaris* L. spontané en France, races chimiques et chémotaxonomie. *Phytochemistry*, 1973, 12, 1683.
11. SIMÉON DE BUOCHBERG M. — De l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. et de ses constituants. Contribution à l'étude du mode d'action et des relations structure-activité des antiseptiques phénols. *Thèse Doct. Pharm.*, Univ. Montpellier I, 1976, n° 116, 217 p.
12. PRIVAT G., ATTISSE M., PELLECUER J., ALLECRINI J., SIMÉON DE BUOCHBERG M. et PASSET J. — Etude de l'huile essentielle de *Satureia montana* L. au cours du cycle végétatif de la plante et variation de son activité antibactérienne. 1^{er} Congrès National des Sociétés de Pharmacie, Nantes, juin 1974. *Bull. Soc. Pharm. Ouest*, 1974, 16, n° 3, 121-127.
13. PELLECUER J. — La Sarriette des montagnes : *Satureia montana* L. (Labiées) : Etude botanique, biochimique, pharmacologique et économique. *Thèse Doct. d'Etat Pharm.*, Univ. Montpellier, 1973, 293 p.
14. ARBOUSSET G. — L'essence de *Rosmarinus officinalis* L. *Thèse Doct. Pharm.*, Univ. Montpellier I, 1972, n° 90.
15. ALLECRINI J., SIMÉON DE BUOCHBERG M. et PELLECUER J. — Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de l'essence de *Satureia montana* L. (Labiées). *J. Pharm. Belg.*, 1974, 2, 137-144.
16. DUQUENOIS P. — Les antibiotiques des plantes supérieures. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1955, 102, 377-405.
17. ROUSSEL J.L., PELLECUER J. et ANDARY C. — Propriétés antifongiques comparées des essences de trois Labiées méditerranéennes : Romarin, Sarriette et Thym. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1973, 33, fasc. 4, 587-592.
18. PELLECUER J., JACOB M., TOMEI R., PRIVAT G. et PUECH A. — Problèmes posés par les « Plantes à usage pharmaceutique ». *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1975, 35, fasc. 4, 307-311.

19. JACOB M., PELLECUER J., PUECH A., PRIVAT G., LAFON J. et MOTTE M.E. — Etude comparée de divers pieds de Belladone languedocienne pour l'obtention de formes pharmaceutiques. *PL. Méd. Phyt.*, 1975, IX, n° 3, 204-210.
 20. PELLECUER J. — Pourquoi et comment la culture des plantes médicinales. *Riv. it. E.P.P.O.S.*, Febbraio 1975.
 21. PELLECUER J. — Les plantes médicinales en Languedoc : le passé... l'avenir. *Riv. it. E.P.P.O.S.*, Agosto 1975.
-

III

Indice aromatique

I. DÉFINITION

Nous avons appelé *indice aromatique* d'un huile essentielle le rapport entre le diamètre, exprimé en millimètres, du halo d'inhibition obtenu par un aromatogramme solide et celui d'une huile essentielle idéale et fictive dont l'action germicide serait maxima dans 100 % des cas.

- Il suffit pour cela, dans un premier temps, de définir l'indice de croix de chaque essence. On additionne entre eux les nombres de croix obtenues dans chaque cas, selon la convention déjà proposée.

- Nous savons d'après cette convention que le symbole 3 croix (3 +) représente l'activité germicide maxima. Si nous voulons définir l'indice de croix d'une essence idéale et fictive dont l'action germicide est maxima dans 100 % des cas, il suffira de faire le produit du nombre de cas, par le chiffre 3 : nous obtiendrions ainsi la valeur maxima exprimée en nombre de croix qu'il soit possible d'obtenir par une essence pour le nombre d'aromatogrammes étudiés : c'est l'activité germicide à 100 %.

- Pour obtenir l'indice aromatique d'une essence donnée, il suffira d'effectuer le rapport entre :

L'indice de croix de cette essence à l'indice de croix de l'essence idéale, efficace à 100 %.

Tableau des indices aromatiques
moyens des huiles essentielles

	ESCHERICHIA COLI	PROTEUS	ENTERO- COQUE	STAPHYLO- COQUE BLANC	STAPHYLO- COQUE DORÉ	STREPTO- COQUE / HEMOLYT	PNEUMO- COQUE	GERMES LIMITES				CANDIDA	INDICE AROMAT MOYEN
								ALK. DISPAR	NEISSERIA	CORYNEBAC- XEROSE	KLEBSIEL.		
ASPIC	0,06	0,23	0,19	0,09	0,09	0	0,04	0,06	0	0,20	0,08	0,03	0,089
BASILIC	0,02	0	0	0,02	0	0	0,04	0	0	0,07	0	0	0,012
BERGAMOTE	0	0	0	0,02	0,03	0	0	0	0,05	0,07	0,14	0	0,025
CAJEPUT	0,39	0,33	0,30	0,33	0,38	0,11	0,50	0,04	0,15	0,57	0,53	0,37	0,333
CANOMILLE	0,02	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002
CANNELLE	0,67	0,73	0,65	0,86	0,86	0,77	0,67	0,30	0,90	0,69	0,78	0,67	0,687
CARVI	0,03	0,07	0,07	0,05	0,04	0	0	0	0,03	0,19	0,05	0,07	0,050
CEDRE	0,05	0,07	0,13	0	0,03	0	0	0	0	0,09	0	0	0,030
CHENOPODE	0	0	0	0,02	0	0	0,04	0	0	0,11	0,14	0	0,025
CITRON	0,12	0,06	0,12	0,09	0,13	0	0,12	0,13	0,13	0,07	0	0,05	0,085
CITRONNELLE	0,02	0,06	0,06	0,01	0	0	0	0,13	0	0,11	0,05	0	0,036
CORIANDRE	0	0	0	0,02	0	0	0,08	0	0	0,30	0,19	0	0,049
CUMIN	0	0	0,01	0,01	0,06	0	0	0	0	0,04	0,05	0	0,014
CYPRES	0,14	0	0,03	0	0	0,16	0	0	0	0,04	0	0,03	0,033
ESTRAGON	0,12	0,06	0,12	0,22	0,18	0,16	0,20	0	0,09	0,16	0,25	0,13	0,140
EUCALYPTUS	0,27	0,35	0,16	0,39	0,44	0	0,45	0,33	0,27	0,40	0,39	0,30	0,312
FENOUIL	0	0,04	0,06	0,02	0,02	0	0,08	0,06	0,07	0	0,05	0,08	0,040
GENIEVRE	0	0,03	0,01	0,02	0,03	0	0	0	0	0,04	0	0,05	0,015
GERANIUM	0,02	0,12	0,20	0,33	0,19	0,28	0,38	0,13	0,31	0,09	0,05	0,02	0,187
GINGEMBRE	0,05	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0,014
GIROFLE	0,47	0,33	0,52	0,60	0,29	0,44	0,83	0,73	0,59	0,38	0,33	0,40	0,517
HYSOPE	0,02	0	0,04	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0	0,014
LAURIER	0	0,04	0	0,02	0	0,16	0	0	0,09	0	0	0,03	0,028
LAVANDE	0,35	0,20	0,36	0,25	0,35	0,61	0,33	0,13	0,19	0,23	0,30	0,26	0,296
LEMON GRASS	0	0	0	0,04	0,03	0	0,08	0	0	0	0,11	0	0,021
MENTHE	0,11	0,02	0,09	0,01	0,14	0,11	0,12	0,06	0	0,07	0,03	0,12	0,073
MYRTE	0,07	0,27	0,16	0,27	0,17	0	0,33	0,46	0,25	0,50	0,39	0,13	0,250
NEROLI	0,07	0,18	0,21	0,01	0,06	0,11	0	0,16	0,01	0,09	0,14	0,09	0,094
NIAOULI	0,19	0,21	0,21	0,03	0,12	0,16	0	0,16	0	0	0,08	0,05	0,100
NOIX DE MUSCADE	0,02	0	0	0	0,08	0	0,04	0	0	0,11	0,11	0	0,030
ORIGAN D'ESP.	0,94	0,92	0,78	0,92	0,88	0,83	0,96	1,00	0,92	0,88	0,78	0,77	0,873
PETIT GRAIN	0,10	0,09	0,23	0,16	0,29	0,22	0,20	0,16	0,15	0,04	0,25	0,77	0,171
PIN	0,44	0,29	0,33	0,40	0,45	0,28	0,41	0,40	0,21	0,40	0,30	0,26	0,317
ROMARIN	0,17	0,12	0,04	0,12	0,03	0,16	0,12	0	0	0	0,03	0,11	0,075
SANTAL	0,02	0,04	0,03	0,02	0,05	0	0	0	0	0	0	0,05	0,017
SARRIETTE	0,30	0,24	0,28	0,72	0,52	0,50	0,50	0,40	0,60	0,71	0,39	0,33	0,457
SASSAFRAS	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0,03	0,002
SAUGE	0	0	0	0	0,02	0,16	0,08	0,16	0	0	0	0,02	0,036
SERPOLET	0,12	0,18	0,16	0,08	0,10	0,44	0,08	0	0,09	0	0,16	0,12	0,126
TEREBENTHINE	0	0,03	0,02	0,04	0,02	0	0,08	0	0,03	0,07	0,11	0,03	0,035
THYM	0,76	0,74	0,72	0,65	0,69	0,66	0,92	1,00	0,64	0,64	0,42	0,70	0,711
VACCINIUM MYRT.	0,05	0	0,01	0	0	0,16	0	0	0	0	0	0,03	0,020
VERVEINE	0,02	0	0	0,08	0,03	0	0	0	0,05	0,04	0	0	0,018

Nous obtiendrons un chiffre de 0 à 1 : plus l'indice aromatique se rapproche de 1, plus l'essence est germicide.

Nous verrons que l'*huile essentielle d'origan d'Espagne* peut atteindre le chiffre 1 dans certains cas.

Nous pourrions ainsi, par une série de diagrammes représenter les indices aromatiques, de chaque essence pour chaque catégorie de germes.

Nous pouvons ainsi statistiquement visualiser l'activité germicide et apprécier rapidement l'éventail de possibilités thérapeutiques offertes au praticien.

Nous constatons immédiatement qu'un certain nombre d'essences se retrouvent de façon constante, ce sont celles dont les valeurs d'indice aromatique sont supérieures à 0,50.

Ce sont : origan, cannelle, thym, sarriette, girofle. (Classe 1 des essences germicides).

On retrouve de façon moins régulière, des essences dont l'indice oscille autour de 0,30 g telles que la lavande, le pin, l'eucalyptus et la myrte. (Classe 2 des essences germicides).

II. SIGNIFICATION DE L'INDICE AROMATIQUE

L'indice aromatique apporte une « indication » non négligeable pour le médecin praticien. En effet, il permet :

1. D'établir au premier coup d'œil par la lecture d'un simple chiffre : le pouvoir antiseptique de chaque essence pour telle ou telle colonie microbienne (voir table récapitulative).

2. Cet indice fait entrer deux composantes :

- Une composante en valeur absolue, par le nombre de croix de chaque huile essentielle obtenue par l'aromatogramme.

- Une composante statistique exprimée sur un grand nombre de cas étudiés.

3. Enfin et surtout, l'indice aromatique, par sa simple lecture permettra au thérapeute de choisir dans l'arsenal des huiles essentielles germicides, en fonction de la gravité du syndrome infectieux et en attendant le résultat de l'aromatogramme.

4. Mais l'indice aromatique n'est qu'un indice, et à ce titre comme tous les indices, il ne donne qu'une « indication » et exprime une simple

tendance. Il pourra être remplacé demain par un autre indice de portée plus générale, en fonction d'une autre méthode d'aromatogramme.

5. Dernier avantage non négligeable ; il permet à un médecin isolé, qui ne peut pratiquer l'aromatogramme, de faire de l'aromathérapie anti-infectieuse avec plus de chances de succès.

III LA CLASSIFICATION DES ESSENCES AROMATIQUES

Annexe 3 : document de Monsieur Sirodeau

JF. SIRAUDAU -

Les OGEARDS

49340 CHANTELOUP LES BOIS -

FRANCE -

Tel 02-41-64-19-06 —

Le 20.04.2000

à Madame. Esther -
Jacques HAZ.

Chère Madame -

Suite - à notre -entretien téléphonique - je reviens vers
- vous - au sujet de votre projet - qui comporte bien des
- points - communs avec le mien -

Mon voyage à Genève début mai, ne se fera pas - mais
je viendrai de nouveau à Rulhouse - cet été - il n'y a plus
faute - de vous voir -

Je vais - vous donner les indications que je pensais vous
expliquer de vive voix - à Genève -

1) - Afin d'avoir une approche rigoureuse - de l'efficacité d'un
éventuel traitement - du Brio par les huiles essentielles (HE)
il faut standardiser la méthode -

→ isoler le ou les germes responsables - Ceci peut se faire
- par dipht. en surface de petits fragments de Brio
(condensés - sur des Boîtes de Gelore -

(vous pourriez voir les possibilités du milieu de Czapek
parfois utilisé pour les aspergilles -)

Ces champignons pourraient être cultivés sur le Brio
- par la présence du LEE liquide - par l'eau d'absorption -

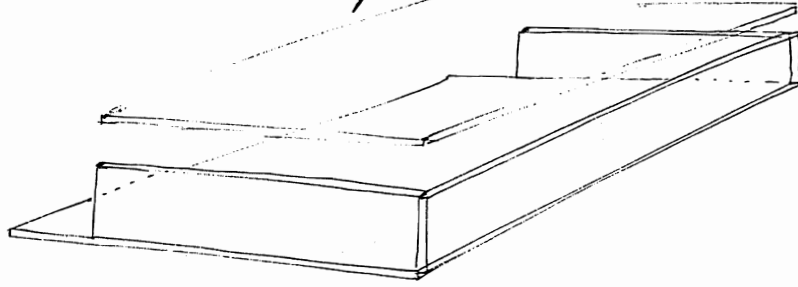
→ une fois les espèces mycéliennes séparées - (et identifiées ?) -
il serait simple de les fragmenter - par broyage de la Gelore
- ultrasonation - ou recueil des spores -

afin d'inoculer - les milieux de recherche de sensibilité aux
HE -

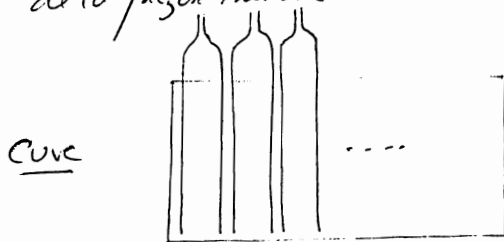
Ceci peut être fait sur un milieu spécifique des champignons
condensés, - ou plus simplement sur milieu Duller - Hinton
Standard - (Milieu Tamponné - qui convient pour tous les germes) -

l'originalité de ma méthode - et sa simplicité - tient au mode de réalisation du test.

Il nécessite la réalisation d'un petit matériel.



- c'est une cuve plate - démontable - qui sert à installer des tubes de verre - type pipette pasteur stériles - non cotonnées - de la façon suivante :



Son épaisseur - est celle des pipettes que l'on va y introduire

Les matériaux de la cuve sont des plaques de verre - collées à la colle silicone - le couvercle est démontable (Colle à l'Alcool non permanent) Elle est donc stérilisable -

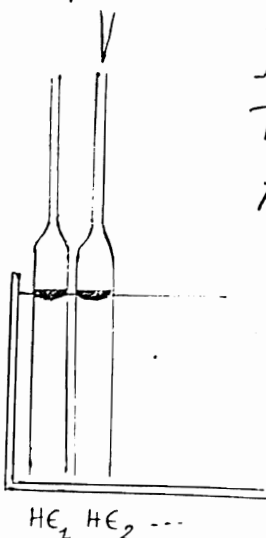
- préparer le milieu de Culture - le maintenir liquide à 55°C au Bain Marié -
- Porter la cuve et la Nettoyée au Bain Marié 55°C -
- Inoculer le Milieu de Culture - avec la souche à tester et le Verser dans la Cuve -
- Placer dans la cuve - les pipettes stériles la partie fine vers le haut - faire Repailler - chaque pipette contient donc - le Milieu à tester - en quantité égale -
- Introduire les HE à tester dans chaque pipette par l'orifice supérieur - à l'aide d'une pipette - effilée -

La quantité à introduire est de l'ordre de 25 à 50 μl mais une fois choisie, cette quantité doit être précisément mesurée -

f) - fermer les tubes à l'aide d'un chalumeau

g) - déposer un film de paraffine à la surface de la cuve - pour empêcher toute évaporation -

Incuber - à l'étuve - à 30° -



Après un temps d'incubation qui peut être variable -
mais une fois déterminé - il doit être toujours le même -
on lit la hauteur d'inhibition de la culture, qui est
proportionnelle à l'activité Fongicide de L'HE. testée.

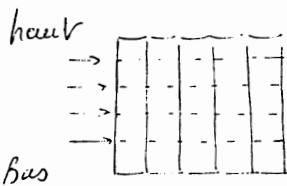
* Cependant cette hauteur d'inhibition dépend aussi
de la diffusibilité de L'HE. dans le milieu hydrotile.
Il est donc important de faire la distinction entre
diffusibilité et activité fongicide.

Un fongicide actif - peut être peu diffusible - et inversement.
Il est donc intéressant de faire une étude de diffusibilité
de quelques HE. prises parmi les plus actives et les moins actives
de façon à faire des corrélations.
la méthode que j'ai employé est similaire.

* Elle consiste à faire migrer dans un grand nombre de tubes
de Gelose Tubes - lenton stérile (≥ 40 tubes) - la même HE
à basse température - pour éviter la polymérisation des germes.
au minimum une semaine.
puis sortir la Gelose des tubes.

(Casser le bout de la pipette au diamant. enlever L'HE
Restant sur un papier filtre. et souffler dans le tube.
On recueille un petit cylindre très facilement.

Aligner tous les cylindres de Gelose sur une plaque. dans le
même sens. et couper en plusieurs sections.

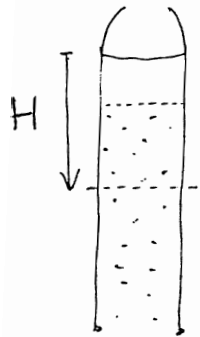


Ramasser chaque niveau. dans un tube de
Verre à paroi épaisse. ajouter 1 ml de
Benzène. (ou autre solvant organique pas trop
volatil) - sceller le tube au chalumeau.
(attention de ne pas enflammer!)

* Placer toutes les ampoules scellées dans une autoclave
(une cocotte minute fait l'affaire) - et monter en pression
quelques minutes - sortir les tubes scellés - émulsionner
le contenu quelques instants, laisser ensuite reposer dans
l'eau chaude. la phase organique à l'extérieur toute L'HE
passée dans la Gelose.

* Après refroidissement - couper l'ampoule - et
recueillir la phase Benzénique - et faire une
chromatographie - Gazeuse.

Sur la base de ces données - on pourra classer
 l'HE la plus diffusible - et la plus active - selon ses
composants - En effet plusieurs cas peuvent se présenter



h : hauteur d'inhibition de la culture

H : hauteur de diffusion maximale de l'HE.

1^{er} cas : $H = h$ - HE Fongicide - active par ses
 fractions les plus "rapides"
 d'autant plus active que h est plus grande.

2^e cas : $H > h$ - HE. plutôt fungistatique -
 peu active par ses fractions les plus rapides -

la hauteur H ne peut être appréhendée que par l'étude de sa
 diffusibilité - comme on l'a vu précédemment.

la force mesurée - consiste en le calcul de la CTI₂ (Concentration
 Diminuant inhibitrice) qui permet de comparer l'activité des HE
 entre elles -

Voici donc l'esprit de la méthode - peut être cela
 vous aidera à mener votre recherche - tout est facilement
 réalisable - et si vous trouvez une unité de Jaurès des
 CPG - ce sera ok.

Si c'est le cas - prévenez moi - je vous enverrai des
 fractions Benzéniques - pour faire les premiers tests -

Avec mes salutations amicales

J.F. Smaudeau

Esther - Jaquemetaz
 Daniel - JEAN RICHARD - 19
 2300 LA CHAUX DE FONDS
 SUISSE

Annexe 4 : rapport de microbiologie

École Supérieure d'Arts Appliqués
Conservation-Restauration d'objet d'intérêts culturels, archéologie, ethnographie

Rapport de microbiologie

Jacquemettaz Esther
Relecture et corrections : François Straub
professeur de biologie

conseils éclairés et dons des huiles essentielles : Mr Pillonnel
pharmacien

Novembre 1999

Introduction

En prévision d'un éventuel travail de diplôme sur la possible utilisation (en tant que biocides) des huiles essentielles en conservation-restauration d'objets archéologiques, nous avons effectués un travail de recherche préliminaire. Pour cela nous avons testé quelques huiles essentielles sur des bactéries misent en culture lors de T.P. de microbiologie.

Mise en culture

La mise en culture s'est faite après avoir fait se développer plusieurs sources microbiennes dans des boîtes de Pétri en cultures d'enrichissement ou en cultures test. Nous avons pu constater le développement des bactéries de l'air et du sol, ce sont spécifiquement celles-ci qui nous intéressent car il est plus que probable de les retrouver dans nos objets archéologiques issus de fouilles.

Isolation des bactéries

Nous avons ensuite prélevé en cultures pures des inoculums, à partir de colonies visibles à l'oeil nu, puis nous les avons inoculé dans des tubes inclinés sur gélose nutritive (nutrient agar).

Observations des bactéries

A partir des souches isolées sur gélose inclinée nous avons confectionné des frottis bactériens. L'observation de ces frottis au microscope nous a montré que certaines souches étaient pures. Ces souches ont été utilisées pour tester les antibiotiques et les huiles essentielles.

Antibiogramme

Dans des boîtes de Pétri nous avons déposé un inoculum issu des souches isolées pures sur nutrient agar. L'inoculum s'est fait par étalement à l'anse de platine. Cet étalement est destiné à produire un voile bactérien à la surface de la culture sur lequel les substances antagonistes sont à tester. Une seule souche a été déposée par boîte de Pétri.

Nous divisons les boîtes de Pétri en six parts. Dans chacune d'elle nous allons inclure un confetti imbibé d'un antibiotique ou d'une huile essentielle. Après un temps de 36 heures nous pouvons observer les résultats obtenus.

Comme antibiotique nous avons pris de la novobiocine au taux de 1 mg./litre, comme huiles essentielles nous avons pris quatre différents chémotype à l'état pur, à savoir :

- *Thym thymol*
- *Thym linalol*
- *Cinnamomum zeylanicum*, *cannelle de ceylan*, o.p.écorce
- *Laurus nobilis* (laurier)

Nous tenons ici à exprimer toute notre reconnaissance et tous nos remerciements à Mr Pillonel pour nous avoir aidé dans le choix de ces huiles, comme pour nous les avoir si gracieusement offertes.

Résultats

Nous sommes perplexe devant les résultats obtenus. En effet, nous ne notons pas de développement significatif du voile bactérien, et ce, dans toutes les boîtes.

D'autre part nous apercevons difficilement un halo neutre autour des confettis. Il semblerait toutefois que l'antibiogramme aie fonctionné sur une souche pour la novobiocine, sur une autre souche pour l'huile essentielle de cannelle et une fois pour celle du laurier.

Nous pouvons noter que laurier et cannelle font partie de la même famille : les Lauracées.

Conclusion

Nous devons admettre le fait que le développement du voile ne s'est pas fait comme il aurait du.

Mais à quoi le devons-nous?

Premièrement ces voiles ont été confectionnés par des étudiants inexpérimentés, ce qui est peut-être la cause de certains échecs.

Deuxièmement nous avons noté que les huiles essentielles lors de leur application émettent une forte odeur, par conséquent, il se pourrait que l'atmosphère se soit chargée en molécules d'huiles essentielles dans l'ensemble des boîtes de Pétri, auquel cas nous pourrions expliquer le non-développement du voile. Dans les cas de voiles bien développés, il faut par contre, conclure que les bactéries (souches sauvages non pathogènes) étaient résistantes aux produits testés.

De plus, nous sommes obligés d'admettre que nous n'avons pas procédé à la réalisation de boîtes témoins.

Lors d'une prochaine recherche il serait judicieux de le faire et d'isoler ces boîtes des autres car l'odeur tenace des huiles s'est répandue dans l'ensemble de l'enceinte de stockage et à perdurée plusieurs jours.

Annexe 5 : Echantillons d'huiles essentielles