



Quantifier le microbiote cutané en seconde à l'aide d'une activité pratique

Lycée (2^{nde})

Édition 1 - 2021 - Thomas Waag (testée par Eric Trehiou)

Intentions

En lien avec la ressource « Le professeur de sciences et le B.O. : microbiote humain et santé - notion n°1 » cette activité a pour objectif de comprendre comment les scientifiques ont pu quantifier le microbiote de la peau. Une activité pratique est proposée en prenant en compte les restrictions liées à la réglementation à suivre pour les séances de TP en lycée afin de faire concevoir par les élèves des protocoles expérimentaux permettant d'échantillonner et quantifier un microbiote.

L'étude du microbiote cutané

Parmi les capacités à travailler selon le B.O., un élève doit pouvoir calculer la proportion de microbes présents dans un individu par rapport à son nombre de cellules. La quantification du microbiote cutané peut être réalisée de façon approximative en observant un cliché de microscopie électronique à balayage de la surface de la peau (cf. figure 1) et en prenant en compte l'échelle et la surface de la peau (en moyenne pour un homme adulte de 70 kg, elle est de 2 m²). Si le cliché est bien choisi, l'élève pourra trouver un ordre de grandeur de 10¹¹ bactéries. En complétant cette valeur avec d'autres données concernant les autres microbiotes (voir la ressource présentée dans les [pistes au quotidien](#)), il sera possible de la comparer au nombre de cellules d'un être humain. Cependant cette méthode ne permet pas de faire travailler l'élève de façon critique sur un cas concret. En effet, aucun argument ne permet de définir la microphotographie choisie comme représentative et la situation ne reflète pas les enjeux actuels de l'étude des microbiotes.

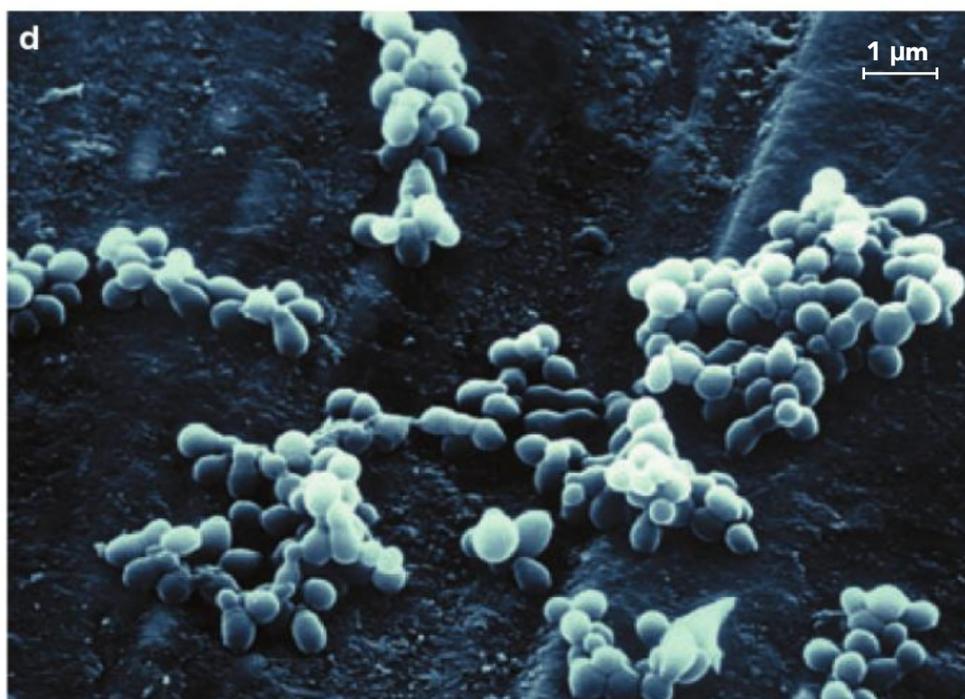


FIGURE 1

Photographie au microscope électronique à balayage de la surface d'un pied (source : Malcolm, 1980)

La réglementation à suivre pour une activité pratique

Selon la réglementation, toute empreinte palmaire est interdite. Par ailleurs, toute culture n'étant pas monospécifique est également proscrite (cf. figure 2). La réalisation d'une séance de travaux pratiques avec les élèves nécessite donc de faire de nombreux compromis. Malgré tout, des manipulations intéressantes peuvent être envisagées afin de faire réfléchir les élèves au sujet des méthodes permettant d'échantillonner et quantifier un microbiote.

Les règles à respecter	Les bonnes pratiques
Les cultures doivent rester mono-spécifiques.	<ul style="list-style-type: none"> ■ Utiliser par exemple des micro-organismes employés dans l'alimentation (levures, ferments lactiques,...), ou certifiés de groupe 1 par le fournisseur. ■ Observer directement des prélèvements de sols, eaux de mares, étangs... <p>⚠ Ne pas réaliser de cultures à partir de prélèvements de sols, eaux, d'empreintes de doigts, de cheveux, sur du pain ou du yaourt, il est impossible de contrôler les souches qui s'y développent.</p>
Tout le matériel utilisé doit être stérile .	<ul style="list-style-type: none"> ■ Stériliser le matériel en verre ou métallique par chaleur sèche et les milieux de culture par autoclavage (au moins 121°C pendant 20 min) ou à défaut avec un autociseur en bon état (à 118°C pendant 1h). ■ Si le matériel est à usage unique, tremper le matériel plastique dans un désinfectant en respectant les conditions d'utilisation du produit (concentration et durée). <p>⚠ Ne pas mettre d'eau de Javel dans un autoclave ou un autociseur.</p>
Les plans de travail doivent être désinfectés et maintenus en état .	<ul style="list-style-type: none"> ■ Nettoyer la paillasse avec un tensio-actif puis désinfecter. ■ Travailler à proximité d'un bec à gaz ou électrique. <p>⚠ Ne pas utiliser d'alcool à proximité d'une source de chaleur.</p>
Les élèves doivent impérativement respecter les consignes de sécurité .	<ul style="list-style-type: none"> ■ Maintenir les cheveux attachés, porter une blouse en coton, se laver les mains avant et après toute manipulation. ■ Pour éviter la contamination des cultures, limiter les mouvements d'air, les gestes brusques, ne pas parler. ■ Récupérer dans une solution désinfectante le matériel utilisé (respecter concentration et temps du produit utilisé).
Les cultures doivent être fermées .	<p>Fermer les boîtes de Pétri avec du film plastique ou du ruban adhésif. Pour les cultures liquides, utiliser uniquement des tubes avec bouchon à vis.</p> <p>⚠ Ne jamais ouvrir les boîtes de culture visiblement contaminées et les éliminer.</p>
Les cultures sont conservées dans un lieu dédié et identifié .	<p>Apposer une affiche sur l'endroit où sont conservées les cultures avec le nom du micro-organisme concerné, le milieu utilisé et la date de mise en culture.</p>
L'utilisation de certains OGM demande une déclaration .	<p>Manipuler des agents intégrant un plasmide implique une simple déclaration en suivant le lien : http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid66789/declaration-d-utilisation-ou-demande-d-agrement-d-utilisation-d-o.g.m.html</p> <p>⚠ Ne concerne pas l'utilisation de la levure ADE2.</p>
La mutagenèse par irradiation impose des précautions spécifiques .	<p>Travailler avec un système d'illumination clos ou une lampe UV protégée par un écran plastique. Utiliser les équipements individuels de protection (lunettes de protection adaptées aux rayonnements utilisés).</p> <p>⚠ Ne jamais exposer la peau et les yeux directement au rayonnement UV.</p>
Les cultures et les outils doivent être inactivés avant élimination.	<p>⚠ Les cultures et les matériels utilisés sont autoclavés à 121° C pendant 20 min ou à défaut stérilisés avec un autociseur en bon état à 118°C pendant 1h.</p> <p>Après inactivation :</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Les déchets liquides sont évacués avec les eaux usées (sauf si les cultures ont reçu des produits chimiques dangereux pour l'environnement, dans ce cas les éliminer avec les déchets solides). ■ Les déchets solides (notamment matériels jetables tels que boîtes, tubes, gants...) sont éliminés par le circuit des déchets spécifiques quand il existe. ■ Les "piquants, coupants, tranchants" sont éliminés comme déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI) dans des collecteurs spécifiques.

FIGURE 2

Les règles à respecter concernant les micro-organismes

(source : Observatoire national de la Sécurité et de l'Accessibilité des établissements d'enseignement)

Un substitut pour exercer son esprit critique lors de l'étude d'un microbiote

Le microbiote de la peau ne pouvant être étudié en classe, un substitut doit être envisagé. Le camembert présente un intérêt pour cette étude car il présente une surface recouverte de micro-organismes. Il est ainsi possible de proposer aux élèves de réfléchir à des protocoles de prélèvement et d'observation de ces micro-organismes. En concevant ces protocoles et en réalisant les expériences, les élèves pourront se rendre compte d'une partie des difficultés d'échantillonnage et de comptage des micro-organismes.

Des méthodes d'échantillonnage possibles et leurs biais

Plusieurs méthodes susceptibles d'être proposées par les élèves sont présentées dans la figure 3.

- Le prélèvement de la croûte (équivalent de la biopsie de la peau)

Le prélèvement et l'observation de la croûte est l'alternative la plus simple à imaginer. Les élèves s'étant rendu compte que son observation au microscope optique n'est pas possible du fait de la difficulté à réaliser une coupe fine et que l'observation à la loupe n'apporte pas la précision nécessaire, il est possible de proposer des microphotographies au MEB.

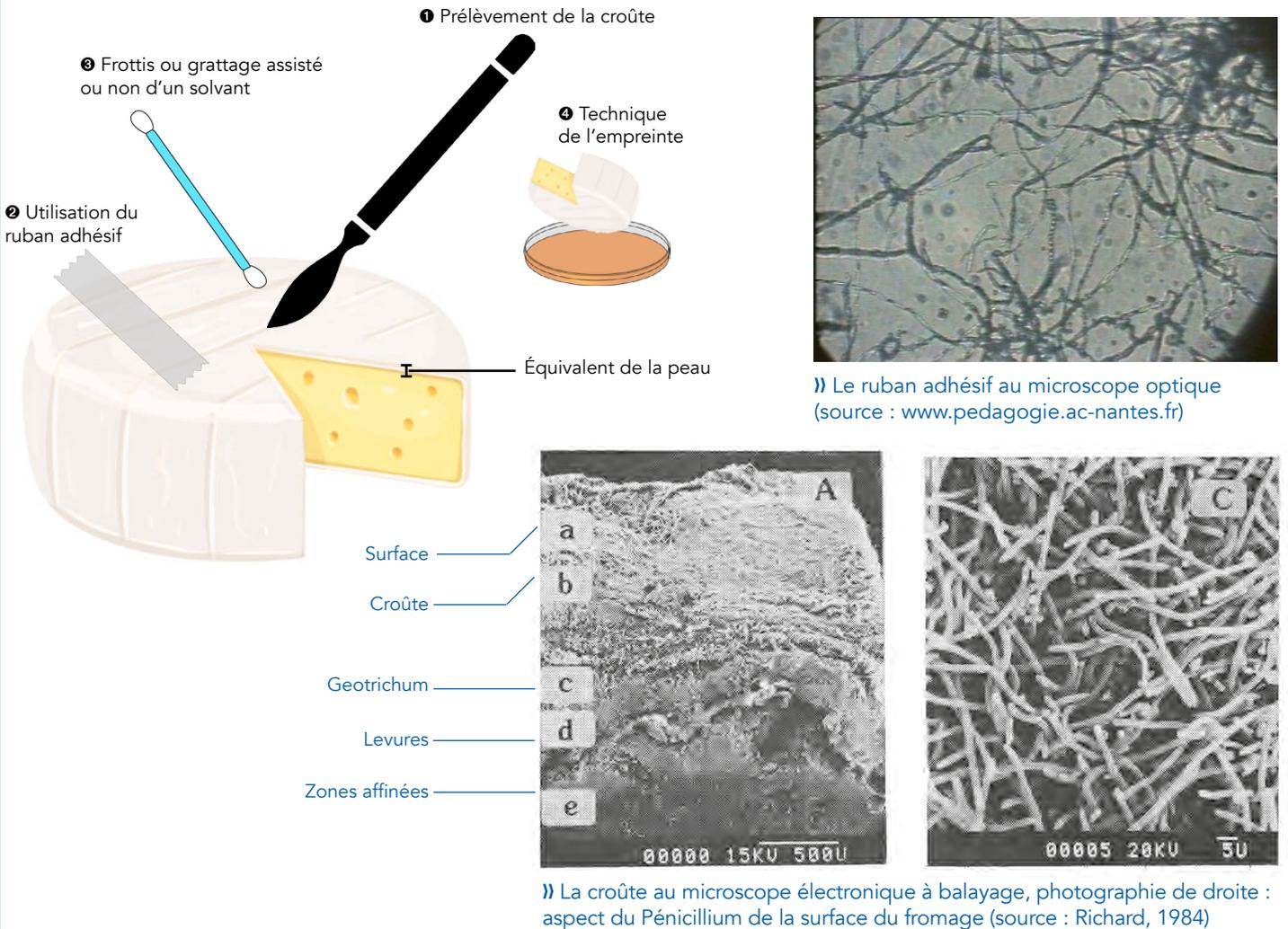
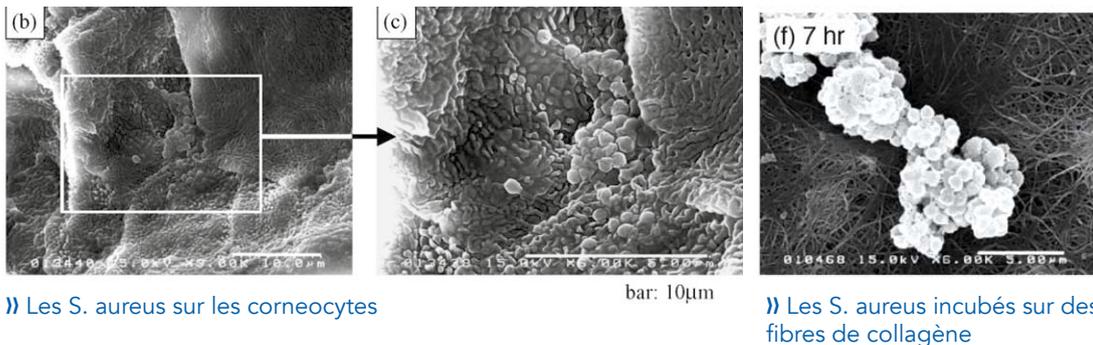


FIGURE 3

Quelques méthodes possibles d'étude du camembert

Les photos (cf. figure 3) permettent de se rendre compte que *Penicillium camberti* et *Geotrichum candidum* ne forment pas une couche mais bien plusieurs couches de micro-organismes. Le dénombrement est donc impossible. La problématique est la même pour la peau et peut être illustrée également par des microphotographies (cf. figures 1 et 4).



» Les *S. aureus* sur les corneocytes

bar: 10µm

» Les *S. aureus* incubés sur des fibres de collagène

FIGURE 4

Le biofilm cutané de Staphylocoques (source : Masako, 2005a et Masako, 2005b)

- La technique du ruban adhésif ou de l’empreinte (équivalent de la plaque de contact pour la peau)

La technique du ruban adhésif est décrite sur le [site pédagogique de l’académie de Nantes](#). Elle permet d’observer une couche de micro-organismes. Puisque le prélèvement est superficiel, il ne permet donc pas de dénombrement. Par ailleurs, l’observation n’est pas aisée. Cette technique devrait être couplée à des techniques de culture (cf. infra) pour mieux détecter les micro-organismes mais le problème principal ne serait quand même pas réglé.

Celle de l’empreinte a le même inconvénient que celle du ruban adhésif. Par ailleurs, la boîte de Pétri utilisée contenant un milieu de culture sélectif ne permettra que de voir une partie des micro-organismes d’intérêt (cf. figure 5). Cette méthode est plus proche de celle utilisée en réalité pour la peau (la méthode de la plaque de contact). À noter que malgré le manque de rigueur pour dénombrer des micro-organismes, cette méthode est fréquemment utilisée dans les études du microbiote cutané car elle a l’intérêt d’être rapide dans son utilisation.

Précisons également que ces cultures sont interdites en lycée car elles ne restent pas monospécifiques. Cependant, il est possible de passer par un laboratoire d’analyse. En effet il pourra garantir le caractère non pathogène des cultures obtenues et pourra également les sceller avant livraison.

Les cultures peuvent être réalisées également à partir de morceaux de fromage mais le développement excessif des thalles ne permettra pas d’analyse (cf. figure 5), ou à partir d’un broyat de fromage dilué dans de l’eau stérile.

- Les techniques de frottis et de grattage assistées ou non de l’utilisation d’un solvant (équivalent de la méthode du frottis et de celle de Williamson-Kligman et de ses variantes pour la peau)

Ces techniques sont efficaces car elles permettent de prélever la quasi-totalité des micro-organismes. Celles utilisant un solvant sont encore plus performantes. Les prélèvements pourront ensuite être placés sur un milieu de culture.

Quelque-soit la méthode de prélèvement choisie, l’observation du résultat d’une culture sous forme de photographie (cf. figure 5) ou de boîte scellée dont la culture a été réalisée dans un laboratoire d’analyse privé, les élèves pourront constater le développement de colonies qu’ils pourront définir comme des unités de mesure. Cette unité correspond à celle utilisée notamment pour l’étude du microbiote cutané et est nommée CFU (colony forming unit). L’appréciation par les élèves de cette situation concrète leur permettra de mieux comprendre les résultats publiés dans les revues scientifiques.

Notons que seules les techniques de frottis ou grattage permettent d’obtenir des colonies qui résultent de la croissance d’un micro-organisme. En effet ces méthodes permettent la dissociation des colonies de micro-organismes de la peau/camembert alors que la méthode du ruban adhésif ou de l’empreinte ne séparent pas les micro-organismes.

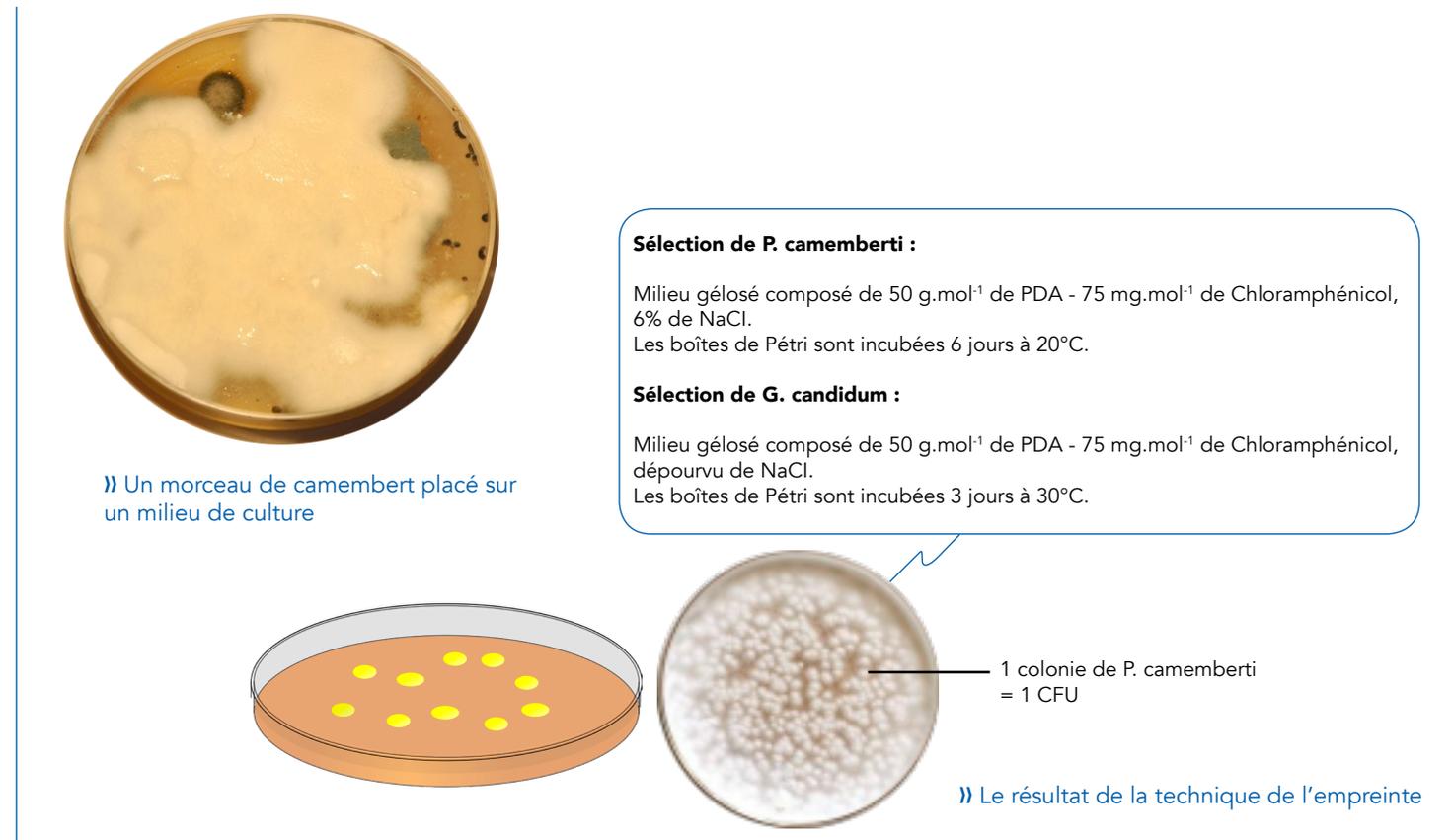


FIGURE 5
L’utilisation de milieux de culture

Le cas de la peau

Une fois que les élèves auront pu se rendre compte des difficultés et intérêts de chaque méthode de prélèvement et de comptage pour le camembert, les limites de ce substitut par rapport à la peau pourront être abordées. La principale différence est que les moisissures sont pluricellulaires et peuvent atteindre une taille importante (300 à 800 μm de longueur pour les conidiophores). Par ailleurs, une problématique importante de l'échantillonnage ne peut pas être appréciée à l'aide de ce modèle et doit être complétée par des photos ; il s'agit de la répartition hétérogène des micro-organismes à la surface de la peau. En effet, les moisissures sont réparties de façon assez uniforme à la surface du camembert alors qu'au niveau de la peau la densité bactérienne varie entre 10^2 cellules/cm² et 10^7 cellules/cm² en fonction des sites. Le principal facteur qui contrôle ces variations est la densité de glandes sébacées, eccrines et apocrines. Il est possible d'aborder ce sujet en proposant un document présentant des estimations de la densité bactérienne en fonction des sites au niveau de la peau (cf. figure 6).

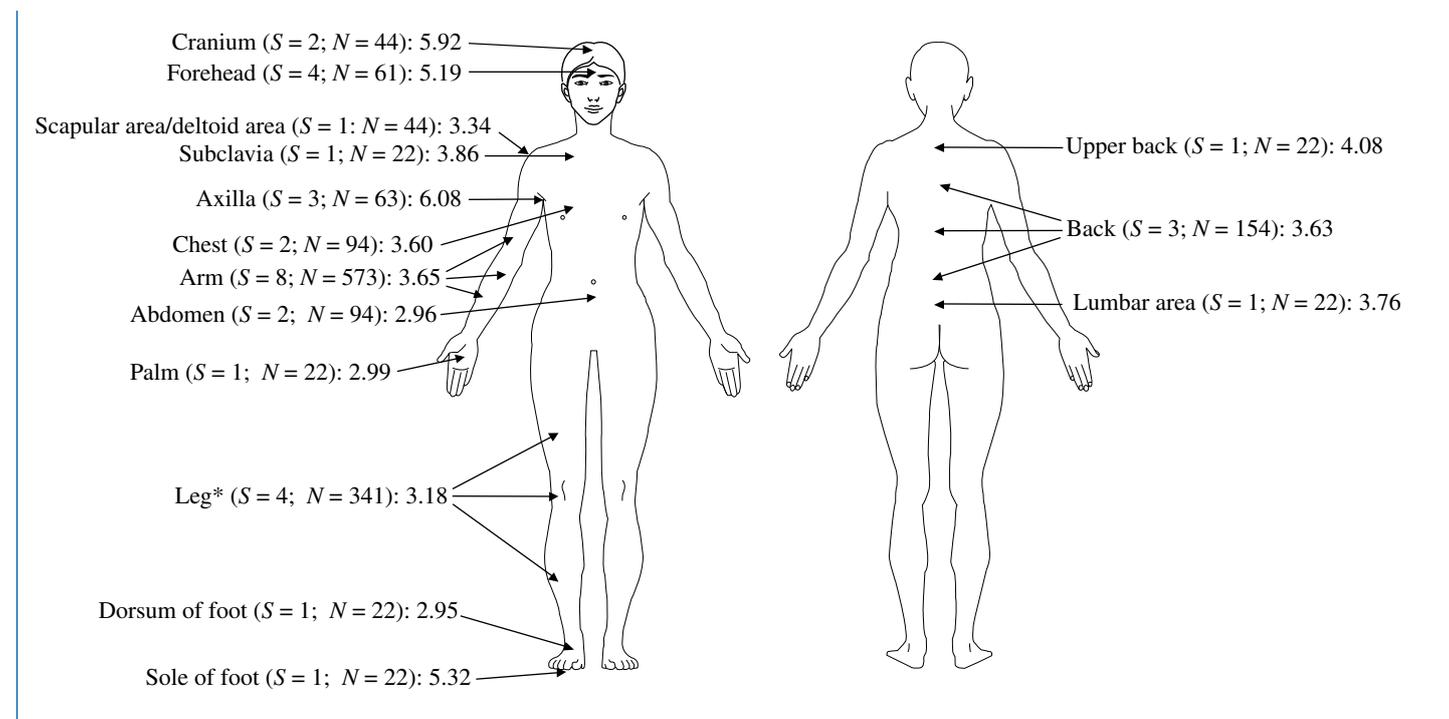


FIGURE 6

La densité bactérienne du microbiote cutané exprimé en log₁₀ cfu/mL (source : Reichel, 2011)

L'intérêt de l'activité pour comprendre l'état actuel des connaissances au sujet du microbiote

Le sujet du microbiote cutané abordé ici sous forme d'une activité permet d'aborder la problématique de l'étude des microbiotes de façon plus générale. Des compromis entre le temps mis pour appliquer les protocoles et la précision des données obtenues doivent être faits.

Mise en pratique en classe

L'activité a été testée en classe par Eric Trehiou. En s'adressant à un laboratoire d'analyse et en utilisant les milieux de culture commandés aux entreprises dont les liens sont indiqués ci-dessous, sa classe de seconde a pu obtenir des résultats similaires à ceux présentés dans la figure 5.

Les milieux utilisés lors du test avec des élèves de seconde :

<http://www.grosseron.com/oo/Assets/client/FTP/GROSSERON/FT/FT9100071.pdf>

https://www.humeau.com/media/blfa_files/_TC_370-oeabouraud-CMP_FR_030315_74703137002.pdf

Conclusion

Cette activité pratique permettra aux élèves d'adopter un esprit critique lorsqu'ils interpréteront des données chiffrées. Dans nos enseignements, les occasions de réaliser des mesures avec un esprit critique sont assez rares et les élèves sont souvent confrontés à des données dont ils n'ont aucune idée de l'origine. Ils pensent alors que les sciences produisent des données chiffrées facilement. En travaillant plus souvent sur la conception de protocoles de collecte de données, ils pourront à terme mieux comprendre pourquoi les « fake news » sont plus nombreuses et faciles à produire que des arguments scientifiques.

RÉFÉRENCES

Malcolm, The demonstration of bacteria on and within the stratum corneum using scanning electron microscopy, *British journal of Dermatology*, 1980

Masako, A novel method to control the balance of skin microflora Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics, *Journal of Dermatological Science*, 2005a

Masako, A novel method to control the balance of skin microflora Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin, *Journal of Dermatological Science*, 2005b

Reichel, Identification of variables for aerobic bacterial density at clinically relevant skin sites, *Journal of Hospital Infection*, 2011