

Étude prophylactique sur la pertinence des protocoles de désinfection utilisés sur les outils d'élagage : résultats de la première phase.

Résumé

Introduction

L'écologie est née de la mise en relation des différentes sciences du vivant. Ici comme ailleurs, les systèmes les plus complexes sont abordés par leurs composants les plus élémentaires. Pour ces raisons, le secteur de l'élagage s'est structuré avec les sciences de l'arbre autour de pionniers comme Alex Shigo (1930-2006) ou Francis Hallé. C'est dans l'application de cette connaissance fondamentale que les métiers de l'élagage trouvent leurs racines. Le développement d'un écosystème à l'interface des sciences et de l'industrie a élevé les élagueurs au rang de praticiens. L'évolution des pratiques et du matériel a ainsi participé à la formulation d'une véritable déontologie du soin.

Pour S.M.D.A., la gestion du chancre coloré sur le canal du Midi en 2016, avec l'abattage de 42.000 arbres, a été le rappel que ce dernier n'est pas qu'un individu mais également un pilier du paysage et plus largement de son écosystème. La nécessité de confiner la propagation de la maladie a justifié la mise en place de mesures sanitaires extrêmement strictes dans le but de ne pas aggraver le vide alors créé. La prophylaxie est alors devenue un enjeu central. Le changement de paradigme en train de s'opérer traduit le fait que le monde de l'élagage s'ouvre sur une nouvelle perspective. En effet, nous sommes en train de replacer l'arbre, notre composante élémentaire, au sein d'un réseau bien plus vaste d'interactions avec les autres éléments du vivant. Le monde de l'infiniment petit est un champ d'investigation, nous qui sommes habitués à l'infiniment grand.

L'éveil de la conscience écologique de ces dernières années a participé au développement associatif qui s'est approprié les questions de défense de la biodiversité. Ce dernier se sert souvent de l'émoi populaire pour contester notre action en faveur du bien-être du patrimoine arboré. Cette remise en question nous oblige à l'exemplarité et nous pousse à faire évoluer nos pratiques. Cependant, le défi que représente cette ouverture nécessite de sortir de sa zone de confort et de dépasser ses acquis pour renouer avec le champ de la recherche et de la compréhension.

Au centre de cette démarche, il y a une question. Cette même question qui animait Louis Landouzy (1845-1917), médecin et chirurgien pendant la guerre franco-prussienne :

« La septicémie était partout, le pus semblait germer de toutes parts, comme s'il avait été semé par le chirurgien. Sur 30 amputations, 1 seul survivant ».

Les maladies nosocomiales sont une préoccupation majeure du monde médical d'aujourd'hui et il paraîtrait impensable qu'un chirurgien opère un patient avec des outils souillés. Cette question S.M.D.A. se la pose aujourd'hui pour que, au même titre que la sécurité ou la prise en compte de la physiologie de l'arbre, les procédures de désinfection soient un réflexe. Quelles sont la nature et l'ampleur de la charge microbiologique transportée par nos outils d'élagage ?

Matériel & Méthode

Support d'étude

Outil emblématique de l'activité arboricole, la tronçonneuse est une mécanique complexe dont le fonctionnement naturel, en particulier celui de la lubrification de ces différents éléments, est favorable au développement des micro-organismes. En conditions normales d'utilisation, cette dernière va favoriser avec la chaleur générée, l'huile et la sciure, des amalgames complexes et difficiles à traiter qui sont de véritables incubateurs microbiologiques.

Pour analyser cette faune commensale à l'activité d'élagage, nous avons demandé à nos équipes de nous fournir leurs engins. Ces derniers devaient remplir deux conditions. La première était que les tronçonneuses devaient avoir servi récemment afin d'être exposées aux différents contaminants d'une journée de travail typique. La seconde était que ces outils ne devaient avoir subi aucune opération de désinfection afin de nous restituer cette charge microbiologique collectée intacte pour analyse.

Traitements réalisés

Les traitements réalisés consistent à évaluer le protocole mis en place de manière systématique par les équipes de SMDA afin d'en évaluer l'efficacité. Ce dernier consiste à réaliser, à l'aide d'un pistolet pulvérisateur de la marque Kontakt®, une désinfection sur l'outil « *chaîne roulante* ».

A ce traitement standard est opposé un traitement des machines plus poussé où l'ensemble du guide de l'outil est immergé dans une solution de Virkon® avant de subir un brossage vigoureux à l'aide d'une brosse métallique. Cette opération a pour but de décoller les agrégats d'huile et de sciure afin de pouvoir faire une désinfection chimique en profondeur. Suite à ce processus, l'outil est immergé une nouvelle fois afin de laver les effluents issus du brossage. Ce type de protocole est notamment recommandé pour la gestion des infections les plus virulentes comme celle du chancre coloré du platane (*Chancre Coloré Du Platane : Guide de Bonnes Pratiques Pour La Lutte*, 2018).

Des prélèvements de ces deux traitements ont été comparés à ceux réalisés directement sur les machines sans désinfection et constituant notre traitement témoin. Une série de trois prélèvements a ainsi été réalisée sur chaque traitement pour un total de 9 échantillons.

Méthode de prélèvement écologique

Les prélèvements faits sur les machines ont été réalisés en interne sur les guides des tronçonneuses et analysés par un laboratoire indépendant accrédité de la société Eurofins. Pour effectuer ces prélèvements et conformément à leurs recommandations, nous avons procédé en suivant le protocole (Cf. Annexe 1) ainsi qu'en utilisant le matériel de prélèvement fourni. A l'aide d'un écouvillon ATL stérile immergé dans une solution de sels de Tryptone et d'un neutralisant, nous avons effectué une collecte des organismes sur un carré de 5 cm de côté pour une surface totale de 25 cm². Nous avons procédé à deux passages en quinconces perpendiculaires en faisant tourner délicatement les écouvillons pour bien jouer sur l'ensemble de leur surface de prélèvement.

Les 9 échantillons ainsi prélevés ont été consciencieusement conditionnés pour le transport et expédiés le jour même dans un colis réfrigéré puis perçus dans les 48h par le laboratoire afin de garantir la meilleure fraîcheur possible pour les analyses.

Dénombrement

Effectué par le laboratoire indépendant de la société Eurofins, le dénombrement bactérien et fongique met en place le même protocole. Une série de dilutions successives est effectuée pour chaque échantillon à partir de la solution mère issue du prélèvement. La solution mère et chacune de ses dilutions filles sont ensuite étalées sur une gélose, non sélective pour la quantification bactérienne, sélective pour la quantification fongique. Les boîtes de pétri ainsiensemencées sont mises à incubation à une température de 22°C pour une durée de 3 jours dans le cas des quantifications bactériennes contre 5-7 jours pour les quantifications fongiques.

A l'issue de cette incubation, les « *Unités Formants Colonies* » (U.F.C.) sont comptabilisées dans les boîtes les plus représentatives. La charge initiale est obtenue en multipliant le résultat de ce dénombrement par le facteur de dilution.

Identification fongique

Effectuée par le laboratoire indépendant de la société Eurofins, l'identification fongique consiste à isoler chacune des souches identifiées sur les premières cultures issues de la solution mère. A la suite de cette deuxième incubation, les souches ainsi isolées font l'objet d'un protocole d'identification par spectrométrie de masse selon la méthode « *MALDI-TOF/MS* » (Chalupová et al., 2014). Dans le cas où cette procédure ne permet pas d'identifier la souche fongique, une procédure par séquençage génétique est alors mise en place et la séquence obtenue est comparée avec les bases de données pour poser un diagnostic.

Résultats

Dénombrement

	Charge bactériologique			Charge fongique		
	Charge.cm-1	Moyenne	E.type	Charge.cm-1	Moyenne	E.type
Témoin n°1	72			0		
Témoin n°2	9,6	187,2	255,5	0	266,7	461,9
Témoin n°3	480			800		
Kontakt n°1	64			1,6		
Kontakt n°2	44	49,3	12,9	11,2	4,3	6,1
Kontakt n°3	40			0		
Virkon n°1	0			0		
Virkon n°2	3,2	1,6	1,6	1,6	0,5	0,9
Virkon n°3	1,6			0		

Tableau 1 : Résultats des quantifications bactériennes et fongiques retrouvées sur les tronçonneuses.

Les résultats des dénombrements présentés dans le Tableau 1 montrent les variations des charges microbiologiques transportées après différentes opérations de désinfection. Avec une charge moyenne de $187,2 \pm 225,5$ germes bactériens et $266,7 \pm 461,9$ spores fongiques par cm^2 , les prélèvements témoins renseignent du potentiel transporté sur les outils de coupe. Toutefois, nous pouvons remarquer la grande variabilité de ces résultats.

En comparaison, le protocole de désinfection standard utilisant la pulvérisation de Kontakt® montre une diminution substantielle de plus de 73% de la charge bactérienne et de

plus de 98% de la charge fongique avec $49,3 \pm 12,9$ germes et $4,3 \pm 6,1$ spores par cm^2 respectivement. L'ensemble ces données pointent vers le fait que cette méthode, même rapide permet déjà d'obtenir une baisse importante de la charge microbiologique. Par ailleurs, cette dernière semble avoir une efficacité plus importante sur la charge fongique avec une élimination des spores quasiment intégralement et ce, quel que soit l'échantillon concerné.

Si l'on considère les résultats de la méthode de désinfection la plus poussée, on se rend compte que même si certains cas présentent un profil stérile, ce dernier n'est pas garanti. En effet, en moyenne avec $1,6 \pm 1,6$ germes bactériens et $0,5 \pm 0,9$ spores fongiques par cm^2 nous atteignons tout de même des diminutions de la charge microbiologique de plus de 99% que l'on considère le bactérien ou le fongique. Par rapport au protocole standard on constate que la différence de réduction de la charge microbiologique s'observe principalement au niveau bactérien avec un écart notable de plus de 25% là où cette différence est presque négligeable au niveau fongique ($\approx 1\%$).

Identifications fongiques

	Moisissure n°1	Moisissure n°2	Moisissure n°3
Témoin n°1	NA	NA	NA
Témoin n°2	NA	NA	NA
Témoin n°3	Stagonospora avenae	NA	NA
Kontakt n°1	Penicillium canescens	NA	NA
Kontakt n°2	Penicillium canescens	Acrostalagmus luteoalbus	NA
Kontakt n°3	NA	NA	NA
Virkon n°1	NA	NA	NA
Virkon n°2	Penicillium canescens	NA	NA
Virkon n°3	NA	NA	NA

Tableau 2 : Résultats présentant les moisissures majoritaires présentes sur les tronçonneuses.

Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent que la méthode de désinfection, si intensive soit elle, ne permet pas véritablement de discriminer certains types de souches fongiques. En effet, une souche comme *Penicillium canescens* se retrouve de manière indifférenciée sur des guides désinfectés de manière standard ou avec un protocole plus poussé. Ces résultats semblent donc nous indiquer que la réduction de la charge microbiologique est l'action principale de ce type de méthode pour des outils mécaniques complexes comme une tronçonneuse.

Discussion

Efficacité des différentes méthodes

La méthode mise en place par les équipes de SMDA permet une réduction substantielle de la charge microbiologique avec une élimination quasi intégrale des spores fongiques. Bien que cette méthode ne soit pas aussi efficace qu'un protocole plus poussé, elle présente les avantages d'être plus rapide, facile et économique à mettre en œuvre qu'une procédure par trempage et brossage logistiquement plus contraignante. Par ailleurs, la perte effective de telles méthodes par rapport à la simple pulvérisation sur outil « *chaîne roulante* » ne se manifeste que sur la charge bactérienne.

Cohorte microbiologique transportée

Les souches fongiques majoritaires relevées pendant l'identification fongique font état de trois espèces principales dont les implications sont nombreuses.

Des souches comme *Penicillium canescens* sont par exemple des adjoints d'arboriculture idéaux. En effet, cette souche ubiquiste améliore le recyclage d'éléments minéraux comme le phosphore ou l'azote et promulgue la mise en place d'une communauté bactérienne avantageuse pour la plante en créant un habitat favorable au développement des probactéries (Hao et al., 2020; Zhang et al., 2020). Par ailleurs, cette souche a également des qualités reconnues de mycorémédiation avec des capacités pour métaboliser des polluants comme les colorations et effluents industriels (Hefnawy et al., 2017), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (H.A.P.) (Veignie & Rafin, 2022) ou l'absorption des métaux lourds (Say et al., 2003).

A contrario, des souches comme *Stagonospora avenae* sont des contaminants de cultures notoires, d'avoine principalement dans ce cas précis. Cette souche endophytique possède la capacité de contourner les défenses de la plante notamment grâce à une enzyme qui hydrolyse en C₃ le saponine glycosylé triterpénoïde antifongique naturellement sécrété par son hôte la rendant disfonctionnelle (Bleddyn Hughes et al., 2004; Morrissey et al., 2000). Pour ces raisons ce type de souche peut avoir un réel impact économique sur l'activité humaine (Cunfer, 1997).

Enfin, certaines souches comme *Acrostalagmus luteoalbus* ne sont pas des pathogènes majeurs même si des formes infectieuses ont déjà été rapportées pour certaines espèces maraîchères et notamment la pomme de terre (Chudinova et al., 2022). Toutefois, cette souche fongique est beaucoup plus documentée dans la littérature médicale car elle possède une action délétère sur la santé humaine par la sécrétion de substances cytotoxiques et immunosuppressives provoquant, entre autres, inflammations subcliniques, allergies ou asthme (Andersson et al., 2021).

Conclusions & perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette première phase expérimentale nous permettent de prendre la mesure de l'importance des protocoles de prophylaxie pour la gestion du patrimoine arboré. En effet, nous avons pu voir que les protocoles les plus poussés permettaient de réduire les charges bactériennes et fongiques de 99%. Ce facteur constitue donc un impact non négligeable au vu des différents organismes transportés dont nous ne maîtrisons pas l'origine. En effet, même s'il existe des espèces qui font partie intégrante du microbiote de l'arbre, certaines souches peuvent présenter un risque à la fois pour la santé et l'activité humaine mais aussi pour la santé du patrimoine arboré.

Il subsiste malgré tout des zones d'ombre dans ce champ d'investigation car s'il est vrai qu'une désinfection avancée par immersion et brossage permet d'obtenir un état de quasi-stérilité, ce protocole reste peu applicable sur le plan opérationnel. Si l'on considère le protocole appliqué par nos équipes, nous pouvons remarquer que les performances au niveau fongiques sont presque équivalentes. S'il est vrai que la cohorte bactérienne transportée reste plus importante, cette méthode ne requiert pas une logistique aussi complexe, coûteuse en temps et en matériel, ainsi que l'utilisation de produits chimiques controversés.

En conséquence, plusieurs questions émergent de cette première phase test. Quels sont les impacts des méthodes et des produits employés sur le niveau de désinfection ? Est-il possible d'obtenir des résultats équivalents avec des alternatives écologiques ? Est-il possible de concilier les impératifs d'efficacité prophylactique et les impératifs opérationnels et économiques ? Quelle part de la charge microbiologique présente sur l'outil est effectivement déposée sur la plaie lors de la taille ? Nous chercherons à répondre à ces questions à travers des phases de test réalisées en accord avec nos ambitions.

Bibliographie

- Andersson, A. M. A., Salo, J., Mikkola, R., Marik, T., Kredics, L., Kurnitski, J., & Salonen, H. (2021). Melinacidin-Producing *Acrostalagmus luteoalbus*, a Major Constituent of Mixed Mycobiota Contaminating Insulation Material in an Outdoor Wall. *Pathogens*, *10*(7), 843. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070843>
- Bleddyn Hughes, H., Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (2004). Characterisation of the Saponin Hydrolysing Enzyme Avenacoside- α -l-rhamnosidase from the fungal pathogen of cereals, *Stagonospora avenae*. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(4), 421–427. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021083.94707.1e>
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., & Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>
- Chancre coloré du platane : Guide de bonnes pratiques pour la lutte.* (2018).
- Chudinova, E. M., Vedmedenko, D. V., Platonov, V. A., Elansky, A. S., Belosokhov, A. F., & Elansky, S. N. (2022). First report of potato tuber disease caused by *Acrostalagmus luteoalbus*. *Journal of Plant Pathology*, *104*(3), in print. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01173-4>
- Cunfer, B. M. (1997). Taxonomy and Nomenclature of *Septoria* and *Stagonospora* Species on Small Grain Cereals. *Plant Disease*, *81*(5), 427–428. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.427>
- Hao, X., Zhu, Y.-G., Nybroe, O., & Nicolaisen, M. H. (2020). The Composition and Phosphorus Cycling Potential of Bacterial Communities Associated With Hyphae of *Penicillium* in Soil Are Strongly Affected by Soil Origin. *Frontiers in Microbiology*, *10*(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02951>
- Hefnawy, M. A., Gharieb, M. M., Shaaban, M. T., & Soliman, A. M. (2017). Optimization of Culture Condition for Enhanced Decolorization of Direct blue Dye by *Aspergillus flavus* and *Penicillium canescens*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *7*(2), 083–092. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70210>
- Morrissey, J. P., Wubben, J. P., & Osbourn, A. E. (2000). *Stagonospora avenae* Secretes Multiple Enzymes that Hydrolyze Oat Leaf Saponins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *13*(10), 1041–1052. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.10.1041>
- Say, R., Yilmaz, N., & Denizli, A. (2003). Removal of Heavy Metal Ions Using the Fungus *Penicillium Canescens*. *Adsorption Science & Technology*, *21*(7), 643–650. <https://doi.org/10.1260/026361703772776420>
- Veignie, E., & Rafin, C. (2022). Efficiency of *Penicillium canescens* in Dissipating PAH in Industrial Aged Contaminated Soil Microcosms and Its Impact on Soil Organic Matter and Ecotoxicity. *Processes*, *10*(3), 532. <https://doi.org/10.3390/pr10030532>
- Zhang, Y., Hao, X., Garcia-Lemos, A. M., Nunes, I., Nicolaisen, M. H., & Nybroe, O. (2020). Different Effects of Soil Fertilization on Bacterial Community Composition in the *Penicillium canescens* Hyphosphere and in Bulk Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.02969-19>

Annexes

Annexe 1 : Protocole de prélèvement par écouvillonnage préconisé par la société EUROFINIS

Protocole de prélèvement d'une surface à l'aide d'un écouvillon pour la réalisation d'analyses microbiologiques

Matériel fourni :

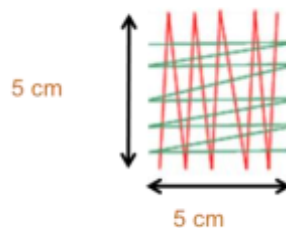
Ecouvillon ATL avec 4 mL de liquide recueil (Tryptone sel + neutralisant)

Utilisation :

L'écouvillon est utilisé dans le but de réaliser des prélèvements de surface en vue d'analyses microbiologiques.

Instructions :

1. Se désinfecter les mains à l'aide d'un eau savonneuse ou d'un gel hydroalcoolique.
2. Ouvrir le tube contenant l'écouvillon et le liquide de recueil. Ne toucher que les parties extérieures du bouchon bleu et du tube contenant le liquide de recueil.
3. Retirer l'écouvillon du liquide. Eliminer le surplus de liquide présent sur l'embout en « mousse » de l'écouvillon en le pressant légèrement sur la paroi intérieure du tube contenant le liquide de recueil (attention à ne pas assécher totalement l'écouvillon).
4. Si le prélèvement est réalisé sur une surface plane, il est recommandé que cette surface ait une dimension de 25 cm², par exemple un carré de 5 cm sur 5 cm.
 - a. Réaliser le prélèvement en frottant la totalité de la surface avec l'embout de l'écouvillon en exerçant une pression constante. Pendant l'écouvillonnage faire tourner doucement l'écouvillon afin que la totalité de la surface de l'embout participe au prélèvement. L'écouvillon doit être incliné avec un angle d'environ 30° par rapport à la surface prélevée.
 - b. Faire un premier passage en faisant des stries parallèles de haut en bas sur 5 cm
 - c. Attendre 10 secondes et faire un second passage en faisant des stries parallèles de gauche à droite sur 5 cm.



Si la surface de prélèvement ne permet pas réaliser un prélèvement de 5 cm sur 5 cm alors réaliser le prélèvement en frottant la totalité de la surface avec l'embout de l'écouvillon en