



ENSP

ÉCOLE NATIONALE DE
LA SANTÉ PUBLIQUE

RENNES

Ingénieur du Génie Sanitaire

Promotion 2006

**Composition bactérienne et fongique de l'atmosphère
des étables et protection de l'enfant contre les maladies
allergiques.**

Pr Renaud Piarroux

Dr Bertrand Sudre

Equipe de recherche Environnement Santé en Franche Comté

SERF (EA 2276)

Université de Franche-Comté

Référent de l'École Nationale de Santé Publique : Bernard Junod

Morgane ALIX

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Piarroux, chef du service de Parasitologie - Mycologie de l'hôpital Jean Minjoz de Besançon, pour son aide et ses conseils lors de la réalisation de ce projet.

Je remercie le Docteur Bertrand Sudre, pour sa disponibilité, les informations enrichissantes qu'il m'a fournies et son soutien quotidien.

J'adresse un remerciement particulier à Mlle Vacheyrou (technicienne de recherche) qui m'a formée aux techniques biologiques et qui m'a guidée dans mon évolution au sein du laboratoire.

Je remercie les Dr Reboux et Roussel pour les documents et renseignements divers qu'ils m'ont procurés en fonction de l'avancée de mon travail.

Je remercie également Mlle Normand (Doctorante) pour son aide généreuse et pour m'avoir fait profiter des résultats de son travail de recherche.

Enfin, je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de l'unité de Recherche Santé Environnement Rural – Franche-Comté du laboratoire de Parasitologie Mycologie du Centre Hospitalo-universitaire de Besançon.

Sommaire

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	Définitions.....	1
1.2	Epidémiologie.....	1
1.2.1	Prévalence des maladies allergiques.....	1
1.2.2	Les facteurs de la modification de la prévalence	2
1.2.3	La théorie hygiéniste	3
1.3	Un contexte particulier et protecteur	3
1.4	Les études microbiologiques en milieu rural agricole	4
2	OBJECTIFS	7
3	ENJEUX	8
3.1	Enjeu scientifique	8
3.2	Enjeu en santé publique.....	8
3.3	Enjeu agroalimentaire	9
4	MATERIEL ET METHODES.....	10
4.1	Etude bibliographique des techniques d'échantillonnage de l'environnement.....	10
4.2	Etude au laboratoire.....	10
4.2.1	Présentation de l'équipe de recherche et déroulement du travail	10
4.2.2	Stratégie de prélèvement.....	10
4.2.3	Les techniques d'échantillonnage utilisées	11
A)	La poussière sédimentée.....	11
a)	Boîte de sédimentation compartimentée	11
b)	Boîte de sédimentation non compartimentée.....	11
c)	Poussières prélevées à la spatule	11
d)	Poussières sédimentées sur lame	11
B)	L'Air	12
a)	Par aspiration sur filtre téflon	12
b)	Par impaction sur membrane.....	12
C)	Le foin.....	12
D)	Les lingettes	13
E)	Le lait.....	13
4.2.4	Analyses microbiologiques	13
A)	La poussière sédimentée.....	13
a)	Analyse par culture	13
b)	Examen direct de la poussière sédimentée sur lame	14
B)	La poussière dans l'air.....	14
a)	Par aspiration sur filtre téflon	14
b)	Par impaction sur membrane plastique.....	14
C)	Le foin et les substrats d'alimentation.....	14
D)	Les lingettes	14
E)	Le lait.....	15
4.2.5	Exploitation des résultats.....	15
5	RESULTATS	16
5.1	Revue des techniques disponibles dans la littérature	16

5.1.1	La composition du bioaérosol des étables	16
5.1.2	Les techniques d'échantillonnage	16
A)	Echantillonneur fixe.....	16
B)	L'air échantillonné par impaction.....	17
C)	L'air échantillonné par pompage sur filtre.....	17
5.1.3	Poussière échantillonnée par prélèvement de surface	18
A)	Prélevée à l'aide d'un aspirateur.....	18
B)	Prélevée à l'aide de lingettes	18
5.2	Résultats	20
5.2.1	Caractéristiques des exploitations agricoles	20
5.2.2	Résultats des prélèvements environnementaux	21
5.2.3	Flux de microorganismes dans les étables	21
5.2.4	Organigramme des techniques d'échantillonnage	22
5.2.5	Synthèse des performances analytiques des caractéristiques logistiques et économiques et des techniques utilisées	22
6	DISCUSSION	31
	CONCLUSION	35
	BIBLIOGRAPHIE	37
	ANNEXES	I

Liste des sigles utilisés

EBV : Virus d'Epstein Barr

IgE : Immunoglobuline E

INRA : Institut National de Recherche en Agronomie

ISAAC : The International Study of Asthma and Allergies in Childhood

O.R. : Odds Ratio

PDF : maladie du Poumon de Fermier (alvéolite allergique extrinsèque)

SERF : Equipe de recherche Santéet Environnement Rural en Franche Comté (EA 2276)

UFC : Unité Formant Colonie

1 Introduction

1.1 Définitions

L'allergie est une réaction exagérée de notre organisme contre des substances étrangères, appelées allergènes, qui ne représentent pas forcément un danger en elles-mêmes. Chez le sujet allergique, pour une raison inexpliquée, le système immunitaire considère ces allergènes à tort comme des ennemis. Cela peut survenir avec de nombreux antigènes capables d'entrer en contact avec l'organisme humain. Aujourd'hui, on recense plus de 400 allergènes différents d'après la 3^{ème} édition du dictionnaire des allergènes de Guy Dutau (Editions Médicales). La maladie allergique présente deux versants ; le premier, inné, lié au patrimoine génétique et à son expression, et le second, environnemental, lié aux substances rencontrées par l'individu au cours de sa vie.

On distingue clairement l'atopie de l'allergie. L'**atopie** (du grec a - privatif - et topos - lieu) est définie comme une forme de réactivité immunologique d'un individu **avec présence d'anticorps réaginique Immunoglobuline E ou IgE**. L'**allergie** (du grec allos - autre - et ergos - action) **correspond à une réaction excessive d'un individu à des agressions par des allergènes**. Elles se manifestent par différents symptômes allergique comme l'eczéma, la rhinite, l'asthme ou l'urticaire, qui peuvent être présents en même temps ou se succéder au cours de la vie pour un même patient. **On peut donc être atopique sans jamais faire de réaction allergique** (ce serait le cas de 30% à 40% des sujets apparemment sains). C'est pourquoi un test de provocation cutané positif mettant en évidence un terrain dit atopique ne signifie pas forcément que l'on est en présence d'une allergie.

1.2 Epidémiologie

1.2.1 Prévalence des maladies allergiques

L'allergie est la résultante de facteurs environnementaux et d'un terrain prédisposé. La génétique a permis de mettre en évidence de nombreux gènes candidats pour la maladie asthmatique [1-4]. Ils correspondent à des gènes de susceptibilité présentant un polymorphisme de leur expression résultant en des variants génétiques. Il existe un risque plus élevé de présenter des symptômes atopiques ou de l'asthme lorsqu'il existe des cas familiaux. Ce profil familial est dit "atopique". L'évaluation de ce risque a été décrite en fonction du statut allergique des membres de la famille, voir le Tableau I (p.6). Il est probable qu'il existe, en parallèle des facteurs familiaux, un mécanisme de régulation complexe. Ces mécanismes de régulation restent difficiles à décrypter à l'heure actuelle.

Le nombre de personnes présentant des symptômes dus à des problèmes allergiques est en constante augmentation. Depuis les années 80 la mortalité due à l'asthme, même si elle reste rare, a augmenté de 66%. De ce fait, le coût de la prise en charge de ces maladies allergiques aux Etats-Unis était de 6,2 billions de dollars en 1990 [5]. Il est rapporté un doublement de la prévalence de l'asthme, de la rhinite allergique et de l'eczéma atopique dans les 20 dernières années, en particulier chez la population jeune. En Belgique, 10 à 12% des nourrissons souffrent de dermatite atopique et certains évoquent une augmentation de 250% durant ces 3 dernières décennies au niveau mondial [6]. Dans 80% des cas, la dermatite atopique se manifeste avant le premier anniversaire du bébé, mais rarement avant 3 mois. En général, elle disparaît spontanément avant l'âge de 3 ans mais 10 à 15% des dermatites atopiques du nourrisson perdurent après la puberté. Le patrimoine génétique est stable sur cette échelle de temps et ne peut, à lui seul, expliquer ces modifications de prévalence des maladies allergique. Il faut donc aussi tenir compte de l'évolution des expositions aux allergènes lors du déroulement de la vie de l'individu et des mécanismes d'induction ou de protection de l'allergie.

1.2.2 Les facteurs de la modification de la prévalence

Les facteurs responsables de la modification de la prévalence des maladies allergiques sont nombreux et variés. La modification des habitudes de vie dans les pays développés est une évolution nette des sociétés occidentales par rapport aux siècles précédents. Cette évolution est marquée par la présence de nouveaux facteurs comme la modification de l'habitat et de l'alimentation, la vaccination, l'usage des antibiotiques et la présence de nombreuses substances chimiques dans l'environnement.

Afin de comprendre ces chiffres en constante augmentation les études en allergologie se diversifient. Certains chercheurs comme Lesvesque se penchent sur la diversité des formes de sensibilisation allergique chez des enfants et des adolescents au Québec. Grâce à la mesure des IgE spécifiques à huit allergènes différents et un questionnement sur les symptômes respiratoires ressentis, il a mis en évidence que la sensibilisation allergique survient par le biais d'un grand nombre de facteurs et qu'elle joue un rôle déterminant dans le développement de l'asthme, de sifflements ou de rhinites [7]. L'étude comparative ISAAC, faite en plusieurs phases, porte sur des cohortes d'enfants de différents pays. Ces cohortes sont suivies afin de définir quels facteurs peuvent expliquer les différences observées en matière de prévalence et d'incidence de maladies allergiques. Cette étude est basée principalement sur des questionnaires, traitant de l'importance et du rôle du mode de vie, du polymorphisme génétique et d'autres facteurs dans la survenue des maladies allergiques. En parallèle, sont réalisés des prick-tests (test de réaction allergique par scarification superficielle de la peau et application d'un réactif composé d'allergènes connus), des suivis médicaux, des analyses sanguines et des prélèvements environnementaux dans les habitations. Les résultats montrent l'existence de variations géographiques dans la prévalence des symptômes [8, 9]. De ces précédents constats on peut retenir une hétérogénéité à la fois spatiale et factorielle de la prévalence de l'allergie, les résultats différant notablement d'un pays à l'autre.

L'un des principaux facteurs ayant un impact en matière de maladie respiratoire est indéniablement la pollution atmosphérique qui a nettement augmentée ces cinquante dernières années avec l'utilisation massive de carburants rejetant des gaz toxiques dans l'atmosphère. Une étude récente montre les relations entre les variations en NO₂, SO₂, O₃, fumées noires dans l'atmosphère et les admissions à l'hôpital pour asthme [10]. La relation dose-effet est mesurable [11]. La pollution industrielle due au développement de la chimie et de la métallurgie est un des facteurs de l'augmentation des maladies respiratoires. Les composants biologiques comme les pollens, par exemple produits par des arbustes comme l'*Ambrosia artemisiifolia* ou ceux de la famille des bouleaux, sont aussi des allergènes importants de l'environnement extérieur. De même, les allergènes pérennels de l'environnement intérieur (comme les acariens, les blattes et les plantes d'intérieurs *ficus benjamina*) ou les spores des organismes fongiques (*Alternaria*) sont très fréquents dans l'environnement intérieur. Par ailleurs, le caractère allergisant de ces substances peut-être d'ailleurs potentialisé par des polluants chimiques de l'environnement intérieur (fumée de tabac, ou NO₂ intérieur). La consommation de tabac est aussi un facteur essentiel en allergologie. Les substances contenues dans la fumée de cigarette présentent un fort potentiel pathogène peut avoir des effets directs à court et à long terme sur les fumeurs ainsi que des conséquences indirectes par le biais du tabagisme passif. Une étude de Jindal met en évidence une sensibilisation accrue aux allergènes peut être liée au tabagisme [12]. Les enfants et les fœtus constituent une population exposée au tabagisme passif et aux problèmes qui y sont associés comme la sensibilité accrue aux allergènes et l'asthme [13].

1.2.3 La théorie hygiéniste

L'augmentation des facteurs favorisant la survenue des maladies allergiques peut-elle, à elle seule, expliquer les modifications de prévalence ? Au début des années 90, la théorie hygiéniste [14-17] vient compléter les hypothèses pour expliquer l'augmentation des maladies allergiques. Il s'agit d'envisager sous un nouvel angle la survenue des maladies allergiques chez les enfants en prenant en compte l'environnement familial et celui de l'enfant depuis sa conception [18]. Ainsi, il est démontré que les conditions d'hygiène et de mode de vie pendant la petite enfance sont directement reliées à l'exposition à certains microorganismes, susceptibles de favoriser ou non la survenue de la maladie allergique chez l'enfant. Par exemple, les premiers contacts d'un enfant avec d'autres enfants de sa fratrie ou d'une même crèche semblent avoir un effet en terme de modulation de l'immunité face aux maladies allergiques. Il en est de même pour le rôle protecteur d'animaux domestiques. Hesselmar a montré, à partir de l'étude d'une cohorte de 832 enfants suédois, que ceux qui vivent durant la première année avec des animaux domestiques et qui ont de nombreux frères et sœurs ont un faible taux de prévalence aux rhinites allergiques et à l'asthme [19]. Les modifications de prévalence seraient peut-être dues à la perte de facteurs biologiques qui induisent une protection vis-à-vis des maladies allergiques. Dans ce contexte d'interdisciplinarité, certaines publications écrites par des auteurs soutenant l'hypothèse "hygiéniste" tentent de synthétiser l'ensemble de facteurs émergents qui sont en cause dans l'étude de la survenue des allergies. On connaît depuis longtemps certains facteurs infectieux, comme les virus, qui sont responsables d'infections respiratoires dans les premières années de la vie. Ces observations épidémiologiques sont confirmées par des analyses biologiques de prélèvements chez des enfants âgés de moins de deux ans. D'autres microorganismes sont responsables d'une modification du risque de développer une maladie allergique comme le montre ce tableau issu d'une publication de 2006 (Tableau II (p.6)).

1.3 Un contexte particulier et protecteur

Lors de l'étude des microorganismes présents dans l'atmosphère du milieu rural, il est apparu qu'un certain nombre de microorganismes qui ne sont pas forcément des agents infectieux pathogènes humains, pourront avoir une contribution bénéfique sur la santé humaine. L'environnement rural expose à des contaminations microbiologiques très élevées. Leynart a étudié une population de 6251 adultes appartenant au European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) par le biais de questionnaires et de la recherche d'IgE sériques. Il a montré que des facteurs, présents dans l'environnement rural, diminuaient significativement le développement de l'allergie à l'âge adulte [20]. En 1999, Charlotte Braun-Fahrlander a comparé des enfants dont les parents sont fermiers ou non fermiers et a trouvé des différences significatives (exprimés en Odds Ratio) pour la prévalence du rhume des foies O.R.= 0,5 (0,32-0,79). Cette maladie était plus rare chez les fermiers. L'exposition précoce des enfants à certains microorganismes spécifiques des fermes, aux animaux dans les étables, à une alimentation composée de produits à base de lait cru et de viande de ferme, à l'activité des moissons dans l'environnement proche, joue un rôle pour la protection de l'asthme [21]. Une étude cas-témoin composée de trois groupes : enfant de fermiers à plein temps, de fermiers à temps partiel et de non fermiers, a montré d'un effet protecteur associé à la fréquentation des étables par les enfants. [16]

La découverte de l'existence d'un phénomène protecteur propre au milieu rural et plus précisément aux étables est observée à l'échelle mondiale, comme notamment au Japon comme le montre Tatsuo dans une étude clinique et environnementale [22] et au Népal [23]. En Nouvelle Zélande, Wickens, à travers l'étude d'une cohorte de 300 enfants et de 1000 adultes a mis en évidence un phénomène inverse, ce qui peut signifier que l'environnement microbiologique des fermes en Europe est différent de celui des fermes en Nouvelle Zélande [24].

Une hypothèse pour expliquer l'influence d'un environnement agricole est la présence de forte concentration d'endotoxines (ce sont les lipopolysaccharides ou composants de la membrane des bactéries Gram négatif). Les concentrations d'endotoxines sont plus élevées

dans les étables et dans les chambres des enfants vivant dans une ferme que chez les enfants témoins non issus d'une famille d'exploitants agricoles [25]. Lauener a mis en évidence la modification du système immunitaire des enfants fermiers induits par des facteurs environnementaux comme les endotoxines. Dans une étude cas-témoin sur des cohortes d'enfants fermiers et non-fermiers, il a constaté, en étudiant des échantillons de sang in vitro, une différence du nombre d'antigènes destinés à être reconnus par deux récepteurs du système immunitaire inné : CD14 et TLR2, entre les deux groupes d'enfants. Un test par PCR 18s RNA montre un nombre plus élevé de ces récepteurs chez les enfants vivant à la ferme [26]. L'étude ALEX (ALlergy and EndotoXin study), a plus particulièrement mis en évidence le rôle protecteur de l'exposition aux endotoxines du matelas de l'enfant, de la fréquentation des étables et de la consommation de lait cru pendant la petite enfance. Dans cette étude réalisée par un consortium d'équipes de recherche Allemande, Suisse et Autrichienne, l'exposition de la femme enceinte et de l'enfant pendant la première année de vie à l'atmosphère des étables et au lait cru entraîne une diminution de la prévalence de l'asthme, du rhume des foies et des allergies respiratoires [27, 28]. L'exposition précoce à l'environnement de la ferme déterminerait ainsi un risque plus faible d'acquies un statut immunologique TH-2 favorable à la survenue des maladies allergiques [29]. L'étude de l'environnement des étables devient ainsi un sujet de travail majeur en épidémiologie environnementale et en microbiologie en lien avec l'allergologie. Les scientifiques tentent maintenant de déterminer la ou les substances responsables d'un effet protecteur.

1.4 Les études microbiologiques en milieu rural agricole

Une étude récente dans le Shropshire, en Angleterre [30] souligne l'effet protecteur de la consommation de lait cru sur la survenue de maladies allergiques après avoir pris en considération des facteurs protecteurs décrit dans la littérature. Il est probable que certains microorganismes présents dans la poussière et l'air des étables se retrouvent probablement également dans le lait cru produit par les vaches de ces étables. La mise en évidence et l'identification de ces microorganismes dans l'air, les poussières et le lait des exploitations est un sujet scientifique de premier plan dans la recherche du ou des facteurs biologiques pouvant moduler la survenue de maladies allergiques.

Il existe déjà des études qui apportent des éléments de réponses sur la composition microbiologique de l'environnement des étables et sur l'exposition aux microorganismes de l'environnement agricole. Ces études apportent des informations sur la composition microbienne de la poussière en suspension et sédimentée. La mesure de l'exposition à des substances présentes dans l'air ambiant et plus particulièrement dans l'air des maisons est aussi un sujet de recherche dans le domaine de l'allergologie. L'air est analysé afin de mettre en évidence sa composition pour mieux connaître son impact potentiel sur la santé. Différentes techniques de prélèvement ont été utilisées pour recueillir des échantillons d'air ambiant ou de poussières. Elles ont été mises au point en tenant compte du type d'analyses chimiques ou biologiques à effectuer par la suite. Un des objectifs est de définir des modèles d'exposition pour déterminer les quantités inhalées de microorganismes par un enfant ou un adulte en médecine du travail ou dans le cadre de l'étude de l'environnement intérieur. Par exemple, afin de déterminer le niveau des contaminants présents dans des maisons aux Etats-Unis, Edwards a prélevé des poussières sédimentées au moyen d'assiettes en plastiques [31]. D'autres méthodes de prélèvement des particules en suspension par sédimentation, par pompage sur filtre ou impaction ont été utilisées, permettant de déterminer les concentrations de pollens, de spores, de champignons, de bactéries et d'endotoxines [32] présents dans l'air [33].

Si l'on s'intéresse à l'exposition aux micro-organismes, les travaux provenant du champ de la médecine du travail nous permettent de recueillir des informations intéressantes sur l'environnement microbiologique rural agricole, notamment par le biais de questionnaires [34]. La maladie du poumon de fermier (PDF), alvéolite allergique extrinsèque, touchant les agriculteurs, est une maladie pulmonaire contractée sur le lieu du travail. Cette pathologie survient lors de l'inhalation répétée d'antigènes capables d'atteindre l'alvéole pulmonaire entraînant des lésions inflammatoires pulmonaires. Ainsi les travaux sur le PDF cherchent à déterminer les caractéristiques microbiologiques de l'environnement des travailleurs dans le

but de mieux diminuer l'incidence de la maladie. Son étude a permis de connaître un certain nombre de facteurs influençant sa survenue et de définir un type de ferme pour le PDF. On remarque que les étables sont souvent accolées à l'habitat et que les granges de stockage du foin sont construites en pierre et peu ventilées [35, 36]. Ces résultats sont basés sur l'étude microbiologique de l'air, des substrats d'alimentation du bétail et des poussières sédimentées. A titre d'exemple, au début des recherches sur ce sujet, entre les années 60 et 75, les chercheurs se sont penchés surtout sur des étiologies liées à *Saccharopolyspora rectivirgula* [37], puis ils se sont intéressés à d'autres microorganismes au fur et à mesure des avancées technologiques et analytiques [38].

Mais les travaux relatifs à ces pathologies en médecine du travail ne couvrent pas l'ensemble de la composition microbiologique de l'environnement agricole. Cette discipline permet effectivement d'améliorer les connaissances sur la composition microbiologique des étables mais la liste des microorganismes étudiés n'est pas exhaustive car limitée aux agents étiologiques, supposés ou prouvés, des pathologies respiratoires étudiées. Elle apporte néanmoins un ensemble de technique de recueil, bien évaluées, des poussières de l'air et sédimentées.

Après avoir rappelé les notions d'allergie, d'atopie, et observé une augmentation inquiétante de la prévalence de ces maladies, nous avons constaté l'existence d'un nombre important de facteurs y contribuant de façon positive et négative. En effet, il y a d'une part un accroissement des facteurs aggravants mais également d'autre part, il y a également une perte de facteurs "protecteur" notamment liés au milieu rural agricole. Ce dernier constat a fait l'objet d'études épidémiologiques, qui mettent en évidence le rôle d'un certain nombre de micro-organismes présents dans cet environnement. Les résultats des études sur l'exposition des enfants à l'environnement fermier et les découvertes des propriétés protectrices de certaines endotoxines des étables constituent une première base de travail dans le domaine de l'allergologie. Cependant ces données sont insuffisantes si l'on souhaite comprendre les mécanismes physiologiques des maladies allergiques. Il est nécessaire d'approfondir les connaissances dans tous les domaines de recherches s'y rapportant.

Comme s'il s'agissait d'une analyse d'un risque microbien en santé publique, nous devons nous intéresser à plusieurs paramètres à la fois, connaître les propriétés intrinsèques de chaque microorganisme, en quantifier le pouvoir pathogène ou non, mesurer l'exposition des enfants à ces microorganismes et définir si seule cette exposition a un impact sur la prévalence des maladies allergiques. Pour cela l'étude de l'environnement microbien des étables s'avère nécessaire en débutant sur un petit nombre d'échantillons et en prenant en compte les différents flux de particules biologiques venant des fourrages, du bétail ou de l'ensilage. De plus, il faut prendre en compte les aspects technologiques et mettre au point des protocoles de prélèvements adaptés aux substrats trouvés dans les étables. Ensuite, il faut définir les méthodes capables d'identifier et de dénombrer le maximum de microorganismes qui caractérisent l'environnement fermier agricole. Cette nouvelle problématique de santé publique nécessite une approche multidisciplinaire étayée par les connaissances existantes dans des domaines scientifiques variés en matière d'exposition microbienne en épidémiologie environnementale.

Tableau I: Risque allergique en fonction des antécédents d'allergie dans la famille

Antécédents familiaux	Risque allergique chez l'enfant
Pas de parents allergiques	10-20%
1 parent allergique	20-40%
1 frère ou une sœur allergique	30%
2 parents atteints d'allergie	40-60%
2 parents atteints de la même allergie	72%

Sources : [39, 40]

Tableau II: Influence des différentes expositions sur le phénotype**Influence de l'exposition sur le phénotype**

Infections virales respiratoires à Rhinovirus	Déclencheur d'épisodes de sifflements, risque de sifflements, protection contre l'atopie
Virus Respiratoire (RSV)	Risque de sifflements, la plupart du temps pas d'atopie
Autres infections virales, Hépatite A	Données contradictoires pour les maladies allergiques
Herpès	Potentiellement protecteur contre l'atopie
EBV	Potentiellement protecteur contre l'atopie
Infections bactériennes, Salmonellose	Potentiellement protecteur contre l'atopie
<i>Helicobacter pylori</i>	Potentiellement protecteur contre l'atopie
Immunomodulation mycobactériale	Résultats contradictoires au regard de l'atopie
Parasites	Potentiellement protecteur contre l'atopie avec des infections de grande intensité
Exposition microbienne, Endotoxines	Protecteur contre l'atopie, risque de sifflements
Acide muramique	Potentiellement protecteur contre l'atopie
Champignons	Faible association avec des sifflements atopiques

Sources : [41]

2 Objectifs

Le but de ce travail est de caractériser les bioaérosols des étables sur le plan microbiologique. Cela permettra, dans un deuxième temps, de croiser les données obtenues avec les résultats des études cliniques et épidémiologiques réalisées par les équipes européennes impliquées dans le projet GABRIEL (dont un des objectifs est d'identifier les facteurs microbiens protecteurs contre l'allergie).

L'étape préliminaire, objet du présent mémoire, va consister à étudier la contamination des échantillons d'air, de poussières sédimentées, du lait et de l'alimentation du bétail dans seize exploitations agricoles de Franche-Comté. Nous chercherons à identifier les sources possibles d'une contamination de l'air (en amont), que ce soit par l'apport de plantes fourragères, la présence d'animaux, ou toute autre activité agricole. Puis nous nous proposons d'inventorier les microorganismes présents dans les substrats suite à une activité agricole susceptible de modifier notablement la composition de l'air. Cela permettra de schématiser les flux de microorganismes à l'intérieur des étables et des salles de traite et d'identifier les différents réservoirs microbiens entre l'air, le lait et la poussière. Nous pourrions alors sélectionner les substrats représentatifs de l'atmosphère des étables offrant des facilités de prélèvement et de conservation. Cette étude nécessite à la fois un travail de terrain dans des étables de Franche-comté et des analyses en laboratoire.

Pour la mener à bien, il sera nécessaire de tester de nouveaux outils de recueil des particules, en suspension dans l'air ou sédimentées, permettant de quantifier les microorganismes. Une comparaison sera effectuée entre les approches testées dans cette étude et celles recensées dans la littérature scientifique. Nous évaluerons plus particulièrement la pertinence du recueil et de l'analyse microbienne des poussières sédimentées, comme indicateur des flux de micro-organismes qui ont transité dans l'air des étables. Ce type de prélèvement, s'il s'avérait représentatif des bioaérosols des étables, pourrait être ensuite appliqué à plus grande échelle dans l'étude GABRIEL. Nous souhaitons donc mener cette réflexion en tenant compte des contraintes logistique, de coûts et de main d'œuvre, dans le cadre d'une étude scientifique internationale.

Les résultats de cette étude pilote pourront aussi servir dans d'autres domaines scientifiques, médicaux ou agroalimentaires (voir enjeux ci-après). Ils seront donc aussi communiqués aux équipes collaborant avec le SERF dans le cadre de l'étude des maladies professionnelles ou dans le domaine agroalimentaire, et plus particulièrement de la filière du lait cru.

3 Enjeux

3.1 Enjeu scientifique

Deux enjeux scientifiques principaux peuvent être abordés à partir de l'étude que nous nous proposons de réaliser.

En premier lieu, l'étude des microorganismes de l'environnement des étables permet d'aborder le thème de la biodiversité des populations bactériennes et fongiques. Les populations microbiennes des étables sont complexes, composées de nombreuses espèces, dont la présence et le nombre dépendent de divers facteurs, tels que les activités menées dans l'étable, la nature et la qualité microbiologique des substrats manipulés pour nourrir le bétail ou pour changer la litière etc.. Cette diversité et cette complexité imposent des démarches de simplification passant par un échantillonnage raisonné, et un choix pertinent d'analyse des échantillons collectés. Pour ce faire, il est alors indispensable de modéliser les flux microbiens dans les étables et de valider la pertinence de prélèvements simples à collecter, tels que les poussières sédimentées, censées contenir, au moins pendant un certain temps, la somme des microorganismes qui ont transité dans l'air des étables étudiées. Cette simplification, une fois validée, permet d'envisager l'étude d'un plus grand nombre d'étables, autorisant l'augmentation de la puissance statistique des enquêtes épidémiologiques.

Le second enjeu scientifique est celui des relations que l'homme entretient avec son environnement et de l'influence de ce dernier dans l'expression de son patrimoine génétique. Les maladies allergiques sont en effet un excellent modèle permettant de montrer comment à partir d'une susceptibilité individuelle, dictée à l'origine par le génome, une maladie peut se développer ou non, selon le type d'environnement fréquenté par l'individu.

3.2 Enjeu en santé publique

Le principal enjeu en terme de Santé Publique est en effet la protection des populations contre les maladies allergiques mais aussi contre les maladies respiratoires d'origine professionnelle. Les chiffres à l'échelle mondiale sont alarmants. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé : il y aurait 1,5 millions de décès annuels par infections des voies respiratoires inférieures dues à la pollution de l'air, intérieur et extérieur. Les maladies respiratoires sont souvent observées dans le domaine du travail notamment parmi les travailleurs de l'industrie chimique ou agricole [42]. Dans le rapport d'une conférence en date du mois de juin 2006 à Genève, il est écrit qu'il y aurait 1,3 millions de décès annuels par maladie pulmonaire obstructive chronique suite à une perte graduelle de la fonction respiratoire résultant de l'exposition à des poussières et à des fumées sur le lieu de travail. Cependant, les travailleurs ne constituent pas la seule population touchée par les maladies respiratoires. En effet la population infantile compte de plus en plus de cas de maladies allergiques que l'on peut relier à de nombreux facteurs de l'environnement comme les pollens, les poussières et les allergènes d'origine animale [43].

Le second enjeu de Santé Publique concerne l'effet bénéfique de la fréquentation du milieu rural agricole. Les études épidémiologiques ont mis en évidence que la fréquentation des étables et la consommation de lait cru sont des facteurs protecteurs. L'analyse de la poussière sédimentée provenant d'étable de l'arc alpin a démontré sur le modèle murin des propriétés immuno-modulatrices. Ainsi la recherche et l'identification de substance ayant un effet modulateur sur les pathologies allergiques ouvrent des perspectives thérapeutiques telles que l'adjonction de substances immuno-modulatrices dans l'alimentation des nourissons.

3.3 Enjeu agroalimentaire

L'étable n'est pas seulement un lieu de travail pour l'agriculteur ou l'endroit où un enfant acquiert une protection contre l'allergie. C'est aussi le lieu de production du lait.

Nous ne pouvons écarter l'hypothèse que les microorganismes caractéristiques des étables sont également présents dans le lait cru. Ainsi, la compréhension des flux de microorganismes dans les étables permet de mieux appréhender les contaminations fongiques et bactériennes du lait. En effet, comme la recherche agronomique s'intéresse à la composition des produits laitiers en particulier de la flore du lait d'intérêt technologique, elle est également demandeuse d'information relative à la sécurité et à la qualité réglementaire du lait. L'influence de la composition du lait cru pour la fabrication du fromage est primordiale. On comprend ainsi les enjeux économiques que sous-tendent ces études en particulier sur les territoires d'Appellation d'Origine Contrôlée.

Sous cette hypothèse, ce travail s'intègre dans un projet régional. En effet, le projet Agrisanté vise à étudier en partenariat avec la Chambre d'Agriculture de Franche-Comté et l'Institut National de Recherche Agronomique de Poligny (Jura) le transfert des microorganismes de l'étable au lait. Cette étude a pour objectif d'approfondir la connaissance sur les liens entre la flore microbiologique des étables et la flore d'intérêt technologique du lait servant à la confection du fromage Comté. Le travail participe à la connaissance du label d'appellation contrôlée, qui peut être valorisé par de tels résultats. En retour, les résultats obtenus par l'INRA sur la flore du lait cru peuvent apporter des connaissances microbiologiques en terme de protection des maladies allergiques.

4 Matériel et méthodes

4.1 Etude bibliographique des techniques d'échantillonnage de l'environnement

Cette recherche bibliographique a été menée tout au long du stage. La méthode utilisée est une recherche systématique sur Pubmed à l'aide du logiciel Endnote 6.0. La bibliographie disponible au laboratoire a permis de compléter les recherches. D'autre part, l'expertise en microbiologie de l'environnement agricole, en particulier sur les alvéolites allergiques extrinsèques, au sein du laboratoire, a permis des échanges scientifiques fournis. Une coopération régulière a eu lieu avec les équipes de recherche d'Utrecht au Pays-Bas (Pr Heederik - Institute for Risk Assessment Sciences) et de Kuopio en Finlande (Dr Hyvärinen – National Public Health Institute – department of environmental health).

4.2 Etude au laboratoire

4.2.1 Présentation de l'équipe de recherche et déroulement du travail

L'équipe de recherche SERF (Santé en Environnement Rural – UFR Médecine et Pharmacie de Franche-comté), sous la direction du Pr. Renaud PIARROUX conduit depuis des années des travaux sur les pathologies respiratoires professionnelles des éleveurs (alvéolite allergique extrinsèque ou pneumopathie interstitielle comme la maladie du poumon de fermier). Cette équipe analyse les liens entre pathologies professionnelles de santé et pratiques agricoles. Dans ce cadre, elle a développé différentes méthodes d'évaluation (échantillonnage, analyse et questionnaire) de l'exposition aux microorganismes de l'environnement (pathogènes ou non) présents dans l'ambiance des étables et des granges. Pendant ce travail, j'ai effectué différentes tâches au laboratoire qui m'ont permis de mieux m'intégrer à l'équipe de recherche. Je me suis tout d'abord familiarisée avec le langage utilisé en parasitologie-mycologie, et j'ai appris à reconnaître certains microorganismes étudiés dans ce projet ou en médecine de routine à l'hôpital. Par ailleurs j'ai été formée à des techniques de laboratoires afin de pouvoir faire moi-même desensemencements ou des préparations de lames d'observation microscopique. Ainsi dans le cadre des protocoles utilisés pour le Service Hygiène-Santé de la Ville de Besançon, j'ai effectué des prélèvements d'air et de moisissure dans un logement, que j'ai ensuite mis en culture, lus et interprétés.

4.2.2 Stratégie de prélèvement

Ces échantillonnages portaient sur différents substrats : l'air, les poussières sédimentées et le lait. Ils ont été complétés par un questionnaire sur les caractéristiques de l'exploitation et sur les pratiques agricoles. L'échantillonnage a eu lieu pendant la saison d'hiver, de la période du 15 janvier au 10 avril 2006. Seize fermes de la région Franche-comté ont été recrutées à partir d'une liste fournie par la Chambre d'agriculture de Franche-Comté. Nous avons choisi 9 fermes dites traditionnelles, avec le bétail entravé, et 7 fermes dites modernes avec la présence d'une salle de traite indépendante et d'une aire de repos pour le bétail.

Trois visites ont eu lieu à 30 jours d'intervalle. La première a consisté à déposer le matériel fixe pour l'échantillonnage de poussière (une boîte grise à compartiments et une bleue non compartimentée ; cf annexes), puis à prélever de la poussière sédimentée à la spatule et à remplir le questionnaire. La seconde visite a permis la réalisation des prélèvements d'air, de substrat alimentaire (foin du jour, foin mélangé et paille), de lait et de surface du trayon. Durant cette seconde visite, les dispositifs fixes ont été relevés et remplacés pour une nouvelle période d'échantillonnage. La troisième et dernière visite a été menée pour recueillir

le deuxième échantillon de poussière. Nous allons maintenant présenter l'ensemble des techniques utilisées durant la campagne de prélèvements de terrain et qui ont été choisies lors d'un travail collaboratif au sein du laboratoire.

4.2.3 Les techniques d'échantillonnage utilisées

A) La poussière sédimentée

a) *Boîte de sédimentation compartimentée*

Le dispositif consiste en une boîte en plastique de dimension (110*50*45 mm), munie d'un couvercle plastique et d'une grille en laiton. Cette boîte contient trois compartiments : deux pour recueillir par sédimentation la poussière en suspension dans l'air et un troisième dans lequel deux lames de verre ont été disposées (voir lame de sédimentation directe ci-dessous).

Ce dispositif a été déposé lors de la première visite pour une période de recueil de 30 jours (période 1 ou P1). A la seconde visite, un dispositif d'échantillonnage identique a été mis en place au même endroit pour une seconde période de prélèvements (période 2 ou P2). Les échantillons ont été conservés dans un endroit sec et à température ambiante. Les caractéristiques complètes du dispositif sont disponibles en annexe (fiche technique - boîte grise compartimentée).

b) *Boîte de sédimentation non compartimentée*

Cette boîte est destinée à recueillir de la poussière en suspension dans l'air dans un seul compartiment. La surface utile d'ouverture est de 50,26 cm² au travers d'un couvercle plastique percé. Le lieu et les périodes d'échantillonnage ont été identiques à ceux des boîtes grises dans chacune des exploitations agricoles. Les échantillons ont été conservés dans un endroit sec et à température ambiante. Les caractéristiques complètes du dispositif sont disponibles en annexe (fiche technique - boîte bleue non compartimentée).

c) *Poussières prélevées à la spatule*

Les prélèvements de poussières sédimentées ont été réalisés à l'aide d'une spatule propre, sur des supports secs (poutrelles métalliques, rebords en béton ...) à une hauteur minimum de 1 mètre. La poussière échantillonnée a été conservée dans un pot en plastique stérile de 50 ml à température ambiante. Cet échantillonnage a été effectué dans plusieurs endroits différents de l'étable.

d) *Poussières sédimentées sur lame*

Les deux lames de verres pour microscope d'une taille de 76 * 26 mm ont été fixées par du scotch double face dans des godets plastiques insérés dans le troisième compartiment de la boîte grise de recueil des poussières. Il y a donc deux lames par boîtes déposées, une relevée par l'agriculteur au bout de 15 jours, et l'autre relevée à la fin de la période d'échantillonnage. Les lames ont été enduites d'un mélange à base de toluène et vaseline fourni par le Réseau National de Surveillance Aerobiologique (www.rnsa.asso.fr)

B) L'Air

a) *Par aspiration sur filtre téflon*

Le recueil des microorganismes a été effectué par un système de pompage d'air modèle GilAir 3[®] (Sensidyne, Clearwater) fixé sur un trépied à une hauteur fixe de 75 cm muni d'une cassette de prélèvement en plastique de 37 mm de diamètre, amovible, de marque GILIAN[®] (Sensidyne, Clearwater). Le filtre en téflon (TJ Environmental, Amsterdam, Hollande) à l'intérieur de la cassette comporte des pores de 0,45 µm de diamètre permettant le recueil de l'ensemble des microorganismes fongiques et bactériens. Sur le dispositif de pompage, un contrôle visuel du débit est possible à l'aide d'une colonne sèche. Un contrôle régulier du calibrage des pompes avec l'appareil GILIBRATOR-2[®] Diagnostic Calibration System (Sensidyne, Clearwater) a permis de constater une variation des débits des pompes inférieure à 5%. Le filtre en téflon de la cassette est fabriqué à base de tétrafluoroéthylène, matière plastique dérivée de l'éthylène et du fluor. Il offre des capacités élevées de résistance aux agents chimiques, à la température et est fortement hydrophobe. Le choix du filtre a été guidé par les caractéristiques granulométriques des microorganismes recherchés. Pour chaque exploitation agricole, l'échantillonnage de terrain comprend trois prélèvements d'air par pompage :

- avant session de travail : dans l'ambiance de repos de l'étable, sans maniement de substrat, d'une durée de 20 min et à un débit de 3 L/min
- après session de travail : avec un temps d'attente de 10 min à la fin de la distribution de l'alimentation, pendant 20 min et à un débit de 3 L/min.
- dans la salle de traite : cet échantillonnage a été réalisé seulement dans les exploitations modernes au moment de la traite, pour les fermes traditionnelles, ce prélèvement correspond à celui d'avant la session de travail. Le prélèvement a une durée de 20 minutes.

Les ensemencements des prélèvements sur milieu de culture sélectifs ont été faits dès le retour au laboratoire (à 4 heures +/- 1h).

b) *Par impaction sur membrane*

La cassette contient un disque en plastique de polypropylène de 28 millimètres recouverts du toluène et vaseline pour une meilleure adhérence des particules impactées. Les échantillons d'air ont été effectués de la même manière et à la suite des prélèvements sur filtre Téflon. La cassette est fermée pendant le transport pour éviter la contamination externe. La durée de prélèvement est de 5 minutes.

C) Le foin

Prélèvement du « foin du jour » : prélèvement standardisé, à 1/3 de l'épaisseur des bottes rondes utilisées pour l'affouragement. La conservation se fait dans un pot stérile de 50 mL. Ce prélèvement a été réalisé dans le but d'évaluer la qualité microbiologique du substrat utilisé lors de l'échantillonnage d'air.

Prélèvement du « foin mélangé » : il correspond aux différents foins utilisés pendant la période 1. Le foin est découpé et mélangé pour avoir un prélèvement homogène. La conservation se fait dans un pot stérile de 50 mL. Ce prélèvement a été réalisé dans le but d'une comparaison avec le prélèvement de poussière de cette même période. Les pots de prélèvements de foin sont stockés au congélateur à -20°C

D) Les lingettes

Le prélèvement consiste à frotter l'extrémité de 2 trayons d'une vache, avec une lingette de tissu stérile préalablement humidifiée avec une solution stérile à 0.1% de Tween 20[®] (Merck, Hoherbrunn, Allemagne). L'échantillonnage se fait sur 10 vaches du troupeau. Les lingettes sont conservées dans un sac stérile.

E) Le lait

Le lait est récupéré dans un pot stérile à la fin de la traite.

4.2.4 Analyses microbiologiques

Sur les différents prélèvements faits dans les 16 fermes du projet Franc-Comtois, plusieurs techniques d'analyse ont été réalisées donnant des informations sur les caractéristiques microbiennes, fongiques et bactériennes des substrats, de l'air et des poussières. Nous avons recherché pour chaque type de prélèvement différents microorganismes, comptabilisés en UFC/g ou UFC/m³ ou UFC/mL suivant le type de substrat. Les analyses mycologiques ont été réalisées à l'aide des protocoles présentés en annexe pour les différents échantillons. Pour les analyses bactériologiques, nous avons seulement présenté les résultats de culture de la gélose Müller-Hinton (milieu non sélectif permettant le développement d'un grand nombre d'espèces).

A) La poussière sédimentée

a) *Analyse par culture*

Le protocole d'analyse microbiologique est identique pour les trois systèmes d'échantillonnage suivant : boîte compartimentée, boîte non compartimentée et à la spatule. La poussière a été recueillie à l'aide d'un pinceau dans les boîtes plastiques et transférée dans un pot stérile conservé à température ambiante. L'analyse a été réalisée selon le protocole suivant : prélèvement de 0,3 grammes de poussière avec la balance électronique, vortexage pendant 1 minute avec 20 ml de solution de Tween[®] 80 à 0,1 % (Merck, Hoherbrunn, Germany). La solution obtenue est diluée à 10^{-2} et 10^{-3} pour les milieux de mycologie : Malt (AES, Combours, France) et DG18 (Merck, Darmstadt, Germany). Pour les bactéries filamenteuses la dilution est de 10^{-2} pour le milieu Difco (BD, Le pont de Claix, France), et de 10^{-1} pour le milieu R8. Pour les autres milieux à bactéries, les dilutions sont de 10^{-3} et de 10^{-4} pour Müller-Hinton (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) et de 10^{-1} pour Drigalski lactose agar (AES laboratoire, Bruz, France) et Slanetz Agar Base (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). L'ensemencement se fait par l'étalement par la technique du râteau de 100 μ L d'inoculum mesuré par une micropipette sur chaque boîte de pétri. Les milieux sont mis à des températures différentes d'incubation et lus à des durées différentes. Le milieu Malt est incubé à température ambiante et DG18 à 30°C, ces 2 milieux sont lus à 3 et 7 jours. Le milieu Difco est mis à 30°C, le R8 à 52°C, et sont lus à 7 jours. Les milieux Müller-Hinton et Drigalski sont incubés à 30°C, Slanetz à 42°C, ces 3 milieux sont lus après 2 jours.

b) *Examen direct de la poussière sédimentée sur lame*

Les lames sont extraites du godet en plastique sous hotte et colorées par quatre goutte d'un mélange fuschine /gélatine (composé par 50 gr de gélatine, 150ml de glycérine, 7g de phénol pour 400 mL d'eau stérile). Une lame couvre objet est déposée pour la lecture sous microscope. Le montage est lu sous le microscope à l'objectif x40.

B) La poussière dans l'air

a) *Par aspiration sur filtre téflon*

L'analyse du filtre téflon à été réalisée selon le protocole suivant : mise en suspension du matériel déposé sur le filtre par rinçage de la cassette et du filtre avec 6 mL d'une solution de Tween® 80 dilué à 0,1% dans du sérum physiologique, et brassage de la cassette au vortex pendant 30 secondes. Les étapes suivantes sont : l'ouverture de la cassette, le transfert du filtre et de la solution dans un sac stérile pour appareil Stomacher® (AES laboratoire, Combourg, France), rinçage à la pipette Pastette de la cassette avec 4 mL de la solution de Tween, transfert du liquide dans ce sac, brassage au Stomacher® pendant 10 minutes, rinçage des deux faces du filtre et transfert du liquide de lavage dans un tube stérile. Sur chaque boîte de Pétri, un volume de 250 µL de cette solution pur a été déposé à l'aide d'une micropipette et ensemencé par étalement sur les différents milieux cités ci-dessus.

b) *Par impaction sur membrane plastique*

On dépose deux gouttes de solution colorée à la Fuchsine sur une lame de verre pour examen au microscope optique. La membrane plastique est transférée de la cassette sur une lame de verre avec trois gouttes de cette solution. Un lamelle de verre est posée à la surface pour l'observation au microscope. Après avoir laissé solidifier à température ambiante, le montage est lu sous le microscope à l'objectif X40. L'identification et le dénombrement des pollens et spores d'origine fongique se fait à chaque champ lu. La méthode de lecture consiste à lire le champ central du filtre, identifié à l'objectif X10. Depuis le centre du filtre, 5 champs consécutifs sont lus diamétralement de chaque coté du champ central. La surface lue sur le filtre est de 5,28 mm².

C) Le foin et les substrats d'alimentation

Les analyses ont été réalisées selon le protocole suivant : prélèvement sous hotte de 5 grammes de foin, transfert dans un sac stérile pour Stomacher® (contrôle du poids avec la balance électronique), brassage pendant 6 minutes par l'appareil Stomacher® avec 80 ml de Tween® à 0,1 % et transfert du liquide de rinçage dans un tube stérile. Le liquide est ensemencé pur et dilué à 10⁻¹ pour les milieux Malt et DG18, pour Difco et R8 pur, pour Müller-Hinton à 10⁻³ et 10⁻², et 10⁻¹ pour Drigalski. L'ensemencement se fait par l'étalement par la technique du râteau de 100 µL d'inoculum mesuré à la micropipette sur chaque boîte de pétri.

D) Les lingettes

Pour l'analyse des lingettes, 100mL de Tween 20 à 0,1% additionné de poudre de lait à 0,5% (préparé extemporanément) sont ajoutés dans le sac. Celui-ci est passé au Stomacher® 1min. L'ensemble des milieux sont ensemencés par l'étalement par la technique du râteau de 250 µL de liquide pur et dilué à 10⁻¹ mesuré à la micropipette.

E) Le lait

Le lait estensemencé pur pour les milieux Malt, DG18, Difco et R8. Les autres milieux (Müller-Hinton, Drigalski et Slanetz) sontensemencés pur et à 10^{-1} . L'analyse se fait par l'étalement par la technique du râteau de 250 μ L sur les boîtes, mesuré à la micropipette.

4.2.5 Exploitation des résultats

Un questionnaire descriptif sur les pratiques agricoles a été rempli lors de la première visite des fermes. Pour définir par autoévaluation la qualité du fourrage, les conditions de récolte, la propreté du bétail, une échelle de 5 catégories a été proposée par l'INRA (1 = très mauvaise, 2 = mauvaise, 3 = moyenne, 4 = bonne et 5 = très bonne). La saisie des données a été faite avec le logiciel Excel® (Microsoft, USA). Le logiciel STATA SE 9.0 (College Station, Texas 77845 USA) a été utilisé pour les analyses statistiques. L'utilisation du logiciel End Note® a permis la constitution d'une base de références à partir de Pubmed pour la synthèse bibliographique. Pour les analyses au laboratoire, le dénombrement des colonies a été exprimé en Unité Formant Colonie soit par mètre cube pour l'air (UFC/m³) ou soit par gramme (UFC/gr) pour les poussières et fourrages.

5 Résultats

5.1 Revue des techniques disponibles dans la littérature

5.1.1 La composition du bioaérosol des étables

La partie biologique de l'atmosphère des étables est appelée bioaérosol. Le bioaérosol a été défini par l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH, 1989) comme l'ensemble des particules aériennes, des molécules et des composés volatiles qui proviennent des organismes vivants. Cette définition regroupe les bactéries, les virus, les champignons (moisissures et levures), les protozoaires et les molécules biologiquement actives qui peuvent être des toxines ou des antigènes. Ces éléments ont des diamètres aérodynamiques qui varient de 0,1 à 100 μm . Les concentrations retrouvées dans l'air de ces composés volatiles ou aéroportés sont dépendantes de la quantité émise à la source, du mode d'émission, du mode de dispersion et de leurs caractères (taille, vitesse de sédimentation, liaison avec des agrégats, condition de croissance ou de prolifération, provenance d'un substrat particulier ...) et de l'environnement (émission intérieure ou extérieure, hygrométrie, ventilation ...). La quantité déposée dans l'arbre respiratoire des différents éléments du bioaérosol dépend de leur taille et de leur concentration.

Les caractéristiques de taille des particules retrouvées dans l'environnement agricole sont reportées dans le Tableau III (p.19). Les particules inhalées comme les spores et les fragments peuvent être fractionnées et donc de plus petites tailles [44]. Le Tableau IV (p. 19) présente les concentrations des bioaérosols mesurées en milieu extérieur et agricole. Il est issu du guide québécois de l'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et Sécurité du Travail (IRSST). Pour l'évaluation de l'environnement trois éléments sont à prendre en compte : les sources d'émission et de prolifération, le mode de dispersion et le mode d'exposition de la population étudiée.

5.1.2 Les techniques d'échantillonnage

A) Echantillonneur fixe

Dans les premières années du 20^{ème} siècle, Lioy décrit une technique originale de collecte des poussières de l'air ambiant. Les particules sont recueillies dans des seaux d'eau placés dans des endroits sécurisés (sur les toits...) et pour obtenir une déposition naturelle les seaux sont laissés en place pendant un mois. Cependant les résultats semi-quantitatifs étant difficile à interpréter, cette technique a été laissée à l'abandon [45].

A l'heure actuelle l'échantillonnage fixe est la technique d'échantillonnage la plus simple et la moins onéreuse. Il existe de nombreux exemples d'utilisation dans la littérature scientifique. Le principe est d'exposer une surface donnée pendant un temps fixe à la sédimentation des particules contenues dans l'environnement. On peut citer comme technique de sédimentation l'exposition de boîtes de Pétri avec ou sans gélose stérile qui recouvre le fond [46], et l'exposition de récipients en polyéthylène non électrostatique sur lesquels étaient déposés des lames de verre de sédimentation [31]. Dans cette dernière étude, la quantité de poussière sédimentée dans un domicile varie de 0,22 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{jour}$ déposées en été à 37 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{jour}$ en hiver. Des dispositifs en carton comme des boîtes à pizza avec une feuille d'aluminium au fond ont permis l'échantillonnage de la poussière pour d'autres études de grandes tailles. Mais la cellulose constituant ces boîtes peut-être utilisées lors de la croissance de certains micro-organismes fongiques contribuant à un biais de mesure.

Il est possible de remplacer les surfaces lisses par des tissus. Le principe repose sur l'utilisation passive d'une lingette électrostatique servant habituellement à enlever la poussière dans le milieu domestique. Depuis quelques années déjà, cette technique est utilisée dans le cadre de recherche sur la contamination des enfants, notamment, par des substances volatiles comme les pesticides ou le plomb (vapeur ou microparticules). En effet, ces éléments se retrouvent dans les poussières des sols, murs, rebords de fenêtre et sont facilement récupérables au moyen de lingettes électrostatiques. Les lingettes peuvent être remplacées par un morceau de papier toilette imbibé d'alcool comme dans une étude de Vostal [47].

Dans une étude australienne en 2003, les allergènes des acariens (DERp 1) ont été échantillonnés sur une membrane PVDF (PolyVinylidène DiFluorure est un fluoropolymère thermoplastique non-réactif) dans une pochette cartonnée déposée dans la chambre. Cette technique a montré une bonne corrélation avec la poussière sédimentée sur boîte de Pétri posée en parallèle [46]. Par ailleurs, l'Institut des Sciences de l'Évaluation du Risque d'Utrecht au Pays-Bas poursuit l'élaboration d'un protocole de recueil de poussières au moyen de lingettes électrostatiques stérilisées pour l'échantillonnage des micro-organismes de l'environnement.

B) L'air échantillonné par impaction

Cette technique utilisée avec un impacteur Andersen est la technique de référence pour mesurer les biocontaminants cultivables en aérobiologie. Mais cet appareillage est désuet et peu utilisé du fait de son poids trop important. La réalisation des prélèvements d'air nécessite un appareil spécifique comme l'impacteur MAS 100[®] (Merk, Germany). Les caractéristiques techniques sont disponibles en annexe (protocole : MAS 100).

Les milieux de culture sont des boîtes de pétri contenant différents substrats gélosés. Ils permettent une culture sélective des espèces. Les milieux gélosés choisis sont placés dans l'appareil et un flux d'air aspiré impacte les particules sur la surface du milieu de culture. L'appareil permet de choisir le volume d'air échantillonné, le temps de d'échantillonnage et le débit. L'unité de mesure est le nombre de colonies comptées sur le milieu par m³ d'air aspiré. Cet appareil permet une large gamme de débits offrant des volumes d'air aspirés importants. L'encombrement et la fragilité de ce type d'appareil le réservent à des situations d'investigation ponctuelle avec de faibles concentrations de micro-organismes (surveillance aérobiologie d'un hôpital ou enquête sur la contamination de l'environnement intérieur d'un domicile par exemple).

Pour l'échantillonnage qualitatif et quantitatif des spores fongiques, la méthode la plus répandue est celle de Hirst. Le principe du piégeage des particules fongiques et polliniques repose sur une girouette tournante (un rotor) qui aspire d'un volume d'air donné et projette ensuite les grains de pollen et spores sur une surface qui sera analysée ultérieurement au microscope (appareils Burkard et de Lanzoni).

C) L'air échantillonné par pompage sur filtre

Le principe est le pompage d'un volume d'air à travers un filtre qui retient les particules du bioaérosol. Le système de pompage est une pompe généralement de faible encombrement. Le filtre est placé dans une cassette en PVC. Les filtres les plus courants sont les filtres téflon, en esther de cellulose et en fibre de verre. Les filtres peuvent être fabriqués dans une grande variété de matériaux et présenter une large gamme de tailles de pores. Le transport d'un filtre est facile et est effectué dans une cassette plastique fermée mettant à l'abri le prélèvement d'une contamination extérieure. Cette technique est particulièrement adaptée, dans le milieu du travail, à l'étude de l'exposition aux fibres minérales, comme l'amiante. Le filtre en fibre de verre est en matière inerte, résistant aux agressions extérieures et moins hydrophobe que le filtre téflon. Il est utilisé en médecine du travail pour les mesures d'endotoxines.

Lors d'expérience de comparaison en parallèle entre l'impacteur MAS 100 et le pompage sur filtre, à volume de pompage équivalent, le rendement pour le recueil des bactéries totales était assez proche (données du laboratoire non publiées) pour une mise en culture immédiate.

5.1.3 Poussière échantillonnée par prélèvement de surface

A) Prélèvement à l'aide d'un aspirateur

Communément appelée "High Volume Surface Sampler" ou HV3S cette technique est couramment utilisée dans l'étude des expositions à des particules nocives dans le cadre d'analyse de risque. Le principe est la pose à l'entrée du tuyau d'aspirateur d'un filtre retenant les particules du flux d'air qui le traverse.

Les quantités de poussières obtenues grâce à cette méthode sont relativement importantes suivant le type d'aspirateur (jusqu'à 63g/m²). Cette méthode d'échantillonnage est utilisée pour recueillir de la poussière dans des études de taille importante. Mais il faut tenir compte du diamètre des particules à recueillir lors du choix des filtres. Le recueil peut se faire sur des filtres [48] [49] ou des chaussettes en nylon [50]. Les analyses microbiologiques des poussières recueillies sont nombreuses (dosage d'endotoxines, cultures ...). Cette méthode peut servir au recueil des allergènes de l'environnement intérieur [51].

Néanmoins ce type de prélèvement est affecté par l'humidité ambiante et ne contient pas que de la poussière mais aussi toutes sortes de particules (miettes, insectes, cheveux...) pouvant avoir une influence sur les analyses microbiologiques. Les microorganismes viables comme certaines espèces bactériennes sont sensibles à la dessiccation sous le flux d'air important généré par l'aspiration. Cette méthode n'est donc pas adaptée pour analyse d'un spectre large d'espèce bactérienne.

B) Prélèvement à l'aide de lingettes

Cette technique est apparue dans les années 70 on trouve des publications relatives à ce sujet, mais peu de résultats suite à leur utilisation. Cependant, cette technique a été utilisée par plusieurs équipes de recherche. Liroy publie notamment les résultats obtenus pour des prélèvements effectués au moyen de lingettes sur le sol et sur des rebords de fenêtre [45, 46]. Cette méthode est utilisée pour connaître la contamination des surfaces particulièrement en hygiène hospitalière. Elle nécessite cependant une standardisation dans le choix de la taille de la surface à échantillonner, de la nature de l'échantillon et du solvant utilisé.

Tableau III : Taille des principaux éléments retrouvés dans l'air des étables

Pollens	10 – 100 µm
Spores fongiques	2 – 100 µm
Pesticides	0,5 – 10 µm
Particules de diesel	0,2 µm environ
Fumée de cigarettes	0,01 – 0,3 µm

Source : [40]

Tableau IV : Concentrations des bioaérosols mesurées dans l'air en milieu extérieur et agricole (en UFC/m³)

Milieu	Bactéries	Bactéries Gram négatives	Actinomycètes thermophiles	Moisissures
Extérieur	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ³
Agriculture normale	10 ⁷	10 ³	10 ³	10 ³⁻⁴
Agriculture (foins moisiss)	10 ⁹	10 ³	10 ⁹	10 ⁹

Source : [52]

Tableau V: Etat des étables avant la traite

Substrat donné avant la traite	Fréquence	Numéro de ferme
Foin seul	1	6
Foin + regain + farine	1	13
Paille + foin + regain + céréales	1	7
Paille foin + regain + farine	1	8
Paille + foin + regain	1	15
Foin + regain	2	3 et 4
Paille seule	4	1, 2, 9,16
Rien	5	5, 10, 11,12 et 14

5.2 Résultats

5.2.1 Caractéristiques des exploitations agricoles

L'étude porte sur 16 fermes d'Appellation d'Origine Contrôlée Comté de la région Franche-Comté dans le nord-est de la France. L'organisation de ces fermes présente deux types d'architectures : la première avec le bétail entravé et un couloir d'alimentation central (n=7) et la seconde avec le bétail maintenu en stabulation et un couloir d'alimentation en général latéral (n=9).

Le nombre d'exploitants par ferme est compris entre 1 et 3. Les fermes dont le bétail est entravé utilisent un système de traite avec un pipeline et le bétail ne se déplace pas dans l'étable durant l'hivernage. Les exploitations agricoles avec une stabulation possèdent une salle de traite séparée, où le bétail est amené pour la traite matin et soir. Les fermes de type entravé ont un quota laitier moyen de 180 873 kilogrammes pour 33 vaches en moyenne. Les fermes avec une stabulation ont un quota laitier moyen de 269 486 kilogrammes avec un nombre de vache moyen de 42.

Onze exploitants utilisent un système de conditionnement du foin en balle ronde lors de la fenaison et 5 un foin en vrac avec un séchage en grange pour 4 d'entre-elles. Seize échantillons de foin du jour ont été recueillis. Les conditions de récoltes ont été bonnes à très bonnes pour l'ensemble du fourrage d'après le questionnaire. Quinze exploitations ont utilisé du regain, de qualité moyenne à très bonne, comme alimentation complémentaire. Quinze exploitations distribuent du foin et du regain matin et soir pour l'alimentation du bétail. Deux exploitations procèdent à une distribution de foin le matin et de regain le soir.

L'échantillon de foin moyen, qui rassemble l'alimentation utilisée pendant les 20 jours précédant la seconde visite, est composé soit uniquement de foin (n=6) soit de foin et de regain (n=10). La qualité du fourrage est classée comme étant bonne pour l'ensemble des prélèvements sauf pour la ferme N° 5 où il est de qualité moyenne.

Les autres aliments utilisés pour l'alimentation du bétail dans le bâtiment agricole pouvant être la source d'une aérocontamination sont les céréales brutes (n=9) ou sous forme de farine (n=15), la betterave (n=3, ferme N° 3 (moisi), 11 et 14), la luzerne (n=2, ferme N° 1 et 2) et des tourteaux de soja (n=1, ferme 6). Les compléments alimentaires peuvent être donnés le matin et/ou le soir avant ou après la traite suivant les habitudes de chaque exploitant. La synthèse des substrats manipulés avant la traite est rapportée dans le Tableau V p.19. On note que les fermes N° 12 et 14 distribuent la farine pendant la traite. Le fumier a été mobilisé suivant différents modes avant la traite pour 14 exploitations (soit un simple raclage, un raclage et paillage ou un brassage du lisier). Seules les exploitations N° 5, 9 et 16 opèrent à un nettoyage du fumier après la traite.

Les 16 échantillons de paille ont été recueillis, celle-ci sert pour la litière des animaux. Elle est soit produite uniquement par l'exploitant (n=3), soit produite et un complément est acheté (n=7) ou uniquement achetée en dehors de l'exploitation (n=6). La paille est conditionnée en balle ronde ou carré de haute densité. La qualité est considérée comme bonne à excellente pour 15 échantillons et, moyenne pour la ferme N°11. Toutes les exploitations utilisent la paille comme litière avec une fréquence de renouvellement manuel bihebdomadaire (ferme N° 2 et 13), mécanique bijournalier (matin et soir, ferme N° 11 et 15) et manuel bijournalier pour l'ensemble des autres exploitations. Les quantités de paille distribuées sont très variables suivant les exploitations : de 0,2 à 9 kg par jour par vache laitière.

La poussière sédimentée a été recueillie dans des boîtes plastiques compartimentées et non compartimentées fixées dans la partie centrale du bâtiment entre 1 et 1,5 mètres du sol et exposées pendant une durée de 30 jours. La poussière sédimentée échantillonnée par raclage à la spatule d'une surface plane provient de différents supports (cornadis en métal, poutre en métal ou rebord en béton). Les sources d'émission de poussières macroscopiques identifiées par les agriculteurs sont les suivantes : manipulations de foin, de regain et production par broyage de la farine à partir de céréales. Le paillage peut être une source de poussières en particulier lors du paillage mécanique (projection mécanique de la paille à plusieurs mètres sur les aires de stabulation)

Lors de la première visite effectuée par les agents de la chambre d'Agriculture de Franche-Comté, un état général de propreté du bétail est rapporté. Celui-ci est globalement bon, cependant on note pour les fermes N° 1, 5, 6 et 7 un indice de propreté du bétail et des mamelles, avant traite, cotée mauvaise sur l'échelle de l'INRA.

La traite est effectuée selon deux modes, soit en salle de traite, soit sans déplacement de la vache directement dans l'étable. Le lait est alors transféré dans le tank à lait par un système d'aspiration appelé pipeline. Les modes de nettoyage des trayons des vaches laitières sont variables. Les exploitants utilisent, pour le nettoyage des trayons avant la traite des lavettes (avec de l'eau douce (n=2) et/ou des produits antiseptiques et/ou du savon). Trois lavages ont lieu seulement avec du savon. Trois exploitants traitent sans nettoyage préalable mais essuient les pis de leurs vaches avec de la paille. Le matériel de traite est en bon état dans l'ensemble des exploitations. Les affections dermatologiques des personnes procédant à la traite sont rapporté dans 4 cas : 3 présentent des crevasses en particulier pendant la saison hivernale et un eczéma en lien avec les produits utilisés pour le nettoyage du trayon. La prise d'air extérieur lors de l'application de la griffe à traite sur le trayon est faible sauf pour les exploitations N° 1, 5 et 10. Les tuyaux transportant le lait sont nettoyés chaque jour, en général avec une alternance d'acide et de base un jour sur deux pour 15 fermes. Deux fermes n'utilisent que de l'acide (exploitation N° 10 et 16). L'état de propreté de l'installation est relevé comme bon à excellent dans 12 exploitations sur 14.

La traite est journalière et les échantillons de lait ont été prélevés au niveau du tank à lait avant le transfert à la fromagerie. Il constitue un pool du lait produit par l'ensemble du troupeau ayant participé à la traite. Il existe deux fourchettes de conservation de température du lait : la première entre 3.5 et 4.5 °C (ferme N° 3, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14 et 15) et la seconde entre 10.3 et 12 °C (ferme N° 2, 5, 7, 8 et 16).

5.2.2 Résultats des prélèvements environnementaux

Les résultats sont montrés sur des Histogramme 1 (p.24) en barre représentant des moyennes calculées sur des échantillons variant entre 4 et 16 fermes. Les graphiques sont commentés dans les cadres adjacents aux figures. Les valeurs numériques sont reportées dans le Tableau VI (p.23) pour les espèces fongiques, les actinomycètes et les bactéries.

Les analyses biomoléculaires sur l'identification des différentes espèces sont en cours. La plus forte diversité d'espèces est retrouvée dans la poussière avec 40 espèces reconnues, puis sur les lingettes des trayons avec 35 espèces et enfin le lait avec 34. Les prélèvements d'air contiennent de 20 à 25 espèces différentes. À titre de comparaison, dans l'environnement intérieur seulement 9 espèces sont comptabilisées. Ces résultats seront complétés car font l'objet d'un travail de thèse au sein du laboratoire.

Les lectures de pollen et spores sédimentés sur lame n'ont pas tous été réalisées car les lames étaient saturées en poussières après 15 jours de pose. De ce fait nous ne pouvons présenter de résultats polliniques et nous n'en tiendrons pas compte dans la modélisation des flux de microorganismes.

5.2.3 Flux de microorganismes dans les étables

Les flux des micro-organismes au sein des exploitations agricoles de cette étude sont synthétisés dans la Figure 1 (p.27)

5.2.4 Organigramme des techniques d'échantillonnage

Nous présentons dans cet organigramme les différentes techniques de prélèvements disponibles. Les techniques utilisées par le laboratoire sont en bleu, les techniques retrouvées dans la littérature sont en rouge. Cette présentation d'ensemble permet de faire la synthèse des différentes techniques citées dans ce travail. (Voir Figure 2 p.28)

5.2.5 Synthèse des performances analytiques des caractéristiques logistiques et économiques et des techniques utilisées.

Pour comparer les différentes méthodes d'échantillonnage sur le plan quantitatif et qualitatif, des contraintes logistiques, de coût économique, de moyen humain, des temps d'exposition, des méthodes de conservation, des différentes méthodes d'échantillonnage sur le plan, nous avons rédigé un tableau de synthèse Tableau VII.

Tableau VI: résultats des techniques d'analyses sur différents substrats des étables

	Foin du jour (n=16)			Foin mélangé (n=16)			Paille mélangée (n=5)			Farine (n=5)			Tourteaux (n=4)		
	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd
<i>Absidia corymbifera</i>	10	4 866	17 026	10	4 866	17 026	3	3 006	4 276	3	324	535	2	373	627
<i>Wallemia sebi</i>	10	385 123	797 914	10	385 123	797 914	2	80 261	168 810	2	2 080	4 526	3	3 293	6 407
<i>Eurotium amstelodami</i>	16	210 728	552 206	16	210 728	552 206	5	119 942	216 332	5	13 337	9 960	4	2 116	1 769
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	186	405	5	186	405	1	520	1 164	0	0	0	1	166	331
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	410	868	8	1 973	3 731	1	76 372	170 774	2	1 311	2 870	1	1 958	3 915
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2	410	1 561	5	977	2 008	0	0	0	2	115	199	0	0	0
<i>Aspergillus candidus</i>	1	127	509	0	0	0	1	382	854	5	2 014	1 448	3	1 349	2 172
<i>Acremonium spp.</i>	3	1 494	4 394	0	0	0	2	117 770	259 093	3	2 214	2 638	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	2 295	5 248	6	2 295	5 248	5	20 689	30 073	3	1 711	1 942	2	264	332
<i>Penicillium spp.</i>	14	12 837	29 120	14	12 837	29 120	5	19 157	16 960	5	4 983	4 531	4	4 770	2 999
Total des moisissures	16	641 117	1 019 170	16	641 117	1 019 170	5	480 676	427 304	5	33 985	14 122	4	15 881	11 613
Levures blanches	10	14 273	40 844	10	14 273	40 844	5	103 309	66 784	5	14 897	22 966	2	36 975	73 132
Levures rouges	8	14 273	40 844	8	1 326	2 519	5	69 691	49 489	5	3 039	3 562	1	153	307
Streptomyces mésophiles	16	31 899	109 059	16	21 045	47 321	4	82 715	94 238	4	573	516	4	3 104	5 305
Autres actinomycètes	15	3 047	3 576	15	6 790	6 973	5	7 712	13 996	4	488	541	3	1 534	2 936
Total des bacteries	16	776 500	966 891	16	776 500	966 891	5	497 120	261 886	3	103 200	131 791			

	Air avant travail (n=16)			Air après travail (n=16)			Air salle de traite (n=8)			Lingette du trayon (n=8)			Lait (n=16)		
	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd
<i>Absidia corymbifera</i>	5	747	1 983	8	789	1 117	4	830	1 164	13	250	359	1	0	1
<i>Wallemia sebi</i>	8	8 798	16 841	11	28 801	69 107	6	3 237	4 161	9	388	918	2	3	14
<i>Eurotium amstelodami</i>	15	17 140	25 687	15	44 405	62 979	8	13 529	12 473	16	1 596	2 310	10	7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	540	1 376	5	623	1 013	4	4 565	11 590	7	168	450	1	1	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	4	3 113	11 231	5	1 785	3 643	3	664	1 065	8	155	443	0	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	1 079	4 316	3	2 200	7 941	2	1 245	3 261	2	14	45	0	0	0
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	0	2	249	836	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium spp.</i>	1	498	1 992	1	83	332	0	0	0	2	25	68	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7	1 494	2 537	10	5 727	7 358	4	4 150	10 676	12	144	208	1	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	12	3 528	4 637	12	7 014	11 092	5	7 055	12 057	13	2 310	5 988	10	34	0
Total des moisissures	16	41 998	44 468	16	104 871	110 496	8	38 097	30 628	16	5 434	6 821	14	48	1
Levures blanches	9	1 743	2 752	5	581	1 369	1	83	235	14	1 608	2 799	14	82	1
Levures rouges	6	332	484	4	373	803	0	0	0	7	26	49	1	1	4
Streptomyces mésophiles	14	24 278	52 057	14	78 726	107 824	8	15 023	19 856	15	2 364	2 987	9	5	8
Autres actinomycètes	7	913	1 587	7	15 687	47 639	5	3 735	6 767	3	1 198	2 614	3	2	5
Total des bacteries	16	1 323 435	4 959 702	16	1 315 094	3 586 798	9	89 788	45 081	16	299 650	163 829	16	12 450	17 891

	Poussière (1) boîte compartimentée (n=16)			Poussière (2) boîte compartimentée (n=14)			Poussière (1) spatule (n=16)			Poussière (2) spatule (n=16)			éch. : échantillon contrôlé positif sd : écart type
	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	éch.	moyenne	sd	
<i>Absidia corymbifera</i>	16	2 025 832	1 984 089	13	1 151 799	918 488	14	2 749 410	4 613 940	11	784 633	770 753	
<i>Wallemia sebi</i>	9	5 230 092	13 700 000	6	1 529 422	3 098 699	8	4 287 350	10 800 000	3	197 160	433 364	
<i>Eurotium amstelodami</i>	16	9 937 979	10 100 000	14	10 600 000	14 900 000	16	6 024 481	3 949 662	14	8 085 989	8 033 348	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13	639 531	791 956	12	822 328	1 370 374	12	1 633 727	5 572 526	8	606 451	1 061 223	
<i>Aspergillus versicolor</i>	3	125 267	316 916	11	711 182	730 565	7	258 830	425 093	8	661 248	1 930 515	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	4	126 500	318 789	5	66 414	98 517	3	140 936	495 068	3	85 057	229 357	
<i>Aspergillus candidus</i>	2	107 545	415 984	1	4 464	16 704	1	73 965	295 858	1	3 509	13 590	
<i>Acremonium spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	43 011	166 580	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	633 937	895 725	1	13 825	51 728	8	2 054 270	3 170 161	0	0	0	
<i>Penicillium spp.</i>	13	2 055 134	4 456 948	9	1 487 680	3 050 631	13	2 932 284	8 937 308	10	534 493	598 189	
Total des moisissures	16	23 200 000	17 300 000	14	19 100 000	19 700 000	16	23 600 000	19 000 000	15	12 100 000	9 563 583	
Levures blanches	4	186 614	451 252	1	4 608	17 243	8	885 659	1 334 446	0	0	0	
Levures rouges	3	45 515	136 054	0	0	0	6	72 677	162 194	0	0	0	
Streptomyces mésophiles	16	7 144 996	7 500 774	13	3 300 051	4 001 885	15	9 370 638	13 900 000	14	4 764 219	4 817 039	
Autres actinomycètes	16	1 111 211	1 914 638	14	1 063 563	904 981	16	2 041 176	4 087 119	15	734 237	791 571	
Total des bacteries	11	10 900 000	13 700 000	14	2 439 668	2 782 283	16	47 700 000	65 600 000	15	7 829 580	8 651 637	

Histogramme 1: Résultats fongiques et bactériens des substrats alimentaires

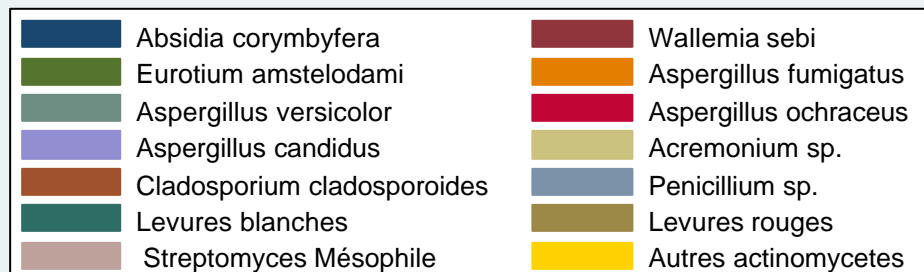


On remarque que la composition microbienne des deux foin est pratiquement la même, il s'agit principalement de deux champignons : *Eurotium amstelodami* et *Walleimia sebi*, on trouve également des actinomycètes. Cette distribution correspond relativement bien à celle de l'air.

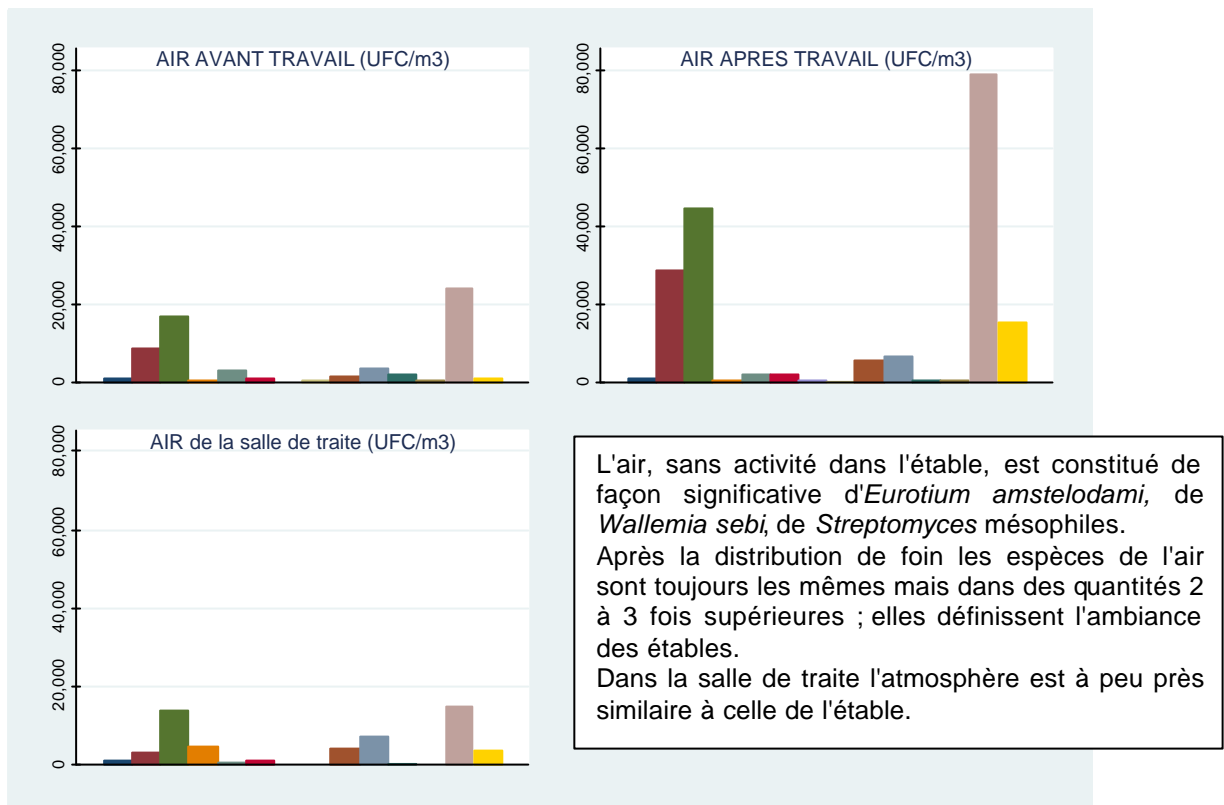
La paille présente un profil microbiologique plus varié. Si on approfondi l'analyse, on distingue que les quantités obtenues pour certaines espèces sont des exceptions dues à des pics dans une ou deux fermes (*Acremonium sp.* et *Aspergillus versicolor*). Finalement les espèces caractéristiques de la paille sont *Eurotium amstelodami*, *Penicillium sp.* et les levures blanches et rouges. On retrouve l'ensemble de ces espèces dans le lait à l'exception des levures rouges.

La farine et les tourteaux ne sont pas très riches en microorganismes du fait de leur transformation et conditionnement préalable (haute température de fabrication industrielle).

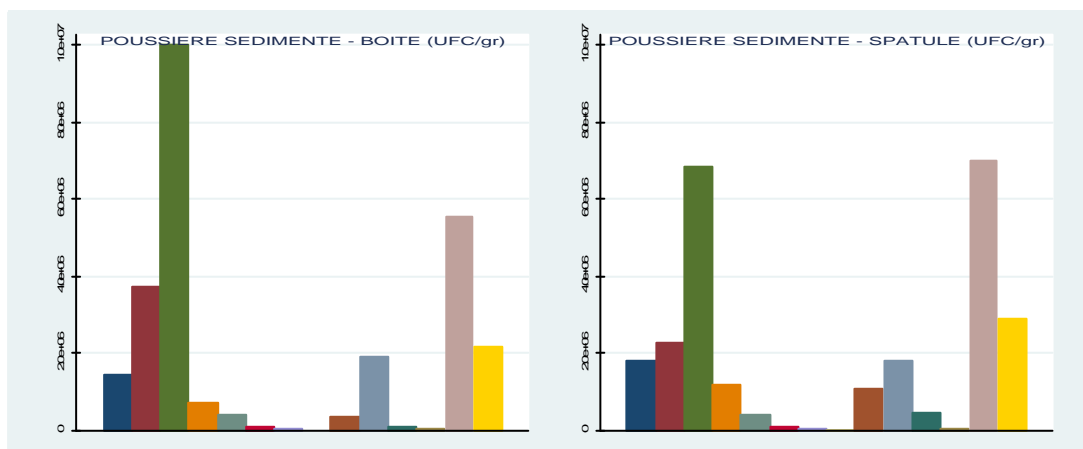
On remarque seulement quelques levures blanches.



Histogramme 2 : Résultats fongiques et bactériens de l'air des étables














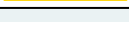


Histogramme 3: Résultats fongiques et bactériens des poussières

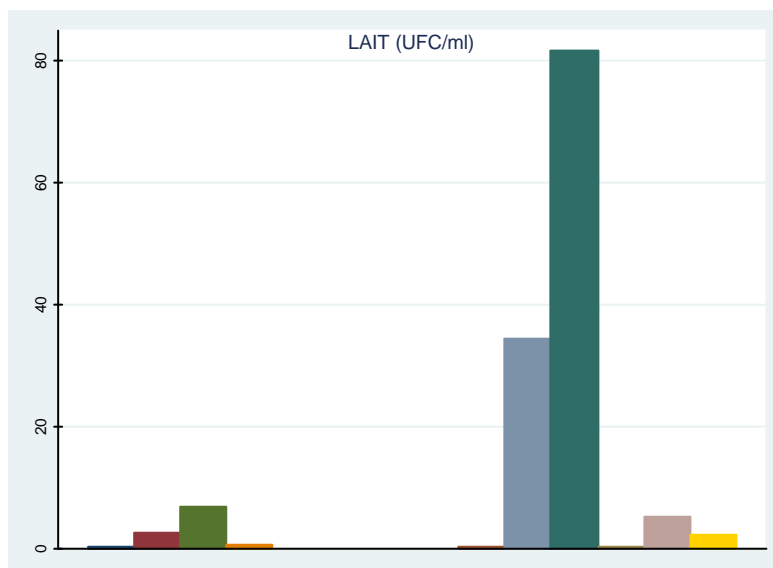
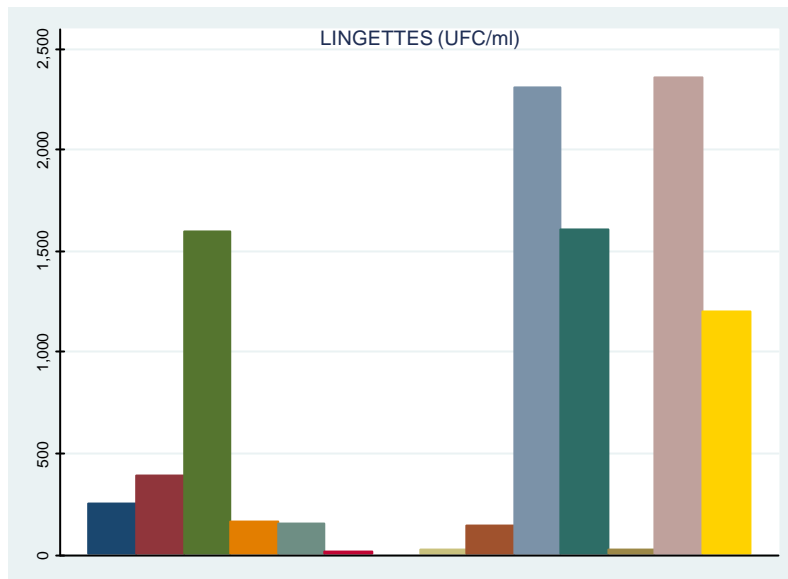


Les poussières sédimentées et prélevées à la spatule ont quasiment le même profil fongique et bactérien, dans des proportions proches. On retrouve bien les éléments présents dans l'air comme *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi* et des *Streptomyces* mésophiles. On retrouve aussi *Aspergillus fumigatus*, dans l'air des étables et sur les lingettes, également *Penicillium sp.* qui est fortement présent dans les lingettes et le lait qui semble lié à la présence des vaches.















On peut donc dire que les poussières sont le reflet de l'air et des sources de contamination des étables.

	<i>Absidia corymbifera</i>		<i>Wallemia sebi</i>
	<i>Eurotium amstelodami</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>
	<i>Aspergillus candidus</i>		<i>Acremonium sp.</i>
	<i>Cladosporium cladosporoides</i>		<i>Penicillium sp.</i>
	Levures blanches		Levures rouges
	<i>Streptomyces Mésophile</i>		Autres actinomycetes

Histogramme 4 : Résultats fongiques et bactériens des lingettes et du lait



Les lingettes et le lait n'ont pas la même composition que l'air ambiant. Les levures et les *Penicillium sp.* sont les espèces les plus représentées. Il existe un bruit de fond provenant de l'air marqué par la présence d' *Eurotium amstelodami*, de *Wallemia sebi* et une forte quantité d'actinomycètes sur les lingettes.

 Absidia corymbifera	 Wallemia sebi
 Eurotium amstelodami	 Aspergillus fumigatus
 Aspergillus versicolor	 Aspergillus ochraceus
 Aspergillus candidus	 Acremonium sp.
 Cladosporium cladosporoides	 Penicillium sp.
 Levures blanches	 Levures rouges
 Streptomyces Mésophile	 Autres actinomycètes

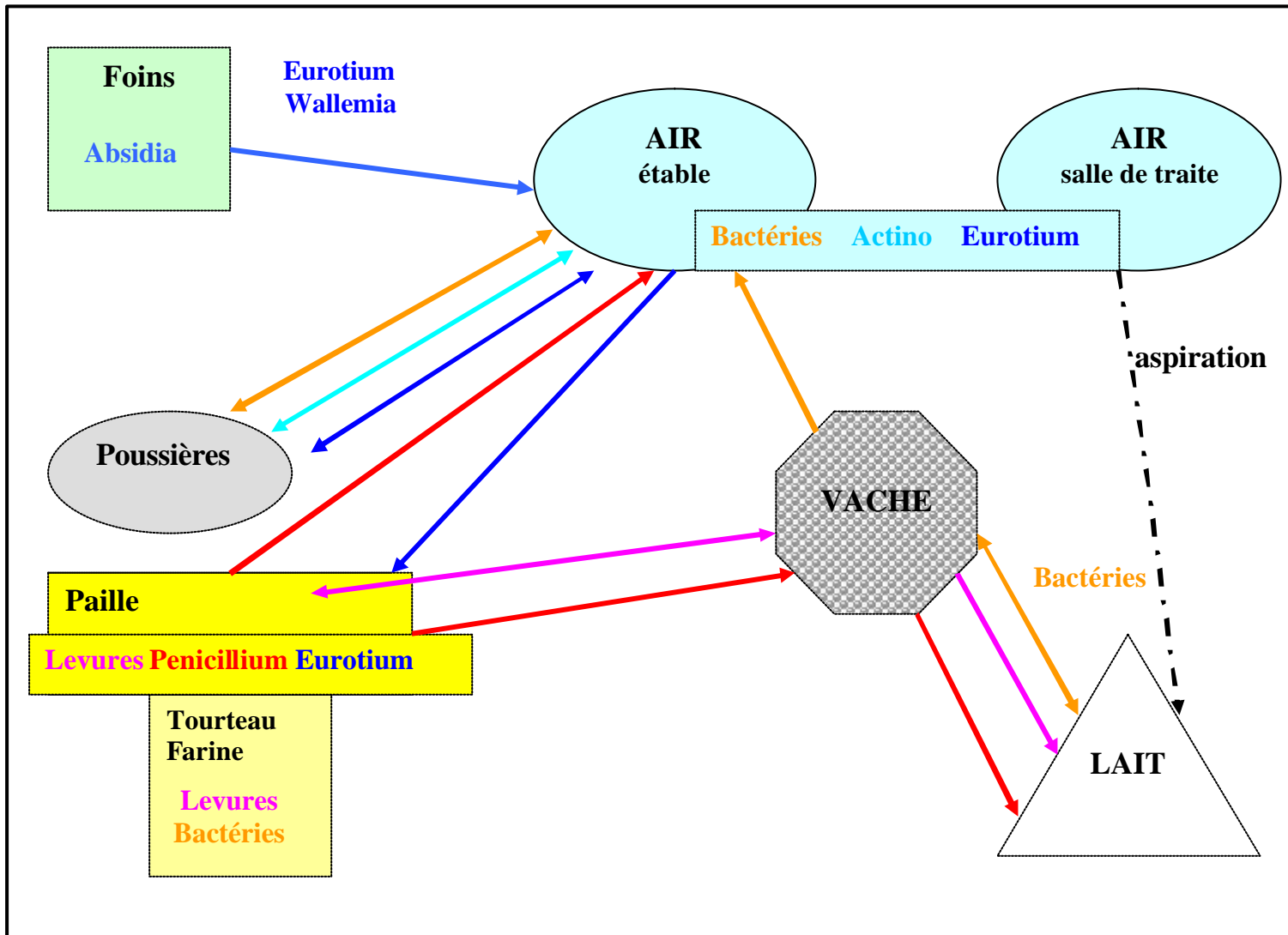


Figure 1 : Schéma des flux de microorganismes dans les étables.

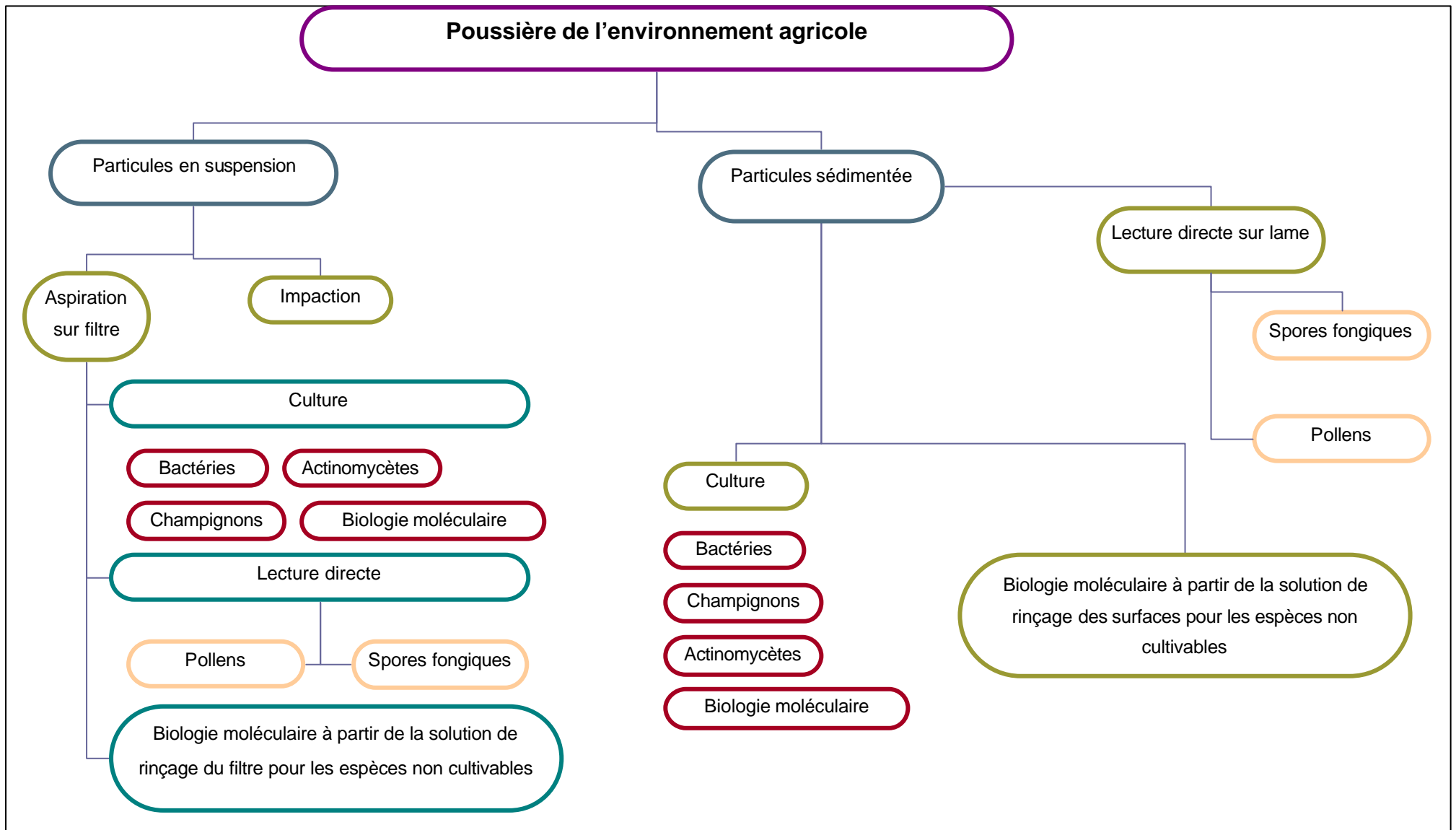


Figure 2 : Organigramme des techniques

Tableau VII : Résumé des caractéristiques des techniques

techniques		Appareil d'Andersen	Air MAS 100	Aspirateur + filtre	boîte en carton + feuille aluminium	Assiettes
méthode		impaction	impaction	aspiration	déposition	déposition
taille		encombrant	~ 80*40*40 cm	~ 40*50* 40 cm	moyenne ~ 50*50 cm	moyenne
coût		important	important	important	faible	faible
durée de pose		inférieure à 10 minutes	inférieure à 10 minutes	~ 20 minutes	suyvant environnement	suyvant environnement (environnement agricole : 0,37 µg/cm²/jour)
mesures du diamètre des particules		oui	non	non	non	non
réalisation		expert	expert	Non expert	auto-échantillonnage	auto-échantillonnage
type de microorganisme et quantité	Bactéries	oui	oui	oui	oui	oui
	Champignons	oui	oui	oui	oui	oui
	Actinomycètes	oui	oui	oui	oui	non
	Endotoxines	non	non	oui	oui	non
	EPS	non	non	non	oui	non
	Pollen	non	non	non	non	non
	dosage allergène	non	non	oui	oui	oui
analyse qualitative		oui	oui	oui		
analyse quantitative		oui	non	non		
logistique		difficile	compliquée	Matériel encombrant	facile	
envoi postal		non	non	oui		
conservation			Au congélateur mais aucun intérêt			non
délai d'analyse						Quelques jours
avantages		pas de limite basse pour bioaérosol	faible limite basse	sol, matelas	faible coût	faible coût
		distribution de la taille des particules		choix des pores du filtre	choix des pores du filtre	
limites		temps de pompage court en Env. fortement contaminé			utilisation de la cellulose par certains microorganismes. réaspiration possible après déposition (perte ?)	perte par remise en suspension
quantités prélevées			63g/m3	0,22 à 37 µg/cm2/jour	environnement agricole : 0,37 µg/cm²/jour Mauvaise viabilité des micororganismes	

techniques		recueil de surface	recueil de surface	Boîte plastique (grise)	Sédimentation lame	Sédimentation pochette
méthode		raclage à la spatule	lingettes, écouvillon, scotch	déposition	déposition	déposition
taille		faible	faible	faible	faible	pochette A4
coût		faible	faible	faible	faible	faible
durée de pose		aucune	aucune	suivant environnement	de 2 à 10 jours en étale	1 semaine
mesures du diamètres des particules		oui au microscope	non	oui	oui	non
réalisation		technicien	technicien	auto-échantillonnage	expert	autoéchantillonnage
type de microorganisme et quantité	Bactéries	oui	oui	oui	non	allergène (Der p 1)
	Champignons	oui	oui	oui	spores	oui
	Actinomycètes	oui	oui	oui	non	oui
	Endotoxines	oui	oui	oui	non	oui
	EPS	oui	oui	oui	non	oui
	Pollen	oui	oui	oui	oui	oui
	dosage allergène	oui	oui /non quantitatif	oui	non	oui
analyse qualitative		oui	oui	oui	oui	oui
analyse quantitative		non	non	oui	non	oui
logistique		facile	facile	facile	facile	facile
envoi postal		oui	oui	oui	oui	oui
conservation		oui congélation	oui congélation	oui congélation	oui	oui
délai d'analyse		long	long	long	long	long
avantages		simple et partout	simple et partout	simple et partout	simple et partout	simple et partout
limites		pas de standardisation possible	standardisation difficile	30 jours en environnement domestique	saturation rapide	standardisation # surface
Quantités prélevées			0,05-7,0 g/m ²	environnement agricole : 57 µg/cm ² /jour		

Env. : environnement

EPS : polysaccharide fongique

1-3 B glucan

6 Discussion

Le premier objectif de ce travail était la description des flux des micro-organismes dans l'atmosphère des étables à partir de l'étude d'ensemble de 16 fermes de la région Franche-comté. Cette étude était basée sur un ensemble de techniques d'échantillonnage de l'environnement intérieur de l'exploitation agricole portant sur des substrats variés (air, alimentation du bétail, poussières déposées, lingettes du trayon et lait). Le deuxième objectif était une réflexion sur la pertinence et les performances analytiques de ces techniques dans le cadre d'études à large échelle de l'environnement agricole à travers des études épidémiologiques sur l'allergie. Nous souhaitons évaluer en particulier les prélèvements de poussières sédimentées de l'environnement.

A partir de nos résultats, une description globale originale des flux microbiens dans l'étable a été possible. Il était nécessaire d'aborder cet environnement intérieur comme un système où l'on peut identifier des sources, des modes de dispersion et de transfert de contaminants biologiques. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence l'implication des différents substrats de l'alimentation dans l'ambiance des étables. Les principales sources sont le bétail, la paille et le foin. Ce dernier contient de grandes quantités d'espèce fongiques en particulier *Wallemia sebi*, *Eurotium amstelodami* et des *Streptomyces* mésophiles. Ce profil de contamination a été retrouvé en aval dans l'analyse de l'air des étables au repos. Nous avons aussi observé une forte augmentation de ces microorganismes retrouvés après la distribution de foin de l'alimentation lors du prélèvement d'air après session de travail. Le foin distribué lors de l'alimentation du bétail contribue donc en grande partie à la contamination aérobiologique de l'atmosphère des étables.

Toutefois l'approche systémique de la contamination des différentes sources apporte un éclairage complémentaire sur la composition de l'ambiance des étables. Par exemple, la paille présente un profil microbiologique différent de celui du foin. Les analyses ont mis en évidence une contamination par des espèces peu fréquentes dans le foin comme *Aspergillus versicolor*, ainsi que des levures blanches et rouges. Ces dernières sont rarement isolées dans les prélèvements d'air avant et après la distribution de l'alimentation et dans la salle de traite, peut-être parce qu'elles adhèrent plus à la paille que les spores de champignons. Par ailleurs, ces levures ont été identifiées sur les lingettes utilisées pour les prélèvements sur les trayons des vaches. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une grande proximité des animaux avec la paille. Par ailleurs, ce substrat, ainsi que le fumier produit par le bétail, contaminent à eux deux la litière des animaux.

Pour compléter la description des flux microbiologiques, l'analyse du lait en aval révèle deux composantes. La première correspond à l'ambiance des étables essentiellement représentée par les espèces fongiques dépendantes du foin comme *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi* et les *Streptomyces* mésophiles. Ce flux de microorganismes est probablement aéroporté puisque retrouvé dans l'air des différentes analyses. La contamination du lait peut se faire soit lors de l'aspiration de l'air au moment de la pose de la machine à traire ou soit par contact avec le trayon, lui-même contaminé par l'air ambiant. La seconde composante est représentée par la présence de levures dans le lait qui ne sont pas retrouvées de façon abondante dans les prélèvements d'air. Cette contamination du lait est probablement liée à la présence des microorganismes sur le trayon mis en évidence par la contamination des lingettes. La contamination de la litière est double à la fois par le substrat qui la compose, ici la paille, mais aussi par le fumier produit par le bétail. Les trayons des vaches pourraient ainsi constituer un passage intermédiaire entre l'air et le lait.

Ces hypothèses sur la modélisation descriptive des flux sont limitées par le faible effectif de ce travail ne permettant pas d'obtenir une puissance statistique convenable au regard de la variabilité des prélèvements environnementaux d'une façon générale. De plus, de nombreuses analyses sont en cours de réalisation, telles que l'identification des bactéries

isolées sur milieu Müller-Hinton, ou la quantification des spores de champignons fixées sur lame. En tenant compte de ces limites méthodologiques, ce travail a permis de mettre en évidence le foin et la paille comme étant deux sources principales de microorganismes de l'environnement des étables avec des profils de contamination différents. Le rôle d'autres substrats comme la farine et les tourteaux sont probablement secondaires car ils sont d'une part distribués en quantité plus faible et d'autre part ils présentent une quantité de microorganismes moins importante que la paille et le foin. De façon complémentaire, pour avoir une vision globale des sources possibles, il serait nécessaire d'évaluer la contamination d'autres substrats alimentaires comme les granulés notamment et le lisier.

Le second objectif était l'évaluation des poussières sédimentées comme technique d'échantillonnage de l'environnement des étables. Deux techniques de prélèvements ont été réalisées : le recueil des poussières par une spatule sur des surfaces sèches et par des dispositifs fixes protégés par une grille. Les profils de contamination sont très proches tant au niveau de la nature des microorganismes que de leur concentration. L'analyse d'un point de vue qualitatif apporte des éléments intéressants. En effet, en dehors des levures, l'ensemble des micro-organismes du foin et de la paille est représenté au sein de la poussière sédimentée. Il faut aussi souligner la similitude avec les microorganismes identifiés dans l'air avant et après session de travail et dans la salle de traite. On peut donc considérer la poussière sédimentée comme un reflet acceptable de la contamination microbiologique des étables.

Il existe de nombreuses méthodes d'échantillonnage du bioaérosol des étables. La revue des techniques disponibles et les résultats des analyses conduisent à l'exclusion d'un certain nombre d'entre elles. L'utilisation de capteur fixe pour les pollens et les spores fongiques basée sur l'aspiration n'est pas réalisable sur une étude épidémiologique à grande échelle. Les impacteurs sur milieux gélosés présentent des contraintes logistiques importantes (transport des milieux de culture court, transport par voie postale non réalisable). De plus, ils ne sont pas adaptés aux environnements fortement contaminés par les microorganismes comme l'est l'atmosphère des étables. Pour ces différentes raisons, il n'est pas possible d'utiliser ce type de méthode de prélèvements. Le pompage sur filtre à partir de pompe portable pour la culture des microorganismes offre une possibilité intéressante de choix. Mais cette technique doit respecter un délai court entre le prélèvement et l'analyse au laboratoire pour éviter la perte d'une fraction importante des microorganismes bactériens sensible à la dessiccation. Dans ce cas, en dépit d'une simplicité d'utilisation, le délai d'un envoi postal ne permettrait qu'un isolement partiel de la communauté bactérienne. Le recueil des pollens et spores fongiques par impaction sur filtre ou par sédimentation est une alternative attractive. En effet, la lecture des prélèvements peut être différée. Cependant le spectre analytique est réduit à ces deux composantes du bioaérosol. De plus, l'exposition des lames de sédimentations doit être courte pour éviter une saturation délétère lors de la lecture directe. Les lingettes du trayon et les analyses de lait sont des techniques particulièrement intéressantes dans l'étude de la composition microbiologique du lait. Néanmoins, les analyses du lait cru doivent être réalisées très rapidement afin d'éviter les modifications de composition microbiologique.

La multiplicité et la diversité des techniques utilisées dans ce travail ou proposées dans la littérature scientifique correspondent à un temps de travail et à un coût très important. Il n'est ainsi pas possible d'utiliser à large échelle l'ensemble de ces techniques. Les méthodes d'échantillonnage ont donc été testées et comparées afin d'en retenir la ou les plus performante(s). Le recueil des poussières dans les dispositifs plastiques fixes permet d'effectuer des prélèvements standardisés. En effet, comme les surfaces d'échantillonnage sont les mêmes dans toutes les fermes, les quantités de poussières prélevées sont donc normalisées. Il est donc possible de faire non seulement une comparaison qualitative mais aussi quantitative entre les fermes pour un temps donné d'exposition. Cette standardisation n'est pas envisageable pour la poussière recueillie à la spatule car la taille de la surface échantillonnée est variable, donc les quantités de poussières recueillies le sont aussi et le temps de dépôt n'est pas connu de l'opérateur.

Finalement, nous pouvons dire que les poussières sédimentées présentent des caractéristiques analytiques intéressantes pour l'étude de l'atmosphère des étables dans le cadre d'étude sur un grand nombre d'exploitation agricole. C'est à partir des poussières qu'il est possible d'effectuer la plus large gamme d'analyse permettant d'obtenir une vision globale de l'environnement aérobiologique des étables. Même si cette méthodologie n'est pas exhaustive, elle permet la réalisation et l'analyse d'un grand nombre de prélèvements environnementaux pour un dispositif de recueil offrant une logistique simple (envoi postal), une conservation à température ambiante et un faible coût. Ce dispositif peut être complété par l'étude des particules sédimentées par examen direct sur lames comme les pollens et les spores fongiques. L'identification des espèces bactériennes présente au sein de la poussière peut être réalisée par séquençage d'une fraction du génome des bactéries présentes en biologie moléculaire. Cependant, il est nécessaire de poursuivre l'étude des échantillons de poussières notamment en terme de reproductibilité des techniques de laboratoire et d'évolution de la composition de la flore microbiologique durant le stockage. D'autres analyses pourront être testées ultérieurement comme la présence de pesticides ou d'antibiotiques par chromatographie, [53], ainsi que celle de métaux lourds, de virus ou de bactéries non cultivables par l'identification de leur ADN par biologie moléculaire.

Ce stage permet de mettre en lumière le travail de l'ingénieur situé au carrefour de différentes disciplines scientifiques en santé publique. Il est confronté à la multiplicité des techniques aux performances parfois contradictoires. Il participe au meilleur compromis face aux enjeux scientifiques. Ce travail a permis d'appréhender la coopération avec des partenaires de culture scientifiques différentes et il est le fruit du travail au sein d'une équipe de recherche. Ici, les compétences de l'ingénieur permettent de faire le lien entre les demandes et les performances des techniques étudiées. Sa mission consiste au recueil des informations provenant de divers domaines afin de les hiérarchiser pour les restituer de façon adéquate et compréhensible. Ce stage a permis une mise en situation de l'évaluation de l'environnement et de sa répercussion sur la santé humaine. Par ailleurs, le travail sur un projet pilote est une démarche d'évaluation progressive avant un changement d'échelle d'étude.

Nous souhaitons souligner que ces résultats constituent un apport intéressant dans des domaines de santé publique variés. En médecine du travail d'abord, où l'étude des flux dans les étables confirme les données de la littérature sur la contamination des étables et sur la possibilité d'un échantillonnage simple de la poussière sédimentée comme le reflet de la contamination du foin. Cette dernière est le facteur principal de certaines pathologies agricoles comme le poumon de fermier. Dans le domaine de l'agroalimentaire, cette étude permet de lier l'ambiance des étables non seulement au bioaérosol mais encore plus en aval aux sources de la contamination microbiologique. Il est nécessaire de souligner l'importance de la connaissance de la flore d'intérêt technologique du lait dans la fabrication du fromage. En effet, elle conditionne en partie les qualités organoleptiques des produits laitiers. Une meilleure connaissance des flux des microorganismes des étables participe à la conservation d'un environnement influençant probablement la production alimentaire issue des produits laitiers.

Enfin, ce mémoire apporte des éléments nouveaux pour la poursuite et la préparation d'études d'impact de l'environnement microbiologique des étables sur l'allergie. Il est maintenant acquis pour la communauté scientifique qu'il existe un ou des facteurs protégeant de la survenue des maladies allergiques, en particulier l'asthme et le rhume des foins, liés à la fréquentation des exploitations agricoles dans l'enfance. Cette protection est particulièrement marquée au sein de l'arc alpin (Suisse, Allemagne et Autriche) où le mode d'agriculture et l'environnement sont assez proches de ceux des fermes Franc-comtoise. La protection pourrait être liée à des substances présentes dans la poussières mais une étude récente souligne aussi le rôle protecteur de la consommation du lait cru des enfants en bas âge vis-à-vis des maladie allergiques en Ecosse [30]. Nous espérons que ce travail participe à la dynamique du champ de l'épidémiologie environnementale au sein du projet GABRIEL.

CONCLUSION

Après avoir identifié dans un premier temps des sources microbiologiques de contamination de l'air et du lait, nous avons pu modéliser les flux de microorganismes à l'intérieur des étables. Il apparaît une contamination de l'air par l'apport de foin contenant des espèces fongiques comme *Eurotium amstelodami* et une contamination du lait par l'air et les trayons des vaches. De plus l'identification d'espèces peu fréquentes comme les levures dans la paille montre la proximité des sources de contamination et de certains substrats. Dans un second temps, nous avons mis en évidence que les analyses microbiologiques de la poussière sédimentée sont fortement similaires à celles de l'air des étables. Ainsi nous pouvons proposer une méthode d'échantillonnage des poussières permettant de caractériser la composition du bioaérosol des étables.

Ces résultats permettent de donner une première définition de la biodiversité microbiologique de l'ambiance des étables et constituent une première étape dans la modélisation de l'exposition aux micro-organismes des enfants à ces ambiances. Par ailleurs, l'approche analytique utilisée lors de cette étude peut être utilisée dans les différents domaines de la santé publique et de la recherche agronomique, apportant ainsi une cohérence et une comparabilité entre les études scientifiques.

De plus la méthode d'échantillonnage retenue, à la logistique simple et d'un faible coût, est applicable à des études scientifiques nécessitant un grand nombre d'échantillons. Ainsi des études à large échelle, comme le projet GABRIEL, pourront se servir des résultats de ce mémoire pour aborder des thématiques de l'allergologie rurale de façon interdisciplinaire. Parallèlement les études portant sur des maladies professionnelles agricoles, ou les recherches en agronomie laitière trouveront dans ce rapport des éléments de réflexion sur l'environnement spécifique des étables.

Bibliographie

1. Perkin, M.R., et al., *The predictive value of early life total immunoglobulin E measurement in identifying atopic children in a population-based birth cohort study*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2006. **17**(2): p. 118-24.
2. Pessi, T., et al., *A common IL-1 complex haplotype is associated with an increased risk of atopy*. *J Med Genet*, 2003. **40**(5): p. e66.
3. Raby, B.A., et al., *Eotaxin polymorphisms and serum total IgE levels in children with asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2): p. 298-305.
4. Randolph, A.G., et al., *The IL12B gene is associated with asthma*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(4): p. 709-15.
5. Koren, H.S. and M.J. Utell, *Asthma and the environment*. *Environ Health Perspect*, 1997. **105**(5): p. 534-7.
6. Schultz and F. Larsen.
7. Levesque, B., et al., *Total and specific immunoglobulin E and their relationship to respiratory symptoms in Quebec children and adolescents*. *Can Respir J*, 2005. **12**(8): p. 426-32.
8. Weiland, S.K., et al., *Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods*. *Eur Respir J*, 2004. **24**: p. 406-412.
9. Austin, J.B., et al., *Hay fever, eczema, and wheeze: a nationwide UK study (ISAAC, international study of asthma and allergies in childhood)*. *Arch Dis Child*, 1999. **81**: p. 225-230.
10. Sunyer, J., C. Spix, P. Quénel, A. Ponce-DE-Léon, A. Pönka, T. Barumandzadeh et coll., *Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four european cities: the APHEA project*. *Thorax*, 1997. **52**: p. 760-765.
11. Koren, H.S., *Associations between criteria air pollutants and asthma*. *Environ Health Perspect*, 1995. **103 Suppl 6**: p. 235-42.
12. Jindal, S.K. and D. Gupta, *The relationship between tobacco smoke & bronchial asthma*. *Indian J Med Res*, 2004. **120**(5): p. 443-53.
13. Gilliland, F.D., Y.F. Li, and J.M. Peters, *Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(2): p. 429-36.
14. van Schayck, C.P. and J.A. Knottnerus, *Can the 'hygiene hypothesis' be explained by confounding by behavior?* *J Clin Epidemiol*, 2004. **57**(5): p. 435-7.
15. Heinrich J., P.M., Wjst M, Goldstein IF, Wichmann HE., *Atopy in children and parental social class*. *Am J Public Health*, 1998. **88**: p. 1319 - 24.
16. Bloomfield, S.F., et al., *Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene*. *Clin Exp Allergy*, 2006. **36**(4): p. 402-25.
17. Weiss, S.T., *Eat dirt--the hygiene hypothesis and allergic diseases*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(12): p. 930-1.
18. Alistair W. Stewart, E.A.M., Neil Pearce, David P. Strachan and Stephan K. Weiland, *The relationship of per capita gross national product to the prevalence of symptoms of asthma and other atopic diseases in children (ISAAC)*. *Journal International of Epidemiology*, 2001. **30**: p. 173-179.
19. Hesselmar, B., et al., *Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development?* *Clin Exp Allergy*, 1999. **29**(5): p. 611-7.
20. Leynaert, B., et al., *Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood?* *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1829-34.
21. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. *Lancet*, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
22. Tatsuo Sakamoto, et al., *Environmental Exposure to Endotoxin and Decreased Risk of Childhood Atopy*. *Allergology International*, 2005. **54**(1): p. 79-87.

23. Melsom, T., et al., *Asthma and indoor environment in Nepal*. Thorax, 2001. **56**(6): p. 477-81.
24. Wickens, K., et al., *Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children*. Allergy, 2002. **57**(12): p. 1171-9.
25. Braun-Fahrlander, C., *Do only European cattle protect from allergies?* Allergy, 2002. **57**(12): p. 1094-6.
26. Lauener, R.P., et al., *Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 465-6.
27. Braun-Fahrlander, C., *The role of the farm environment and animal contact for the development of asthma and allergies*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(12): p. 1799-803.
28. Braun-Fahrlander, C. and R. Lauener, *Farming and protective agents against allergy and asthma*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(4): p. 409-11.
29. Eder, W., et al., *Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 482-8.
30. Perkin, M.R. and D.P. Strachan, *Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy?* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(6): p. 1374-81.
31. Edwards, R.D., E.J. Yurkow, and P.J. Liroy, *Seasonal deposition of housedusts onto household surfaces*. Sci Total Environ, 1998. **224**(1-3): p. 69-80.
32. Park, J.H., et al., *Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(11): p. 1023-8.
33. Mullins, J. and J. Emberlin, *Sampling Pollens*. J. Aerosol Set., 1997. **28**(3): p. 365-70.
34. Roussel, S., *Influence des pratiques agricoles sur la flore microbiologique des fourrages et sur le risque de maladie du poumon de fermier.*, in *Sciences de la vie et de la santé*. 2004, University de Franche-Comté: Besançon. p. 0-159.
35. Dalphin, J.C., et al., *Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France*. Thorax, 1991. **46**(9): p. 619-23.
36. Dalphin, J.C., et al., *Influence of barn drying of fodder on respiratory symptoms and function in dairy farmers of the Doubs region of France*. Thorax, 1994. **49**(1): p. 50-3.
37. Pepys, J., et al., *Farmer's Lung. Thermophilic Actinomycetes as a Source of "Farmer's Lung Hay" Antigen*. Lancet, 1963. **41**: p. 607-11.
38. Tao, B.G., et al., *An epidemiological study on farmer's lung among hay grinders in Dafeng County*. Biomed Environ Sci, 1988. **1**(1): p. 13-8.
39. Hamburger, R., Nutr Res, 1992. **12**: p. 101-107.
40. Brain, An Rev Resp Disea Brignon Rev Mal Respi, 1979 1997.
41. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 969-77; quiz 978.
42. Keman, S., et al., *A five year follow-up of lung function among chemical workers using flow-volume and impedance measurements*. Eur Respir J, 1996. **9**(10): p. 2109-15.
43. Peters, M., et al., *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. Thorax, 2006. **61**(2): p. 134-9.
44. Gorny, R.L., et al., *Fungal fragments as indoor air biocontaminants*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(7): p. 3522-31.
45. Liroy, P.J., N.C. Freeman, and J.R. Millette, *Dust: a metric for use in residential and building exposure assessment and source characterization*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(10): p. 969-83.
46. Tovey, E.R., et al., *Four methods of sampling for dust mite allergen: differences in 'dust'*. Allergy, 2003. **58**(8): p. 790-4.
47. Vostal, J.J., et al., *Lead analysis of house dust: a method for the detection of another source of lead exposure in inner city children*. Environ Health Perspect, 1974. **7**: p. 91-7.
48. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.

49. Waser, M., et al., *Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(3): p. 389-97.
50. Schram, D., et al., *Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**: p. 1272-1278.
51. Vojta, P.J., et al., *Effects of physical interventions on house dust mite allergen levels in carpet, bed, and upholstery dust in low-income, urban homes*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(8): p. 815-9.
52. *Guide Québécois de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en Santé et Sécurité du Travail (IRSST)*.
53. Hamscher, G., et al., *Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers?* Environ Health Perspect, 2003. **111**(13): p. 1590-4.

Annexes

- **BOÎTE DE SÉDIMENTATION NON COMPARTIMENTÉE**
- **BOÎTE DE SÉDIMENTATION COMPARTIMENTÉE**
- **POMPAGE SUR FILTRE**
- **IMPACTION SUR MEMBRANE**
- **IMPACTION SUR MILIEUX GÉLOSÉS**
- **ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LINGETTES (SÉDIMENTATION DIRECTE)**
- **ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE LA POUSSIÈRE SÉDIMENTÉE**
- **SÉDIMENTATION DE POUSSIÈRE DIRECTEMENT SUR LAME**
- **ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU FOIN ET DE L'ALIMENTATION SOLIDE DU BÉTAIL**
- **ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LINGETTES DU TRAYON**

Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	BOÎTE DE SEDIMENTATION NON COMPARTIMENTÉE	Fiche descriptive
---	---	-------------------

Boîte en plastique utilisée pour la commercialisation des cônes de micropipette de la marque Aerosol Resistant Tips



Prix : non disponible

Le prix d'une boîte remplie est d'environ 100€

Dimensions : 120 x 100 mm ; Poids: 133,3g

Description : Le fond de la boîte est surmonté d'un couvercle percé de trous de 8 mm de diamètre, servant de présentoir à embout. Le tout est complété d'un véritable couvercle. La surface utile est de 50,26 cm².

Utilisation : La boîte est placée dans les étables à 1 m du sol au minimum afin de recueillir la poussière qui va se sédimer. Elle doit être posée pendant une période de minimum 1 mois.

- **Points forts** : Cette boîte comporte un premier couvercle percé servant de filtre aux éléments indésirables comme la paille, il n'est donc pas nécessaire de la recouvrir d'une plaque. Son poids léger permet une expédition par colis. Comme elle est en plastique, il n'y a pas d'utilisation par les micro-organismes fongiques des parois de la boîte.
- **Points faibles** : La surface utile est petite et nécessite des temps de pose relativement long pour obtenir suffisamment de quantité de poussière. Il n'y a pas de compartiment permettant de recueillir des poussières directement sédimentées sur lames.

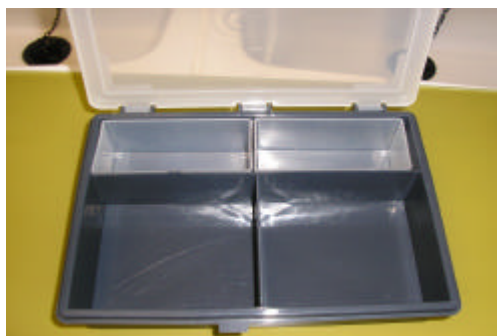
Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	BOÎTE DE SEDIMENTATION COMPARTIMENTEE	Fiche descriptive
--	--	-------------------

Boîte grise Mobil Plastic

REFERENCES : PB Class 20 (prix: 6,20 € HT à l'unité 4,56 € HT pour 30 boîtes) et gobets plastiques intérieur (prix: 0,43 € HT à l'unité 0,32 € HT pour 30 godets)

Dimensions extérieures : (186*240*55) mm

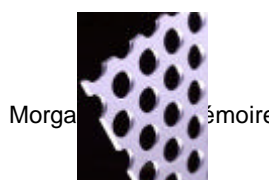
Compartiments intérieurs : deux de (152*222) mm et un de (110*50*45) mm



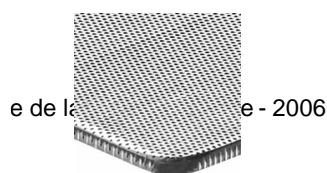
DESCRIPTION : La boîte est en plastique gris, munie d'un couvercle plastique transparent et d'un fermoir coulissant. A l'intérieur il y a trois compartiments, (voir photo) et dans le compartiment rectangulaire le plus fin viennent se placer deux godets en plastique transparent avec les lames de sédimentation

UTILISATION : La boîte est utilisée pour collecter la poussière sédimentée. Elle est déposée ouverte à 1m du sol au minimum pendant un mois. La boîte est protégée par une grille en laiton de manière à ce que le moins de particules (morceaux de foin, paille ...) gênante pour l'analyse ne se déposent. Il est important de noter la date de pose de la boîte afin de pouvoir calculer par la suite le rendement en $g/cm^2/jour$.

- **Points forts** : La surface est assez grande pour recueillir une quantité suffisante de poussière pour les analyses. Cette boîte se referme facilement et est hermétique. Son poids est relativement léger: 269,75 g + 2 godets de 19,375 g chacun et une grille métallique de 16,822g, le tout pèse donc: 325,322 g. On peut récupérer la poussière sédimentée au pinceau en balayant et de la poussière sédimentée directement sur lame grâce aux différents compartiments. Elle peut être expédiée par la poste
- **Points faibles** : La grille actuelle a un maillage large qui laisse passer de la paille et d'autres particules non souhaitées pour l'analyse.
- **Améliorations possibles** : Il nous faudrait une plaque légère qui vienne se fixer à l'intérieur de la boîte ouverte avec par exemple des petits rabats internes. Cette plaque doit être aux dimensions de la surface libre (intérieure) de la boîte soit 152*222 mm et devra présenter environ 280 trous de 8 mm de diamètre. Ceci ramène donc la surface utile à $140,74 cm^2$.



Types de grille



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	POMPAGE SUR FILTRE	Mode opératoire
--	--------------------	-----------------

PRINCIPE : Analyse bactériologique et fongique de l'air.

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Pompe Gilair 3® / Cassettes spéciales adaptées à cette pompe / Filtres téflon avec des pores de 0,45 µm / Solution de Tween 80 à 0,1% / 1 Vortex® / Milieux gélosés Müller-Hinton (MH) pour les bactéries, R8 et Difco ou Actino pour les actinomycètes, DG18 et Malt + NaCl pour les champignons.

PRÉLÈVEMENT : Air des étables et des habitations

Poser le filtre téflon dans une cassette

Régler la pompe sur le débit 3L/min

Adapter la cassette sur la pompe (la partie de la cassette avec des rainures doit être en bas)

Prélever pendant 20 minutes en posant la pompe à 75 cm du sol dans les étables.

MODE OPÉRATOIRE

Rincer la cassette avec 6 mL de Tween - Vortexer pendant 1 minute - Verser le filtre et le liquide de rinçage dans un sac à stomacher, rincer la cassette avec 4 mL de Tween - Stomacher pendant 10 minutes pour homogénéiser

Ensemencer 250 µL de solution pure sur chaque milieu

Placer en incubation (Müller-Hinton : 30°C -> 2 jours , Malt : 20°C -> 7 jours , DG18 : 30°C -> 7 jours , R8 : 52°C -> 7 jours , Difco : 30°C -> 7 jours)

INTERPRÉTATION : identification macro- et microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : Vortex et pompe Gilair



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	IMPACTION SUR MEMBRANE	Mode opératoire
--	------------------------	-----------------

PRINCIPE : Mise en évidence de pollens et spores de l'air par lecture directe.

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Pompe Gilair 3® / Cassettes spéciales adaptées à cette pompe / Membranes en PVC adaptées au diamètre intérieur des cassettes / Lames (76x26 mm) et lamelles (24x60 mm) / Solution de toluène et vaseline / Solution de montage (gélatine, glycérine, phénol fuschine) / Microscope avec objectifs x10, x25, x40.

PRÉLÈVEMENT : Air des étables et des habitations

Recouvrir un côté de la membrane avec la solution toluène-vaseline, laisser s'évaporer.

Régler la pompe sur le débit 3L/min

Mettre une membrane en PVC côté enduit vers le haut dans une cassette

Adapter la cassette sur la pompe (la partie de la cassette présentant des rainures doit être en bas) et prélever pendant 5 minutes dans une étable.

MODE OPÉRATOIRE :

Sortir la membrane et la découper afin d'obtenir une bande puis fixer la membrane face impactée au-dessus sur la lame avec 3 gouttes de solution de montage.

Fixer la lamelle sur le filtre avec 3 gouttes de solution de montage et attendre 24 heures que la solution ait durci.

INTERPRÉTATION : Identification et dénombrement des espèces au microscope (objectif * 40)

PHOTOGRAPHIES : Pompe Gilair 3® et cassette avec membrane toluène



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	IMPACTION SUR MILIEUX GELOSES	Mode opératoire
---	-------------------------------	-----------------

PRINCIPE : Mise en évidence de la contamination de l'air par impaction sur milieu de culture

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Appareil MAS100® / Milieux gélosés spécifiques des microorganismes recherchés.

PRÉLÈVEMENT : Air intérieur des milieux professionnels, domestiques et hospitaliers

MODE OPÉRATOIRE :

Dévisser la partie haute du MAS100® et placer un boîte de Pétri contenant un milieu gélosé sur l'appareil.

Replacer la partie haute, enlever le couvercle et régler le débit et le temps d'aspiration voulu

Placer les milieux à la température d'incubation voulue.

INTERPRÉTATION : Identification et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : Impacteur MAS100®



Zone sans le couvercle dans lesquelles sont placées les boîtes de culture

Espace d'allumage et de programmation



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LINGETTES (SÉDIMENTATION DIRECTE)	Mode opératoire
---	--	-----------------

PRINCIPE : Analyse microbiologique des poussières sédimentées sur lingettes

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES :

Lingettes électrostatiques stériles (200°C au poupinel, autoclave à chaleur sèche 4h) / Pochettes plastiques porte-document / Milieux gélosés (Müller-Hinton (MH) pour les bactéries, R8 et Difco ou Actino pour les actinomycètes (bactérie filamenteuse), DG18 et Malt + NaCl pour les champignons)

PRÉLÈVEMENT : Poussières des étables et habitations rurales

MODE OPÉRATOIRE

Découper des morceaux de lingettes avant stérilisation (12x10 cm environ) et en scotcher deux sur chaque face de la pochette

Placer la pochette ouverte sur un sol de la pièce ou dans l'étable pendant 20 jours . Enlever les lingettes, les mettre dans un sac spécial "stomacheur"

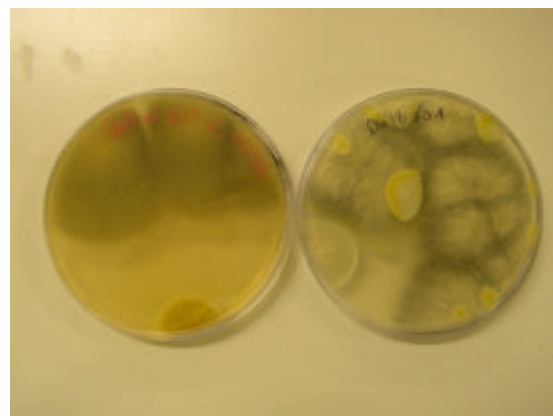
Ajouter 20 mL d'eau distillée et placer 10 minutes dans la machine à agitation vigoureuse

Prélever le liquide, mettre 5 gouttes sur chaque boîte de milieu et étalement.

Müller-Hinton : à 10^{-3} et 10^{-4} à 30°C -> 2 jours / Malt : à 10^{-3} et 10^{-2} à 20°C -> 7 jours / DG18 : à 10^{-3} et 10^{-2} à 30°C -> 7 jours ,/ R8 : à 10^{-1} à 52°C -> 7 jours / Difco : à 10^{-2} à 30°C -> 7 jours

INTERPRÉTATION : identification macro- et microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : étalement sur boîte de Pétri a gauche et colonies fongiques à droite après incubation.



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE LA POUSSIÈRE SÉDIMENTÉE	Mode opératoire
---	--	-----------------

PRINCIPE : Analyse microbiologique de poussière sédimentée.

PRÉLÈVEMENT : Poussière standardisée

Placer les boîtes "bleues" non compartimentée et "grises" compartimentée à une hauteur de 1 mètre pour une durée minimum d'un mois

Poussière sédimentée : récolter la poussière de l'étable sur des supports secs à une hauteur minimum de 1 mètre

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Solution de Tween 80 à 0,1% / Milieux gélosés Müller-Hinton (MH) pour les bactéries, R8 et Difco ou Actino pour les actinomycètes , DG18 et Malt + NaCl pour les champignons.

MODE OPÉRATOIRE

Recueillir la poussière avec une spatule ou un pinceau stérile en tamisant si nécessaire le foin ou autres débris macroscopiques inutiles

Placer la poussière récoltée dans un pot stérile (pour la conservation) préalablement pesé et étiqueté, repeser pour connaître la quantité de poussière recueillie

Prélever 0,3g de poussière dans un petit pot stérile pour l'ensemencement et ajouter 20 mL de Tween 80 à 0,1 % puis vortexer 1 minute pour homogénéiser

Ensemencement avec 100 µL du mélange et incubation (Müller-Hinton, Drigalski, Slanetz : à 10^{-1} et 10^{-2} à 30°C -> 2 jours / Malt : à 10^{-3} et 10^{-2} à 20°C -> 7 jours / DG18 : à 10^{-3} et 10^{-2} à 30°C -> 7 jours / R8 : à 10^{-1} à 52°C -> 7 jours / Difco : à 10^{-2} à 30°C -> 7 jours)

INTERPRÉTATION : identification macro- et microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : boîte grise pleine, boîte et spatule pour le recueil des poussières, tamis.



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	SÉDIMENTATION DE POUSSIÈRE DIRECTEMENT SUR LAME	Mode opératoire
---	--	------------------------

PRINCIPE : Dénombrement de pollens et spores par lecture directe de la poussière sédimentée sur lame de verre

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Boîte "grise" compartimentée avec les gobelets / lame de sédimentation (76x26 mm) / Scotch / Solution de montage (gélatine, glycérine, phénol, fuschine) / Microscope avec objectifs x10; x25, x40

PRÉLÈVEMENT : Air des étables

Préparer les lames avec la solution de vaseline-toluène pour que les poussières adhèrent.

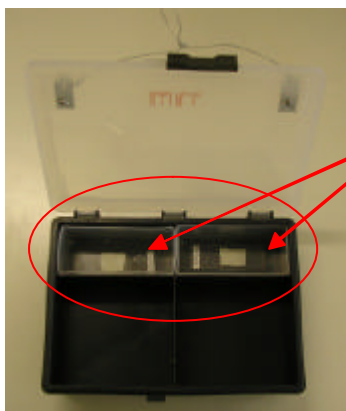
Fixer les lames de sédimentation préalablement numérotées ou annotées au fond des godets de la boîte grise avec du scotch double face.

Déposer les boîtes à un mètre de hauteur minimum dans la ferme ou dans une étable pendant deux semaines

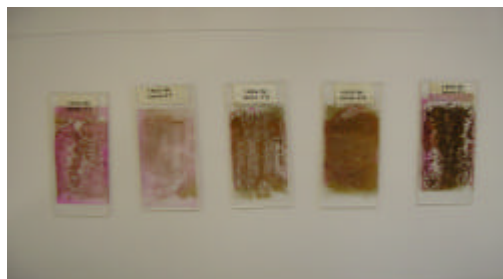
MODE OPÉRATOIRE : Mettre 5 gouttes de solution de montage sur chaque lame, recouvrir avec une lamelle et observer au microscope

INTERPRÉTATION : Identification microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : Lame en place dans une boîte avant exposition, lame après exposition et 5 lames montées avec la coloration.



Lames de sédimentation directe



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU FOIN ET DE L'ALIMENTATION SOLIDE DU BETAIL	Mode opératoire
---	---	-----------------

PRINCIPE : Analyse microbiologique de foin et substrats alimentaires (paille, tourteaux, farine ...)

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Solution de Tween 80 à 0,1%, / Milieux gélosés, Müller-Hinton (MH) et Drigalski pour les bactéries / R8 et Difco ou Actino pour les actinomycètes / DG18 et Malt pour les champignons

PRÉLÈVEMENT : Prélever une poignée de la botte de foin donnée lors du prélèvement et placer l'échantillon au congélateur à -20 °C pour le foin du jour. Le foin et la paille « mélangée » sont un mélange des foins et des pailles utilisées dans les 20 jours qui précèdent les prélèvements de poussières.

MODE OPÉRATOIRE :

Prélever 5 g de foin du prélèvement et les placer dans un sac à stomacher, noter le poids exact grâce à la balance électronique

Ajouter 80 mL de Tween 80 à 0,1 % puis vortexer 6 minutes pour homogénéiser

Ensemencer les boîtes avec 100 µL du mélange et placer en incubation (Müller-Hinton, Drigalski, Slanetz : à 10^{-1} et 10^{-2} à 30°C -> 2 jours / Malt : à 10^{-3} et 10^{-2} à 20°C -> 7 jours / DG18 : à 10^{-3} et 10^{-2} à 30°C -> 7 jours ,/ R8 : à 10^{-1} à 52°C -> 7 jours / Difco : à 10^{-2} à 30°C -> 7 jours)

INTERPRÉTATION : identification macro- et microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : ensemencement des boîtes avec 100µl



Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - CHU de Besançon	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LINGETTES DU TRAYON	Mode opératoire
---	--	-----------------

PRINCIPE : Analyse microbiologique de poussière sur les pis des vaches

PRÉLÈVEMENT : Lingettes stériles (200°C au poupinel, autoclave à chaleur sèche) ou compresses stériles dépliées (7,5*7,5) cm (Laboratoire Sylamed, France)

MATÉRIEL ET CONSOMMABLES : Solution de Tween 80 à 0,1% / Milieux gélosés / Müller-Hinton (MH) et Drigalski et Slanetz pour les bactéries / R8 et Difco ou Actino pour les actinomycètes (bactérie filamenteuse) / DG18 et Malt pour les champignons

MODE OPÉRATOIRE :

Placer dans un sac à stomacher 10 lingettes des vaches d'un même troupeau

Ajouter 100 mL de Tween 20 à 0,1 % et 0,5 % de poudre de lait et agiter 1 minute pour homogénéiser.

Ensemencer les boîtes avec 250 µL du mélange et placer en incubation (Müller-Hinton, Drigalski, Slanetz : à 10^{-1} et 10^{-2} à 30°C -> 2 jours / Malt : à 10^{-3} et 10^{-2} à 20°C -> 7 jours / DG18 : à 10^{-3} et 10^{-2} à 30°C -> 7 jours ,/ R8 : à 10^{-1} à 52°C -> 7 jours / Difco : à 10^{-2} à 30°C -> 7 jours)

INTERPRÉTATION : identification macro- et microscopique et dénombrement des espèces

PHOTOGRAPHIES : sac pour Stomacher et boîtes de Pétri conditionnées pour l'incubation à l'étuve.

