

MICROORGANISMES VIABLES CULTIVABLES OU NON CULTIVABLES : EXEMPLES DES MOISSURES ENVIRONNEMENTALES

Michel THIBAUDON, ASPEC/RNSA

La microbiologie est un domaine des sciences appliquées qui a pour objet les micro-organismes et les activités qui les caractérisent. Plus spécifiquement, la microbiologie se consacre à :

- identifier et caractériser des micro-organismes
- étudier leur origine et leur évolution
- définir leurs caractéristiques, les produits de leurs activités et leurs besoins
- comprendre les relations qu'ils entretiennent entre eux et avec leur milieu naturel ou artificiel.

La microbiologie culturale a été créée il y a plus d'un siècle dans le but de pouvoir identifier les microorganismes à l'origine de maladies infectieuses. Cette technologie, très en avance, permettait de transformer l'invisible en visible et de pouvoir déterminer plus complètement les caractéristiques des différents germes en fonction de la composition des milieux de culture, des températures et durées d'incubation. De plus, la microbiologie a été immédiatement orientée par la microbiologie clinique avec la nécessité de détecter les microorganismes responsables de maladies (infectieuses) et d'être capable d'identifier les germes à leur origine.

Pour ces besoins, ont été développés avant le début du 20^e siècle des milieux de culture permettant le développement des microorganismes. Ces milieux ont permis de sélectionner les microorganismes d'intérêt, appliqués à chaque type de pathologies infectieuses.

La microbiologie environnementale développée, depuis une quarantaine d'années, à partir des techniques culturales éprouvées en microbiologie clinique, montre une forte différence entre le nombre de microorganismes viables et cultivables et le nombre de microorganismes viables non cultivables (The Great Plate Count Anomaly). Un pourcentage important (de 50 à 99% selon les biotopes) des microbes de l'environnement sont incultivables (Amann, Ludwig, and Schleifer 1995) notamment lorsqu'ils sont stressés par leur environnement.

En microbiologie environnementale, l'utilisation de milieux de culture universels, même si leur utilité est aujourd'hui démontrée, contraint la culture de différents types de micro-organismes et nécessite un temps de réponse lié aux durées et températures d'incubation des milieux inoculés.

De nombreux travaux ont permis, au cours des dix dernières années, de voir apparaître des méthodes alternatives aux méthodes culturales, en microbiologie environnementale (et aussi en microbiologie clinique) basées soit sur la microscopie, la cytométrie, la fluorescence, la bioluminescence, ou les différentes techniques de biologie moléculaire, etc. Certaines de ces méthodes permettent d'obtenir des résultats en temps réels et d'autres ont permis de largement diminuer les durées d'incubation.

La microbiologie environnementale comprend essentiellement les mesures des biocontaminants dans l'air, les surfaces et l'eau. Elle se décompose en actions de prélèvements (échantillonnage) et d'analyses. L'échantillonnage peut être décomposé en différentes techniques en fonction de la méthode d'analyse retenue. La méthode d'analyse la plus courante demeure la méthode par culture, bien qu'il s'agisse d'une méthode de mesurage indirecte qui présente certaines limites. D'autres méthodes plus récentes, appelées « métrologie avancée », proposent une approche de détection différente et particulièrement intéressante, notamment les méthodes de microbiologie alternative (AMM). Les méthodes AMM assurent une surveillance et une détection quasi instantanée de toutes les particules viables, sans se limiter aux seules particules cultivables. Ces technologies ne sont cependant pas suffisamment développées pour remplacer les méthodes indirectes traditionnelles reposant sur le dénombrement des UFC (Unité Formant Colonie) et qui demeurent les méthodes de référence.

Les méthodes microbiologiques rapides (RMM) sont en plein développement depuis 20 ans. Ces méthodes, présentées comme plus sensibles, précises, reproductibles ou rapides, contribuent à accélérer le lancement de lots de production et à obtenir rapidement des résultats sur la contamination biologique. Ces méthodes permettent de mieux comprendre les sources de contaminations tout au long du procédé et garantissent un retour sur investissement significatif moyennant un important effort de validation. Par contre, bien souvent ces méthodes nécessitent des étapes de pré-enrichissement par culture ce qui limite leur portée aux particules cultivables dans les conditions de l'essai. Une meilleure compréhension des procédés contribue à réduire les non-conformités tout en améliorant le rendement. La mise en œuvre de méthodes alternatives et/ou rapides représentent une avancée considérable afin qu'elles puissent devenir des solutions microbiologiques classiques dans l'industrie. Elles répondent directement aux attentes d'excellence qualitative et opérationnelle exprimées dans l'industrie pharmaceutique/biopharmaceutique des sciences de la vie ; mais à ce jour elles ne peuvent pas remplacer les méthodes traditionnelles de par les difficultés de comparaisons, essentiellement entre particules cultivables et particules viables.

La version en cours de développement du projet de norme sur la biocontamination présente des définitions spécifiques :

- particule viable : particule contenant un ou plusieurs micro-organismes vivants
- particule cultivable : particule qui a la capacité de se développer et de produire des unités formant colonie au moyen de techniques standards de mise en culture microbiologique
- particule non cultivable : qui n'a pas la capacité de se développer et de produire des unités formant colonie au moyen de techniques standards de mise en culture microbiologique

Et enfin :

- biocontaminants : contaminants renfermant des micro-organismes viables (ou d'origine biologique)

Les mesures de la biocontamination environnementale comprennent deux étapes, souvent distinctes, le prélèvement et l'analyse. Chacune de ces étapes se trouve

entachée d'un niveau d'erreur qui aboutit bien souvent à une interprétation difficile du résultat, surtout en milieux très faiblement contaminés. Par exemple une absence de colonie sur une boîte de culture d'un milieu universel ayant subi une impaction, n'a pas d'autre signification que « rien ne pousse ».

Les seules méthodes de prélèvements de l'air que ce soit par sédimentation, par impaction, par cyclones etc. ne permettront pas de réaliser tous les types d'analyses, de même pour les surfaces, les boîtes contact, les bullages, les lames adhésives seront utilisées à des fins analytiques différentes.

L'exemple des moisissures environnementales est un bon modèle pour comprendre les difficultés rencontrées. En effet des spores fongiques sont très abondantes dans l'air extérieur, en particulier entre la fin du printemps et la fin de l'automne, et on les retrouve partout à l'intérieur des locaux que ce soit en habitat, en établissements recevant du public, en milieux hospitaliers, dans le tertiaire et dans les différents types d'industries. Citons simplement les *alternaria* abondants et à l'origine de manifestations allergiques graves, ou certain *stachybotrys* (*Stachybotrys chartarum*) capables de produire des mycotoxines dangereuses, ou en encore des *aspergillus* comme des *Aspergillus niger* ou *Aspergillus fumigatus* dont les conséquences sanitaires et économiques ne sont plus à démontrer.

Des contrôles environnementaux réalisés par milliers dans des environnements comprenant de nombreuses moisissures en plusieurs locaux ont permis de constater les grandes différences d'efficacité des différents types de prélèvements et d'analyses. Si l'on s'en tient uniquement aux deux méthodes classiques que sont la culture en milieu spécifique pour les moisissures ou la détection par observation au microscope optique, on constate que :

- Une grande majorité des spores fongiques sont détectées facilement en microscopie optique mais les identifications au niveau du genre sont plus délicates et dépend de la nature même du prélèvement.
- Les analyses par culture donnent des résultats très différents selon que l'on utilise un milieu universel de type TSA (Tryptone Soja Agar), un milieu Sabouraud, très utilisé en clinique, ou un milieu MEA (Malt Extract Agar) qui est le plus performant.
- Les analyses par cultures ne sont pas performantes au niveau de la détection ni du quantitatif, mais permettent une meilleure possibilité d'identification grâce à l'étape de culture des mycéliums, par exemple. Dans ces cas la microscopie devient un outil d'aide à l'identification.
- Les analyses par culture nécessitent des étapes d'incubations longues alors que les détections par microscopie peuvent être faites dans les minutes qui suivent l'arrivée du prélèvement au laboratoire.

Détection des moisissures :

Contamination de l'air	Culture	Détection au microscope optique	
Spores en faible quantité	++	+++	Détection
	+	+++	Comptage
	+++	++	Identification
Spores en grande quantité	++	+++	Détection
	++ (problème d'envahissement)	+++	Comptage
	++ (problème d'envahissement)	++	Identification
Mycélium en faible quantité	++	+++	Détection
	+	+++	Comptage
	+++	0	Identification
Mycélium en grande quantité	++	+++	Détection
	++ (problème d'envahissement)	+++	Comptage
	++ (problème d'envahissement)	0	Identification



Tous ces travaux ont été réalisés dans des environnements classiques, donc avec un niveau de contamination moyen ou élevé. Dès que l'on s'adresse à des environnements théoriquement très peu contaminés par des moisissures, les incertitudes de récupérations en utilisant les méthodes culturales sont encore plus importantes.