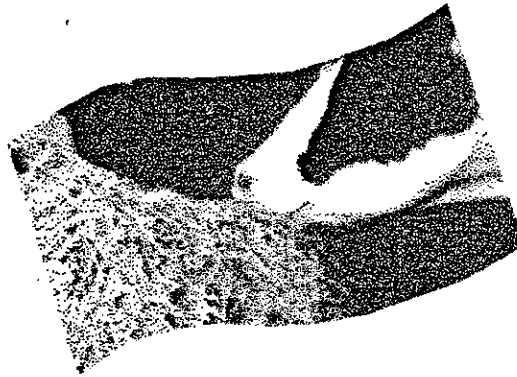


**Étude d'un moyen de prévention
d'une maladie professionnelle
(le poumon du fermier) :
ensemencement de bactéries
dans le fourrage**



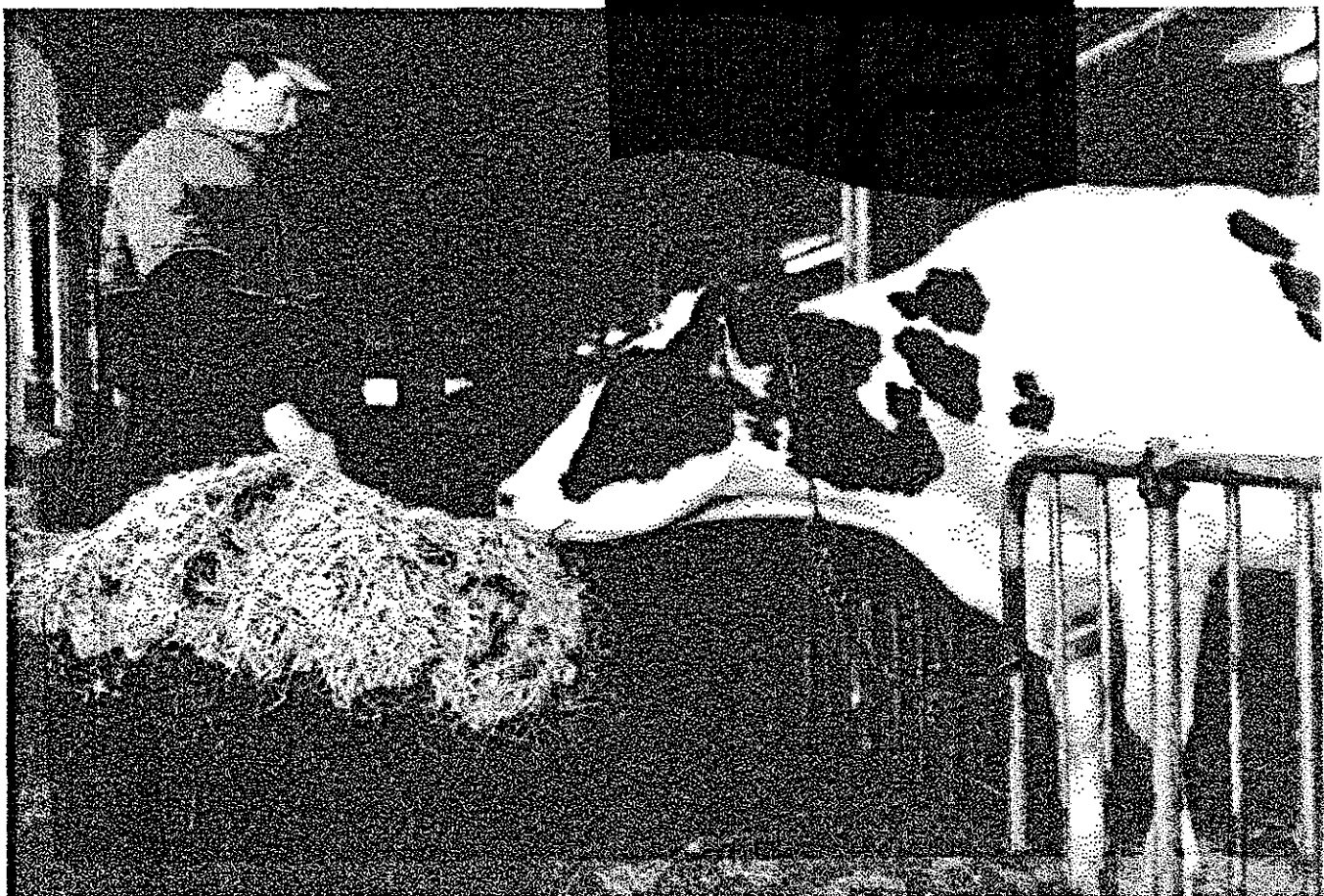
**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

Caroline Duchaine
Anne Mériaux
Gaétane Racine-Bédard
Évelque Israël-Assaouag
Gilles Brochu
Marc C. Lavoie
Yvon Cormier

Février 1996

R-120

RAPPORT



IRSST
Institut de recherche
en santé et en sécurité

La recherche, pour mieux comprendre

L'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec (IRSST) est un organisme de recherche scientifique voué à l'identification et à l'élimination à la source des dangers professionnels, et à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes. Financé par la CSST, l'Institut réalise et finance, par subvention ou contrats, des recherches qui visent à réduire les coûts humains et financiers occasionnés par les accidents de travail et les maladies professionnelles.

Pour tout connaître de l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par la CSST et l'Institut.

Les résultats des travaux de l'Institut sont présentés dans une série de publications, disponibles sur demande à la Direction des communications.

Il est possible de se procurer le catalogue des publications de l'Institut et de s'abonner à *Prévention au travail* en écrivant à l'adresse au bas de cette page.

ATTENTION

Cette version numérique vous est offerte à titre d'information seulement. Bien que tout ait été mis en œuvre pour préserver la qualité des documents lors du transfert numérique, il se peut que certains caractères aient été omis, altérés ou effacés. Les données contenues dans les tableaux et graphiques doivent être vérifiées à l'aide de la version papier avant utilisation.

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec

IRSST - Direction des communications
505, boul. de Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : (514) 288-1 551
Télécopieur: (514) 288-7636
Site internet : www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche en santé
et en sécurité du travail du Québec,

**Étude d'un moyen de prévention
d'une maladie professionnelle
(le poumon du fermier) :
ensemencement de bactéries
dans le fourrage**

Caroline Duchaine, Anne Mériaux, Gaétane Racine-Bédard,
Évelyne Israël-Assayag, Gilles Brochu, Marc C. Lavoie et
Yvon Cormier
Centre de pneumologie de l'Hôpital Laval, Université Laval

**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

RAPPORT

Résumé

Au Québec, les conditions climatiques rendent très difficile le travail des agriculteurs en ce qui concerne la qualité du fourrage produit. Le climat humide ne permet pas souvent un séchage adéquat du foin avant l'entreposage hivernal. Les fermiers font face à plusieurs problèmes résultant du taux d'humidité très élevé dans le foin : lorsque le foin, mis en balle, contient un taux élevé d'humidité, l'activité microbienne accrue mène à un réchauffement de la balle. La température atteinte peut alors causer l'autocombustion. Mais, la pire conséquence de ce réchauffement est la détérioration de la qualité du foin par les moisissures, la diminution de la valeur nutritive et bien sûr, la croissance des actinomycètes thermophiles (se développant à température élevée) qui sont responsables d'une maladie respiratoire appelée le poumon du fermier. Cette affection se caractérise par des difficultés à respirer et peut entraîner des séquelles irréversibles tels l'emphysème ou la fibrose pulmonaire.

Pour contrer ces problèmes causés par l'humidité, les agriculteurs utilisent plusieurs moyens afin de faciliter la conservation du fourrage : séchoir à foin, addition de divers produits lors de la mise en balle. Le projet effectué consistait en l'étude d'un de ces produits qui est un additif microbien : des bactéries productrices d'acide lactique (ici *Pediococcus pentosaceus*) sont inoculées dans le but de prévenir la croissance des moisissures et des autres responsables de la détérioration et du réchauffement du foin.

Les objectifs étaient de répondre aux questions suivantes : de quelle façon ces produits modifient-ils la microflore de l'air inhalé par les travailleurs lors de la manutention du fourrage traité? Est-ce que ce produit est efficace pour empêcher le foin de se détériorer? Cette bactérie qui est en quelque sorte un nouveau représentant de la flore peut-elle être allergénique et causer des problèmes aux producteurs? Ces derniers possèdent-ils des anticorps dirigés contre la bactérie du traitement, contre la bactérie responsable de la maladie du poumon du fermier (*Saccharopolyspora rectivirgula*) ou contre les autres représentants majoritaires de la microflore? Quel est leur état de santé respiratoire?

À l'aide du modèle de souris utilisé au laboratoire, nous avons pu démontrer que cette bactérie lactique utilisée pour traiter le foin est aussi allergénique que *S. rectivirgula* lorsqu'instillée nasalement aux souris. Ces souris développent des anticorps et une inflammation pulmonaire comparable à ceux développés lors de l'instillation de *S. rectivirgula*.

Nous avons procédé à l'analyse de l'air de 37 établissements : 19 fermes utilisant le traitement à l'étude et 18 fermes contrôles. Les bactéries et moisissures furent comptées par mètre cube d'air lorsque le foin est donné aux animaux. Nous avons démontré que la présence du traitement n'améliore pas la quantité et la qualité de contaminants dans l'air : les mêmes espèces de moisissures sont retrouvées, la même quantité de bactéries totales, d'endotoxines, de *S. rectivirgula* sont présents. Aucune bactérie du traitement n'a été retrouvée vivante dans les échantillons d'air.

Nous avons vérifié l'efficacité du traitement car si le *P. pentosaceus* empêche la détérioration du foin, cela pourrait modifier la microflore de façon intéressante pour les utilisateurs. À l'aide de foin traité en laboratoire et dont nous connaissions et

contrôlions le taux d'humidité et la quantité de bactéries du traitement ajoutées à ce foin et le temps d'incubation, nous avons suivi la croissance de cette bactérie, le pH et la détérioration du foin dans le temps, et ce pour des % d'humidité variant de 20 à 35%. Le traitement n'affecte pas la détérioration du foin qui moisit très rapidement aux taux d'humidité supérieurs à 20%. La bactérie est incapable de croissance dans le foin de 20 à 30% d'humidité. Elle croît bien dans le foin très humide (35%) sans toutefois empêcher les moisissures de s'installer. Le pH du foin traité s'alcalinise (augmentation du pH) lorsque les moisissures le colonisent et le traitement au *P. pentosaceus* est incapable de contrôler cette augmentation de pH.

La santé des travailleurs fut évaluée par un questionnaire et un test de capacité pulmonaire. Une prise de sang fut effectuée pour la détermination des anticorps sériques dirigés contre *S. reactivigula*, *P. pentosaceus* et moisissures majoritaires dans l'air des fermes : *Aspergillus glaucus*, *Alternaria* sp. Les fermiers possédant des anticorps dirigés contre *S. reactivigula* sont retrouvés en même nombre dans les groupes traité et non-traité. Les anticorps dirigés contre *P. pentosaceus* sont considérés comme étant non significatifs étant donné que les fermiers des deux groupes en possèdent (les fermiers non traités aussi) et qu'il y a présence de réactions croisées avec *Streptococcus lactis*, une bactérie contrôlée apparentée. Un nombre comparable de fermiers possèdent des anticorps dirigés contre les moisissures de la ferme (*Alternaria*, *A. glaucus*). Les questionnaires sur la santé ne montrent aucune différence dans les signes et symptômes des fermiers selon qu'ils utilisent ou non le traitement de foin sec. Les fonctions respiratoires sont aussi les mêmes.

Les cultivateurs devront être avisés que le traitement de foin par l'ensemencement de bactéries productrices d'acide lactique ne modifie pas la contamination microbiologique de l'air de leurs étables. Par conséquent, il est très peu probable que de tel traitement diminue les risques pour la santé respiratoire du contact répété avec cet environnement (ex: poumon du fermier, bronchite chronique). L'addition de cette bactérie ne semble pas néfaste pour les utilisateurs mais n'offre aucun effet de protection comme près de la moitié des producteurs le croient (14/30). Les fermiers ne doivent donc pas adopter de comportements permissifs ou être plus négligeants en se croyant protégés (rentrer le foin plus humide comme l'affirment 18/30 des répondants).

D'autres méthodes de préservation de fourrage et de contrôle de l'environnement devront être développées pour diminuer les risques pour la santé respiratoire des agriculteurs producteurs laitier.

INTRODUCTION	4
1.2 Les préservatifs de foin	4
1.3 Innocuité de la bactérie inoculée	4
1.4 Efficacité du traitement	5
1.5 Microflore de l'air des établissements et santé des travailleurs	5
2 OBJECTIFS DE RECHERCHE : GÉNÉRAUX ET SPÉCIFIQUES	6
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	7
3.1 Analyse du potentiel allergénique de <i>P. pentosaceus</i>	7
3.1.1 Préparations bactériennes	7
3.1.2 Instillation des animaux	7
3.1.3 Index pulmonaire et analyses d'histopathologie	7
3.1.4 Détermination des nombres et populations des cellules du lavage bronchoalvéolaire	7
3.1.5 Mesure des anticorps	8
3.2 Efficacité du traitement de foin au <i>P. pentosaceus</i>	8
3.2.1 Préparation du foin	8
3.2.2 Traitement du foin	8
3.2.3 Analyse du foin	8
3.3 Analyse de l'air des fermes	9
3.3.1 Choix des fermes et échantillonnage	9
3.3.2 Mise en culture des échantillons	10
3.3.3 Analyse des échantillons: décomptes et isolement	10
3.3.3.1 Bactéries totales	10
3.3.3.2 Moisissures	10
3.3.3.3 <i>S. rectivirgula</i>	11
3.3.3.4 <i>P. pentosaceus</i>	11
3.3.3.5 Endotoxines	11
3.3.4 Analyse des cultures: identification	11
3.3.3.1 Moisissures	11

	2
3.3.3.2 <i>P. pentosaceus</i>	11
3.3.3.3 <i>S. rectivirgula</i>	12
3.4 Santé des travailleurs	12
3.4.1 Questionnaire	12
3.4.2 Spirométrie	13
3.4.3 Anticorps	13
4 RÉSULTATS	13
4.1 Analyse du potentiel allergénique de <i>P. pentosaceus</i>	13
4.2 Efficacité du traitement de foin au <i>P. pentosaceus</i>	14
4.3 Analyse de l'air des fermes	14
4.3.1 Bactéries totales	14
4.3.2 Moisissures	15
4.3.3 <i>S. rectivirgula</i>	15
4.3.4 <i>P. pentosaceus</i>	15
4.3.5 Endotoxines	15
4.4 Santé des travailleurs	16
4.4.1 Questionnaire	16
4.4.2 Spirométrie	16
4.4.3 Anticorps	16
5 DISCUSSION	16
6 CONCLUSION	18
7 APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS	18
8 RETOMBÉES ÉVENTUELLES	19
9 LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS	19
9.1 Articles scientifiques en préparation soumis ou sous révision	19
9.2 Communications	19
10 Figures	

Introduction

Les fermiers du Québec sont atteints d'une affection respiratoire appelée Poumon du fermier qui atteint 3/1000 nouveaux fermiers annuellement et qui peut mener à des séquelles irréversibles. Le poumon du fermier est l'alvéolite allergique la plus commune. C'est en 1963 que le premier agent responsable de la maladie fut identifié (Pepys and Jenkins, 1963). Depuis, plusieurs bactéries et moisissures sont connues comme responsables mais, au Québec, *Saccharopolyspora rectivirgula* est la cause la plus fréquente de cette affection. Cette bactérie n'est pas présente en été lorsque le foin est frais mais se développe lors de l'entreposage de foin humide (>20%) qui possède alors une activité microbienne accrue. C'est cette activité métabolique abondante qui cause le réchauffement du foin pouvant atteindre des températures menant à l'autocombustion. Les espèces se développant alors contaminent l'environnement aérien des établissements lorsque le foin est manipulé par les travailleurs.

Les fermiers atteints ont alors des difficultés respiratoires, des frissons, de la fièvre dans les heures suivant le contact avec les bactéries. Ces symptômes augmentent avec les contacts. Les fermiers atteints possèdent des anticorps dirigés contre la ou les bactérie(s) impliquée(s). Les fermiers malades ne sont pas les seuls possédant des anticorps contre *Saccharopolyspora rectivirgula* au Québec. Environ 10% des fermiers possèdent des anticorps spécifiques à cette bactérie sans pour autant démontrer des signes de la maladie. Ces fermiers sont décrits comme asymptomatiques. La présence de ces anticorps pourrait représenter un signe avant coureur de la maladie car ces fermiers possèdent des infiltrats de cellules inflammatoires, au niveau des poumons, détectés au lavage bronchoalvéolaire (lymphocytose alvéolaire).

1.2 Les préservatifs de foin

Puisque le climat québécois est très humide, il est très fréquent que les fermiers mettent en balles du foin à haut taux d'humidité : 25-35%. Des techniques sont utilisées pour sécher le foin (séchoir à foin) ou pour empêcher ce dernier de se détériorer : acides propionique et lactique, urée, bactéries productrices d'acide lactique. C'est un produit à base de bactéries qui fut l'objet de notre étude: *Pediococcus pentosaceus*.

Cette bactérie devrait, lorsqu'inoculée à 500 000 UFC/g de foin, produire assez d'acide pour contrer au développement microbien et prévenir le réchauffement. Si la température est maintenue basse, les bactéries thermophiles qui causent la maladie du poumon du fermier ne pourront pas se développer. De plus, la microflore de l'air ambiant sera de meilleure qualité car les contaminants moins abondants.

1.3 Innocuité de la bactérie inoculée

Les fermes sont des environnements hautement contaminés en terme de microflore. Il n'est pas rare de retrouver plusieurs millions de bactéries cultivables

(UFC) par m³ d'air dans ces établissements. Les fermiers sont donc exposés à de grande quantité de contaminants biologiques et quelquefois, les espèces retrouvées sont nocives lorsque présentes en grande quantité (p. ex. *Aspergillus fumigatus*). Il est intéressant de se demander si l'addition d'une autre bactérie en grandes quantités pourrait modifier la microflore de l'air ambiant de façon soit à diminuer la quantité ou la qualité de contaminants, soit en ne modifiant pas la quantité mais la qualité de l'air ambiant (changement dans la microflore du foin), soit en modifiant ou non la microflore de l'air mais en ajoutant un nouveau contaminant (bactérie inoculée). Dans ce dernier cas, est-ce que la bactérie ajoutée pourrait être un nouvel allergène inhalé? Pourrait-elle agir en synergie avec d'autres bactéries fréquemment rencontrées et augmenter les risques d'alvéolite allergique (poumon du fermier)? Un modèle de souris fut utilisé afin de déterminer le potentiel allergénique de *P. pentosaceus* seul et en combinaison avec *S. rectivirgula* et en comparaison avec une autre bactérie métaboliquement apparentée (*Lactococcus lactis*).

1.4 Efficacité du traitement

La bactérie disponible commercialement se retrouve sous forme de poudre ensachée qui doit être mélangée à l'eau et répandue par fins jets d'eau à la surface du foin avant le pressage. L'efficacité du traitement dépendra de l'homogénéité de l'inoculum, de la capacité de la bactérie à croître dans son milieu (foin plus ou moins humide), de sa capacité d'acidification du milieu pour empêcher la croissance microbienne massive et le réchauffement. Les inoculants microbiens furent d'abord mis au point pour favoriser la fermentation de l'ensilage (Lane, 1981). Les bactéries inoculées se retrouvent alors dans du foin très humide (50-60%) et dans des conditions d'anaérobiose (silo ou balles enveloppées). Ces conditions sont idéales pour la croissance des bactéries utilisées (*Lactobacillus*). Il est incertain que le foin moins humide (20%) sera un support adéquat pour la croissance de bactéries lactiques.

Étant donné la grosseur des balles de foin (les balles rondes pèsent souvent 300Kg), la technique d'inoculation utilisée par les fermiers (fins jets d'eau) et la difficulté d'échantillonnage dans la balle de foin (surtout dans le cas des balles rondes), des échantillons de foin furent séchés et humidifiés en laboratoire, traités et analysés. Un mélange de mil, trèfle et luzerne fut étudié à différents taux d'humidité et pour deux concentrations de bactéries inoculées. La détérioration fut suivie lors d'un entreposage mimant celui effectué par les fermiers.

1.5 Microflore de l'air des établissements et santé des travailleurs

Les établissements utilisant un traitement de foin sec au *P. pentosaceus* ont peut-être une microflore différente de ceux qui n'en utilisent pas. La majorité des contaminants aériens sont libérés du foin sec lorsque le fermier le manipule pour nourrir les animaux. Des échantillons d'air doivent donc être effectués au poste de travail (près des animaux et à la hauteur approximative du nez du travailleur).

Puisque plusieurs contaminants sont présents, différentes techniques pour l'isolement de diverses bactéries, levures et moisissures doivent être utilisées. Les moisissures totales, les bactéries totales, les bactéries thermophiles (avec un accent sur les thermoactinomycète) et les endotoxines furent étudiées.

2 Objectifs de recherche : généraux et spécifiques

- Déterminer le potentiel antigénique de *P. pentosaceus* en utilisant le modèle murin d'alvéolite allergique
 - Mesurer l'inflammation locale pulmonaire par index pulmonaire et lavage bronchoalvéolaire
 - Mesurer les IgG et IgA sériques et locaux (lavage) produits contre le ou les antigène(s) instillé(s)
- Déterminer l'efficacité du traitement de foin sec au *P. pentosaceus* à différents % d'humidité
 - Suivre la croissance de la bactérie inoculée
 - Suivre l'évolution du pH du foin
 - Suivre la détérioration du foin traité vs non-traité
 - Vérifier l'effet de la bactérie à plus grande dose
- Déterminer la microflore de l'air ambiant des fermes laitières utilisant le traitement au *P. pentosaceus* vs les fermes n'utilisant aucun traitement
 - Quantifier les bactéries totales
 - Quantifier et identifier les moisissures totales
 - Quantifier et identifier *S. rectivirgula*
 - Quantifier les endotoxines totales
- Évaluer la santé des travailleurs dans les établissements étudiés
 - Évaluer la santé respiratoire par un questionnaire
 - Évaluer la santé respiratoire par un test de fonction pulmonaire (spirométrie)
 - Quantifier les IgG sériques spécifiques à *S. rectivirgula*, *P. pentosaceus*, *Aspergillus fumigatus* et autres moisissures abondantes (à déterminer)

3 Matériel et méthodes

3.1 Analyse du potentiel allergénique de *P. pentosaceus*

3.1.1 Préparations bactériennes

P. pentosaceus fut isolé du produit commercial de traitement du foin et cultivé à 30°C dans un bouillon MRS. *S. rectivirgula* (ATCC 15347) fut cultivé à 52°C dans un bouillon TSB. *Lactococcus lactis* (ATCC 11454) fut cultivée 30°C dans un bouillon MRS. Un homogénat non-viable fut préparée à partir de chacune de ces trois cultures, selon la technique décrite par Schulyer (1982).

3.1.2 Instillation des animaux

Cinquante souris naïves, C57/Bl6 de 20 grammes (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) furent gardées dans des cages séparées et 5 groupes formés selon la nature de l'antigène instillé : *P. pentosaceus*, *S. rectivirgula*, *L. lactis*, *S. rectivirgula*+*P. pentosaceus* et le groupe contrôle (saline). Les souris furent instillées nasalement avec 50µl contenant 250µg de l'extrait antigénique respectif. Les instillations ont eu lieu 3 jours successifs pendant 3 semaines. Dans chacun des groupes, différents animaux furent choisis pour soit le lavage bronchoalvéolaire et le prélèvement sanguin ou pour l'index pulmonaire, l'histopathologie et le prélèvement sanguin. Les prélèvements sanguins furent obtenus par ponctions rétro-orbitales.

3.1.3 Index pulmonaire et analyses d'histopathologie

Les sacrifices ont eu lieu par dislocation cervicale (sous anesthésie légère à l'isofurane) le 4e jour après la dernière instillation. Les souris furent pesées et les poumons prélevés, nettoyés et pesés. L'index pulmonaire fut calculé à partir de l'équation :

Un pathologiste a observé à l'aveugle les poumons fixés dans le Bouin coupés et colorés et a recherché les infiltrations cellulaires et autres dommages et signes inflammatoires (lésions focales, hyperplasie lymphoïde). Une cote fut attribuée à chacun des poumons observés : + = inflammation légère; ++ = inflammation modérée; +++ = inflammation importante; ++++ = inflammation très importante.

3.1.4 Détermination des nombres et populations des cellules du lavage bronchoalvéolaire

Après sacrifice, la trachée des souris de ce groupe fut canulée (catheter 20g) et les poumons furent lavés par 3x1ml de solution saline stérile. Le liquide de lavage fut centrifugé à 1200 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant fut conservé pour la mesure des anticorps spécifiques (IgG et IgA) et le culot resuspendu dans 500 µl de solution saline. La viabilité et le nombre de cellules furent évalués par coloration au bleu-trypan (1:2) et au crystal violet (1:2) respectivement. Deux cent mille cellules

furent utilisées pour coloration différentielle (Diff-Quick- Baxter-Canlab) et coloration à l'estérase non-spécifique pour la détermination des populations cellulaires.

3.1.5 Mesure des anticorps

Les échantillons sanguins furent centrifugés (1000RPM 10 min) et les sérums surnageants congelés. Des plaques à 96 puits (Nunc Maxi-Sorp immunoplates) furent tapissées avec 100µl d'une solution à 250 µg/ml de l'antigène approprié. Les plaques furent ensuite lavées et saturées avec de l'albumine de sérum de veau (BSA) à 1%. Les anticorps spécifiques ainsi que les réactions croisées furent mesurés dans le liquide de lavage et dans le sérum. Une titration fut effectuée pour déterminer la meilleure dilution à utiliser qui minimisera les réactions croisées et maximisera la réaction spécifique. Des dilutions de 1:1000 dans le cas du sérum et de 1:2 dans le cas du liquide de lavage furent choisies. Le sérum et le liquide de lavage furent déposés sur les plaques et les anticorps spécifiques révélés par l'addition d'anti-IgG et anti-IgA de souris couplés à la peroxydase. L'OPD fut utilisé comme substrat et l'absorbance lue à 490 nm.

3.2 Efficacité du traitement de foin au *P. pentosaceus*

3.2.1 Préparation du foin

Un mélange de foin contenant de la luzerne, du trèfle et du mil fut utilisé : le foin frais (40% d'humidité) fut séché par air chaud (55°C pour 6 heures) et coupé en petits morceaux (1-4 cm de long). Le % d'humidité du foin fut obtenu par séchage au four à micro-ondes jusqu'à la stabilisation du poids. Le foin est pesé avant et après cet exercice.

3.2.2 Traitement du foin

Des aliquots de foin (20g) furent déposés dans des sacs de plastique de type "Zip-Lock". Le nombre du UFC (bactéries viables) de *P. pentosaceus* fut déterminé à partir de la poudre commerciale. Une solution d'eau et de bactéries, suffisante pour obtenir 20g de foin à 20, 25, 30 et 35% d'humidité et/ou 500 000 UFC/g de foin, fut aspergée dans les sacs respectifs. Nous avons donc obtenu des sacs contenant du foin à 4 taux d'humidité différents avec ou sans bactéries lactiques inoculées. La même expérience fut effectuée mais le traitement de foin fut utilisé à une concentration 10 fois plus élevée que celle proposé par le détaillant (5 000 000 UFC/g de foin).

Les sacs furent laissés à température de la pièce (21-24°C), à l'abri de la lumière.

3.2.3 Analyse du foin

Des prélèvements de 1g furent prélevés des sacs traités et non-traités aux jours 0, 1, 3, 6, 8, 12, 30 post-traitement. Ces échantillons furent placés dans 30ml de solution saline contenant 0,05% Tween 80 et 1 g de billes de verre (0,45mm) pour

augmenter l'efficacité du lavage. Le pH de la solution initiale était de 7.1. Les échantillons furent agités par brassages manuels vigoureux et le pH des solutions mesuré directement de la suspension de foin.

Afin de faire les décomptes de *P. pentosaceus* de la solution de foin, la suspension fut diluée dans 9ml de solution saline (10^0 à 10^{-6}) et 100µl de la dilution étalés sur milieu MRS (additionné de cycloheximide). Les pétris furent incubés à 30°C en aérobiose 4 jours. Les colonies de *P. pentosaceus* furent comptées et identifiées par galeries API-50CH (Biomérieux).

Les foins traités et non-traités furent évalués pour la détérioration visuelle suivant une échelle déjà utilisée par certains auteurs: 0= intact, sans moisissure, 5= présence de mycélium et spores abondants, 10= mycélium abondant, décoloration, texture liquéfiée.

3.3 Analyse de l'air des fermes

3.3.1 Choix des fermes et échantillonnage

Dix-neuf fermes utilisant un inoculant de foin sec à base de *P. pentosaceus* furent sélectionnées dans différentes régions : Portneuf, Lotbinière, Québec, Victoriaville : producteurs "traités". Les producteurs devaient nous fournir le nom et l'adresse d'un producteur témoin n'utilisant aucun traitement de foin sec (producteur "non traité") dont l'établissement est à moins de 5 km de celui du producteur traité (pour minimiser les différences du climat et des précipitations), dont l'établissement est sensiblement de même grandeur et de même type (bétail à boucherie, ferme laitière, type d'alimentation). Au total, 18 fermes non-traitées et 19 fermes traitées furent visitées (une des fermes traitées n'ayant pu fournir de nom de témoin). Les fermes furent visitées de novembre à mai pour échantillonner au moment où les animaux sont à l'intérieur et que les fermiers manipulent le foin dans un environnement clos.

Deux types d'échantillons d'air furent prélevés au moment où le fermier distribuait le foin sec aux animaux. Deux impacteurs d'Andersen en simultané (un contenant du MRS pour l'isolement de *P. pentosaceus* et l'autre contenant du TSA pour le *S. rectivirgula*) échantillonnaient respectivement pendant 7 et 5 minutes à 28,5 l/min. Trois barboteurs liquide (impingers) AGI-30 contenant 20ml d'eau saline stérile échantillonnaient simultanément (avant ou après les Andersen) pendant 8 minutes à 13,5 l/min. Les échantillonneurs étaient placés sur une table et l'orifice d'entrée des particules à peu près à la hauteur de la taille des travailleurs.

Les impacteurs d'Andersen étaient lavés à l'éthanol, séchés à l'acétone entre les deux établissements tandis que des barboteurs différents étaient utilisés pour les deux fermes. Des bouchons rodés étaient déposés sur les barboteurs et les échantillons manipulés au retour en laboratoire.

3.3.2 Mise en culture des échantillons

À l'arrivée en laboratoire, les boîtes de pétri de l'Andersen étaient placées à l'incubateur: 30°C pour le *P. pentosaceus* (milieu MRS) et 52°C pour le *S. rectivirgula* (milieu TSA).

Les barboteurs étaient lavés avec une solution saline additionnée de Tween 80 à 0,075% avec un volume nécessaire pour compléter le volume d'échantillonneur à 30ml (10-12ml selon l'évaporation). Nous obtenions donc une solution d'échantillonnage à 0,05% Tween pour faciliter le mouillage des spores lors des dilutions subséquentes.

De l'échantillon 10⁰, 1ml était dilué dans 9 ml de solution saline stérile (10⁻¹) et ce tube dilué de la même façon en série jusqu'à 10⁻⁶. Cet exercice était effectué en triplica pour chaque échantillonneur (3 échantillonneurs par ferme). Chacun des tubes de dilution ainsi que le liquide d'échantillon non-dilué (10⁰) était étalé sur les milieux suivants en triplica à raison de 100µl/pétri :

TSA à 52°C : *S. rectivirgula*

TSA à 30°C : Bactéries totales

MRS à 30°C : *P. pentosaceus*

SDA à 30°C : Moisissures totales

CZA à 30°C : Moisissures totales et *Aspergillus*

Le liquide d'échantillonnage avec Tween non-dilué fut congelé pour détermination des endotoxines.

3.3.3 Analyse des échantillons: décomptes et isolement

3.3.3.1 Bactéries totales

Les colonies sur boîtes de TSA à 30°C furent comptées à la dilution contenant entre 30 et 300 colonies après 60 heures. Les moyennes par échantillonneur (3 pétris) et par ferme (3x3 pétris) furent effectuées. Les compte furent transformés en UFC/m³ d'air.

3.3.3.2 Moisissures

Les colonies sur boîtes de CZA et SDA furent comptées à la meilleure dilution (non-confluence) et toutes les colonies différentes isolées pour identificaton ultérieure. Les compte furent transformés en UFC/m³ d'air. Les colonies isolées furent conservées sur gélose inclinée en tube vissé de SDA à 4°C.

3.3.3.3 S. rectivirgula

Les colonies sur TSA à 52°C susceptibles d'être du *S. rectivirgula* furent comptées pour l'Andersen et les boîtes d'étalement du barboteur. Les colonies d'actinomycètes jaunâtres ou orangées furent retenues : comptées et isolées pour identification ultérieure.

3.3.3.4 P. pentosaceus

Les colonies sur MRS à 30°C susceptibles d'être du *P. pentosaceus* furent comptées pour l'Andersen et les boîtes d'étalement du barboteur. Les colonies blanches crayeuses, qui étaient des coques en paires ou en tétrades Gram positif furent retenues : comptées et isolées pour identification ultérieure.

3.3.3.5 Endotoxines

Les échantillons avec Tween des barboteurs qui furent conservés et congelés (3 par fermes) furent dilués et les endotoxines mesurées avec le test colorimétrique de Limulus Amoebocyte Assay (LAL) (Associates of Cape Cod), et c'est la dilution (entre 1:10 et 1:10 000) qui permet d'avoir une absorbance dans la courbe standard qui fut utilisée pour le calcul. La quantité est exprimée en unités d'endotoxine (EU).

3.3.4 Analyse des cultures: identification

3.3.3.1 Moisissures

Les moisissures isolées sur SDA et CZA furent repiquées sur SDA et finalement regroupées selon l'aspect macroscopique. Pour les moisissures de même type isolées sur SDA et CZA, seul le représentant venant de SDA fut identifié et son identification fut attribuée à l'espèce de CZA.

Des cultures sur lame de chacune des espèces différentes furent faites sur SDA et les lamelles observées par coloration au bleu-coton (bleu lactophénol). Les cultures furent identifiées à l'espèce pour les *Aspergillus* et au genre pour les autres spécimens.

3.3.3.2 P. pentosaceus

Les colonies isolées et répondant aux critères décrits plus haut furent recultivées sur MRS en anaérobiose à 30°C, numérotées et identifiées à mesure en utilisant le système API-50CH qui exprime la capacité de fermentation avec production d'acide par l'utilisation de 50 carbohydrates. Le patron de sucres fermentés est alors comparé aux patrons standards.

3.3.3.3 S. reactivus

Les actinomycètes thermophiles, répondant aux critères cités ci-haut, furent conservés sur gélose inclinée en tube vissé de TSA à 4°C.

Les souches seront identifiées selon les réactions métaboliques et les caractéristiques suivantes:

Colonies:

Mycélium aérien

Couleur, texture, forme coloniale

Températures de croissance

Assimilation des hydrates de carbone et/ou production d'acide:

Amidon, arabinose, dulcitol, cellobiose, erythritol, fructose, galactose, glucase, glycérol, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, salicine, sorbitol, sucrose, tréhalose, xylose

Hydrolyse:

Amidon, xanthine, hypoxanthine, tyrosine, adénine, caséine

Paroi cellulaire:

sucres et acide mycolique (chromatographie sur couche mince)

C'est à partir des données obtenues que nous pourrons comparer notre identification à celle d'un laboratoire de référence (LSPQ) pour une des souches.

Cette étape n'est pas encore complétée.

3.4 Santé des travailleurs

3.4.1 Questionnaire

Un questionnaire dérivé de celui de l'American Thoracic Society est rempli par les producteurs aidés d'une infirmière. Différents aspects de la santé respiratoire sont touchés: histoire, tabagisme, signes et symptômes. Ce questionnaire est rempli par tous les travailleurs réguliers de l'établissement.

Une question concernant les raisons motivant le producteur à utiliser un traitement de foin à base de *P. pentosaceus* est posée (pour la ferme traitée)

Les questionnaires seront compilés et la santé générale des producteurs de fermes traitées sera comparée à celle des fermes non-traitées.

3.4.2 Spirométrie

Un appareil portatif fut apporté sur les lieux et les tests de VEMS (volume expiratoire maximal en 1 seconde) et de CVF (capacité vitale forcée) furent effectués sur tous les travailleurs réguliers de l'établissement.

3.4.3 Anticorps

Une prise de sang est effectuée par l'infirmière pour tous les travailleurs réguliers de la ferme.

À l'aide des sérums des producteurs, les IgG spécifiques à *S. rectivirgula*, *P. pentosaceus*, *A. fumigatus* et les autres moisissures majoritaires de la microflore (ici, *Alternaria*, *A. glaucus*) sont mesurés.

Des plaques à 96 puits furent tapissées avec 100µl d'une solution à 250 µg/ml de l'antigène approprié. Les plaques furent ensuite lavées et saturées avec de l'albumine de sérum de veau (BSA) à 1%. Les IgG spécifiques seront mesurés par incubation d'une dilution 1:500 et 1:1000 des sérums étudiés et révélés à l'aide d'un anti-IgG humain couplé à la peroxydase. Le substrat utilisé sera l'OPD.

La fréquence des fermiers possédant des IgG spécifiques contre un ou plusieurs des antigènes testés sera compilée selon le type de ferme et comparée aux taux et au type de contaminants identifiés.

4 Résultats

4.1 Analyse du potentiel allergénique de *P. pentosaceus*

Le modèle murin nous a permis de déterminer le potentiel de *P. pentosaceus* à provoquer une inflammation pulmonaire.

L'inflammation pulmonaire fut déterminée par plusieurs facteurs : index pulmonaire, histopathologie, lavage bronchoalvéolaire.

L'augmentation de l'index pulmonaire par *P. pentosaceus* ($1.95 \pm 0,1$) par rapport au groupe contrôle fut d'amplitude plus importante que celle causée par *S. rectivirgula* ($1,46 \pm 0,17$) ($p < 0,05$). La coïnstillation de ces deux antigènes a augmenté encore plus cet index ($2,490 \pm 0,35$). La souche contrôle (*L. lactis*) n'a pas causé d'augmentation significative de l'index pulmonaire. Ces résultats sont montrés à la figure 1.

Après avoir fixé les poumons dans le Bouin, des coupes dans la paraffine de 5µm furent effectuées, colorées et observées par un pathologiste, à l'aveugle. Une cote résumant l'inflammation globale fut attribuée à chacun des spécimens. Des moyennes furent calculées par groupe. Les résultats de l'analyse pathologique sont présentés à la figure 1 (cote d'inflammation et de dommages) tandis que des microphotographies des poumons des groupes Saline, *S. rectivirgula*, *P. pentosaceus*

et *S. rectivirgula* + *P. pentosaceus* sont en figure 2. Les dommages majeurs causés au tissu sont des infiltrations cellulaires péri-bronchiques et péri-vasculaires, une diminution de l'espace alvéolaire et bronchique. Ce sont les souris du groupe *S. rectivirgula*+*P. pentosaceus* à qui fut attribuée la cote la plus élevée pour les dommages histologiques (++++). Les groupes *S. rectivirgula* et *P. pentosaceus* furent cotés ++ tandis que la souche contrôle *L. lactis* a obtenue une cote de +. Ces cotes concordaient avec l'index pulmonaire mesuré.

Le nombre total de cellules du lavage bronchoalvéolaire a augmenté significativement pour tous les antigènes utilisés, en comparaison avec le groupe contrôle (figure 3A). Le ratio de chacune des cellules comptées (macrophages, neutrophiles et lymphocytes) est le même pour tous les groupes (figure 3B).

Des IgG spécifiques furent détectés contre tous les antigènes utilisés dans le sérum (figure 4A) et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (figure 4B). Aucune réaction croisée et très peu d'IgA furent détectés (résultats non montrés).

4.2 Efficacité du traitement de foin au *P. pentosaceus*

La croissance de la bactérie inoculée (*P. pentosaceus*) fut suivie dans le foin et est exprimée à la figure 1. Les données furent transformées en \log_{10} UFC/g de foin pour le traitement à 500 000 UFC/g (figure 5A) et pour le traitement à 5 000 000 UFC/g de foin (figure 5B). Dans le foin à 20, 25 et 30% d'humidité, la bactérie n'a pas poussé (décroissance du nombre de CFU assez rapide) tandis que dans le foin à 35% d'humidité, le *P. pentosaceus* s'est développé jusqu'à $6,3 \times 10^8$ UFC/g, après 28 jours. (figure 5). Après 90 jours, quelques échantillons furent prélevés du foin à 35% d'humidité et aucun *P. pentosaceus* vivant ne fut détecté (résultats non montrés).

Le pH du foin fut suivi tout au long de cet entreposage post-traitement. À la figure 6, nous pouvons constater que le pH du foin augmente de la même façon dans le foin traité et non-traité. Le pH final du foin suit l'indice de détérioration (figure 7) et ce sont les moisissures qui semblent alcaliniser le foin. Le pH final du foin est plus élevé selon que le taux d'humidité est augmenté.

4.3 Analyse de l'air des fermes

Suite à l'échantillonnage, à la culture, au décompte et à l'identification des microorganismes retrouvés dans l'air des fermes utilisant ou non un traitement de foin sec à base de bactéries, nous avons pu comparer les taux et la nature des contaminants dans les deux conditions.

4.3.1 Bactéries totales

Après culture de 60 heures sur TSA à 30°C, les colonies furent comptées aux dilutions contenant entre 30 et 300 colonies. Les moyennes des 9 boîtes comptées pour chaque établissement furent calculées et des moyennes par type d'établissements furent effectuées : $1\ 318\ 537 \pm 1\ 629\ 584$ UFC/m³ d'air (médiane =

528 666) pour les fermes traitées et $1\,364\,623 \pm 2\,209\,629$ UFC/m³ d'air (médiane = 384 000) pour les fermes non traitées (figure 8).

4.3.2 Moisissures

Sur milieu Sabouraud (SDA), le nombre de colonies de moisissures comptées sur les boîtes non confluentes furent compilées par type d'établissement : $8\,424\,662 \pm 12\,291\,231$ UFC/m³ d'air (médiane = 3 180 000) pour les fermes traitées et $8\,785\,527 \pm 13\,823\,536$ UFC/m³ d'air (médiane = 4 537 037) pour les fermes non-traitées (figure 9). Sur milieu Czapek, nous avons obtenu $1\,277\,705 \pm 2\,306\,555$ avec une médiane de 315 000 UFC/m³ pour les fermes traitées et $1\,822\,368 \pm 3\,198$ UFC/m³ d'air (médiane = 243 889) pour les fermes non traitées (figure 10). En ce qui concerne la nature des moisissures présentes dans les deux types d'établissements, les résultats sont présentés aux figures 11 (SDA) et 12 (CZA). Les moisissures majeures sont *Aspergillus glaucus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus sp.*, *A. nidulans* avec la présence d'autres espèces minoritaires.

4.3.3 *S. rectivirgula*

Après isolement sur milieu TSA à 52°C (du barboteur ou de l'impacteur d'Andersen) et mise au froid sur gélose inclinée, les cultures de *S. rectivirgula* présumées seront identifiées puis comptées. Dans les fermes traitées, $183\,164 \pm 550\,494$ UFC/m³ d'air de *S. rectivirgula* (médiane = 1 026) tandis que dans les fermes non traitées, $187\,967 \pm 666\,128$ UFC/m³ d'air (médiane = 3 000) furent retrouvées (figure 13). Les données utilisées pour ces comptes sont les chiffres des colonies de *S. rectivirgula* "présumées" en se basant sur l'identification d'une souche par un laboratoire de référence (LSPQ) et en comparaison des morphologies coloniales. Les fermes contenant moins de 1 UFC/m³ d'air (donnant zéro au calcul car aucune colonie comptée) ne se retrouvent pas sur le graphique car les données sont exprimées en log₁₀ des CFU obtenus pour faciliter l'observation de chacun des points du graphique (log₁₀0 est impossible à calculer). Treize fermes traitées et 15 fermes non traitées possédaient du *S. restivirgula* en quantité supérieure à 1 UFC/m³ d'air.

4.3.4 *P. pentosaceus*

L'air de 19 fermes traitées au *P. pentosaceus* fut étudié et les colonies de la bactérie en question recherchées. Aucune ferme ne possédait de colonie de *P. pentosaceus* détectable avec les techniques utilisées (barboteur AGI-30 et impacteur d'Andersen).

4.3.5 Endotoxines

Les liquides des barboteurs congelés furent utilisés pour la mesure des endotoxines totales dans l'air des établissements. La figure 14a montre que les taux d'endotoxines sont semblables entre les fermes traitées (de 349 à 6824 UE/m³ d'air)

et les non-traitées (de 615 à 8349 UE/m³ d'air). Les données sont très variables tout comme dans le cas des autres contaminants.

4.4 Santé des travailleurs

4.4.1 Questionnaire

Les questionnaires furent compilés. Les données ont démontré qu'aucune différence dans la santé des travailleurs concernant l'histoire et les symptômes n'est présente chez les fermiers étudiés. Les résultats principaux du questionnaire sont retrouvés à la figure 15

4.4.2 Spirométrie

Les données de fonctions respiratoires furent analysées. Les fonctions respiratoires moyennes sont les mêmes dans les deux groupes. Les résultats des fonctions respiratoires se retrouvent à la figure 15.

4.4.3 Anticorps

Les anticorps dirigés contre *S. rectivirgula*, *P. pentosaceus*, , *A. fumigatus* *Aspergillus glaucus* et *Alternaria sp* furent mesurés (les trois dernières espèces furent choisies car elles étaient importantes soit dans toutes les fermes (*A. glaucus*) ou dans certaines fermes particulières (*Alternaria sp.*). Le même nombre de fermiers possédant des anticorps (IgG) dirigés contre *S. rectivirgula* furent retrouvés dans les fermes traitées et non-traitées (figure 16). Des anticorps dirigés contre *P. pentosaceus* furent détectés dans les fermes traitées et non-traitées. Puisque ce dernier résultat était très peu logique (car les fermiers des fermes non-traitées ne devraient pas être en contact avec cette bactérie), nous avons vérifié la spécificité des anticorps en mesurant les réponses contre *Lactococcus lactis*, une bactérie très apparentée mais non utilisée pour traiter le foin: cette vérification a démontré que certains fermiers possédaient des IgG sériques contre cette dernière bactérie aussi. La réponse au *P. pentosaceus* ne semble donc pas spécifique. Nous considérons donc les anticorps dirigés contre *P. pentosaceus* comme non-significatifs. (figure 16).

5 Discussion

La maladie du poumon du fermier est une affection répandue au Québec et les producteurs tentent tant bien que mal d'améliorer l'air des établissements agricoles par plusieurs moyens. Les préservatifs de foin sont des moyens couramment utilisés. Nous avons voulu étudier l'efficacité et l'innocuité d'un traitement de foin sec à base de *Pediacoccus pentosaceus*.

Un modèle de souris pour l'alvéolite allergique, fréquemment utilisé dans notre laboratoire, nous a permis de constater que le *P. pentosaceus* possède un potentiel allergénique d'importance aussi grande que le *S. rectivirgula*, si on se fie aux paramètres étudiés. L'index pulmonaire, les anticorps sériques et pulmonaires (IgG),

les cellules inflammatoires ainsi que l'index pulmonaire sont augmentés de façon similaire dans le cas d'une instillation nasale de la bactérie étudiée ou de la bactérie connue comme responsable de la maladie du poumon du fermier. La souche témoin (*L. lactis*), bien qu'ayant induit une production d'anticorps importante et une présence de cellules inflammatoires au niveau des poumons, n'a pas induit une augmentation de l'index pulmonaire ni de signes d'histopathologie significativement différents du contrôle. Nous devons être très prudents quand vient le temps d'extrapoler des études sur modèles animaux aux humains mais les résultats obtenus nous ont suggéré que le traitement du foin sec à base de bactéries pourrait ajouter un antigène potentiel dans l'air des fermes, à moins que sa présence n'empêche la détérioration du foin donc, ne diminue le taux de microorganismes totaux dans l'air. L'expérience sur l'efficacité du traitement de foin en laboratoire nous a permis d'éclaircir ce dernier point.

Nous avons constaté que, dans les conditions d'expérimentation, *P. pentosaceus* est incapable de croissance dans le foin aux taux d'humidité les plus bas (20, 25 et 30%). Dans ces cas, le foin traité ou non se détériorait de la même façon et ce fut plutôt le taux d'humidité plutôt que la présence de la bactérie qui fut déterminant pour la vitesse de détérioration. Le pH de ce foin a augmenté de façon proportionnelle à la détérioration. Dans le cas du foin à 35% d'humidité (très humide), la bactérie fut en mesure de bien se développer mais la comparaison de la détérioration des foins traités ou non a mis en évidence l'inutilité d'un tel traitement. Dans les deux cas, le foin s'est détérioré jusqu'à avoir une apparence visqueuse, décolorée avec présence abondante de spores (cote de 10/10). Le pH n'a probablement pu être acidifié assez rapidement pour contrer au développement des moisissures. Cette inefficacité n'exclut toutefois pas la présence potentielle de *P. pentosaceus* dans l'air des fermes : la bactérie est quand même inoculée à 500 000 UFC/g de foin sec. Dans le cas où elle se développe (foin très humide), elle serait alors présente en plus grande quantité.

L'analyse de l'air a démontré un nombre de bactéries totales très semblables dans le cas des fermes traitées ou non (figure 9). Il fut remarqué en plus que la majorité de la microflore cultivée à 30°C sur TSA avec cycloheximide (bactéries) était composée en majorité d'actinomycètes (morphologies coloniale et cellulaire) et que ceci est semblable dans les deux types de fermes. Ce type de bactéries est connu comme étant nombreux sur le foin (Lacey, 1971).

Les moisissures isolées sur SDA ou sur CZA sont aussi semblables en nombre ou en nature selon que l'établissement utilise du foin traité ou non. Diverses espèces furent identifiées mais les espèces majoritaires sont *Aspergillus glaucus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* et *Aspergillus* sp.

La présence de *S. rectivirgula* fut démontrée dans plusieurs établissements mais aucune différence entre la concentration moyenne de cet actinomycète dans les deux types de fermes ne fut observée (figure 14). C'est donc certainement la qualité initiale du foin, les conditions d'entreposage et d'humidité qui furent déterminantes quant à la présence d'actinomycètes thermophiles et non pas la présence d'un traitement à base de bactéries.

Aucun *P.pentosaceus* ne fut décelé dans l'air des fermes (à part quelques colonies et de façon irrégulière). Dans le cas où la bactérie se serait développée (dans du foin très humide), cette dernière est probablement morte compte tenu du temps écoulé entre la saison où les échantillonnages furent effectués (novembre à avril) et celle où le foin fut traité (juin-juillet). Que la bactérie se soit développée ou non, elle fut inoculée en grande quantité et les antigènes bactériens sont toujours présents

Le questionnaire n'a démontré aucune différence entre les symptômes et l'histoire de problèmes respiratoires. Les anticorps ont révélé que la même proportion de personnes dans chacun des groupes possède des IgG dirigés contre *S. rectivirgula*. La présence et l'absence du traitement n'a donc aucun effet sur la santé respiratoire des personnes étudiées. Ceci est très intéressant compte tenu des réponses du questionnaire à la question: pourquoi utilisez-vous des préservatifs de foin sec?, plusieurs (14/30) ont répondu pour protéger ma santé (figure 15). Cette affirmation démontre bien dans quelle optique plusieurs producteurs utilisent le produit. De plus, la qualité de l'air n'étant pas modifiée, les résultats obtenus concernant la santé (questionnaires et anticorps) ne sont pas surprenants.

6 Conclusion

L'analyse du potentiel allergénique de *P. pentosaceus* a démontré que, en comparaison avec *S. rectivirgula*, cette bactérie utilisée dans le traitement du foin sec a induit une inflammation pulmonaire chez la souris. Cette inflammation est de même nature et de même amplitude que celle causée par *S. rectivirgula* dans le modèle de souris.

Le traitement de foin s'est montré inefficace pour empêcher la détérioration du foin dans une expérience simulant les conditions d'entreposage dans les fermes. Le foin ne semble pas très bien supporter la croissance du *P. pentosaceus* à moins d'être très humide. Dans ce cas, les moisissures colonisent très rapidement le foin et la bactérie du traitement ne peut pas agir efficacement.

Une analyse de la microflore de l'air des établissements utilisant ou non le préservatif de foin étudié fut effectuée lors de la manutention du foin. Aucune différence ne fut décelée dans la nature et la quantité des contaminants aériens. Ce traitement ne devrait donc pas être utilisé dans le but d'améliorer la qualité de l'air respiré et diminuer les risques d'affection respiratoire, contrairement à la croyance de plusieurs producteurs (14/30).

L'analyse du questionnaire, des fonctions respiratoires et des anticorps sériques ont permis de savoir que *P. pentosaceus* a aucun effet sur l'incidence des symptômes respiratoires et sur la présence d'anticorps contre *S. rectivirgula* et les autres représentants de la microflore des fermes.

7 Applicabilité des résultats

Les cultivateurs devront être avisés que le traitement de foin par l'ensemencement de bactéries productrices d'acide lactique ne modifie pas la contamination microbiologique de l'air de leurs étables. Par conséquent, il était très peu probable que de tel traitement diminue les risques pour la santé respiratoire du contact répété avec cet environnement (ex: poumon du fermier, bronchite chronique). L'analyse de nos résultats sur la présence d'anticorps spécifiques contre la bactérie *P. pentosaceus*, *S. reactivigula* et les autres représentants de la microflore des fermes et l'état de santé respiratoire des cultivateurs qui ont utilisé ou non ce préservatif de foin a démontré que le traitement ne doit pas être utilisé à des fins de protection de la santé et que ce traitement ne diminue pas les risques de maladie de poumon du fermier. Le *P. pentosaceus* ne semble toutefois pas néfaste si les producteurs ne s'y fient pas et ne deviennent pas plus permissifs dans leurs comportements (rentrer le foin plus humide,...)

8 Retombées éventuelles

D'autres méthodes de préservation de fourrage et de contrôle de l'environnement devront être développées pour diminuer les risques pour la santé respiratoire des agriculteurs producteurs laitier.

9 Liste des articles scientifiques et communications

9.1 Articles scientifiques publiés, soumis et en préparation

Caroline Duchaine Marc C. Lavoie and Yvon Cormier (1995). Effects of a bacterial hay preservative (*Pediococcus pentosaceus*) on hay under experimental storage conditions., *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4240-4243

Caroline Duchaine, Evelyne Assayag and Yvon Cormier. Effects of *Pediococcus pentosaceus* alone and in combination with *Saccharopolyspora reactivigula* in murine model of allergic alveolitis. Soumis *European Respiratory Journal*

Caroline Duchaine, Anne Mériaux, Gilles Brochu and Yvon Cormier. Airborne microflora in Quebec dairy barns: lack of effect of bacterial hay preservative. Manuscrit en préparation

9.2 Communications

Caroline Duchaine, Anne Mériaux, Gilles Brochu and Yvon Cormier. Bacterial hay preservative (*Pediococcus pentosaceus*) does not change barn air microflora. Soumis au 1996 American Society for Microbiology general Meeting, New Orleans, Louisiana, may 19-23 1996

Caroline Duchaine, Anne Mériaux, and Yvon Cormier. Do bacterial hay preservative decreases risk for farmer's lung?. Soumis au 1996 American Thoracic Society International conference, New Orleans, Louisiana, may 11-15 1996

Caroline Duchaine, Evelyne Assayag, Marclen Fournier et Yvon Cormier. (1995). Effets de *Pediococcus pentosaceus* seul et en combinaison avec *Saccharopolyspora rectivirgula* dans le modèle murin d'alvéolite allergique. XXXVII réunion annuelle, Club de Recherches Cliniques, 28, 29 et 30 Septembre 1995, Le Château Bromont, Bromont.

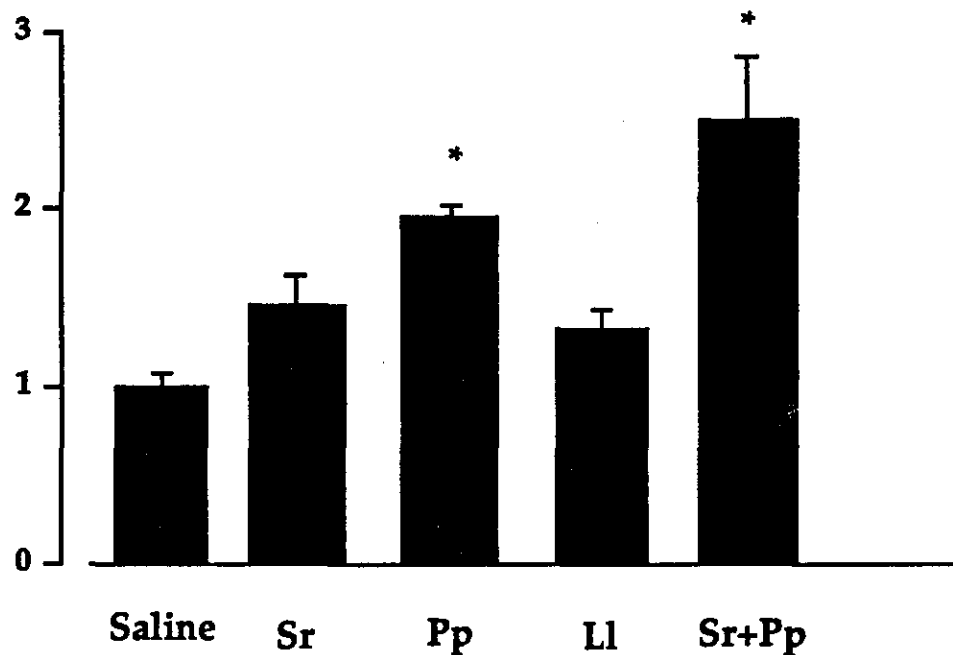
Caroline Duchaine, Evelyne Israël-Assayag, Marclen Fournier and Yvon Cormier. (1995). Effects of *Pediococcus pentosaceus* alone and in combination with *Saccharopolyspora rectivirgula* in murine model of allergic alveolitis. INSPIRAPLEX Respiratory Health Network of Centres of Excellence Annual General Meeting, 21-23 Septembre 1995, Montréal.

Caroline Duchaine, Evelyne Assayag and Yvon Cormier. (1995). Effects of *Pediococcus pentosaceus* alone and in combination with *Saccharopolyspora rectivirgula* in murine model of allergic alveolitis. American Thoracic Society international conference, Seattle, Washington, 23 may 1995

Caroline Duchaine et Yvon Cormier (1994). Analyse d'un moyen de conservation du foin: inoculation de bactéries lactiques. Colloque de la Recherche en Santé et Environnement, Pavillon La Laurentienne, Université Laval, 10 Décembre 1994

Caroline Duchaine et Yvon Cormier (1994). Analyse d'un moyen de conservation du foin: inoculation de bactéries lactiques. 11e Congrès Scientifique annuel de l'Association des Microbiologistes du Québec, 17-18 Septembre 1994, Québec, PQ

Index pulmonaire



Cote
histopathologique

0	++	++	+	++++
---	----	----	---	------

Figure 1: Index pulmonaire (moyenne \pm SEM) et intensité des lésions observées en histopathologie pour tous les groupes de souris.

*= différent du groupe contrôle ($p < 0,05$)

Abbréviations: Sr: *S. rectivirgula*; Pp: *P. pentosaceus*; Ll: *L. lactis*

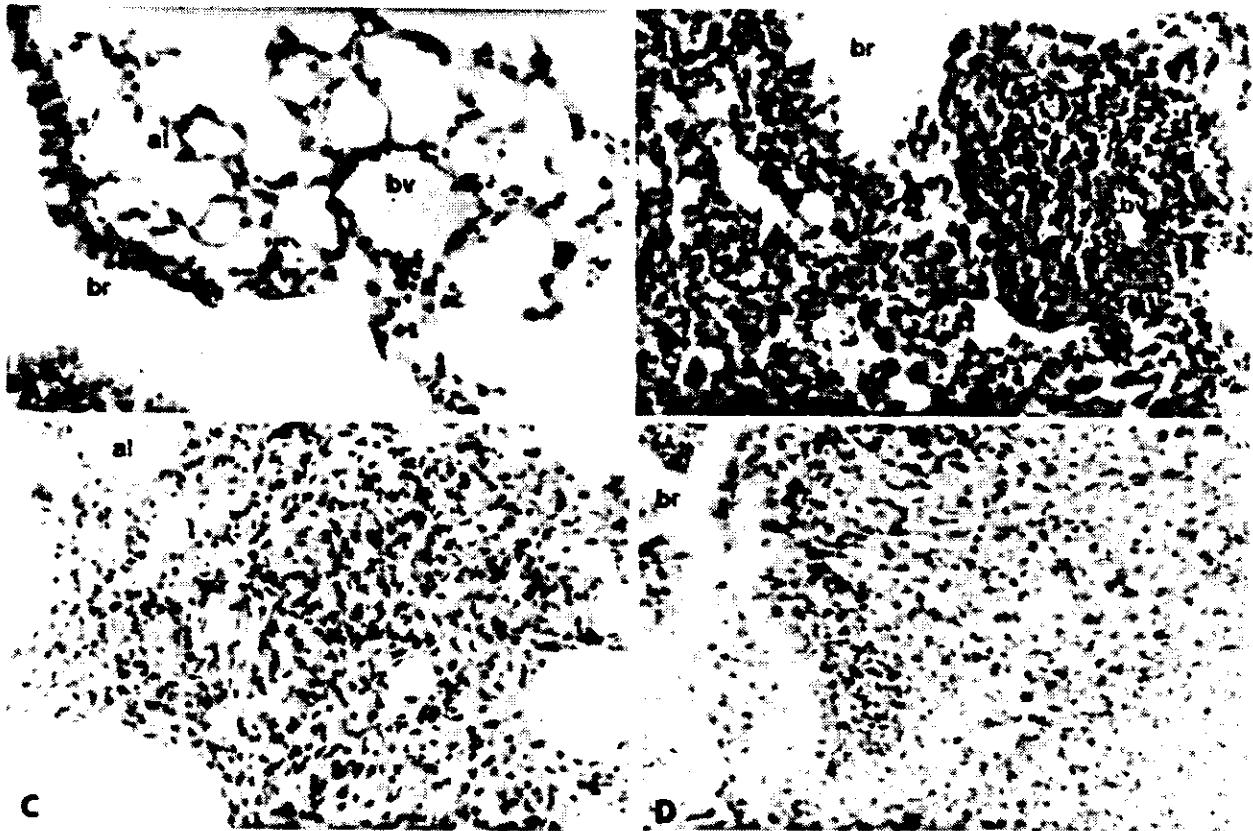


Figure 2: Microphotographies d'histologie pulmonaire montrant l'amplitude des lésions des groupes contrôle (A), Sr (B), Pp (C) et Sr+Pp (D)

* = différent du groupe contrôle ($p < 0,05$)

Abbréviations: Sr: *S. rectivirgula*; Pp: *P. pentosaceus*; Ll: *L. lactis*; br: bronche; bv: vaisseau sanguin; al: alvéole

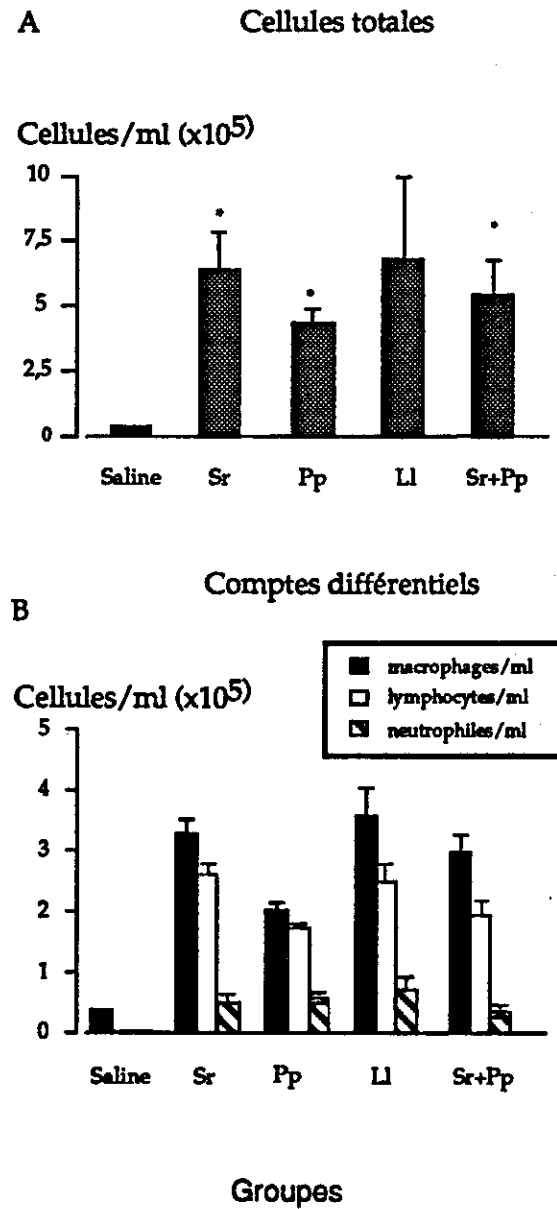


Figure 3: Cellules totales (A) et différentielles (B) du lavage bronchoalvéolaire (moyenne \pm SEM)
 * = différent du groupe contrôle
 Abréviations: Sr: *S. rectivirgula*; Pp: *P. pentosaceus*; Ll: *L. lactis*

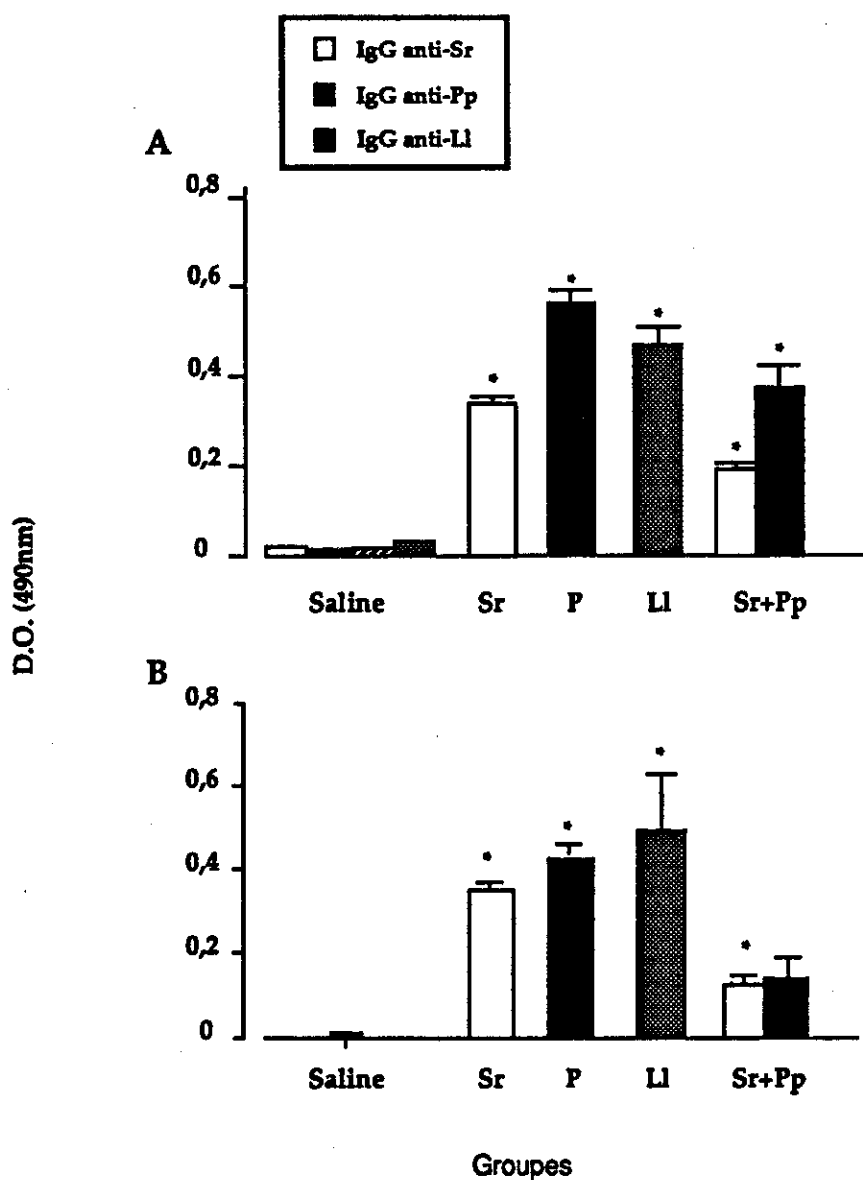


Figure 4: IgG spécifiques du sérum (A) et du lavage bronchoalvéolaire (B) exprimés en densité optique à 490nm (moyenne \pm SEM). Aucune réaction croisée ne fut observée.
 * = différent du groupe contrôle ($p < 0,05$)
 Abréviations: Sr: *S. rectivirgula*; Pp: *P. pentosaceus*; Ll: *L. lactis*

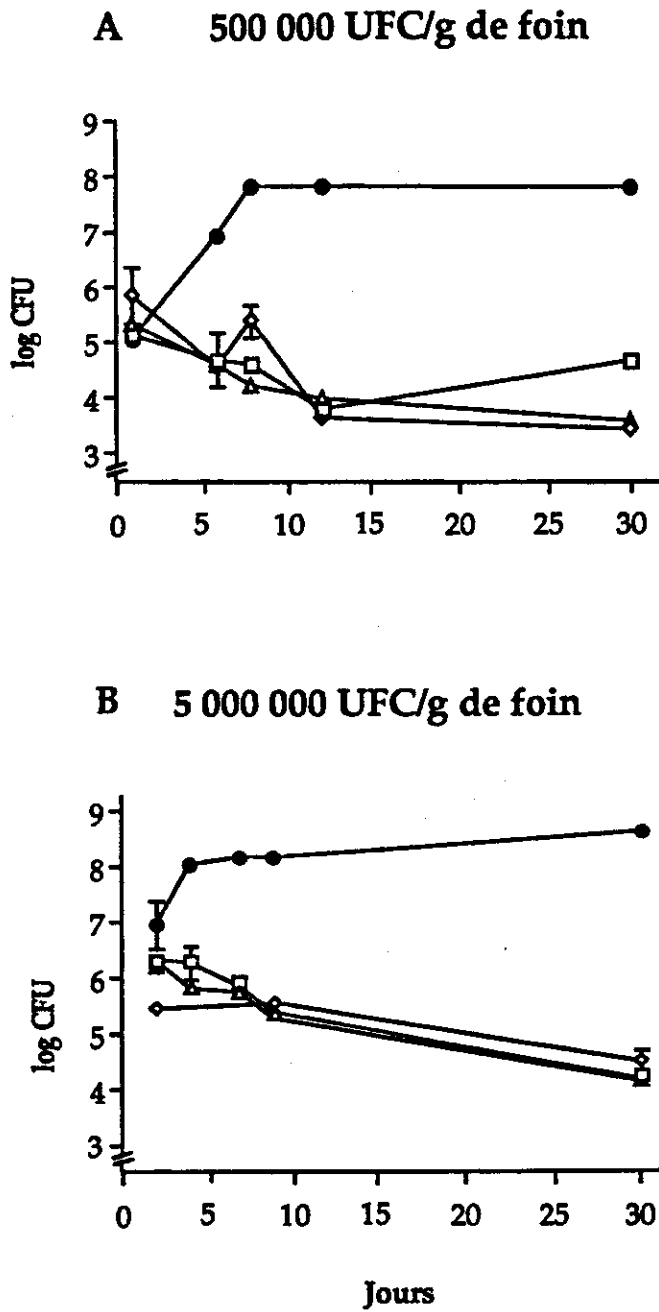


Figure 5: Croissance de *Pediococcus pentosaceus* inoculé à 500 000 UFC/g de foin (A) et 5 000 000 UFC/g de foin (B) à différents taux d'humidité (moyenne \pm SEM):
 20% Δ 25% \square 30% \diamond 35% \bullet

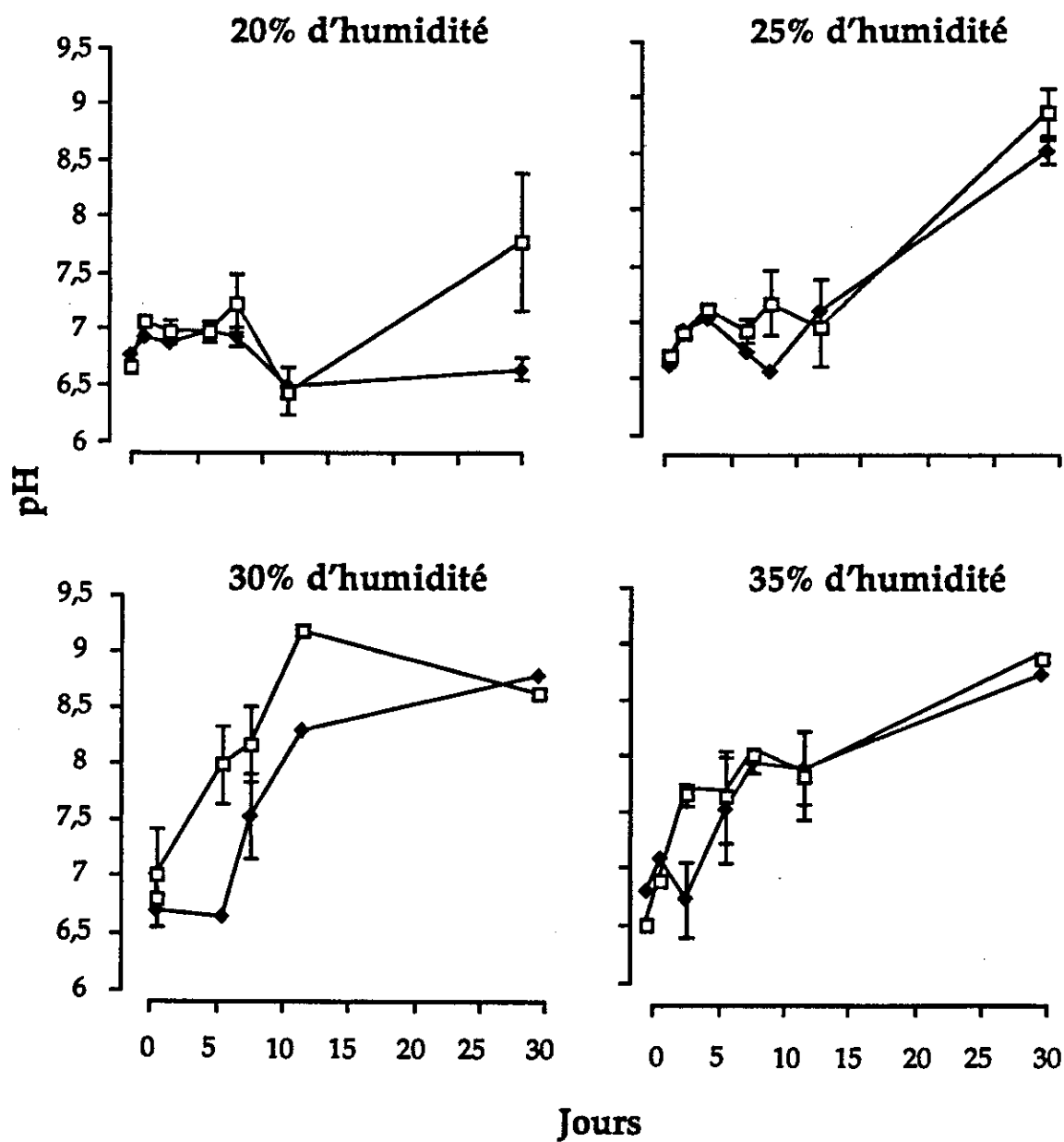


Figure 6: Évolution du pH du foin traité □ et non traité ◆ à différents taux d'humidité au cours des 30 jours d'entreposage. (moyenne \pm SEM): 20%, 25%, 30%, 35%.

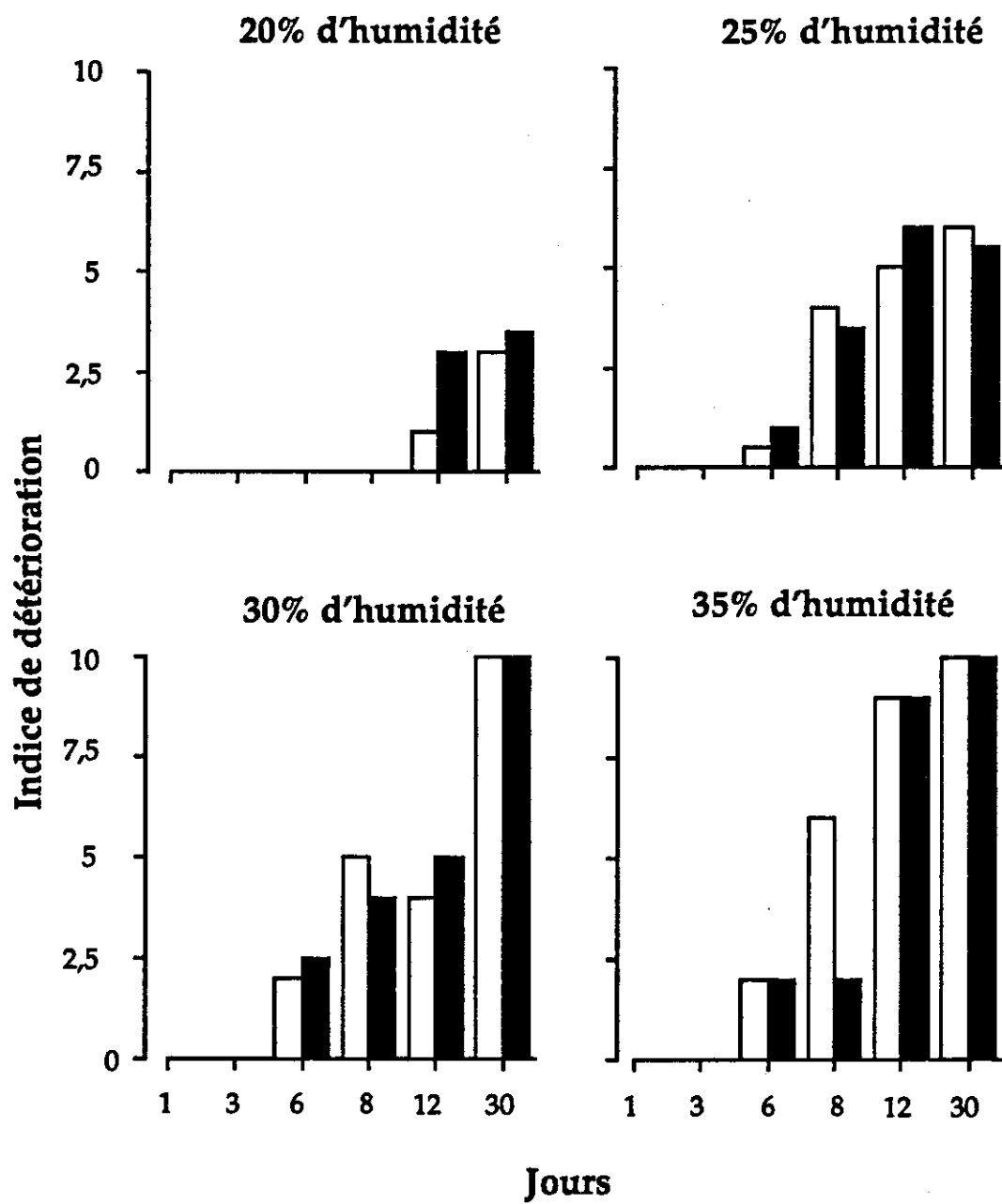


Figure 7: Détérioration visuelle du foin traité □ et non traité ■ à différents taux d'humidité: 20%, 25%, 30%, 35%.

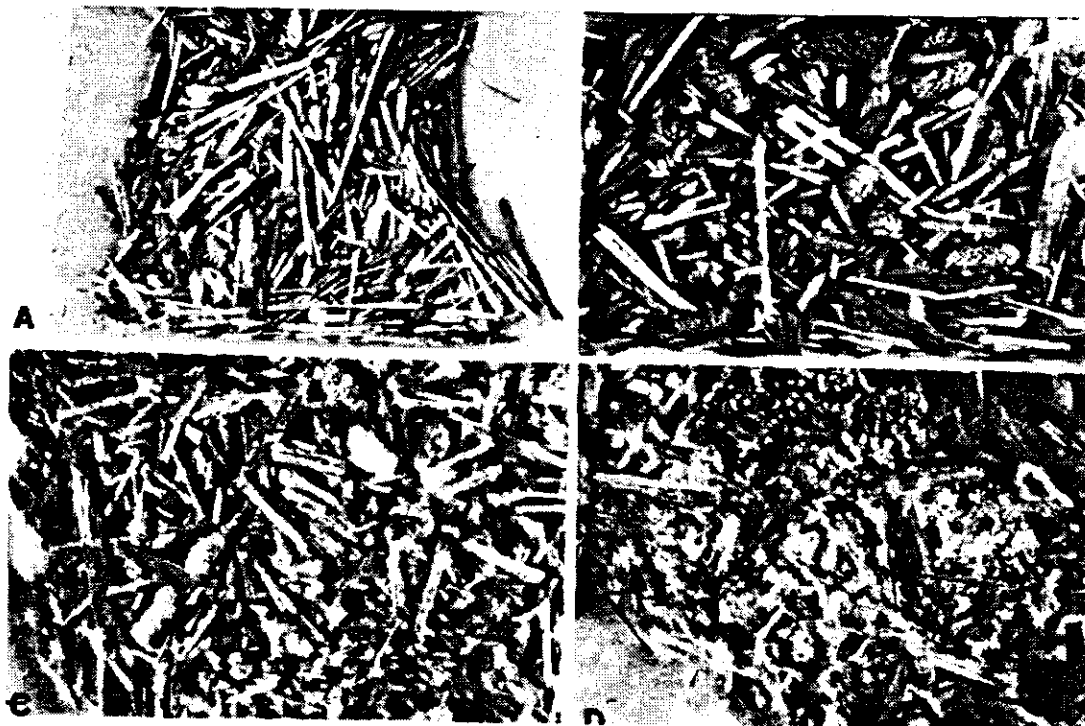


Figure 8: Photographies de foin

A) au jour 0

B) Non traité à 20% d'humidité au jour 30, coté 3

C) Non traité à 35% d'humidité après 30 jours, coté 10/10

D) Traité à 35% d'humidité après 30 jours, coté 10/10

Bactéries totales
($\times 10^6$ CFU/m³ d'air)

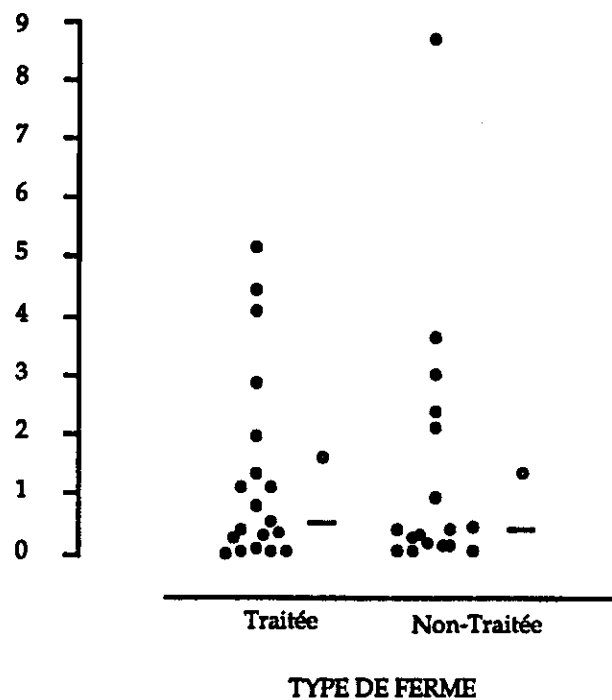


Figure 9: Bactéries totales/m³ d'air mesurées dans les fermes traitées ou non au *Pediococcus pentosaceus*
(•=moyenne —=médiane)

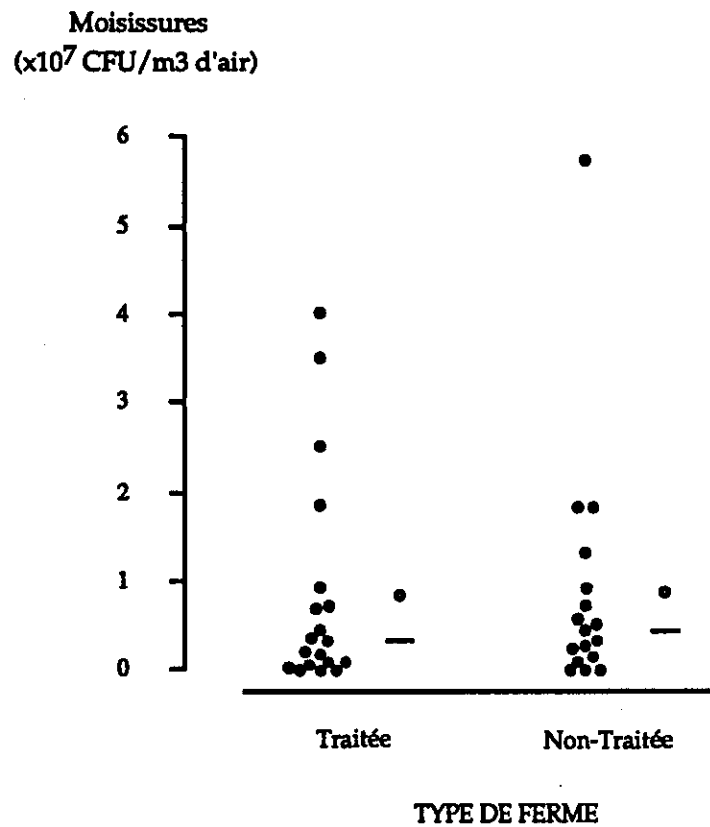


Figure 10: Moisissures totales isolées sur milieu SDA/m³ d'air mesurées dans les fermes traitées ou non au *Pediococcus pentosaceus* (•= moyenne —= médiane)

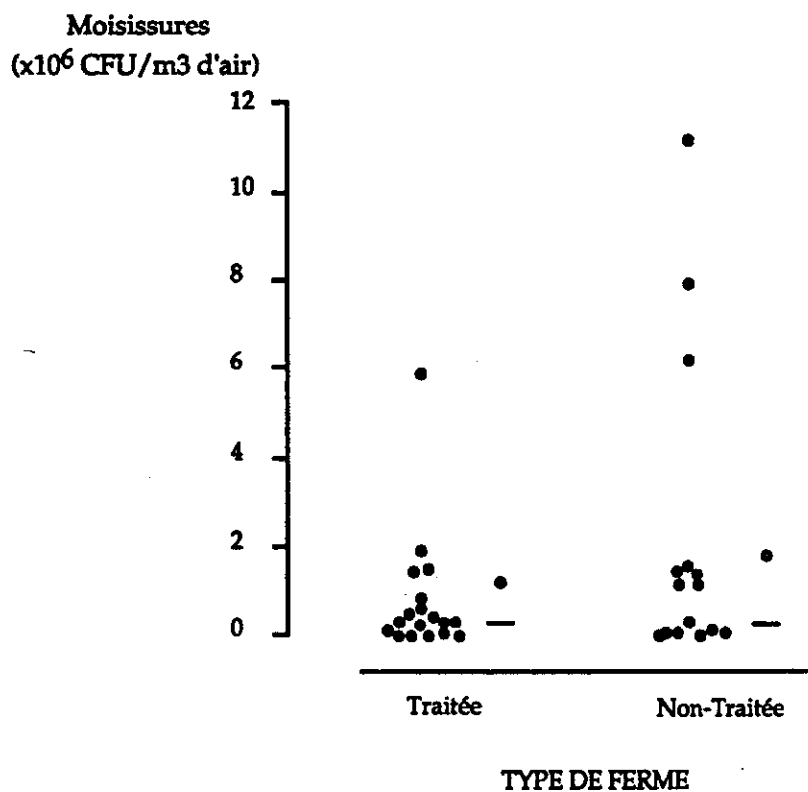


Figure 11: Moissures totales isolées sur milieu CZAPEK/m³ d'air mesurées dans les fermes traitées ou non au *Pediococcus pentosaceus* (•=moyenne —=médiane)

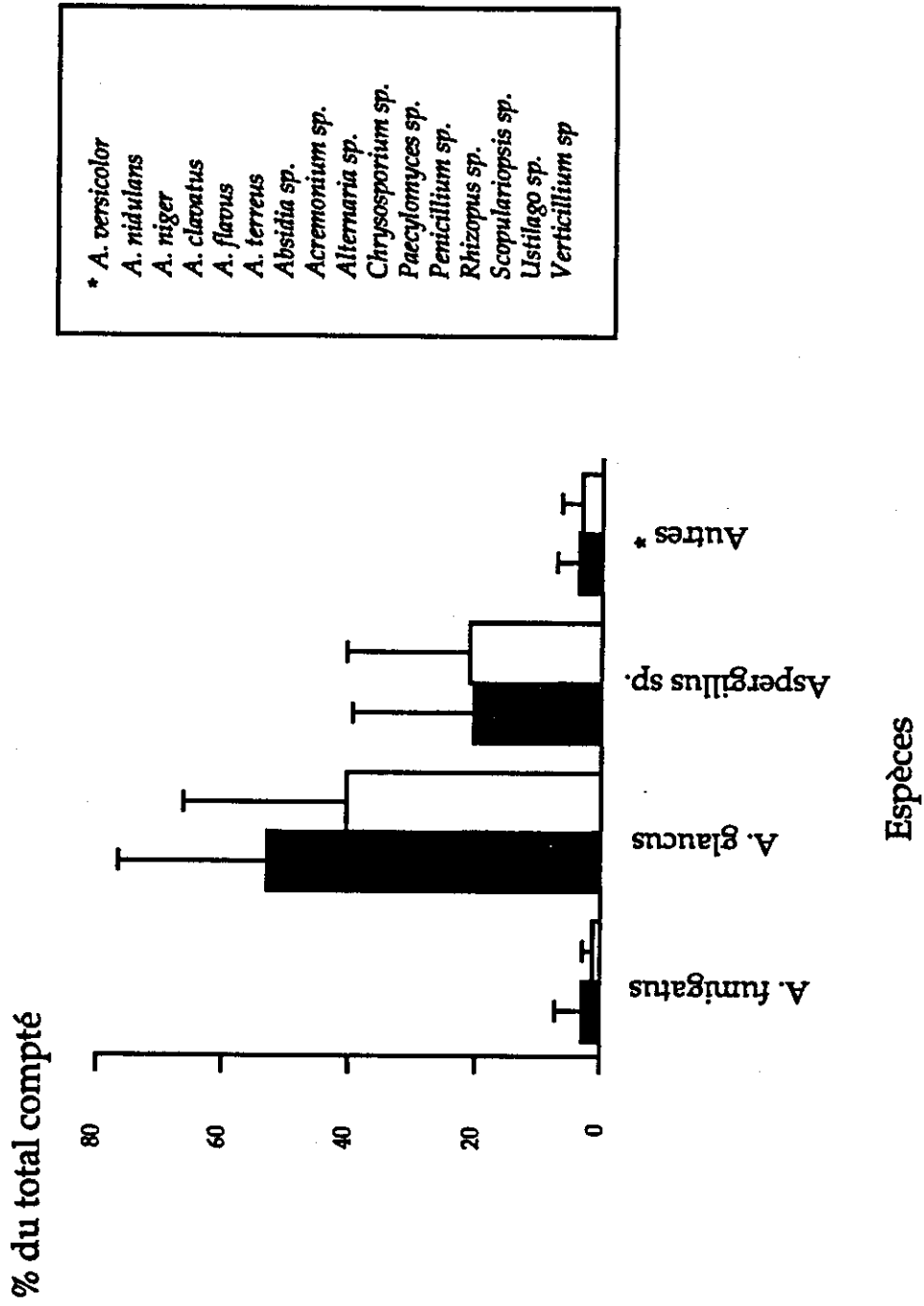
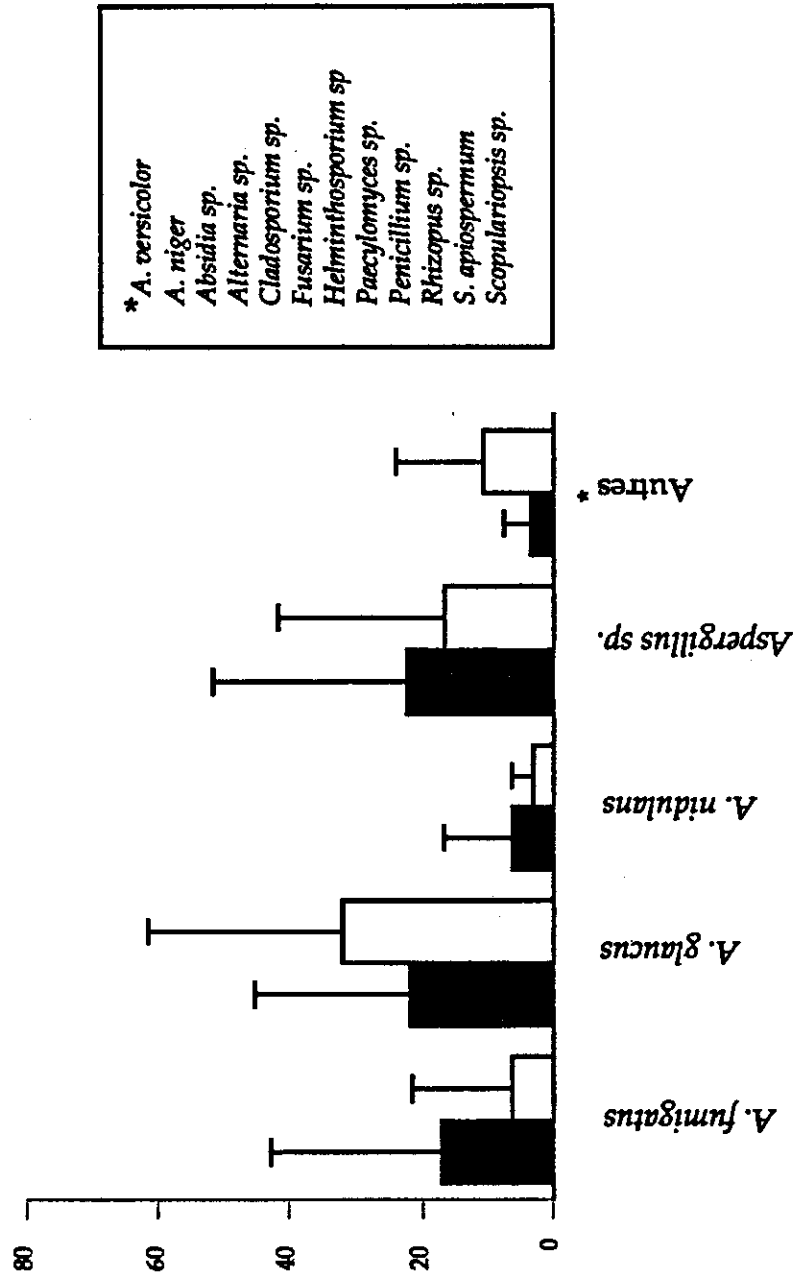


Figure 12: Espèces de moisissures isolées sur SDA

fermes traitées ■ ou non-traitées □

% du total compté



- * *A. versicolor*
- A. niger*
- Absidia sp.*
- Alternaria sp.*
- Cladosporium sp.*
- Fusarium sp.*
- Helminthosporium sp.*
- Paecylomyces sp.*
- Penicillium sp.*
- Rhizopus sp.*
- S. apiospermum*
- Scopulariopsis sp.*

Espèces

les fermes traitées ■ ou non traitées □

Figure 13: Espèces de moisissures isolées sur CZAPEK dans

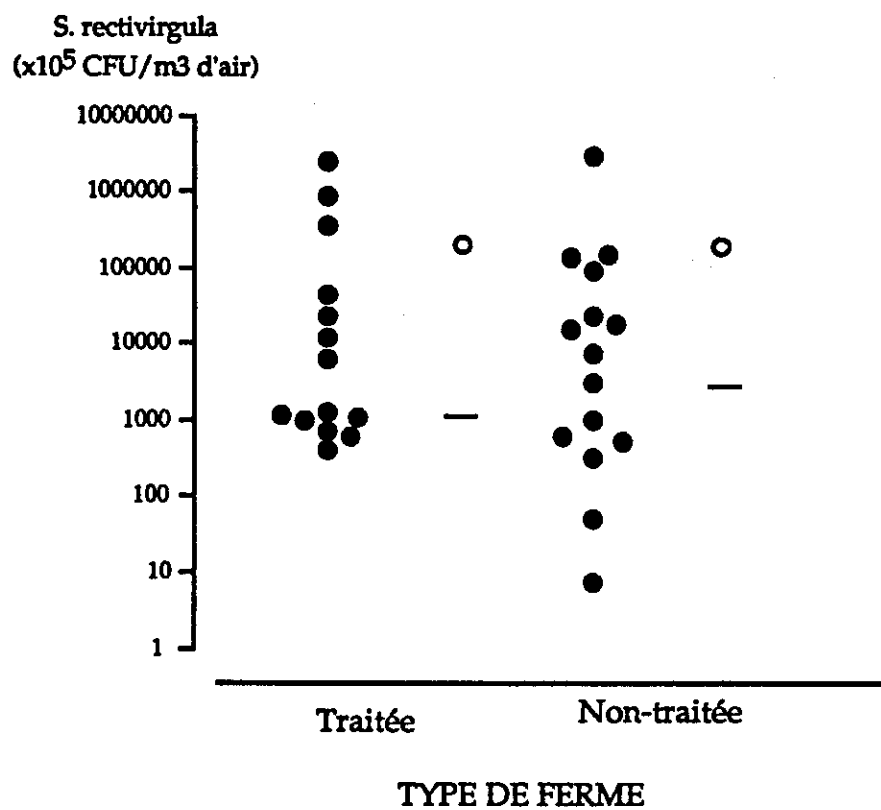


Figure 14: *S. rectivirgula* /m³ d'air mesurées dans les fermes traitées ou non au *Pediococcus pentosaceus*
(•= moyenne —= médiane)

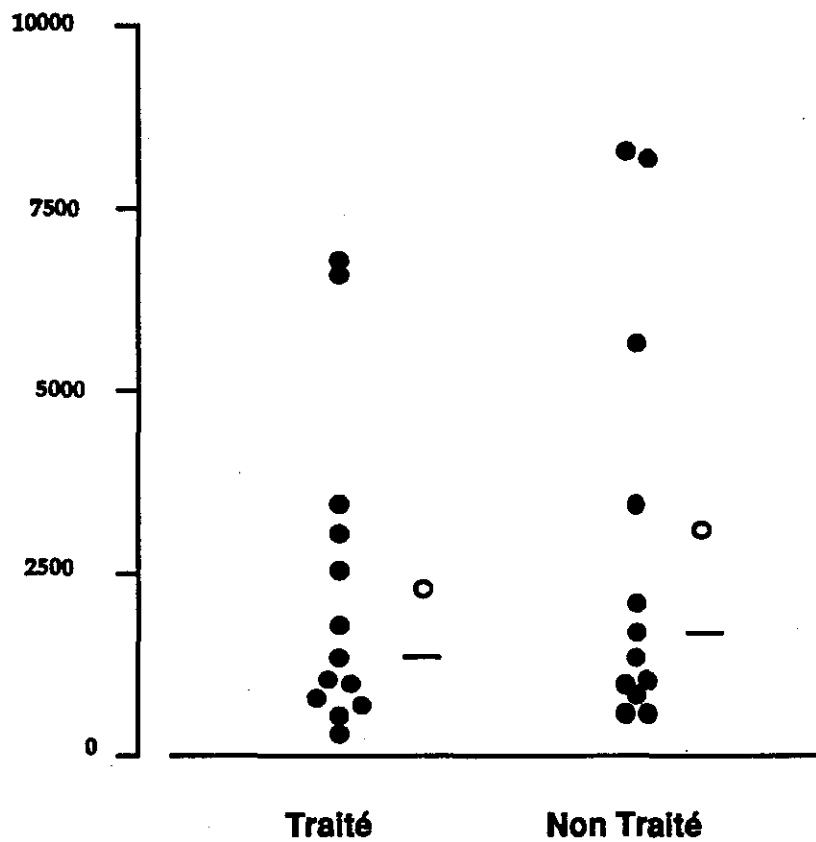
Endotoxines (UE/m³ d'air)

Figure 14a: Endotoxines (Unités d'endotoxines/m³ d'air) de l'air des fermes traitées ou non traitées (○=moyenne; —=médiane)

	Traité n=34	Non traité n=25
Hommes/femmes	29/5	22/3
âge moyen	40	39
A grandi sur une ferme	32 (94%)	24 (96%)
Travaille plus de 20 heures par semaine	27 (79%)	18 (80%)
Têtes de bétail		
50-75	19 (56%)	9 (36%)
plus de 75	12 (35%)	9 (36%)
25-50	2 (6%)	7 (28%)
Animaux nourris au foin sec	100	100
Moisissure dans le foin cette année		
aucune	2 (6%)	2 (8%)
1 à 5% du foin	22 (65%)	19 (78%)
5 à 10% du foin	5 (15%)	2 (8%)
10 à 30% du foin	4 (12%)	3 (12%)
Traitement pour le foin à base de bactéries	34 (100%)	0 (0%)
Tabagisme		
Fumeurs ou ex-fumeurs	11 (32%)	12 (48%)
Symptômes respiratoires		
Sifflements dans la poitrine et/ou essoufflements et/ou Essoufflement au repos et/ou Toux et expectorations	11 (32%)	9 (36%)
Asthme	2 (6%)	2 (8%)
Poumon du fermier	2 (6%)	2 (8%)
Poumon du fermier-parents	0 (0%)	0 (0%)
Allergies aux animaux, poussière, plumes	11 (31%)	6 (24%)
Allergies aux pollens	3 (9%)	5 (20%)
FVC (% de la prédite)	107	102
FEV1 (% de la prédite)	95	91
FEV1/FVC	72	72
Pourquoi utilisez-vous le <i>P. pentosaceus</i> ? n=30		
Empêcher le foin de chauffer	24 (80%)	ne s'applique pas
Empêcher la détérioration du foin	28 (93%)	
Augmenter la qualité nutritive	21 (70%)	
Protéger ma santé	14 (47%)	
Rentrer le foin plus humide	18 (60%)	

Figure 15: Tableau résumant les réponses aux questions sur la population étudiée, les signes et symptômes et les raisons motivant l'utilisation de préservatif de foin à base de bactéries

	IgG α <i>S. rectivirgula</i>	IgG α <i>A. glaucus</i>	IgG α <i>Alternaria sp.</i>
Traités (n=30)	9 (2)	2	2
Non traités (n=23)	8 (2)	3	3

Figure 16: tableau donnant le nombre de fermiers ayant démontré une présence d'IgG sériques spécifiques. Les valeurs entre parenthèse () donnent le nombre de fermiers ayant répondu très positivement au test d'anticorps (valeur très élevée).