

Chapitre II: Les milieux de culture et les méthodes d'isolement

II.1. Introduction

L'examen direct d'un étalement biologique contenant des bactéries n'est généralement pas suffisant pour identifier l'espèce bactérienne en cause; seule la culture associée à une galerie d'identification biochimique peut garantir une identification précise. Différentes particularités bactériennes expliquent cette limitation :

- Il existe un très grand nombre de germes différents.
- Les bactéries ont une taille limite pour la microscopie optique :
 - ✓ Epaisseur entre 0.2 et 2 μm ,
 - ✓ Longueur entre 0.8 et 10 μm .
- Elles sont incolores à frais (et nécessitent donc des colorations particulières).
- Elles sont morphologiquement peu différenciables (coques – bâtonnets). Leur morphologie peut même varier en fonction de certains paramètres (différentes souches, différents milieux de culture, âge de la culture, patients immunodéprimés, traitement en cours, ...).
- Il n'existe parfois aucune différence morphologique entre certains germes pathogènes et non pathogènes (*Neisseria meningitidis* par exemple et les autres *Neisseria*).
- La virulence d'un germe est variable en fonction :
 - ✓ De sa localisation,
 - ✓ De la souche et de son sérotype,
 - ✓ Du nombre de germes envahissant une personne,
 - ✓ Du niveau de résistance du patient.
- Les échantillons sont souvent contaminés par des germes commensaux (endroits non stériles ou contamination vraie).

La culture des micro-organismes n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont disponibles. Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisée pour cultiver, transporter et conserver les micro-organismes. Pour être efficace, le milieu doit contenir tous les nutriments nécessaires au développement du micro-organisme. Il est essentiel d'avoir des milieux spéciaux pour l'isolement et l'identification des micro-organismes et pour la mesure de la sensibilité aux antibiotiques. Bien que tous les micro-organismes exigent des sources d'énergie et des macro-et micronutriments, la composition précise d'un bon milieu dépend de l'espèce à cultiver, car les besoins en éléments nutritifs sont très différents. La connaissance de l'habitat normal d'un micro-organisme est souvent utile pour

sélectionner un milieu de culture approprié, parce que ses besoins nutritifs reflètent son environnement naturel. Très souvent, on utilise un milieu pour sélectionner et propager des micro-organismes spécifiques ou pour faciliter l'identification d'une espèce particulière, Les milieux peuvent également être conçus spécifiquement pour permettre la croissance d'un type de micro-organisme présent dans un échantillon naturel.

Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure. Un milieu de culture utilisés en bactériologie doit satisfaire à toutes les exigences nutritives des micro-organismes : apport de la source d'énergie, de carbone, d'azote; besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance; pH et force ionique voisins des valeurs optimum.

Les milieux de culture sont classés selon plusieurs paramètres : les constituants chimiques qui les composent, leur nature physique et leur fonction (Tableau 1). Les types de milieux définis selon ces paramètres sont décrits ci-dessous.

Tableau 1: Types de milieux de culture

Base de classification	Types
Composition chimique	Défini (synthétique), complexe
Nature physique	Liquide, semi-solide, solide
Fonction	Milieu d'utilité générale, enrichi, sélectif, différentiel

II.2. Les types de milieux de culture

II.2.1. Les types chimiques et physiques des milieux de culture

On appelle milieu défini ou synthétique, un milieu dans lequel tous les composants sont connus. Il peut être liquide (un bouillon) ou solidifié par un agent comme l'agar. Des photolithoautotrophes, comme les cyanobactéries et les protistes photosynthétiques, sont souvent cultivés au moyen de milieux définis. Ces organismes utilisent du CO₂, comme source de carbone et de la lumière comme source d'énergie. Ils se développent donc sur des milieux contenant du carbonate ou du bicarbonate de soude (sources de CO₂), du nitrate ou de l'ammoniaque comme source d'azote, du sulfate, du phosphate et d'autres minéraux. De nombreux chimio-organohétérotrophes sont aussi cultivés dans des milieux définis. Ces

organismes utilisent des molécules organiques comme source de carbone et d'énergie. Un milieu contenant du glucose (source de carbone) et un sel d'ammonium (source d'azote) assurera leur croissance. Tous les milieux définis ne sont pas aussi simples que les exemples donnés dans le Tableau , certains en effet sont constitués de dizaines de composants. Les milieux définis sont beaucoup utilisés en recherche parce qu'il est souvent nécessaire de connaître précisément ce que le micro-organisme étudié métabolise.

Tableau 2: Exemple de milieu défini

Milieu BG-11 pour Cyanobacteria	Quantité (g/litre)	Milieu pour <i>Escherichia coli</i>	Quantité (g/litre)
NaNO ₃	1,5	Glucose	1,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,04	Na ₂ HPO ₄	16,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075	KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
Acide citrique	0,006	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200,0 mg
Citrate ferrico-ammonique	0,006	CaCl ₂	10,0 mg
EDTA (sel de Na ₂ Mg)	0,001	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 mg
Na ₂ CO ₃	0,02	pH final 6,8-7,0	
Solution de métaux en traces ¹	1,0 ml/l		
pH final 7,4			

Les milieux complexes sont ceux qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée. Ils sont très utiles, car un seul milieu complexe peut être suffisamment riche et complet pour satisfaire tous les besoins nutritifs de nombreux micro-organismes différents. En outre, ces milieux s'avèrent souvent utiles lorsque les besoins nutritifs d'un micro-organisme particulier sont inconnus et donc qu'un milieu défini ne peut pas être préparé. On les emploie également pour cultiver des bactéries exigeantes qui ont des besoins nutritifs complexes.

La plupart des milieux complexes contiennent des composants indéfinis comme des peptones, des extraits de viande et des extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats de protéines obtenus par digestion protéolytique partielle de viande, de caséine, de soja, de gélatine et d'autres protéines. Elles servent de sources de carbone, d'énergie et d'azote. Les extraits de bœuf et de levure sont respectivement des extraits aqueux de viande bovine maigre et de levure de bière. L'extrait de bœuf contient des acides aminés, des peptides, des nucléotides, des acides organiques, des vitamines et des minéraux. L'extrait de levure est une excellente source de vitamines B ainsi que de composés azotés et carbonés. Trois milieux complexes sont souvent utilisés : le bouillon nutritif, le bouillon au soja et la gélose MacConkey (

Tableau).

Tableau 3: Quelques milieux complexes courants

Bouillon nutritif	Quantité (g/litre)	Bouillon au soja trypsique	Quantité (g/litre)	Gélose MacConkey	Quantité (g/litre)
Peptone (hydrolysat de gélatine)	5	Tryptone (hydrolysat pancréatique de caséine)	17	Hydrolysat pancréatique de gélatine	17,0
Extrait de bœuf	3	Peptone (hydrolysat de soja)	3	Hydrolysat pancréatique de caséine	1,5
pH final 6,8		Glucose	2,5	Hydrolysat pepsique de tissus animaux	1,5
		Chlorure de sodium	5	Lactose	10,0
		Phosphate dipotassique	2,5	Sels biliaires	1,5
		pH final 7,3		Chlorure de sodium	5,0
				Rouge neutre	0,03
				Cristal violet	0,001
			Agar	13,5	
			pH final 7,4		

Les milieux liquides et solidifiés sont utilisés de manière routinière en laboratoire. Les milieux solidifiés sont cependant particulièrement importants parce qu'ils permettent d'isoler différents micro-organismes les uns des autres de manière à obtenir des cultures pures. L'agar (ou gélose) est l'agent solidifiant le plus communément utilisé. C'est un polymère sulfate composé principalement de D-galactose, de 3,6-anhydro-L-galactose et d'acide D-glucuronique. Il est généralement extrait d'algues rouges. L'agar convient bien comme agent solidifiant pour plusieurs raisons. Après liquéfaction à environ 90 °C, il ne se solidifiera pas avant d'atteindre environ 45 °C. Après liquéfaction dans de l'eau bouillante, il peut donc être refroidi à une température supportable à la fois pour les mains de l'expérimentateur et pour les micro-organismes. En outre, il est possible d'incuber les cultures microbiennes dans un large éventail de températures. Enfin, l'agar est un excellent agent solidifiant, car la plupart des micro-organismes sont incapables de le dégrader. D'autres agents solidifiants peuvent être utilisés, comme les œufs coagulés dans le milieu de Löwenstein-Jensen utilisé pour la recherche des mycobactéries et le sérum coagulé pour le milieu de Loeffler utilisé pour la recherche du bacille de la diphtérie.

Les milieux sont commercialisés soit sous forme de poudres déshydratées, soit prêts à l'emploi en tube ou en boîte de Petri. Pour les poudres déshydratées, les milieux doivent être reconstitués selon les instructions du fabricant et doivent être autoclavés avant utilisation, sauf dans certains cas lorsque les milieux contiennent des composés thermolabiles. Les milieux prêts à l'emploi présentent l'avantage d'être de qualité constante et de garantir la croissance d'un certain nombre de bactéries testées avant mise sur le marché des lots fabriqués, cela bien évidemment sous condition d'avoir été stockés selon les recommandations du fabricant et d'être utilisés dans leur période de validité.

II.2.2. Les types fonctionnels de milieux

II.2.2.1. Milieux de base

Les milieux de base ou d'utilité générale sont des milieux tels que le bouillon au soja et la gélose au soja, car ils permettent la croissance de nombreux micro-organismes. Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/l.

II.2.2.2. Milieux d'enrichissement

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant la multiplication d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu coeur-cerveau (brain-heart infusion [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

On peut ajouter du sang et d'autres nutriments aux milieux de base pour favoriser le développement d'hétérotrophes exigeants. Ces milieux spéciaux (ex. la gélose au sang) sont des milieux enrichis (Figure 1).

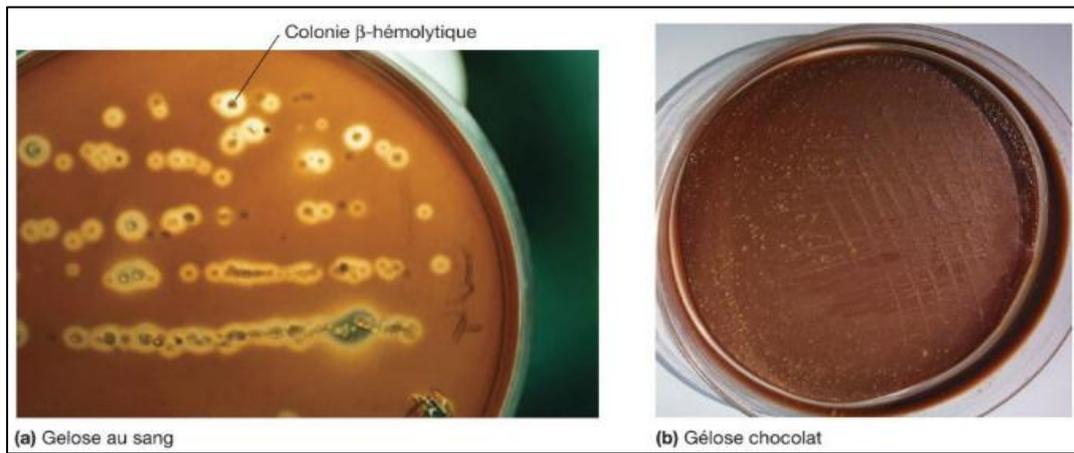


Figure 1: Les milieux enrichis.

(a) Culture sur gélose au sang de bactéries provenant d'une gorge humaine. (b) La gélose chocolat est un milieu enrichi utilisé pour cultiver des micro-organismes exigeants tels que *Neisseria gonorrhoeae*. La couleur brune résulte du chauffage et de la lyse des globules rouges du sang avant leur addition au milieu. Cette gélose tire son nom de la couleur brun chocolat ainsi obtenue.

II.2.2.3. Milieux sélectifs

Les milieux sélectifs permettent la croissance de micro-organismes particuliers tout en inhibant la croissance d'autres (Tableau). Par exemple, les bactéries Gram-négatives se développeront sur des milieux contenant des sels biliaires ou des colorants, (e.g. la fuchsine basique et le cristal violet), alors que la croissance des bactéries Gram-positives est inhibée. Les géloses Endo (éosine-bleu de méthylène) et MacConkey (Tableau) sont souvent utilisées pour rechercher *E. coli* et des bactéries apparentées dans l'eau alimentaire et ailleurs. Ces milieux empêchent la croissance des bactéries Gram-positives.

Tableau 4 : Mécanisme d'action de milieux sélectifs et différentiels.

Milieu	Type fonctionnel	Mécanisme d'action
Gélose au sang	Enrichi et différentiel	Permet la croissance de nombreuses bactéries exigeantes, qui peuvent être différenciées par la production d'hémolysines – des protéines qui lysent les hématies. L'hémolyse apparaît comme une zone claire (hémolyse β) ou comme un halo verdâtre (hémolyse α) autour de la colonie (ex. <i>Streptococcus pyogenes</i> , un streptocoque β hémolytique).
Gélose EMB (éosine bleu de méthylène)	Sélectif et différentiel	Deux colorants, l'éosine Y et le bleu de méthylène, inhibent la croissance des bactéries Gram-positives. Ils réagissent aussi avec les produits acides libérés par certaines bactéries Gram-négatives lorsqu'elles métabolisent le lactose ou le saccharose (des sources d'énergie et de carbone). Les colonies de Gram-négatives qui produisent de grandes quantités de produits acides ont un aspect vert brillant (ex. les bactéries fécales telles que <i>E. coli</i>).
Gélose MacConkey (MAC)	Sélectif et différentiel	Les composants sélectifs de ce milieu sont des sels biliaires et le cristal violet, qui inhibent la croissance des bactéries Gram-positives. La présence de lactose et de rouge neutre, un indicateur de pH, différencient les bactéries Gram-négatives en fonction des produits libérés lorsqu'elles métabolisent le lactose. Les colonies, qui libèrent des substances acides, sont rouges (ex. <i>E. coli</i>)
Gélose mannitol-sel	Sélectif et différentiel	Une concentration de NaCl 7,5 % sélectionne les staphylocoques. On différencie les staphylocoques pathogènes grâce aux produits acides libérés lorsqu'ils métabolisent le mannitol comme source de carbone et d'énergie. L'acidification fait passer l'indicateur de pH (le rouge phénol) au jaune (ex. <i>Staphylococcus aureus</i>)

II.2.2.4. Milieux différentiels

Les milieux différentiels sont des milieux permettant de distinguer différents groupes de bactéries et même d'identifier des micro-organismes sur base de leurs caractéristiques biologiques. La gélose au sang est un milieu à la fois différentiel et enrichi. Il distingue les bactéries hémolytiques des bactéries non hémolytiques. Certaines bactéries hémolytiques (ex. de nombreux streptocoques et des staphylocoques isolés de la gorge) présentent une zone claire due à la destruction des globules rouges autour de leurs colonies (Figure 1a). La gélose au sang (généralement du sang de mouton) apporte les protéines, les glucides, les lipides, le fer, nombre de facteurs de croissance et de vitamines indispensables à la croissance de micro-organismes exigeants. La gélose MacConkey est à la fois différentielle et sélective. Comme elle contient du lactose et du rouge neutre, les colonies de bactéries fermentant le lactose libèrent des déchets acides. Ces colonies apparaissent roses ou rouges et se distinguent très facilement des colonies de bactéries qui ne le fermentent pas.

II.3. La culture des aérobies et des anaérobies

Des approches radicalement différentes doivent être utilisées pour cultiver les aérobies nécessitant de l'oxygène et les anaérobies tués par l'oxygène. Quand des micro-organismes aérobies sont cultivés dans de grands volumes de milieu, il faut agiter le milieu pour l'aérer ou y injecter de l'air stérile. Sans aération, les micro-organismes ne pourraient obtenir une quantité suffisante d'oxygène en raison de sa faible solubilité dans le liquide.

Un problème inverse se présente avec les anaérobies : tout l'oxygène doit être éliminé. Cela peut se faire de plusieurs façons. (1) On utilise un milieu anaérobie spécial contenant des agents réducteurs comme du thioglycolate ou de la cystéine. Le milieu est bouilli lors de sa préparation pour dissoudre ses composants et éliminer l'oxygène. Les agents réducteurs éliminent l'oxygène résiduel dissous pour permettre aux anaérobies de se développer sous la surface. (2) On peut également éliminer l'air d'une zone de travail fermée, souvent appelée chambre de travail anaérobie. On en retire la majeure partie grâce à une pompe à vide et on expulse l'oxygène résiduel avec de l'azote (Figure). Un mélange de gaz contenant de l'hydrogène est ensuite introduit dans la chambre de culture. En présence d'un catalyseur (du palladium), l'hydrogène et les dernières molécules d'O₂, réagissent pour former de l'eau, en créant un environnement anaérobie. On ajoute souvent du CO₂, à la cuve puisque de nombreux anaérobies requièrent de faibles quantités de CO₂ pour une bonne croissance. (3) Une méthode de culture d'un petit nombre d'organismes anaérobies consiste à utiliser le système Gas Pak, qui produit également de l'hydrogène en présence de palladium pour éliminer l'oxygène (Figure). (4) Une approche similaire utilise des sacs en plastique contenant du carbonate calcique et un catalyseur de façon à créer une atmosphère anaérobie riche en CO₂. (5) Dans les laboratoires cliniques, on remplace de plus en plus le

système Gas Pak par une enzyme bactérienne, qui élimine l'oxygène, lorsqu'elle est ajoutée à un bouillon de culture et à l'espace mort du conteneur.



Figure 2 : Une chambre de travail et un incubateur anaérobies.

Ce système contient un plan de travail et un incubateur dépourvus d'oxygène. Un sas à la droite du plan de travail permet d'entrer le matériel sans exposer l'intérieur de la chambre à l'oxygène. L'atmosphère anaérobie est obtenue essentiellement par une pompe à vide et des purges d'azote. L'oxygène résiduel est éliminé grâce à de l'hydrogène et un catalyseur de palladium. L'oxygène réagit avec l'hydrogène pour former de l'eau, qui est alors absorbée par un agent desséchant.

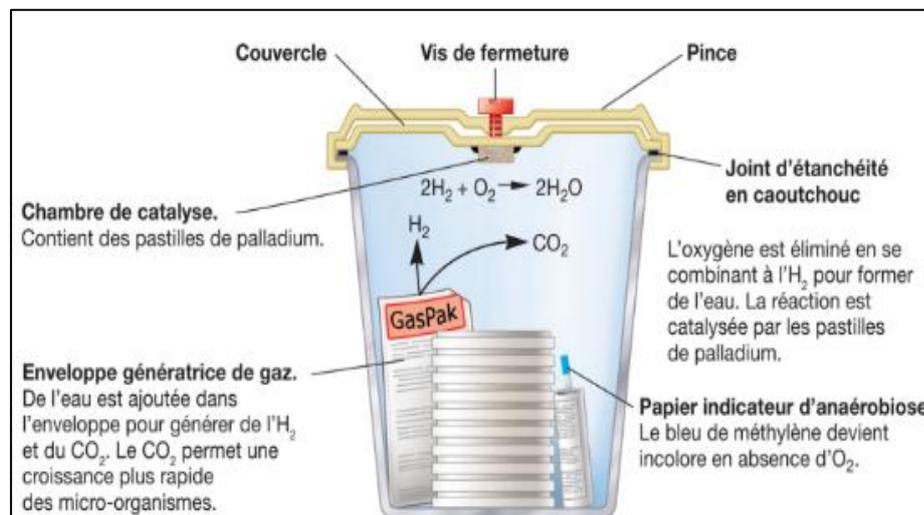


Figure 3 : Le système anaérobie GasPak.

L'hydrogène et le dioxyde de carbone sont produits par une enveloppe GasPak. Le catalyseur de palladium, localisé dans le couvercle de la chambre, forme de l'eau à partir d'hydrogène et d'oxygène en éliminant ainsi l'oxygène de l'enceinte scellée.

II.4. Méthodes d'isolement

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, les méthodes d'ensemencement diffèrent.

II.4.1. Ensemencement des milieux solides en boîte de Petri

II.4.1.1. Méthodes des quadrants

Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange. Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près d'un bord de la boîte de Petri, ou en une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant. Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ou d'un ensemenceur à usage unique stérile selon les différentes étapes de la Figure .

Ainsi, par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées dont la morphologie permet de s'orienter vers une espèce ou un genre bactérien voire une famille de bactérie. C'est à partir de ces colonies isolées que des tests d'identification pourront être pratiqués et la sensibilité aux antibiotiques testée. Parfois, une subculture peut être nécessaire pour parfaire l'obtention d'une culture pure avec un inoculum suffisant pour les tests à effectuer.

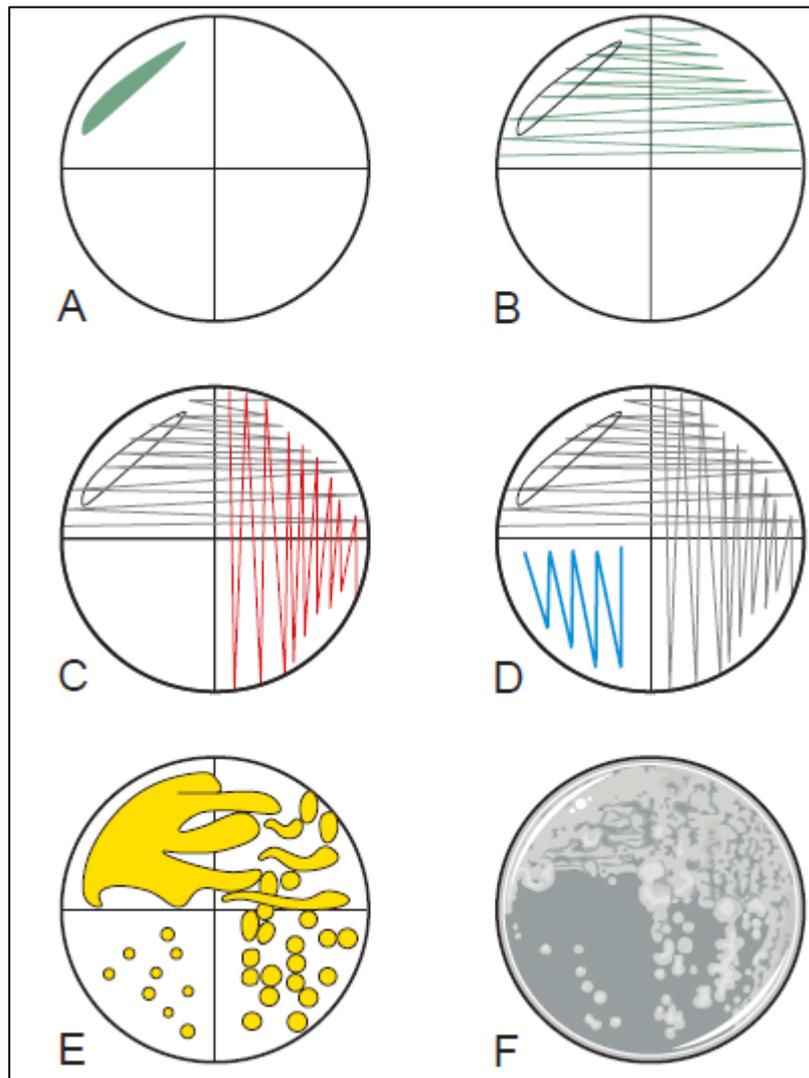


Figure 4: Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant

A. Dépôt de l'échantillon. B. Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes). C. Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges). D. Le dernier quadrant estensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en E et en pratique en F.

II.4.1.2. Ensemencement pour dénombrement des bactéries

Plusieurs approches en dehors de l'isolement en quadrants peuvent être retenues pour une appréciation semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes.

II.4.1.2.1. Ensemencement en stries

Cette technique est en particulier appliquée pour estimer de manière approchée la quantité de bactéries dans les urines (Figure). Un volume connu d'urine est déposé en strie d'un bord au centre de la boîte de Petri ; l'étalement est effectué en réalisant des stries serrées bord à bord comme indiqué sur la Figure .

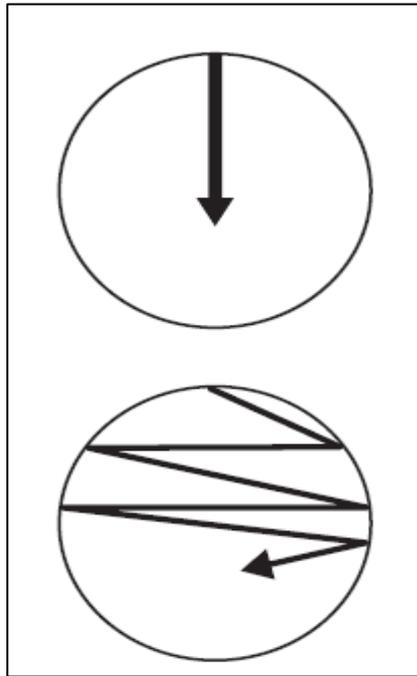


Figure 5: Modalités d'ensemencement d'une gélose pour numération semi-quantitative.

En haut, une strie est effectuée. L'étalement est effectué par des stries serrées sur l'ensemble de la boîte sans faire tourner celle-ci de 90°.

II.4.1.2.2. Ensemencement par la technique du râteau

À partir d'un volume défini déposé à la surface d'une gélose, 50, 100, ou 200 μl par exemple, il est possible d'étaler le dépôt à l'aide d'un étaleur ou « râteau ». L'ensemble de la suspension est étalé sur la gélose en faisant tourner la boîte (Figure 6).

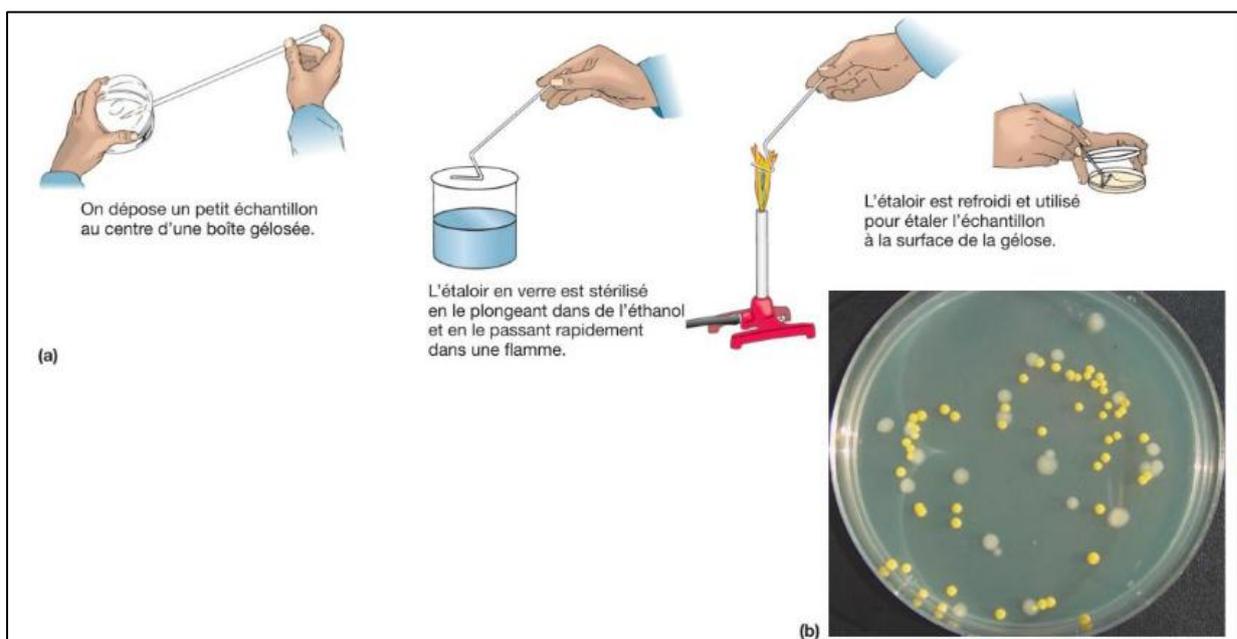


Figure 6 : La technique d'ensemencement en surface (technique du râteau).

(a) Préparation d'un étalement à la surface d'une boîte. (b) Résultat typique d'un ensemencement en surface.

II.4.1.2.3. Ensemencement en spirale

Des appareils appelés « ensemenceurs en spirale » permettent d'étaler un volume donné à la surface d'une gélose en partant du centre jusqu'au bord.

II.4.1.2.4. L'ensemencement en profondeur

Il est très utilisé avec les bactéries, les archées et les champignons. Il est particulièrement utile lors de l'échantillonnage d'une population hétérogène de micro-organismes, dont certains pourraient produire des colonies s'étalant sur une surface de gélose lors d'un isolement par les méthodes de striation ou d'étalement. Dans la méthode d'ensemencement en profondeur, l'échantillon de départ est dilué en série de manière à réduire suffisamment la population microbienne et à obtenir des colonies séparées (Figure). De petits volumes de plusieurs échantillons dilués sont ensuite mélangés à de la gélose liquide refroidie à 45 °C. Les mélanges sont versés immédiatement dans des boîtes de culture stériles. La plupart des micro-organismes résistent à ce bref contact avec la gélose chaude. Après solidification de la gélose, chaque cellule est immobilisée et va former une colonie.

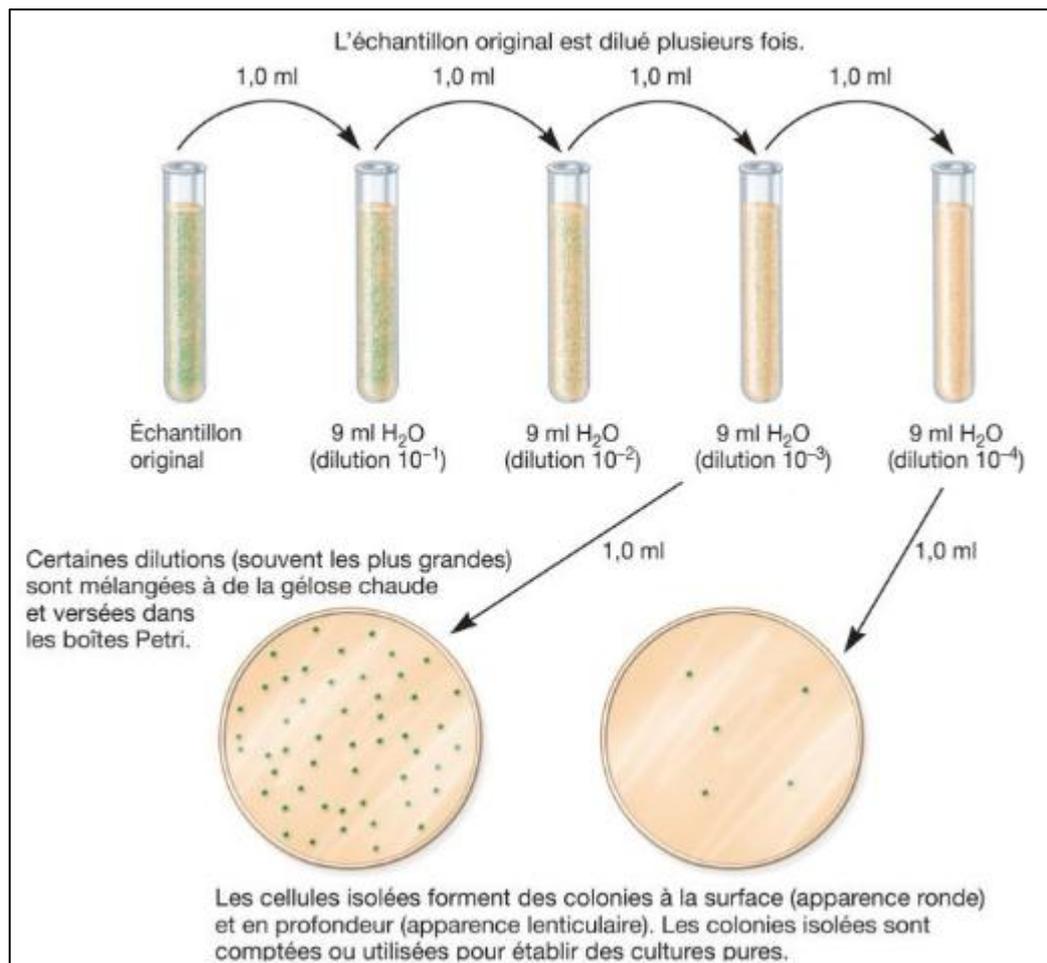


Figure 7: La technique d'ensemencement en profondeur

II.4.1.2.5. Autres méthodes

Plusieurs souches peuvent être déposées sur une seule et même gélose en faisant des stries radiaires ou en faisant des stries parallèles.

II.4.1.3. Ensemencement pour étude de la sensibilité aux antibiotiques en milieu solide

Pour la méthode d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose, il est recommandé d'inoculer les suspensions bactériennes, ajustées pour obtenir une densité bactérienne de 0,5 McFarland pour la très grande majorité des bactéries, à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension et « essoré » sur le bord du tube. Les géloses sont ensemencées par écouvillonnage de la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

II.4.2. Ensemencement des milieux solides en tube

La plupart de ces milieux sont ensemencés en surface sur la pente de la gélose soit en déposant quelques gouttes d'un liquide biologique, soit en faisant des stries à la surface de la pente à l'aide d'un ensemenceur à usage unique ou à l'aide d'un système automatisé.

Pour l'ensemencement de certains milieux particuliers comme le milieu de Kligler-Hajna, une piqûre centrale venant inoculer en profondeur la gélose complète l'ensemencement de la pente effectué par des stries à la surface.

II.4.3. Ensemencement des milieux liquides

Les milieux liquides d'enrichissement sont ensemencés directement avec le produit à analyser. Les milieux liquides d'identification sont ensemencés en ajoutant des bactéries prélevées avec un ensemenceur ou bien en déposant quelques gouttes de la bactérie à étudier en suspension.