

JOURNÉE
TECHNIQUE



Caractérisation des bioaérosols par PCR quantitative

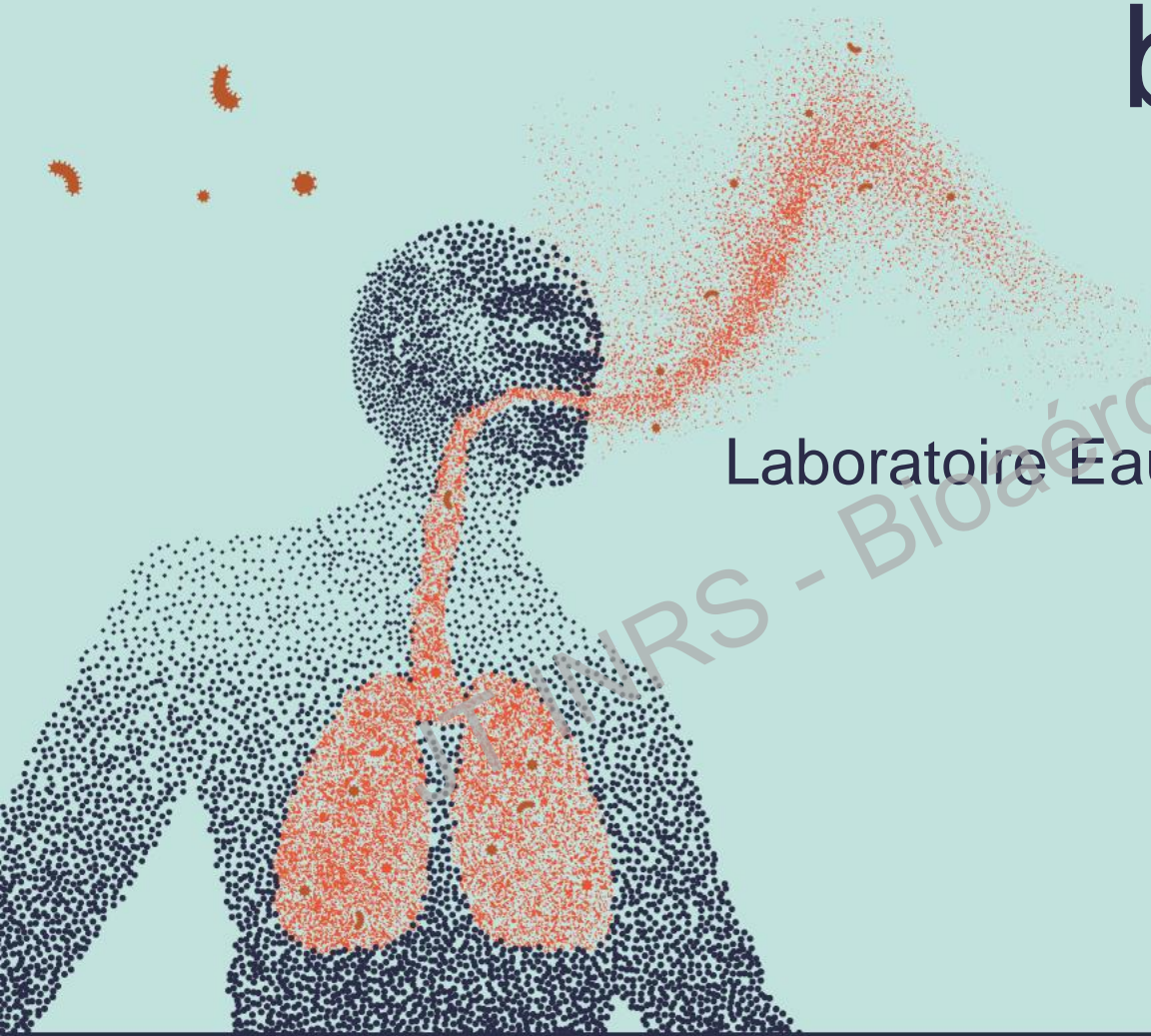
Alexis SIMONS

Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, UPEC

**BIOAÉROSOLS
AU TRAVAIL**

Mieux les comprendre pour les prévenir

26 NOVEMBRE 2024

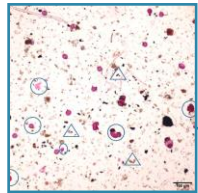


Méthodes d'analyse des bioaérosols

Culture



- **Détection et identification des microorganismes vivants.**
- **Peu coûteuse.**
- **Pas de détection des microorganismes non cultivables.**
- **Temps d'incubation long.**



Microscopie

- **Observation rapide de la morphologie (cellule, spore, etc.).**
- **Pas d'identification précise des microorganismes.**

Comment détecter, quantifier et identifier les microorganismes présents dans les bioaérosols ?

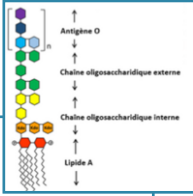


Détection rapide ?
Identification d'espèces ?
Quantification directe ?

PCR quantitative
PCR en temps réel

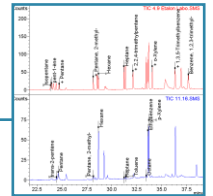
Endotoxines

- **Détection rapide.**
- **Evaluation possible de la charge bactérienne globale.**
- **Mesure indirecte.**
- **Détection uniquement des bactéries à Gram négatif.**

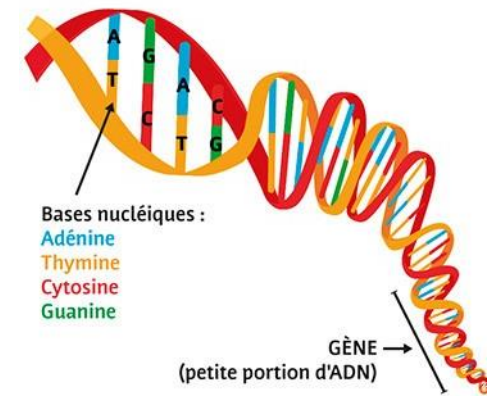


Composés primaires et secondaires

- **Indicateurs de l'activité microbienne (production de toxines, COV, etc.)**
- **Pas d'identification précise des microorganismes.**
- **Couteux et nécessite des équipements particuliers.**



Définition et application de la PCR quantitative (qPCR)



Séquences d'ADN :
Peuvent être spécifiques
de différents organismes

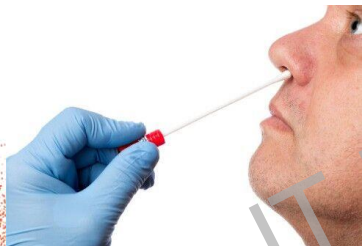
PCR temps réel / quantitative (qPCR) :
Méthode permettant de mesurer la quantité
d'ADN initiale dans un échantillon en ciblant une
séquence spécifique d'ADN.

Exemples :

Diagnostic d'infections virales (ex. VIH, SARS-CoV-2, hépatite) et
bactériennes (ex. *Mycobacterium tuberculosis*).

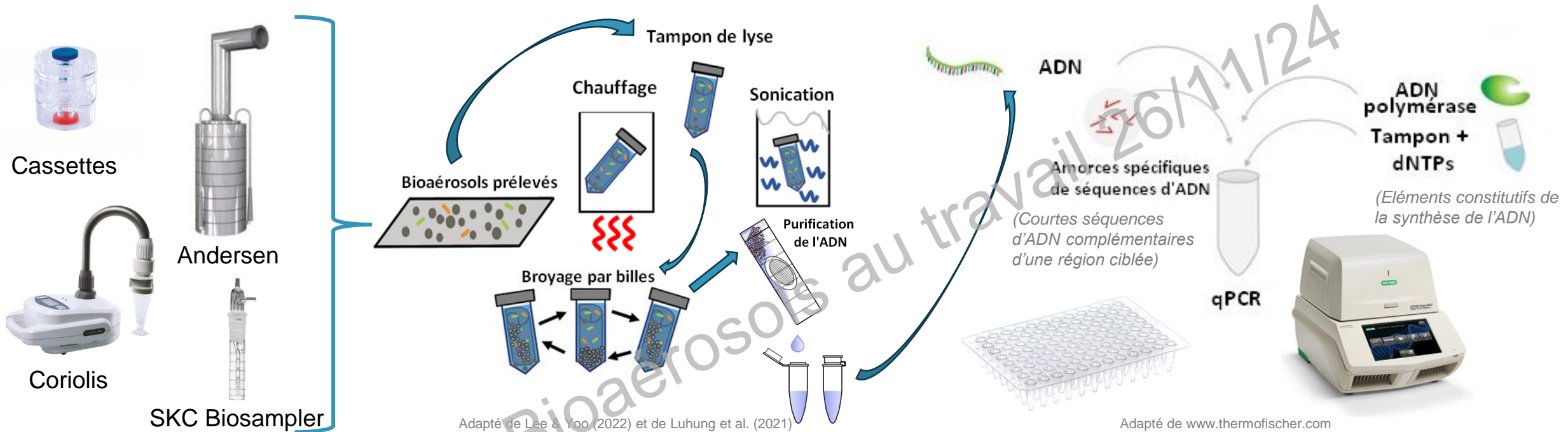
Détection de la contamination microbienne dans l'eau potable et les
eaux usées (ex. *E. coli.*, etc.)

Etc.



Utilisation pour l'étude des bioaérosols et les risques sanitaires associés
Comment est-ce que cela fonctionne ?

Principe de la PCR quantitative (qPCR)



Prélèvement des échantillons d'air (filtration, impaction, etc.)

Extraction d'ADN des échantillons collectés

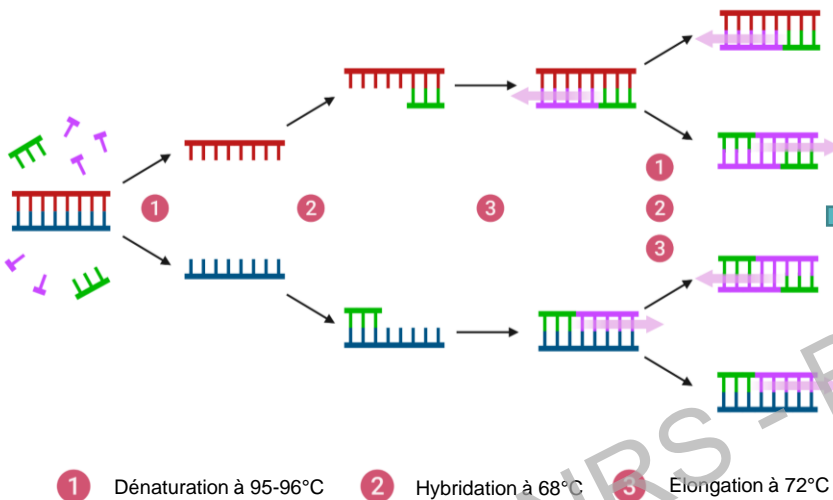
Amplification et quantification via qPCR avec des amorces spécifiques des cibles (bactéries, champignons, pathogènes précis, etc.)

Principe de la PCR quantitative (qPCR)

Doublement du nombre de copie d'ADN ciblé par cycle d'amplification

Mesure par fluorescence de la quantité d'ADN à la fin de chaque cycle

Gamme étalon avec différentes concentrations d'ADN : corrélation entre cycle seuil et quantité initiale d'ADN



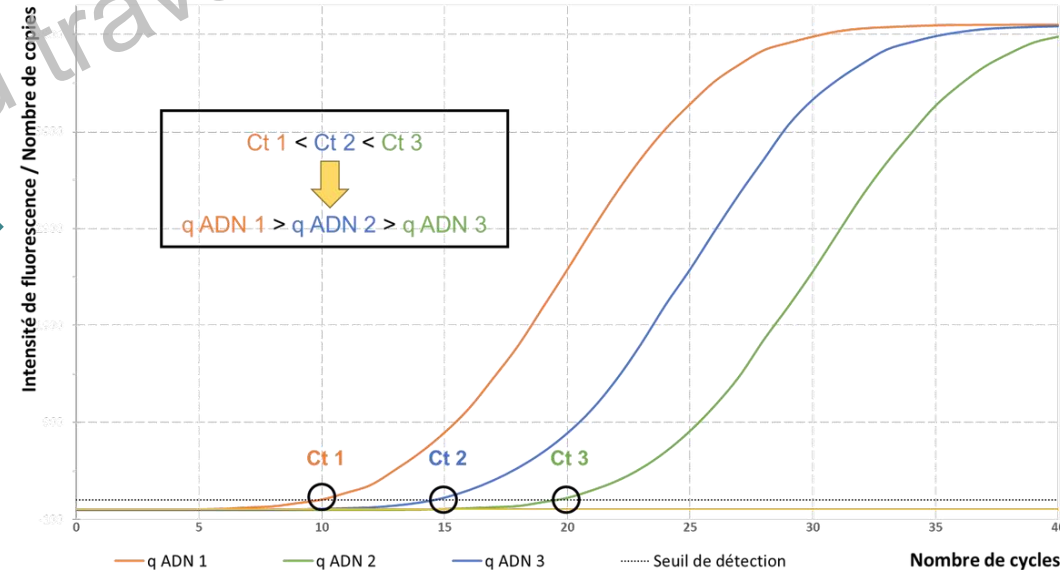
www.biorender.com

Mesure par SYBR Green I

Mesure par sonde TaqMan

Probe

Cao et al. (2020)



www.biomnigene.fr

Mesure de la concentration de la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon et spécifique des amorces utilisées

Utilisation de la qPCR pour l'analyse des bioaérosols



INTERÊTS :

- **Sensibilité** : limite de quantification très basse.
- **Spécificité** : possibilité de **cibler spécifiquement** certaines catégories de microorganismes.
- Détection possible de microorganismes **non / difficilement cultivables** (ex. *Mycobacterium*, *Legionella*, etc.)
- Détection **rapide** : pas de temps d'incubation nécessaire, possibilité d'effectuer l'ensemble des manipulations pour avoir des résultats en moins de 24h.



LIMITES :

- **Pas de distinction entre les cellules mortes et vivantes.** (possibilité d'ajouter une étape pour n'amplifier que l'ADN des cellules vivantes).
- **Coûts** du consommable et des appareils élevés.
- **Préparation rigoureuse des échantillons nécessaires** (contamination avec de l'ADN extérieur, dégradation de l'ADN par des enzymes, etc.)
- Personnel spécialisé nécessaire.

Utilisation de la qPCR pour l'analyse des bioaérosols

- Outil de diagnostic intéressant pour les bioaérosols liés aux risques professionnels.
- Pas nécessairement un remplacement des méthodes actuellement utilisées mais une **approche complémentaire**.
- Possibilité de cibler précisément certains organismes
→ intérêt pour détecter rapidement des pathogènes **en fonction des contextes professionnels**.

Exemple d'utilisation de la qPCR sur les bioaérosols :

Projet REMIFLU

Etude du microbiote associé aux brouillards de fluide de coupe

A. Simons, C. Therial, R. Levilly, P. Duquenne, B. Facon, A. Pedros, V. Renevot, I. Colina Moreno et F.S. Lucas

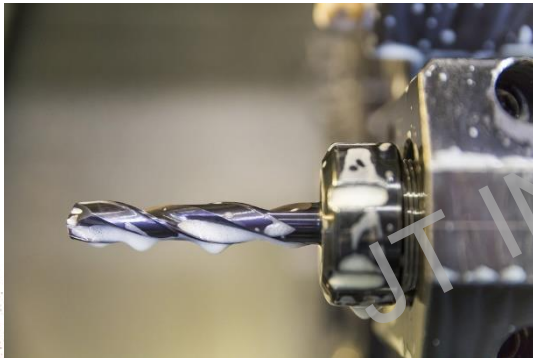


Fluides de coupe et enjeux sanitaires

Fluides de coupes (FDC) :

- Huiles minérales et/ou synthétiques : fonction de lubrification.
- Fluides aqueux : fonction de refroidissement.
- Utilisation dans le domaine industriel (métallurgie, automobile, aéronautique, etc.)

(Saha et Donofrio 2012)



© C. Pasquini /INRS



www.nederman.com

Aérosolisation
Gouttelettes en suspension

Brouillard de fluides de coupe

Présence potentielle de pathogènes opportunistes

(Wallace et al. 2002, Gilbert et al 2010)

Ex :

- Mycobactéries
- Moisissures (*Aspergillus*, etc.)
- Toxines

Impacts sanitaires



Affections cutanées : irritations cutanées, dermites allergiques, ...



Affections respiratoires : pneumopathies d'irritation, pneumopathies allergiques, **pathologies respiratoires causées par des microorganismes (pathogènes, endotoxines)**

Quelle est la composition microbienne des bains et brouillards de FDC ?
Quelles sont les sources de contamination responsables de la présence de microorganismes au sein des brouillards de fluides de coupe ?

Approche expérimentale

Objectif de l'étude

Caractériser les communautés bactériennes et fongiques associées aux brouillards de FDC et leurs potentielles sources de contamination

Campagne de prélèvement : 2019 – 2023 / 2 à 3 jours par site



4 usines (FJ, U1, U2, DF)

Types de prélèvement

FDC



Eau du réseau



Cassettes



Air

Andersen



Effet du vieillissement des FDC « neufs » vs « usagés » ?

Rôle de l'eau utilisée pour dilué les FDC ?

Différences entre points fixes dans les ateliers, points sur les opérateurs, points extérieurs ?

Rôle de la granulométrie ?



Analyse par culture



Détection des endotoxines



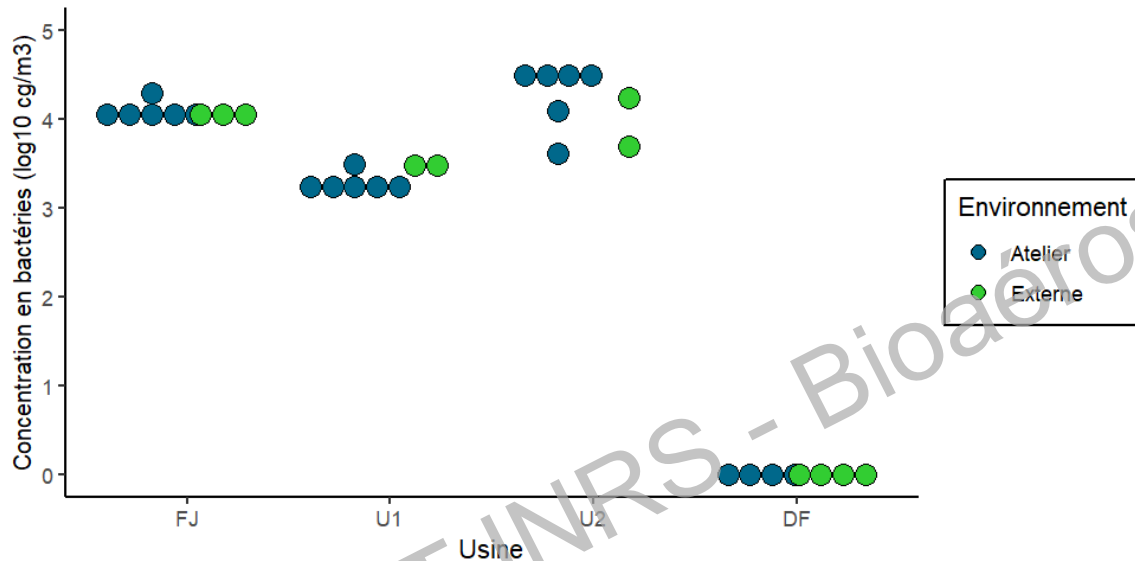
Quantification des microorganismes par qPCR



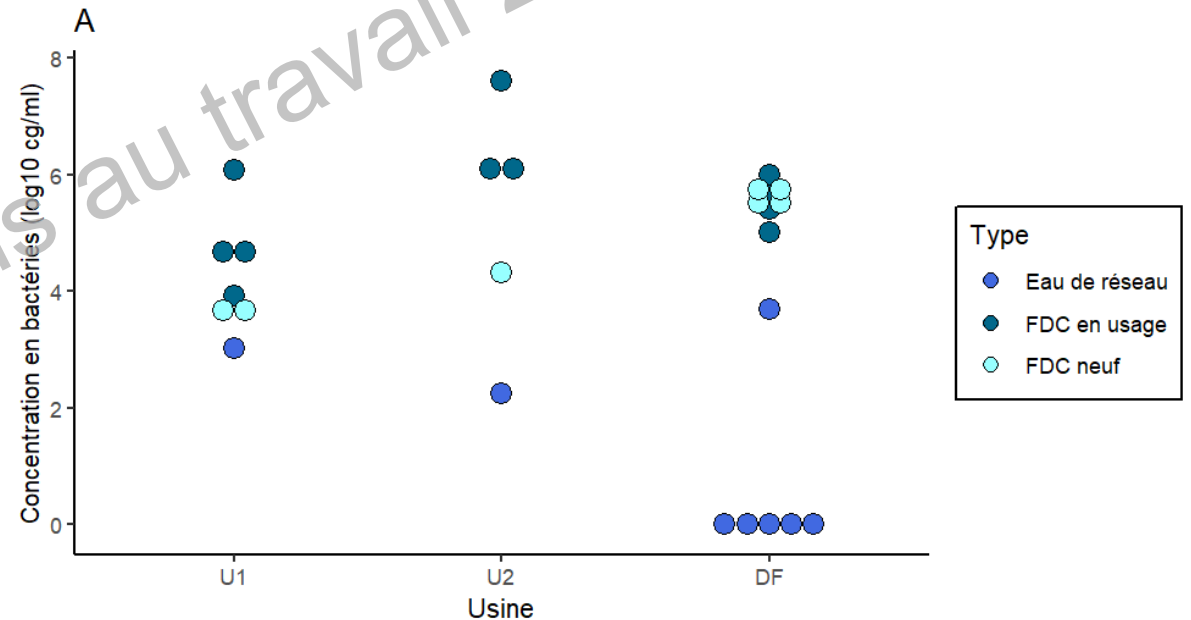
Analyse de la biodiversité par séquençage haut-débit

Concentration des communautés microbiennes par qPCR

Ateliers vs références internes et externes
→ Pas de différences significatives



FDC plus concentrés en bactéries que l'eau de réseau

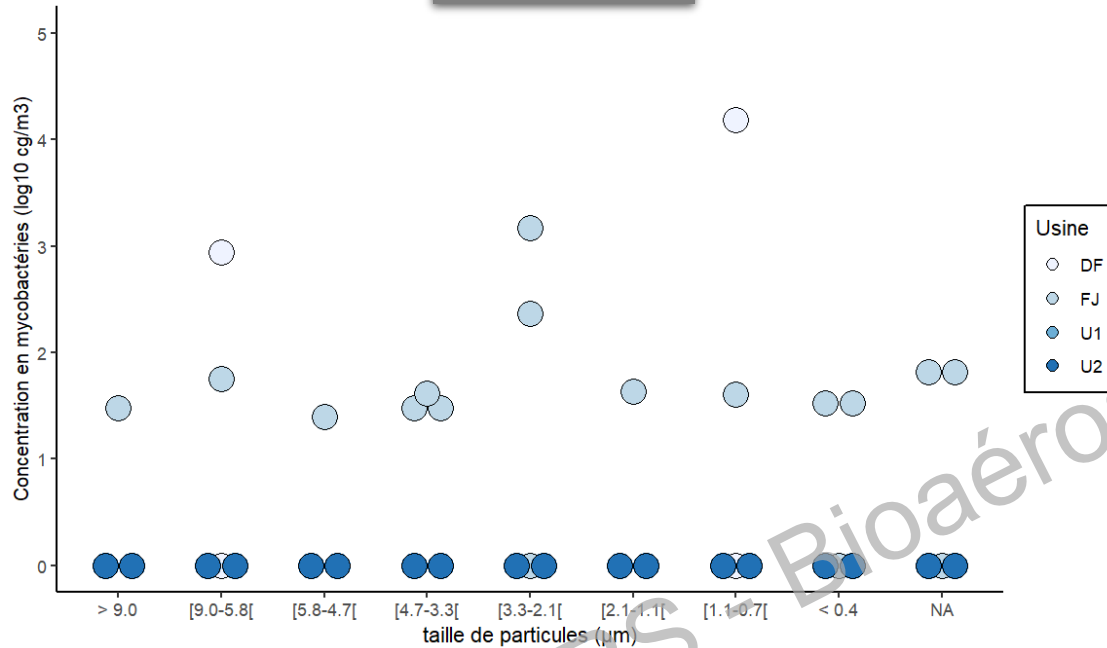


→ Culture : environ 1 log₁₀ de moins mais mêmes proportions entre Site / échantillons

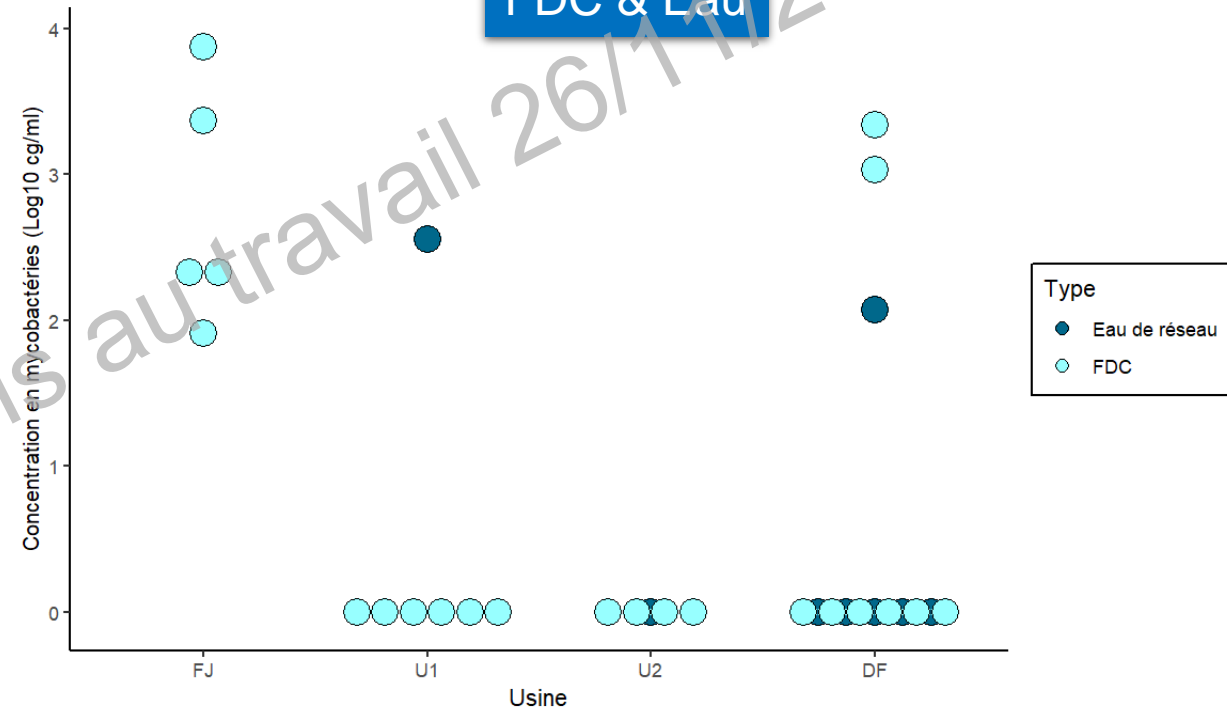
→ Quantités similaires à celles détectées dans d'autres usines (Saha et Donofrio, 2012 ; Gilbert et al., 2010)
→ Pas d'impact significatif de l'usage des FDC sur la quantité de bactéries dans les bioaérosols de ces sites ?

Détection de mycobactéries par qPCR

Andersen



FDC & Eau



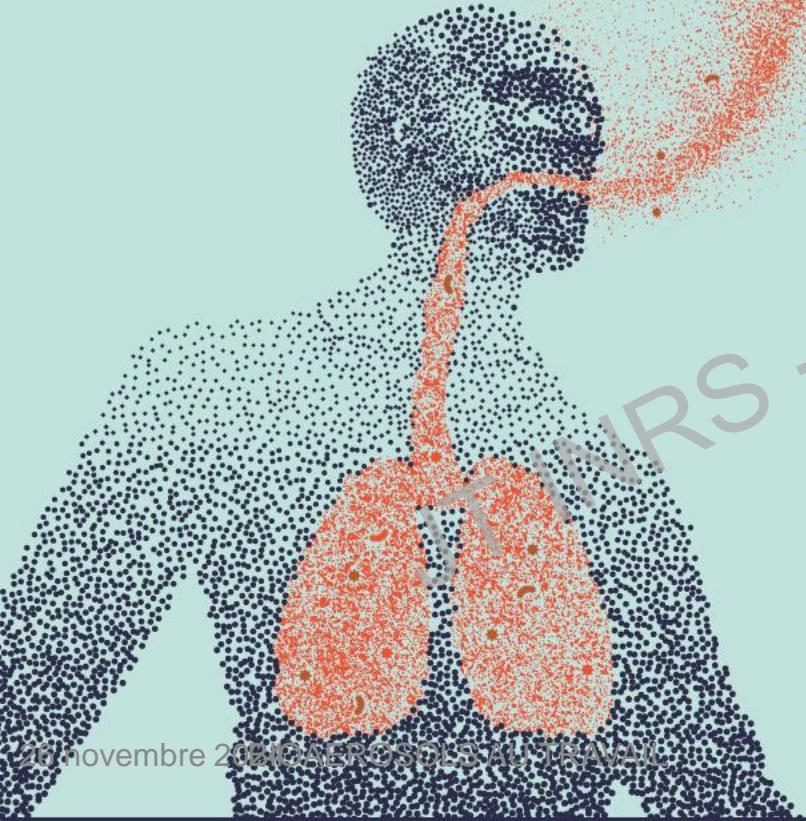
- Pas de détection de mycobactéries dans les sites U1 & U2
- Lorsque les mycobactéries sont détectées : pas d'effets visible de la granulométrie

- Détection de mycobactéries dans l'eau du réseau mais pas nécessairement dans les FDC et l'air

- Intérêt de la qPCR dans l'étude : quantification des microorganismes totaux (bactéries, champignons) ou pathogène ciblé (mycobactéries)
- Comparaison avec d'autres techniques : meilleure vision des concentrations et des sources de microorganismes dans les FDC

JOURNÉE
TECHNIQUE

MERCI POUR VOTRE ATTENTION



BIOAÉROSOLS AU TRAVAIL

Mieux les comprendre pour les prévenir

26 NOVEMBRE 2024