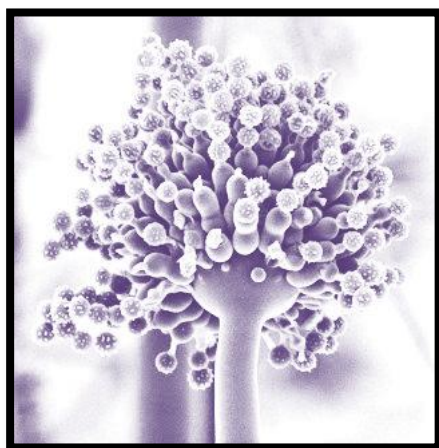




# Vérification de la validité des normes concernant les biocides à activité fongicide



**Licence Professionnelle Microbiologie Industrielle et Biotechnologie**

**Promotion 2012 - 2013**

**Responsable de la formation : Laurence Fraissinet - Tachet et Yvan Moëgne-Loccoz**

**Tutrice alternance :  
Odile DUMONT**

**Maître d'apprentissage :  
Michel THIBAUDON**

**Rapport présenté par :  
Jennifer CHARBONNIER**

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Michel THIBAUDON, maître d'apprentissage et directeur du RNSA, pour son accueil, son accompagnement, ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de mon année d'apprentissage.

Mes remerciements vont aussi vers Nadine DUPUY, Solène POILANE et Estelle TISSOT qui m'ont beaucoup appris lors de cette année et qui m'ont formé pour la reconnaissance des moisissures.

Je souhaite remercier Gilles OLIVER et Charlotte SINDT, techniciens au RNSA, et plus particulièrement cette dernière pour les semaines de formations passées avec elle pour l'apprentissage de la reconnaissance des pollens.

Je remercie Isabelle CHARMET, secrétaire-comptable au RNSA, pour son aide et sa bonne humeur au quotidien.

Je remercie également Audrey JEAN, Julie NAGY, Dheliat IBARA, Rébecca Bilon et Samuel MONNIER alternants et stagiaires au RNSA pour leur aide et leur bonne humeur tout au long de cette année.

Enfin, je tiens également à remercier ma tutrice, Odile DUMONT, pour avoir pris le temps de relire mon rapport de stage ainsi que pour ses nombreux conseils.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| LEXIQUE .....   | 1  |
| INTRODUCTION .....  | 2  |
| I. Le RNSA : Réseau National de Surveillance Aérobiologique .....   | 3  |
| a) Situation géographique.....  | 3  |
| b) Organisation.....  | 3  |
| c) Rôle et fonctionnement du RNSA .....   | 4  |
| d) Les différentes tâches réalisées au RNSA .....   | 4  |
| e) Les tâches que j'ai effectuées au cours de mon apprentissage .....                                     | 6  |
| II. Synthèse bibliographique : Normes concernant les biocides à activité fongicide.....                   | 7  |
| a) Réglementation .....   | 7  |
| b) Les normes : généralités .....   | 8  |
| c) Normes permettant de tester l'efficacité des biocides à activité fongicide.....                        | 9  |
| III. Les normes sur la fongicide peuvent-elles s'appliquer aux formes végétatives des moisissures ? ..... | 11 |
| IV. Matériels et méthodes .....   | 13 |
| a) Moisissures utilisées lors de l'essai.....   | 13 |
| b) Produits utilisées lors de l'essai.....  | 14 |
| c) Vaporisation.....  | 16 |
| d) Protocole.....   | 16 |
| V. Résultats.....   | 18 |
| e) Résultats par produits.....  | 19 |
| f) Résultats par souches .....  | 20 |
| g) Résultats par essais.....  | 21 |
| VI. Discussion .....  | 22 |
| VII. Conclusion .....   | 24 |
| VIII. Bilan général .....   | 25 |
| BIBLIOGRAPHIE .....   | 26 |

# LEXIQUE

Les mots suivis d'un (\*) dans le texte seront cités dans le lexique.

**Aérobiologie** : Science qui traite de l'étude des particules biologiques en suspension dans l'air, tels que les bactéries, les spores fongiques, les morceaux très petits des insectes et les grains de pollens.

**AFNOR** : Association Française de NORmalisation. C'est l'organisme officiel français de normalisation, membre de l'organisation internationale de normalisation (ISO : Internationale Organization for Standardisation) auprès de laquelle elle représente la France.

**ATCC** : Les numéros ATCC correspondent aux numéros de souches dans la collection de cultures cellulaires de l'American Type Culture Collection.

**Biocide** : Produits destinés à détruire, repousser, contrôler ou rendre inoffensifs des organismes nuisibles, par une action chimique ou biologique.

**Biofilm** : Les biofilms sont des communautés de micro-organismes qui se développent en association sur une surface.

**Fongicide** : Produit qui tue les champignons (levures et moisissures), ainsi que leur spores, dans des conditions définies. (NF 1275)

**Fungi** : Le règne des Fungi regroupe des organismes unicellulaires (levures) et pluricellulaires (champignons à thalle filamenteux).

**Norme** : Document qui définit des exigences à utiliser systématiquement pour assurer l'aptitude à l'emploi de matériaux, produits, processus ou service.

**Nycthémeral** : Le rythme nycthémeral désigne une alternance d'un jour et d'une nuit correspondant à un cycle biologique de 24 heures.

**Palynologie** : Étude des grains de pollens et des spores.

**Pollinose** : Allergie causée par le pollen de certaines plantes.

# INTRODUCTION

L'exposition à l'humidité et aux moisissures dans les résidences constitue un facteur de risque important dans le développement de problèmes de santé.

Pour remédier à cela, il faut désinfecter de façon efficace. La désinfection est l'opération qui consiste à détruire les germes infectieux à l'aide de produits chimiques ou d'agents physiques. Les agents antimicrobiens désignés sous le terme de désinfectants sont parfois utilisés alternativement en tant que produits d'hygiène et antiseptiques [1].

Le nettoyage et la désinfection des surfaces, que ce soit dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou dans le domaine médical, constituent un volet essentiel de la lutte contre les bactéries et/ou les champignons.

Les biocides\* à activité fongicide sont utilisés pour détruire les *fungi*\*. L'utilisation et la mise sur le marché de ces produits est strictement réglementée. De plus, de nombreuses normes\* entourent ces fongicides car elles permettent de vérifier leur efficacité. Pour être validé, un produit fongicide doit prouver son efficacité sur les spores de moisissure or les moisissures possèdent également une forme végétative très résistante avec par exemple la formation de biofilms chez certaines espèces.

Les essais réalisés pour ce rapport font suite à la synthèse bibliographique effectuée lors de l'UE 9 intitulé : « Normes concernant les biocides à activité fongicide ».

Ce rapport, réalisé au RNSA (Réseau National de Surveillance Aérobiologique) à Brussieu, a pour objectif d'étudier la validité des normes permettant d'évaluer l'efficacité des biocides à activité fongicide. Pour cela, nous étudierons tout d'abord le cadre réglementaire de ces biocides, les normes qui les encadrent et nous réaliserons des essais sur différentes moisissures avec divers produits pour vérifier la validité de ces normes.

# I. Le RNSA : Réseau National de Surveillance Aérobiologique

## a) Situation géographique

Le RNSA se situe dans la zone artisanale du plat du Pin à Brussieu (69) à 40 km à l'ouest de Lyon (Figure 1). C'est une association de loi 1901 créée en 1996 pour poursuivre les travaux réalisés depuis en 1985 par le Laboratoire d'Aérobiologie de l'Institut Pasteur à Paris.



Fig.1 : Le Réseau de Surveillance Aérobiologique à Brussieu

Ce réseau a pour objectif d'étudier le contenu de l'air en particules biologiques (grains de pollens et spores de moisissures) pouvant avoir une incidence sur le risque allergique pour la population. De plus, le RNSA s'intéresse également aux effets sur la santé de ces différentes particules grâce à de nombreux sites de surveillance répartis dans toute la France.

En effet, afin de mener à bien sa mission, le RNSA a mis en place un réseau efficace de 75 sites de capture (Figure 2), répartis sur le territoire français. C'est en 1987 qu'ont été implantés les premiers capteurs permettant d'étudier le contenu de l'air en pollens allergisants et moisissures. C'est donc, à l'heure actuelle, une surveillance optimale du territoire qui a été mise en place [2].



Fig.2 : Emplacement des 75 capteurs

## b) Organisation

Le RNSA est une très petite entreprise (TPE) dans laquelle se trouve 8 salariés, 3 alternantes et une stagiaire :

- Directeur : Michel Thibaudon
- Secrétaire-comptable : Isabelle CHARMET
- 5 techniciens : Nadine DUPUY, Charlotte SINDT, Gilles OLIVER, Solène POILANE et Estelle TISSOT
- Accueil-réception : Nicolas MARS

- 2 alternantes : Audrey JEAN et Jennifer CHARBONNIER
- 2 stagiaires : Julie NAGY et Dheliat IBARA

Le RNSA fonctionne grâce à un Conseil d'Administration (composé de cliniciens, d'analystes, de membres fonctionnels) et à un Conseil scientifique composé de membres nommés par la direction générale de la santé, l'Institut de veille sanitaire ainsi que des spécialistes en allergologie, en palynologie\* et en analyses biologiques. Son budget annuel est de 500 K€.

### c) **Rôle et fonctionnement du RNSA**

En France, l'allergie aux pollens touche de plus en plus de patients de tous âges. Plus d'un quart des français est atteint de pollinose\*. Le RNSA est l'organisation d'aérobiologie française ; son principe de fonctionnement commence par la constitution des sites de capture de l'air. Ainsi, on retrouve sur chaque site : un capteur (Figure 3), un responsable du capteur et un médecin responsable du site. Les sites sont choisis par rapport à des critères de densité de population, d'implantation des espèces végétales et de climat.



Fig.3 : Capteur de pollens

C'est notamment pour informer les personnes allergiques grâce à ses études sur le contenu de l'air que le RNSA a été créé. Le RNSA est constitué de 104 médecins sentinelles et de 32 centres d'analyses à travers toute la France. Le centre de coordination se situe à Brussieu. Ce centre reçoit les résultats des analyses polliniques et les informations cliniques associées. Ensuite, il assure la rédaction de bulletins allergo-polliniques hebdomadaires composés d'informations polliniques, cliniques et du risque allergique associé. Ces bulletins nationaux ou régionaux sont retransmis sur le site internet du RNSA mais également sur les sites contrôlant la qualité de l'air, aux médias, aux services du Ministère de la Santé et à tous les partenaires du RNSA.

Pour la commercialisation de ces données auprès des partenaires privés, comme les laboratoires pharmaceutiques, les opérateurs téléphoniques et autres. Le RNSA a également créé une filiale : RNSA Laboratoire.

### d) **Les différentes tâches réalisées au RNSA**

Il existe différents types de travaux au centre de coordination de Brussieu. De la recherche aux analyses en passant par la gestion des bases de données, le centre est en fait divisé en 3 parties distinctes.

- **Administration et comptabilité** : C'est Isabelle CHARMET qui dirige ce secteur en assurant la gestion du personnel, l'accueil téléphonique, l'accueil des visiteurs, la rédaction et le traitement des données, la saisie de documents. En Février 2013, Nicolas MARS l'a rejoint en tant qu' « emploi d'avenir ».

- **RNSA association** : Au sein de cette partie on retrouve notamment la **gestion des bases de données**. Ces dernières correspondent à un système informatique permettant de répertoire et de conserver l'ensemble des données polliniques. Chaque semaine, les données polliniques des différents sites de capture sont envoyées par mail au RNSA et sont traitées par un technicien. La vérification des données ainsi que leur intégration dans les bases nationales et européennes sont les deux étapes indispensables à effectuer. Les données sont ensuite exploitées pour réaliser le bulletin allerge-pollinique hebdomadaire mais également pour élaborer des rapports annuels. La gestion des bases de données est effectuée par Gilles OLIVER et Charlotte SINDT.

Les **analyses** font elles aussi partie du travail confié à RNSA association. Sur le site de Brussieu, une dizaine de capteurs sont à analyser chaque semaine (et même plus pendant la saison pollinique de l'ambrosie : entre Juillet et Septembre). Les analyses de pollens sont effectuées par l'ensemble des techniciens, alternants et stagiaires qui ont reçu une formation de 15 jours pour apprendre à reconnaître les différents pollens au microscope optique. A Brussieu, parmi les sites analysés entre Février et Octobre on retrouve : Annemasse, Chambéry, Genas, Nice, Craponne, Gerland, Montluçon, Saint Quentin-en-Yvelines. Au début de la saison de l'ambrosie, 5 sites de la région Rhône-Alpes sont rajoutés.

Le secteur concernant la **recherche et le développement** est géré par Michel THIBAUDON et donne lieu à de nombreux travaux. À partir des résultats des analyses de l'air (extérieur ou intérieur), le RNSA est en mesure de réaliser des études concernant par exemple :

- l'évolution de la pollinisation dans une ville
- l'élaboration de cartes concernant la pollinisation
- l'étude de l'incidence de la pollution sur la pollinisation
- la mesure des allergènes dans l'air
- l'étude des rythmes nyctéméraux\* de la pollinisation

En ce qui concerne la **formation**, c'est à Brussieu qu'est situé le centre de formation qui est dirigé par Nadine DUPUY. Ce centre assure la formation initiale et la formation continue pour la reconnaissance des pollens et des moisissures de tous les analystes du réseau. La formation est complétée par un contrôle qualité annuel.

Pour les pollens, ce dernier est composé de 10 lames aveugles différentes (avec un seul pollen sur chaque lame) et d'une lame sauvage sur laquelle sont présents une vingtaine de pollens différents.



Pour les moisissures, tous les trimestres, le RNSA reçoit 4 souches différentes en tube qu'il faut repiquer sur un milieu et identifier (genre et/ou espèce). Ceci permet d'assurer une formation continue pour les techniciens effectuant des identifications de moisissures pouvant être rencontrées en air extérieur ou intérieur.

- **RNSA laboratoire** : Cette filiale de l'association est destinée aux **relations techniques et économiques** avec les **partenaires privés**. Cette partie est dirigée par Nadine DUPUY et Michel THIBAUDON ; Solène POILANE s'occupe de la partie technique. RNSA Laboratoire (filiale AIRTEST) est spécialisé dans l'expertise de la contamination microbiologique de l'air non seulement en industrie (salles propres par exemple) mais aussi dans l'environnement extérieur, en effectuant des audits, des analyses et des études spécifiques de l'air. Les expertises sont réalisées sur des paramètres biologiques tels que les moisissures, les pollens, les bactéries, les acariens etc... ceci nécessite donc de solides compétences en aérobiologie\*.



Fig. 4 : Biocollecteur Coriolis

Pour les prélèvements en **extérieur**, les capteurs de type Hirst (Lanzoni ou Burkard) ou les biocollecteurs Coriolis (Figure 4) sont utilisés. L'analyse de ces prélèvements se fait par microscopie optique. Ainsi, il est possible de connaître la quantité en spores de moisissures, grains de pollens et bactéries dans l'air. Pour les prélèvements intérieurs, on utilise le biocollecteur cyclonique Coriolis, grâce à cela, RNSA Laboratoire peut quantifier et qualifier les particules biologiques de l'air.

### e) Les tâches que j'ai effectuées au cours de mon apprentissage

J'ai effectué mon alternance dans la partie RNSA Laboratoire sous la responsabilité de Michel THIBAUDON, Solène POILANE et Estelle TISSOT.

Durant les premières semaines où j'ai intégré le RNSA, afin de m'intégrer au mieux à l'équipe j'ai tout de suite suivi une formation de 15 jours pour apprendre à reconnaître et quantifier les différents pollens.

De même, j'ai par la suite été formée pour reconnaître les différentes moisissures et leurs spores que l'on retrouve le plus souvent dans l'air ambiant. J'ai donc pu par la suite analyser non seulement les capteurs de plusieurs sites mais aussi réaliser des prélèvements hebdomadaires dans une industrie pharmaceutique du Rhône et dans une industrie chimique de la région lyonnaise. Une fois les prélèvements réalisés, il faut les analyser pour rendre les résultats aux clients au plus vite.

## II. Synthèse bibliographique : Normes concernant les biocides à activité fongicide

Les fongicides\* sont très largement utilisés dans de nombreux domaines : agriculture, industrie agroalimentaire, industrie pharmaceutique, milieu hospitalier, bâtiment...

Un encadrement est nécessaire pour la mise sur le marché de ces produits compte tenu des propriétés dangereuses de ces produits mais aussi pour harmoniser le niveau de protection et le marché au niveau communautaire [3].

### a) Réglementation

Un produit ne peut pas être mis sur le marché s'il n'a pas fait l'objet au préalable d'une autorisation. Historiquement dans l'Union Européenne (UE), la mise sur le marché de ces produits n'était pas harmonisée.

En premier lieu, la **directive 98/8/CE** a été mise en place ; elle concerne l'autorisation de mise sur le marché des biocides. Elle possède différents objectifs : limiter la mise sur le marché des produits biocides aux seuls produits efficaces et ne présentant pas de risques inacceptables, vérifier la bonne notification des substances actives et harmoniser la réglementation des Etats membres de l'Union Européenne en garantissant l'unicité du marché [4]. Une fois cette directive mise en place, il a donc fallu trier, recenser et éliminer les produits les plus dangereux. La réglementation des produits biocides, issue de la directive 98/8/CE, va connaître une modification d'ampleur en 2013. En effet, le Conseil de l'UE a définitivement adopté un règlement qui renforcera dès septembre 2013 le contrôle des produits biocides au nom du principe de précaution et harmonisant les procédures d'homologation.

Ensuite, il existe un règlement plus complexe nommé **REACH** (Restriction, Evaluation, Autorization of CHemicals). Ce règlement est entré en vigueur le 1<sup>er</sup> Juin 2007. Il permet la rationalisation et l'amélioration de l'ancien cadre réglementaire de l'Union Européenne sur les produits chimiques. Ce règlement s'applique aux fabricants, importateurs, utilisateurs en aval de substances chimiques telles qu'elles ou contenues dans des articles ou des préparations [5].

L'objectif était de renforcer l'évaluation et la prévention des risques émergents et des risques liés aux multi-expositions à long terme et à faible dose aux contaminants chimiques. Et ce, que l'exposition soit primaire (manipulation des produits, préparation, application) ou qu'elle soit secondaire (résidus dans l'alimentation ou dans l'environnement par exemple).

À l'heure actuelle, ce règlement et la directive précédente cohabitent pour réglementer la mise sur le marché des biocides.

## **b) Les normes : généralités**

Pour **valider l'efficacité** des produits mis sur le marché – notamment les biocides à activité fongicide –, des normes européennes (EN) relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques ont été mise en place.

Elles sont homologuées pour la France par l'AFNOR\* et sont diffusées sous la référence NF EN suivi d'un nombre de quatre chiffres ; elles sont en constante évolution. Les normes permettent d'évaluer l'efficacité des produits biocides, elles sont indispensables pour tester et comparer ceux-ci. L'efficacité va être mesurée selon différentes conditions : en utilisant des souches déterminées, un temps de contact précis, une température donnée, avec la présence ou non de substances interférentes et en utilisant les produits à une concentration précise [6][7].

Les microorganismes testés dans les normes d'application ont été sélectionnés pour leur résistance particulièrement élevée afin de rendre compte de l'efficacité des produits sur l'ensemble des microorganismes appartenant au même groupe [8].

Pour évaluer l'efficacité antimicrobienne d'un antiseptique ou désinfectant chimique, celui-ci doit être soumis en fonction de son usage à un certain nombre d'essais selon un programme de normes de base dites de phase 1 et d'application dites de phase 2[9].

- **Norme de base : Phase 1**

Cette phase constitue la première étape à franchir. Ces normes démontrent l'existence d'une activité grâce à une substance active dans les conditions les plus favorables au produit : suspension en milieu liquide, absence de substances interférentes, et ce quelles que soient les conditions spécifiques d'usage prévu. Lors de cette phase, le but est de diminuer la population en microorganismes en testant le produit à une concentration et à une température donnée en un temps défini. Elle est à compléter avec la norme d'application et est indépendante du domaine d'application.

- **Norme d'application : Phase 2**

Le but de cette phase est de reproduire pour chaque usage des conditions proches des conditions réelles d'utilisation. Elle précise les conditions d'efficacité du désinfectant (dose d'application notamment) pour un usage donné. Cette phase est divisée en 2 étapes : la première, correspond à l'application *in vitro*. Ce sont des essais quantitatifs de suspension qui prennent en compte les substances interférentes et les micro-organismes spécifiques à chaque usage pour évaluer l'activité du produit. La 2<sup>ème</sup> étape est une méthode d'essai permettant de déterminer si un désinfectant possède des propriétés bactéricide, levuricide, fongicide en présence de substances interférentes pouvant diminuer l'efficacité de certains désinfectants. Cette étape modélise un usage ; cela correspond à l'application *in vivo* [10].

### **c) Normes permettant de tester l'efficacité des biocides à activité fongicide**

- **NF EN 1275 (Avril 2006) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques**

Ce texte correspond à la norme de base, c'est-à-dire à la **phase 1**. Cette norme détermine l'activité fongicide des produits antiseptiques et désinfectants.

Cette norme européenne spécifie une méthode d'essai de suspension permettant de déterminer si un désinfectant chimique présente ou non une activité fongicide de base ou une activité levuricide de base dans les domaines que décrit la norme. Il n'est pas possible, à partir de cette méthode d'essai, de déterminer l'acceptabilité d'un produit pour une utilisation donnée. Les produits doivent passer d'autres tests qui font partis des normes d'application [11].

L'activité fongicide doit être évaluée en utilisant comme microorganismes d'essai les souches suivantes : *Candida albicans* (ATCC\* 10231) et *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Le produit, lorsqu'il est soumis à l'essai doit entraîner une réduction logarithmique décimale d'au moins 4 logarithmes. La température doit être de 20°C et le temps de contact obligatoire est de 15 minutes. En plus, des souches complémentaires, des températures et des temps de contact additionnels peuvent être rajoutés.

En ce qui concerne le principe, on utilise un échantillon du produit tel quel ou dilué avec de l'eau que l'on ajoute à **une suspension de spores** de la souche à tester. Le mélange est maintenu à 20°C pendant 15 min. A l'issue de ce temps, une partie du mélange est récupérée puis neutralisé par dilution-neutralisation. Les cellules survivantes sont dénombrées et le taux de réduction est calculé.

- **NF 1650 (Octobre 2008) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité**

Ce texte correspond à la norme d'application *in vitro*, c'est-à-dire à l'étape 1 de la phase 2.

Cette norme spécifie une méthode d'essai pour tester la fongicidie d'un produit. Les essais sont réalisés dans des conditions représentatives de l'usage pratique du produit. Ces essais prennent en compte les conditions pratiques d'utilisation du produit, lesquelles comprennent, le temps de contact, la température, les microorganismes d'essai et la substance interférente ; c'est-à-dire les **conditions susceptibles d'influer sur l'action du biocide** dans la pratique.

Les conditions d'essais sont destinées à couvrir les usages généraux et à permettre des comparaisons entre laboratoires et entre les types de produits.

L'essai est effectué en utilisant les mêmes souches que pour la norme précédente, c'est-à-dire *Aspergillus niger* et *Candida albicans* [12].

La substance interférente doit être choisie en fonction des conditions d'utilisation stipulées pour le produit, et doit être stérile. Pour cette norme, une solution d'albumine bovine sera utilisée comme substance interférente, elle mimera des conditions de saleté quand elle sera en forte concentration (3g/100mL), ou des conditions de propreté quand elle sera à une concentration faible (0,3g/100mL).

Pour finir, outre les conditions obligatoires concernant la température, le temps de contact, la substance interférente et les microorganismes, des conditions peuvent être choisies en fonction de l'utilisation prévue du produit.

- **NF EN 13697 (Mai 2001) : Essai quantitatif de surface non poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de normes publiées de phase 2 de bactéricidie, de fongicidie, de levuricide et de sporidie pour les produits de désinfection des surfaces du domaine médical. En attendant, les normes définies pour l'hygiène des collectivités sont utilisées.

Pour ce rapport, on a choisi la norme européenne NF EN 13697. Elle regroupe différents domaines d'applications : la fabrication, la distribution et la vente des produits alimentaire ; les domaines domestiques et les collectivités, les autres secteurs industriels (pharmaceutique, biotechnologie...).

Cette norme permet de déterminer l'activité bactéricide ou fongicide de produits prêts à l'emploi. Trois concentrations doivent être soumises à l'essai dont une active et une autre non active. Lorsque le produit est dilué il doit entraîner une réduction au moins égale à  $10^3$  du nombre de cellules fongiques viables.

L'activité fongique sera évaluée en utilisant 2 souches : *C. albicans* et *A. niger* à une température entre 18 et 25°C pendant 15 minutes. Pour cette norme, la surface d'essai (type de matériaux) correspond à un ou des disques d'acier inoxydable [13].

### III. Les normes sur la fongicide peuvent-elles s'appliquer aux formes végétatives des moisissures ?

Ce rapport a pour objectif de tester l'efficacité de produits fongicides (ayant passé au moins une des normes précédentes) sur la forme végétative des moisissures. En effet, les normes citées précédemment n'imposent des tests de validité que sur **les spores de moisissures** souvent considérées comme les formes les plus résistantes des moisissures. Or, c'est par amalgame avec la spore bactérienne que l'on considère la spore de moisissure comme la forme de résistance alors ces spores correspondent surtout à la forme de dissémination du champignon et assurent la reproduction de ceux-ci (Figure 5).

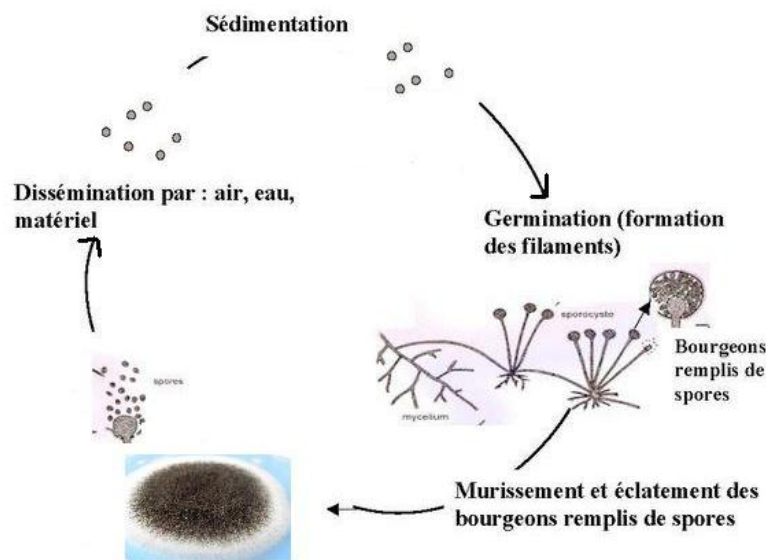


Fig. 5 : Cycle simplifié de développement d'une moisissure

Une spore est donc avant tout une forme de propagation et aussi, bien souvent, une forme de résistance aux conditions défavorables du milieu, donc une structure de survie. Ces spores sont donc considérées comme la forme la plus résistante des champignons microscopiques [14].

Malgré cela, le mycélium très ramifié des moisissures pourrait être lui aussi très résistant (Figure 6). En effet, les biofilms\* microbiens ont été étudiées avec un intérêt croissant au cours des dernières années, et il est maintenant généralement admis que cette forme est souvent le mode de vie dominant sur les surfaces alors pourquoi n'en serait-il pas de même pour les champignons ?

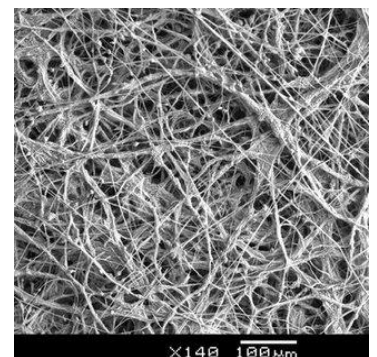


Fig.6 : Mycélium : un enchevêtrement presque impénétrable

Bien que la grande majorité des articles publiés se rapportent seulement aux bactéries ou à des levures; des champignons filamenteux pourraient être inclus en tant que microorganismes formant des biofilms [15][16].

Il a été démontré que les moisissures aussi étaient capables de réaliser des biofilms tout aussi résistants que les bactéries grâce au mycélium ramifié qui constitue leur partie végétative.

Les biofilms se forment grâce à l'adhésion des cellules fongiques sur une surface par des liaisons chimiques. Les cellules se divisent ensuite pour former des micro-colonies et permettre aux biofilms de s'étendre.

Ils sont **ubiquitaires**, et sont donc la source de lourds problèmes industriels. En effet, les biofilms d'origine fongique sont en train de devenir un problème clinique majeur du fait de grande leur résistance grâce à leur densité cellulaire. L'architecture des biofilms est très ordonnée ce qui leur permet d'absorber les nutriments et d'expulser les déchets.

Certaines études soutiennent que la densité physique des cellules au sein d'un biofilm les rendent récalcitrantes aux antifongiques [17]. De ce fait, l'élimination des biofilms constitue un enjeu majeur dans de nombreux secteurs, de l'agroalimentaire à l'industrie lourde en passant par le milieu hospitalier. Il est donc possible que certaines parties du mycélium ne soient plus accessibles par les désinfectants.

Or les normes citées précédemment n'imposent des tests d'efficacité que sur les spores ce qui pourrait poser un problème au niveau de l'efficacité des produits ayant été validés par la norme.

Ce ne sont pas uniquement les moisissures ou les bactéries qui sont capables de faire des biofilms. En effet, un rapport d'activité de l'Institut Pasteur de 2004 traite de la formation des biofilms par une levure : *Candida albicans* [18]. Dans le cas des levures pathogènes comme celle-ci, la formation de biofilms a été observée sur différents dispositifs médicaux (prothèses, cathéters) et est directement responsable de certaines pathologies. Les levures présentes dans le biofilm développent une résistance accrue aux antifongiques et peuvent donc constituer une source de ré-infection après le traitement apparemment efficace d'une candidose.

Toutes ces informations nous amène à nous poser la question de savoir qui est le plus résistant entre la spore et la forme végétative.

Pour vérifier si en pratique la forme végétative des moisissures est plus résistante, nous avons décidé de réaliser différents types d'essais sur cette forme végétative en considérant que les produits fongicides utilisés sont efficaces sur les spores.



## IV. Matériels et méthodes

### a) Moisissures utilisées lors de l'essai

Pour réaliser notre essai et vérifier l'efficacité des fongicides ou non sur la forme végétative des moisissures, nous allons tester l'activité fongicide de différents biocides sur 4 champignons microscopiques dont 3 moisissures et une levure. Ce travail se base sur des observations macroscopiques.



Fig.7 : *Aspergillus niger*

***Aspergillus niger*** : Les *Aspergillus* poussent rapidement, ils sont poudreux ou duveteux et de couleur variable : blanc, vert, brun à noir. *Aspergillus niger* (Figure 7) est un des champignons les plus connus du genre *Aspergillus*. Il apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire; on peut le retrouver dans les sols mais également dans l'air ambiant ou dans certains bâtiments. C'est une espèce mésophile qui se développe cependant très bien à hautes températures. *In vitro*, cette moisissure peut survivre à 60°C. Cette espèce est capable de se développer sur des pH inférieurs à 2 quand l'humidité relative est élevée [19].

*Aspergillus niger* est caractérisé par la formation d'organes de reproduction asexuée : les têtes aspergillaires. C'est une espèce toxique et pathogène qui peut provoquer des mycoses pulmonaires chez l'homme. Dans l'air, la survie des souches végétatives est limitée en raison des contraintes telles que la dessiccation, la température et l'exposition aux rayons UV. Pour notre essai, on a choisi d'utiliser *A. Niger* ATCC 16404) qui est notamment utilisé pour tester l'activité fongicide d'un biocide pour valider certaines normes telles que la EN NF 1650 ou la EN NF 1275.

***Aspergillus fumigatus*** : Toujours dans la famille des *Aspergillus*, *A. fumigatus* (Figure 8) est l'espèce qui pose le plus de problèmes sanitaires. Cette moisissure est très commune à l'extérieur et ses spores sont fréquentes dans l'air. A l'intérieur des locaux, elles sédimentent rapidement et s'accumulent sur les surfaces et dans les poussières où elles peuvent survivre très longtemps. Cette espèce est la plus fréquemment incriminée en pathologie humaine car elle provoque 80% des aspergilloses humaines [20] [21]. Les conidies sont normalement éliminées par l'hôte immunocompétent par les mécanismes immunitaires innés.

Ainsi, *A. fumigatus* a été considérée pendant des années comme un pathogène faible. Cependant, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, il y a eu une forte progression d'aspergilloses invasives sévères et souvent fatales. C'est notamment à cause de cela que nous avons choisi d'intégrer cette souche à notre essai. En effet, cette espèce pose de lourds problèmes dans les hôpitaux, il faut donc être certain que les biocides sont efficaces contre elle [22].



Fig.8 : Culture d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu MEA



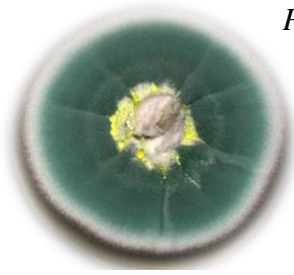


Fig. 9 : Culture de *Penicillium chrysogenum* sur milieu MEA

***Penicillium chrysogenum*** : Cette moisissure est également connue sous le nom de *Penicillium notatum* (Figure 9). Elle est célèbre car elle est à l'origine de la découverte du premier antibiotique découvert par Alexandre Fleming : la pénicilline. Cette espèce est en effet utilisée pour la fabrication industrielle de la pénicilline. C'est une moisissure bleu-verte facilement reconnaissable car elle produit un exsudat typique sous forme de gouttes jaunes à sa surface.

Nous avons choisi d'ajouter cette souche à notre essai car elle est régulièrement retrouvée dans l'air ambiant. Elle est également ubiquiste et c'est probablement l'espèce la plus fréquente du genre [23]. De plus, *Penicillium sp* fait partie des souches additionnelles que l'on peut utiliser pour valider les normes qui nous intéressent dans ce rapport.

Les trois moisissures qui viennent d'être citées seront cultivées sur un milieu MEA (Malt Extract Agar).

***Candida albicans*** : C'est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida* (Figure 10). Habituellement inoffensive, elle siège naturellement dans les voies génitales, le tube digestif, la bouche, la peau. Dans certains cas, elle peut devenir pathogène et est alors responsable de candidose. Cela se produit notamment chez les personnes immunodéprimées.

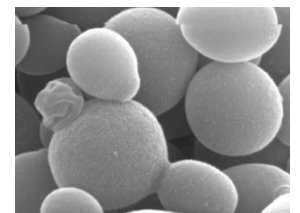


Fig.10 : *Candida albicans* au microscope électronique à balayage

Généralement les lésions de la peau ou sur les muqueuses sont sans gravité ; mais elles peuvent être plus graves lorsqu'elles atteignent les viscères digestifs ou les poumons [24]. Cette souche, en association avec *A. Niger*, est utilisée pour définir l'activité fongicide de normes. Testée seule, cette espèce permet également de définir une activité levuricide de normes telle que la NF EN 1275. *Candida albicans* sera cultivée sur un milieu Sabouraud qui est un milieu d'isolement des *Fungi*\* grâce à son acidité qui inhibe de nombreuses bactéries.

## **b) Produits utilisés lors de l'essai**

**Produit A** : Ce produit est une solution hydroalcoolique prête à l'emploi, détergente et désinfectante pour les dispositifs médicaux non invasifs et les surfaces. En ce qui concerne l'activité microbiologique, ce produit est bactéricide suivant les normes EN 1040, EN 1276 (en conditions de propreté) et EN 13697 (en conditions de saleté et de propreté).

Au niveau de la fongicidie, il a été validé par les normes suivantes concernant l'activité fongicide : EN 1275 (uniquement sur *C. albicans*), EN 13697 (en condition de propreté sur *C. albicans*).

C'est un produit qui possède un large spectre de désinfection pour réduire les risques de contamination. L'éthanol est à l'origine de son efficacité, il est concentré à 24%.

**Produit B = Le vinaigre blanc :** Le vinaigre est un liquide acide qui contient entre 6 et 8% d'acide acétique. Utilisé en cuisine, c'est également un nettoyant multi-surface très apprécié car c'est un produit ménager économique et naturel. Il est réputé pour avoir des qualités bactéricides et fongicides. C'est un excellent nettoyant, désodorisant, désinfectant, détartrant. Le vinaigre utilisé lors de l'essai contient 8% d'acide acétique.

**Produit C = La javel :** C'est une solution liquide oxydante, fréquemment utilisée comme désinfectant ou comme décolorant. L'eau de javel est commercialisée sous plusieurs niveaux de dilution. La quantité de chlore est exprimée en pourcentage de chlore actif (c.a.).

La javel utilisée lors de l'essai est indiquée à 2,6% c.a. Le pourcentage de chlore actif représente la masse de dichlore formé à partir de 100 g d'eau de Javel. On trouve par exemple des bouteilles d'eau de Javel à 2,6 % de chlore actif et des berlingots d'eau de Javel concentrée à 9,6 % de chlore actif. L'eau de Javel est bactéricide, sporicide, fongicide et virucide ; elle est validée par l'EN 1650 [25]. L'eau de javel utilisée lors de l'essai contient 2,6% de c.a.



Fig.11 : Eau de javel

**Produit D :** Ce produit correspond à une solution désinfectante réalisée à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide péracétique. Il est fongicide selon la norme européenne NF EN 1275 en 15 minutes de contact à 20°C sur les souches de référence *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Cette solution possède également une activité fongicide selon la norme NF T 72 281 sur la souche *Candida Albicans* à 8 ml/m<sup>3</sup> en 1H00 de contact à 20°C ou 6 ml/m<sup>3</sup> et en 2H00 de contact sur la souche *Penicillium chrysogenum*. La molécule permettant son efficacité est le peroxyde d'hydrogène concentré à plus de 5%.

**Produit E = le formol :** Le formol, aussi appelé formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O), est un composé faisant partie des aldéhydes. C'est en fait un mélange de méthanal (sous forme de gaz à température ambiante) qui se solubilise très bien dans l'eau pour former le formol. Il est notamment utilisé comme désinfectant. En France, cette substance active n'est plus autorisée depuis Juillet 2006 dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché [26]. Il s'agit en effet d'un produit CMR (cancérogènes, mutagène ou toxique pour la reproduction) [27]. Le formol utilisé lors de l'essai est concentré à 37%.

**Produit F :** Ce produit est décrit comme étant un désinfectant breveté pour les surfaces, à large spectre et biodégradable. C'est un bactéricide, virucide, levuricide, fongicide, sporicide qui détruit 99,99999% des virus, bactéries, champignons et germes pathogènes. Il est non nocif et non toxique pour l'homme et son environnement. Ce produit est composé de deux solutions

distinctes : la partie A contenant 3,2% d'ammonium quaternaire et du benzyalkyl et la partie B contenant 7,95% de peroxyde d'hydrogène non organique [28].

Ces 2 produits sont mélangés à 50% pour leur application. Une fois le mélange réalisé, celui-ci reste actif uniquement 8h.

**Produit G :** Ce produit est également composé de deux solutions : la première correspond à la solution de base qui est dix fois plus concentrée que la seconde : l'activatrice. Une fois les deux solutions en contact il faut attendre deux minutes pour que la solution soit efficace et ce pendant 24h. Ce produit est destiné en priorité aux salles blanches, le mélange des 2 produits génère une solution de dioxyde de chlore.

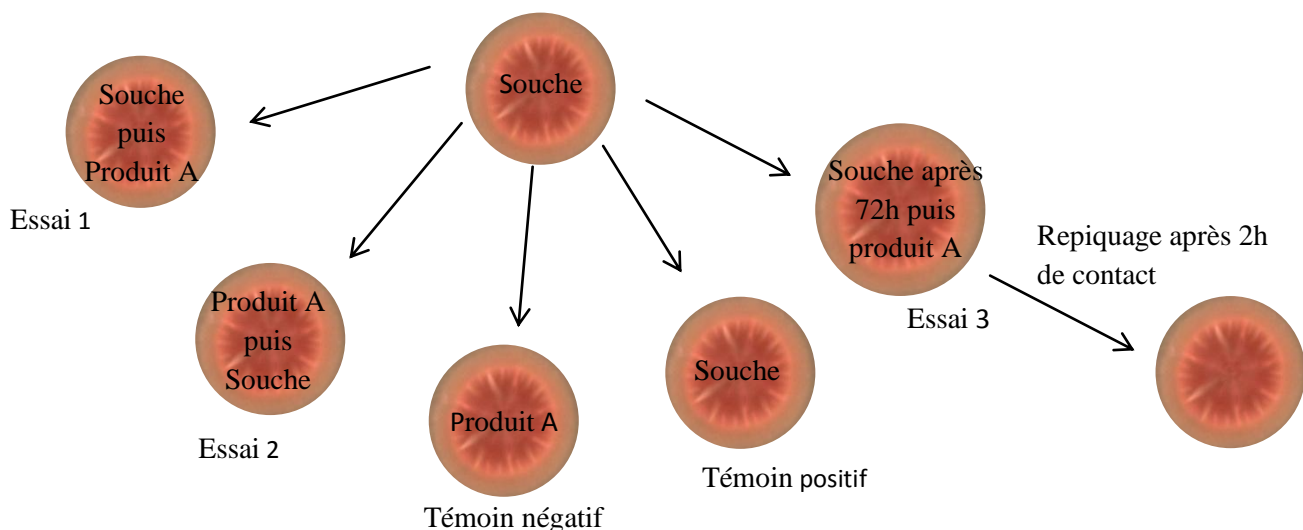
Pour ces essais, tous les produits sont utilisés à leur dose indiquée d'utilisation.

### c) Vaporisation

Pour mettre en contact nos produits et nos souches, nous avons repiqué les souches dans des boîtes de Pétri sur du milieu MEA et nous avons vaporisé sur celle-ci les produits fongicides. Les vaporisateurs ont été réglé pour projeter 0,6 ( $\pm$  0,1) mL à chaque vaporisation. De plus, une seule vaporisation suffit pour recouvrir la totalité de la boîte par le produit.

### d) Protocole

Pour mettre en évidence l'activité fongicide ou non des produits, nous avons mis en place le protocole suivant. Voici l'exemple pour la souche 1 et le produit A.



Pour chaque essai, on utilisera la souche de départ pure.

**Pour le premier essai :**

- Vaporiser le produit sur une boîte de Pétri stérile
- Repiquer la souche en faisant des stries à l'aide d'une oese

**Pour le second essai :**

- Repiquer la souche en faisant des stries à l'aide d'une oese
- Vaporiser le produit
- 

**Pour le troisième essai :**

- Prendre une souche à (t + 72h)
- Vaporiser le produit
- Laisser en contact 2h
- Racler la surface de la moisissure à l'aide d'une oese
- Réaliser des stries pour repiquer la souche sur une nouvelle boîte de Pétri.

Il y a également un témoin négatif (le produit seul) et un témoin positif (le repiquage seul).

Le même schéma sera reproduit avec les 4 souches et les différents produits. Les boîtes seront ensuite mises à incuber à 25°C pendant 96h.

Les lectures se font à 24h, 48h et 96h. Ces temps de lecture ont été choisis pour observer à quelle vitesse pousse la colonie, c'est-à-dire pour voir si le produit a un impact que ce soit en accélérant ou en ralentissant la croissance de la souche concernée. **Les essais seront répétés 3 fois.**

## V. Résultats

Les produits fongicides doivent être validés par des normes pour être sûr de leur efficacité. Or, pour passer ces normes, l'efficacité des produits n'est testée que sur les spores de moisissures celles-ci étant considérées comme les formes les plus résistantes des moisissures.

En ce qui concerne les résultats de l'étude, tout d'abord les boîtes des témoins négatifs sont restées vierges de toutes colonies de microorganismes que ce soit des bactéries ou des moisissures. Les témoins positifs eux ont poussés, sans contamination.

Un tableau récapitulatif des résultats a été réalisé (Tableau 1) : les essais, les produits et les souches y sont rappelés. Une case avec un point vert ● signifie que l'on a le résultat attendu : le produit est efficace. Au contraire, une case avec un point rouge ● signifie que la souche a poussé. Les explications concernant le tableau sont ci-après.

| Produit | <i>Aspergillus niger</i> |                     |              | <i>Aspergillus fumigatus</i> |                     |              |
|---------|--------------------------|---------------------|--------------|------------------------------|---------------------|--------------|
|         | Souche puis produit      | Produit puis souche | Souche à 72h | Souche puis produit          | Produit puis souche | Souche à 72h |
| A       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| B       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| C       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| D       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| E       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| F       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |
| G       | ●                        | ●                   | ●            | ●                            | ●                   | ●            |

| Produit | <i>Penicillium chrysogenum</i> |                     |              | <i>Candida albicans</i> |                     |              |
|---------|--------------------------------|---------------------|--------------|-------------------------|---------------------|--------------|
|         | Souche puis produit            | Produit puis souche | Souche à 72h | Souche puis produit     | Produit puis souche | Souche à 72h |
| A       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| B       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| C       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| D       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| E       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| F       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |
| G       | ●                              | ●                   | ●            | ●                       | ●                   | ●            |

Tab.1 : Tableau récapitulatif : Résultats de l'étude par souche et par produit, les résultats prennent en compte uniquement la lecture à 92h

Tout d'abord, les essais en 3 fois nous permettent d'assurer une reproductibilité lors de l'étude. La plupart du temps, les 3 boîtes concernant le même essai (même souche, même produit) ont obtenues le même résultat.

Lorsque les résultats divergeaient, nous avons considéré la majorité. Ainsi, si une souche poussait sur 2 boîtes mais pas sur la troisième, nous avons estimé qu'elle poussait à chaque fois, ce qui donne un point rouge dans le tableau. De plus, nos témoins sont bons ce qui signifie que notre essai est valable.

### e) Résultats par produits

- **Produit A :** Pour les 4 souches, on remarque que le produit A est très peu efficace, il n'empêche que *Penicillium chrysogenum* de pousser dans un seul cas : lorsque la souche est d'abord repiquée sur la boîte de pétri puis le produit vaporisé.

- **Produit B :** Le produit B correspond au vinaigre blanc. On remarque que sur les *Aspergillus* le produit n'est pas efficace : il ne gêne pas la croissance des moisissures (Figure 12). Et pour les 4 souches il est inefficace sur une souche de 72h.

On observe seulement une efficacité sur les 2 premiers essais sur *P. chrysogenum*.



Fig.12 : *Aspergillus fumigatus* puis vaporisation du produit B : résultat après 92h à 25°C

- **Produit C :** Le produit C, l'eau de javel, paraît plus efficace que les produits précédemment cités. Il est efficace sur les 2 premiers essais pour chaque souche mais pas sur l'essai concernant la souche à 72h, sauf pour *A. niger*. On peut estimer que ce produit est quand même efficace car dans 9 cas sur 12 il empêche la croissance de la souche.

- **Produit D :** Le produit D n'a eu aucune efficacité sur *Candida albicans* en effet, les 3 essais montrent que la souche a été capable de pousser malgré la présence du produit. Au contraire, *Aspergillus niger* n'a pas pu pousser en présence du produit. Enfin, pour les 2 souches restantes, seuls les 2 premiers essais ont permis de prouver l'efficacité du produit. C'est sur les deux *Aspergillus* que le produit a été le plus efficace.

- **Produit E :** Le produit E est un des plus efficace. En effet, il empêche la croissance de *P. chrysogenum*, *A. niger* et *A. fumigatus* pour les 3 essais mis en place. Par contre, avec *Candida albicans*, le produit est efficace uniquement lorsque la souche a été repiquée puis le produit vaporisé.



- **Produit F** : Avec ce produit, les 4 souches ont la même réaction : elles sont capables de pousser pour le 3<sup>ème</sup> essai mais leur croissance est inhibée pour les 2 premiers essais.

On peut donc penser que le produit F est efficace si le mycélium n'est pas développé. Au contraire, le produit F n'a aucune action sur une souche à 72h, soit quand le mycélium est déjà formé.

- **Produit G** : Le produit G est le moins efficace de tous les produits testés durant l'étude. En effet, sur 36 boîtes (12 essais en triplicata) aucune n'est restée vierge, le produit n'a empêché la croissance d'aucun *Fungi* sur les différents essais.

## f) Résultats par souches

Sur *Aspergillus niger*, les produits C et E sont les plus efficaces : la souche ne pousse sur aucune boîte. Au contraire, les produits A, B et G n'ont réussi à empêcher la croissance de l'*aspergillus* sur aucun des essais.

Pour le deuxième *Aspergillus* : *Aspergillus fumigatus*, les produits A, B et G ont le même effet que précédemment : ils n'ont aucune efficacité. Le produit E est encore efficace sur tous les essais. Les produits C et F ne sont pas efficace sur la souche de 72h.

Sur *Penicillium chrysogenum*, seul le produit G n'a aucune efficacité. Le produit E est quant à lui une nouvelle fois efficace sur tous les essais.

Les produits A et D n'empêchent la croissance du penicillium que sur l'essai 1 : repiquage de la souche puis vaporisation du produit. Pourtant, la couleur marron que prend la colonie après 2h de contact avec le produit D pourrait faire penser que ce produit aurait pu être efficace sur l'essai 3 (Figure 13).



Fig.13 : *Penicillium chrysogenum* à 72h après 2h de contact avec le produit D

Enfin, pour *Candida albicans* seuls les produits A et F sont capables d'éviter la croissance de la levure sur les 2 premiers essais. Pour la souche à 72h, aucun produit n'a de réelle action sur la levure.

### g) Résultats par essais

Pour le premier essai (souche puis vaporisation du produit) dans 17 cas sur 28 les produits sont efficaces. Les produits A, B et G sont ceux qui ont le moins d'efficacité.

Pour le second essai, les résultats sont similaires au premier essai. Le produit G est là encore inefficace sur chaque souche.

Pour le troisième essai, seul le produit E a été efficace sur 3 souches sur 4. Le manque d'efficacité des produits peut être dû au fait que le mycélium est développé sur ces souches et que lors du repiquage après 2h de contact il est capable de repousser. On aurait alors une action fongistatique des produits et non pas une action fongicide.

On peut également noter que pour le troisième essai sur *Aspergillus niger*, la souche repiquée se développe plus vite que le témoin positif avec le produit B. On peut donc penser qu'au lieu d'inhiber la croissance de la moisissure, le fongicide stimule celle-ci.



## VI. Discussion

Dans l'ensemble, on remarque que les produits sont plus efficaces sur les 2 premiers essais que sur le troisième ceci est peut-être dû au fait que pour les 2 premiers essais le mycélium n'est pas développé. En effet, lorsque la souche a 72h le mycélium est bien formé, ainsi, même après 2 heures de contact, le produit biocide ne peut pas pénétrer entièrement dans le mycélium c'est pourquoi lorsque l'on repique la souche elle réussit à pousser sur un milieu neuf. Les produits sont donc plus efficaces si le mycélium n'est pas développé ce qui validerait l'hypothèse que la forme végétative des moisissures est plus résistante que la forme sporulée.

On peut également penser que le produit sélectionne les éléments les plus résistants de la souche. Ceci expliquerait que certaines souches poussent.

Les produits sont dans l'ensemble moins efficaces sur *Candida albicans* que sur les autres souches. Cette levure fait partie des souches utilisées par les normes pour valider l'efficacité des produits biocides à activité fongicide. Elle a été sélectionnée pour sa résistance aux produits biocides.

Lorsque les fournisseurs annoncent sur un produit : NF EN 1275 (*Candida albicans*) cela signifie que le produit a été validé par la norme car il est efficace sur cette levure. En joignant les fournisseurs, ceux-ci nous apprennent que lorsque le produit est efficace sur *Candida albicans* il sera donc efficace sur *Aspergillus niger* car ce dernier est moins résistant. Au vu des essais réalisés, cette théorie peut-être validée car on voit bien que les produits ont plus de mal à inhiber la croissance de la levure que celle de la moisissure.

Au contraire, *Penicillium chrysogenum* semble être une des souches les plus faciles à être inhibée car c'est sur celle là que l'on trouve le plus de cas avec un point vert.

Cette étude permet donc de prouver que la forme végétative des moisissures est bien plus résistante que les spores. En effet, si les souches poussent sur les boîtes de pétri alors que les spores sont inhibés cela signifie que la forme végétative n'a elle pas été décontaminée.

Pourtant, les normes étudiées lors de ce rapport mettent bien en évidence que seule l'efficacité du produit sur les spores de moisissures est demandée pour que le produit soit validé par la norme. Mais si la forme végétative des moisissures est plus résistante que les spores, des produits qui éliminent seulement les spores sont-ils réellement efficaces ?

De plus, les normes ne spécifient aucune action mécanique (frottement...) pour valider l'efficacité des produits. Ainsi, les normes devraient-elles préciser qu'une action mécanique est nécessaire pour assurer la bonne efficacité des produits.

Pour répondre à cela il faudrait réaliser d'autres tests.

Tout d'abord, on pourrait réaliser des tests concernant les concentrations des produits en testant différentes concentrations de chaque produit pour contrôler si une concentration plus élevée peut permettre une décontamination efficace.

Il faudrait également tester d'autres produits validés par les normes pour confirmer le diagnostic qui indique que la forme végétative des moisissures est la forme la plus résistante de ces dernières.

D'autres essais pourraient également être mis en place pour prouver que certains produits sont capables d'inhiber la croissance des moisissures mais non pas de tuer celles-ci.

## VII. Conclusion

Les moisissures jouent un rôle majeur dans les problèmes de contamination. Elles ont un impact sanitaire et économique majeur dans notre société. Pour les combattre, de nombreux produits sont sur le marché, leur vente et leur production sont très règlementer grâce au règlement REACH et à la directive biocide 98/8/CE.

Le contrôle des moisissures est donc primordial. Pour limiter ces contaminations, en laboratoire, nous utilisons au quotidien des produits biocides à activité fongicide que ce soit pour la décontamination des surfaces ou celle du matériel.

Mais ces méthodes d'élimination sont-elles vraiment efficaces ? En effet, l'étude réalisée lors de ce rapport nous prouve que la forme végétative des moisissures est plus résistante que les spores. Or les produits fongicides mis sur le marché sont validés par des normes n'imposant que des tests sur les spores. On peut donc penser que ces normes ont des limites.

Pour remédier à cela, il faudrait mettre en place de nouvelles normes imposant des tests d'efficacité sur les spores mais également sur la forme végétative des moisissures. De plus, il serait sans doute judicieux de mettre en place des tests différents selon l'usage pratique des fongicides. En effet, les moisissures à éliminer sont différentes que l'on se situe dans un hôpital ou dans une industrie agroalimentaire par exemple. Etant donné que les cibles seront différents, les tests devraient eux aussi être différents.

## VIII. Bilan général

D'un point de vue professionnel, cette année en alternance m'a beaucoup appris en effet, elle m'a permis de côtoyer de plus près le monde du travail ainsi que les relations avec les clients.

J'ai pu participer à des prélèvements dans une industrie pharmaceutique de la région lyonnaise ce qui m'a permis d'adopter un comportement professionnel vis-à-vis du client. Cela m'a également appris à être plus autonome car j'ai plusieurs fois eu l'occasion d'aller seule dans cette entreprise pour réaliser les prélèvements.

Au niveau relationnel, le fait d'entrer dans une petite entreprise m'a permis de m'intégrer très facilement à l'équipe et d'être rapidement à l'aise avec mes collègues de travail.

D'un point de vue personnel, cette année m'a permis d'acquérir une année supplémentaire de compétences tant au niveau théorique que pratique. Cela m'a permis de découvrir un domaine que je ne connaissais pratiquement pas et qui m'a tout de suite plu. Durant toute mon année d'apprentissage j'ai pu réaliser de nombreux travaux variés : repiquage de souche, reconnaissance et comptage des pollens et moisissures, mise en place des tambours de pollens, réalisation et lecture de scotch-test... J'ai également pu acquérir de nouvelles connaissances dans la vie de tous les jours en ce qui concerne des notions comme les arbres allergisants ou les risques de contaminations liés aux moisissures.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Salles propres, Mars-Avril 2010, N°67, ISSN 1291-6978
- [3] Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement, Avril 2011, **La réglementation sur les produits biocides**
- [4] Isabelle Prevost, 2004, **Implications techniques administratives et commerciales de l'évolution réglementaire. Application aux détergents et désinfectants utilisés à l'hôpital**
- [5] Jacques Estienne, 2006, Annie Albert, **REACH**
- [6] C.Dumartin, 2005, **Les produits désinfectants et détergents-désinfectants : Normalisation et classification**
- [7] Anne Brunon, Novembre 2012, **Les désinfectants**
- [8] Xavier Verdeil, 2008, **Les antiseptiques**
- [9] **Synthèse et veille normative relative aux antiseptiques et désinfectants**, 2005
- [10] Sandrine MARIE, 2006, **Evaluation de l'activité des désinfectants utilisés en industrie pharmaceutique et cosmétique par des essais quantitatifs de surface**
- [11] **Norme AFNOR NF EN 1275**, 2006
- [12] **Norme AFNOR NF EN 1650**, 2008
- [13] **Norme AFNOR NF EN 13 697**, 2001
- [14] Nicolas GIRARDIN, 2011, **Gestion des biofilms : enjeux industriels**
- [15] Gordon Ramage, Ranjith Rajendran, Leighann Sherr, Octobre 2011, **Fungal Biofilm resistance**, International Journal of Microbiology
- [16] Carly V. Redelman, Chike Maduakolam, Gregory G. Anderson, Octobre 2012, **Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development**, FEMS Immunol Med Microbiol, Vol 66 p 411–418
- [17] Gordon Ramage, Ranjith Rajendran, Leighann Sherr, Octobre 2011, **Fungal Biofilm resistance**, International Journal of Microbiology
- [19] G.K. Villena , T. Fujikawa , S. Tsuyumu, 2009, **Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy**, Bioresource Technology 1920 - 1928
- [20] Eloise M Harman, Zab Mosenifa, Mai 2011, **Aspergillosis Treatment & Management**
- [21] Jean-Paul Latgé, Avril 1999, ***Aspergillus fumigatus* and Aspergillose**, Clinical Microbiology reviews

[22] R. Benghida, H. Ghezzi, J.L. Malo, 2007, **Sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* et devenir fonctionnel de l'asthme**, Revue des Maladies Respiratoires, Vol 24, N° 1, p. 23-31

[24] Jeniel E. Nett, Kristie M. Guite, Alex Ringeisen, Juin 2008, **Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms**, Antimicrob Agents Chemother, Vol 52(9): 3411–3413

[26] INRS, Janvier 2008, **Le point des connaissances sur le formaldéhyde**

[27] **Etat des lieux sur l'utilisation du formaldéhyde en Lorraine**, 2007

[28] DEVEA, Novembre 2012

### Internet :

[2] <http://www.rnsa.fr> (consulté le 23 Mai 2013)

[18] <http://www.pasteur.fr/recherche/2004/Bpf.html> (consulté le 18 Mai 2013)

[23] [http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/nov2003.html](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2003.html) (consulté le 23 Juillet 2013)

[25] <http://www.consoglobe.com/eau-javel-chasse-bacteries-cesser> (consulté le 19 Juin 2013)

### Sources photos :

Figure 1 : [www.rnsa.fr](http://www.rnsa.fr)

Figure 2 : [www.rnsa.fr](http://www.rnsa.fr)

Figure 3 : [www.rnsa.fr](http://www.rnsa.fr)

Figure 4 : [www.processpropre.fr](http://www.processpropre.fr)

Figure 5 : Inspirée de [www. accident-fromagerie.fr](http://www.accident-fromagerie.fr)

Figure 6 : [www.thenauhaus.com](http://www.thenauhaus.com)

Figure 7 : Source RNSA

Figure 8 : Source RNSA

Figure 9 : [www.botit.botany.wisc.edu/tomfingi](http://www.botit.botany.wisc.edu/tomfingi)

Figure 10 : [www.biotrans.uni.wroc.pl](http://www.biotrans.uni.wroc.pl)

Figure 11 : Source RNSA

Figure 12, 13 : Photos prises lors de l'essai