

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-595



Caractérisation des bioaérosols par écologie microbienne moléculaire

*Caroline Duchaine
Valérie Létourneau
Benjamin Nehmé
Anne Mériaux
Yan Gilbert
Marc Veillette*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : 1-877-221-7046

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales
2009

ISBN : 978-2-89631-337-2 (version imprimée)

ISBN : 978-2-89631-338-9 (PDF)

ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
janvier 2009



Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

■ RAPPORT R-595

Caractérisation des bioaérosols par écologie microbienne moléculaire

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Caroline Duchaine^{1,2}, Valérie Létourneau¹, Benjamin Nehmé¹,
Anne Mériaux¹, Yan Gilbert¹, Marc Veillette¹*

*¹Centre de recherche, Institut de recherche en cardiologie
et en pneumologie, Hôpital Laval*

*²Département de biochimie et de microbiologie, Faculté
des sciences et de génie, Université Laval*

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSS

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les producteurs de porcs pour leur précieuse collaboration sans laquelle cette étude n'aurait pas été possible.

Nous remercions le Docteur Robert Forster d'Agriculture et agroalimentaire Canada (Lethbridge AL) qui a accueilli Benjamin Nehmé dans son laboratoire pour lui offrir son expertise pour la construction des arbres phylogénétiques.

Jonathan Roy-Chevalier et Hubert Morissette-Rouleau ont apporté leur soutien technique et nous les en remercions ainsi que Jakob Bonlokke et Arnold Radu qui ont effectué les échantillonnages sur le terrain durant l'été.

Nos remerciements vont également à Serge Simard pour les analyses statistiques.

Nous remercions également Agriculture et agroalimentaire Canada (Lennoxville QC) ainsi que l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) pour leur participation au recrutement des entreprises.

Cette étude a été rendue possible grâce à la subvention 288122-04 du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada à laquelle l'IRSST s'est joint.

SOMMAIRE

La santé des travailleurs a été abondamment étudiée et il est connu que les travailleurs des porcheries plus particulièrement peuvent développer des inflammations chroniques des voies respiratoires suite à l'inhalation de contaminants organiques, de gaz comme l'ammoniac provenant du lisier (NH₃) ou le gaz carbonique (CO₂) produit par l'activité des porcs. Pour documenter les causes de ces problèmes et y remédier, de nombreuses études ont été effectuées. Malheureusement il a toujours été difficile de faire le lien entre les causes et les effets.

En effet, par le passé, pour étudier la biodiversité dans l'environnement, beaucoup d'analyses étaient basées uniquement sur la culture des microorganismes. Or, les réactions d'inflammation étant causées par les protéines de surface, il n'est pas nécessaire que le microorganisme soit vivant pour provoquer une inflammation celle-ci pouvant même être initiée par des débris cellulaires

Il est donc nécessaire d'appliquer des méthodes autres que la culture car celle-ci limite la biodiversité microbienne par le choix des milieux de culture et sous-estime également la charge microbiologique, les organismes n'étant pas toujours « récupérables » sur les différents milieux.

Des approches alternatives sont maintenant disponibles. Il s'agit de méthodes basées sur la biologie moléculaire qui se servent de l'étude des séquences des gènes conservés de l'ADN bactérien 16S ou de l'ADN eucaryote 18S, ce qui permet de décrire la biodiversité d'un milieu sans avoir recours à la culture. Ces méthodes ont été largement utilisées dans l'étude de la microbiologie des sols, mais n'ont pas encore été appliquées à l'étude des bioaérosols (particules biologiques en suspension dans l'air).

Nos objectifs dans ce projet étaient donc, en appliquant les méthodes de biologie moléculaire comparées à la méthode classique de la culture, d'étudier l'influence des saisons et l'influence du mode de gestion du lisier sur la charge et la nature des bioaérosols.

Vingt-six entreprises de production porcine ont été recrutées dans les environs de Québec (150km) et la plupart (18) ont été visitées à trois reprises, deux fois en hiver et une fois en été. Vingt-deux (22) porcheries faisaient de l'engraissement sur lattes, les quatre autres pratiquant l'engraissement sur litière (profonde ou non). L'étude de la biodiversité, de certains pathogènes ainsi que l'étude de la charge microbiologique totale ont été effectuées à l'aide des méthodes de biologie moléculaire et des méthodes classiques de culture sur les échantillons d'air recueillis à l'aide de divers échantillonneurs.

Il en ressort que, même si la température diminue dans les engraissements sur litière par rapport aux engraissements sur lattes, la concentration totale des bactéries cultivables dans l'air est plus élevée dans les engraissements sur litière que dans les engraissements sur lattes. Par contre cette différence n'apparaît pas quand on fait l'analyse par biologie moléculaire, cette méthode donnant cependant des concentrations 1000 fois plus élevées que les comptes cultivables.

Certains pathogènes sont retrouvés dans l'air et, dépendant de la nature du microorganisme, certains sont observés uniquement par culture alors que pour d'autres l'analyse par biologie moléculaire donne de meilleurs résultats.

L'analyse par biologie moléculaire a permis d'établir que la charge microbiologique totale ainsi que les concentrations de certains pathogènes (*Enterococcus* sp. et *E. coli*) étaient plus élevées en hiver qu'en été. D'autre part, il a été démontré que la biodiversité ne varie pas selon les saisons indépendamment des variations de ventilation et de température et qu'elle est constituée à 94% de bactéries à gram-positif appartenant principalement au groupe des bactéries fermentaires provenant de l'intestin du porc.

Les outils de biologie moléculaire ont également permis de mettre en évidence la présence d'archaebactéries, les concentrations étant du même ordre que celles des bactéries totales et diminuant de 3,5 fois durant l'été.

Notre étude a donc permis de démontrer la faisabilité et l'utilité des outils de biologie moléculaire pour la caractérisation des bioaérosols en milieu agricole. Cependant, les analyses utilisant ces nouvelles technologies ont elles aussi leurs limites techniques pouvant influencer l'étendue de la biodiversité observée, notamment à cause des limites de détection relativement élevées de celles-ci. Les méthodes de culture demeurent encore un complément essentiel aux études moléculaires.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	3
3. MATÉRIEL ET MÉTHODE	5
3.1 RECRUTEMENT DES PORCHERIES	5
3.2 PROTOCOLES DE PRÉLÈVEMENT.....	6
3.2.1 <i>Protocole 1 ou caractérisation exhaustive.....</i>	7
3.2.2 <i>Protocole 2 ou caractérisation partielle.....</i>	9
3.3 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PAR BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	9
3.3.1 <i>Extraction de l'ADN total.....</i>	9
3.3.2 <i>Quantification des bactéries totales et des différents pathogènes.....</i>	9
3.3.3 <i>Identification des bactéries pathogènes.....</i>	10
3.3.4 <i>Analyse de la biodiversité des bactéries totales.....</i>	10
3.3.5 <i>Analyse des archaeobactéries.....</i>	11
3.4 TESTS STATISTIQUES.....	12
4. RÉSULTATS.....	13
4.1 IMPACT DU TYPE DE GESTION DU LISIER SUR LA TEMPÉRATURE ET LES CONCENTRATIONS EN BACTÉRIES DANS L' AIR	13
4.1.1 <i>Comparaison de la température et de l'humidité dans les 2 types de porcheries</i>	13
4.1.2 <i>Détermination de la concentration par culture (bactéries cultivables) et par biologie moléculaire (bactéries totales) des bactéries aérosolisées dans les deux types de porcheries</i>	13
4.1.3 <i>Détermination de la concentration des pathogènes humains dans l' air</i>	14
4.2 INFLUENCE DES SAISONS SUR LES CONCENTRATIONS DE BACTÉRIES TOTALES, LA BIODIVERSITÉ ET LES ARCHAEABACTÉRIES	17
4.2.1 <i>Concentrations de bactéries totales.....</i>	17
4.2.2 <i>Biodiversité des bactéries</i>	17
4.2.3 <i>Archaeobactéries</i>	21
5. DISCUSSION.....	25
5.1 INFLUENCE DU TYPE DE GESTION DU LISIER SUR LES CONCENTRATIONS DE BIOAÉROSOLS DANS L' AIR	25
5.2 INFLUENCE DE LA SAISON SUR LES CONCENTRATIONS DE BACTÉRIES TOTALES, LA BIODIVERSITÉ DES BACTÉRIES ET DES ARCHAEABACTÉRIES	25
6. CONCLUSION	29
7. LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS.....	31
7.1 ARTICLES PUBLIÉS OU EN PRÉPARATION.....	31
7.2 COMMUNICATIONS	31
8. BIBLIOGRAPHIE.....	33
9. ANNEXE.....	37
ACCEPTATION DU CONTENU PAR LES AUTEURS	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Calendrier des visites dans les porcheries et type d'entreprise.....	5-6
Tableau 2	Types et conditions d'échantillonnages.....	7
Tableau 3	Milieux et conditions de culture des microorganismes.....	8
Tableau 4	Résumé des séquences des amorces et sondes utilisées.....	11
Tableau 5	Comparaison des concentrations de bactéries totales et des différents pathogènes selon les saisons.....	17
Tableau 6	Identification la plus probable obtenue suite à l'excision, ré-amplification et séquençage des bandes des gels DGGE (ADNr16S).....	19

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation schématique des méthodes utilisées pour quantifier les archaeobactéries et analyser la biodiversité	12
Figure 2:	Température et humidité relative à l'intérieur des 18 porcheries étudiées....	13
Figure 3:	Comparaison des concentrations des bactéries totales par culture et PCR dans les deux types de porcheries.....	14
Figure 4:	Concentrations de <i>Campylobacter</i> sp. dans les porcheries visitées.....	15
Figure 5:	Concentrations de <i>C. perfringens</i> dans les porcheries étudiées	15
Figure 6:	Concentrations d'<i>Enterococcus</i> sp. dans les porcheries étudiées.....	16
Figure 7:	Concentrations d'<i>E.coli</i> dans les porcheries étudiées.....	16
Figure 8:	Profils DGGE de l'ADN extrait des bioaérosols de 8 porcheries (A,B,C,D,E,F,G,H) durant deux hivers et un été. M= contrôle de migration de standard d'ADN (reproduit de Nehmé et al, 2008).....	18
Figure 9:	Arbre phylogénétique dérivé de 2 échantillons de bioaérosols prélevés durant l'hiver (extrait de Nehmé et al 2008).....	20
Figure 10:	Corrélation entre les concentrations de bactéries totales dans l'air et les concentrations d'archaeobactéries.....	21
Figure 11:	Profils DGGE de l'ADN extrait des bioaérosols de 8 porcheries (A,B,C,D,E,F,G,H) durant deux hivers et un été.....	22
Figure 12:	Arbre phylogénétique établi à partir de trois échantillons de bioaérosols prélevés durant l'hiver.....	23

1. INTRODUCTION

Au Canada, depuis les 50 dernières années, les éleveurs de porcs ont intensifié leur production avec pour conséquence un accroissement de la densité animale et des changements majeurs dans l'organisation du travail, la topographie de bâtiments et la gestion du lisier. En 1950, la production était d'environ 13,5 porcs/ferme tandis qu'elle atteignait 1162 porcs/ferme en 2006 (statistiques Canada <http://www.statcan.ca>).

La production étant devenue extensive, les producteurs passent donc beaucoup plus de temps dans les différents bâtiments de leur exploitation et sont donc plus exposés à leur environnement. La piètre qualité de l'air n'affecte pas seulement la santé du producteur de porc, elle peut également affecter la croissance du porc.

La santé des travailleurs a été abondamment étudiée et il est connu que les travailleurs des porcheries peuvent développer des inflammations chroniques des voies respiratoires suite à l'inhalation de contaminants organiques, mais également par contact avec des gaz comme l'ammoniac (NH_3) ou l'hydrogène sulfureux (H_2S) qui peuvent provenir du lisier ou de la litière et le gaz carbonique (CO_2) qui vient de l'activité des porcs.

Par le passé, beaucoup d'analyses de l'environnement reposaient sur la culture des microorganismes, ce qui excluait les microorganismes non vivants et les débris de microorganismes qui peuvent avoir un potentiel allergénique important et être également dommageables pour la santé.

Il est donc important de caractériser le mieux possible l'environnement des travailleurs des porcheries par de nouvelles méthodes de façon à ce que les analyses représentent le plus possible la réalité.

2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Comme il a été souligné précédemment, les travailleurs de milieux industriels telles les scieries, les tourbières et les entreprises d'usinage de métaux peuvent être exposés à de grandes concentrations de bioaérosols. Le milieu agricole peut être également une grande source de bioaérosols et de tels environnements peuvent conduire à l'apparition de pathologies respiratoires, notamment l'asthme professionnel, l'alvéolite allergique, le syndrome toxique des poussières organiques ou la mycotoxicose.

Les études visant à comprendre les problèmes de santé en fonction de l'environnement de travail sont rarement concluantes.

Certaines études attribuent ce manque de données probantes à des lacunes de la culture microbienne dans l'évaluation des bioaérosols. En effet, la sous-estimation dramatique de la culture microbienne a déjà été mise en lumière (Amman *et al.*, 1995). La comparaison des comptes microbiens de différents environnements obtenus par culture et les comptes microscopiques directs permet d'affirmer que la culture sous-estime de 100 à 10 000 fois les comptes réels. Il faut se rappeler qu'il n'est pas nécessaire que les microorganismes soient vivants pour causer des dommages sur la santé (Mesbostad *et al.*, 2001).

Si la culture sous-estime la concentration des microorganismes dans l'air, elle a également un impact sur l'évaluation de la biodiversité microbienne. Le choix du milieu de culture, les stress subis par les microorganismes lors de leur aérosolisation ainsi que ceux qui leur sont imposés lors de l'échantillonnage diminuent de façon substantielle le taux de recouvrement des microorganismes par culture (Heidelberg *et al.*, 1997).

Pour pallier aux lacunes de la culture microbienne, des approches alternatives et complémentaires sont maintenant disponibles : il s'agit de méthodes basées sur la biologie moléculaire. Elles ont été intensivement appliquées à l'étude de la microbiologie du sol, mais n'ont jamais été utilisées pour l'étude des microorganismes dans l'air.

Ces méthodes basées sur l'analyse de la biodiversité génétique, permettent de décrire les consortiums microbiens présents dans des environnements complexes. L'analyse de la diversité des séquences des gènes conservés tels d'ADNr 16S bactérien et l'ADNr eucaryote 18S permet l'étude de la biodiversité sans avoir recours à la culture. Elle permet une description exhaustive et la quantification de la biomasse (16S et 18S) dans divers environnements ce qui pourrait conduire à la description de bactéries aérosolisées jamais décrites par les méthodes de culture.

Il est connu que le milieu agricole génère de grandes concentrations d'aérosols (Duchaine *et al.*, 1999) et plus particulièrement l'environnement des travailleurs des porcheries (Donham K *et al.*, 1989, Cormier *et al.*, 1990). C'est la raison pour laquelle ce milieu a été choisi comme modèle pour tester la faisabilité d'études d'écologie microbienne moléculaire pour analyser les bioaérosols microbiens.

L'objectif de ce projet était d'étudier les bioaérosols dans les porcheries du Québec de la façon la plus exhaustive possible à l'aide d'outils de biologie moléculaire comparés aux méthodes classiques de culture.

De façon plus spécifique, ces méthodes ont été utilisées et comparées pour étudier l'influence des saisons et l'influence du mode de gestion du lisier sur la charge microbologique et la nature des bioaérosols dans les porcheries (bactéries, pathogènes humains et archaebactéries).

3. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Recrutement des porcheries

Vingt-six entreprises ont été recrutées dans un rayon de cent à cent-cinquante kilomètres de la ville de Québec. La plupart ont été visitées à trois reprises durant l'étude: une fois en hiver pour avoir un niveau de base de l'exposition aux bioaérosols, une autre fois en été où, en principe, le niveau d'exposition devrait être moindre, la ventilation étant à son maximum, la troisième visite étant réalisée pour le bénéfice d'un autre projet. Ces entreprises, de tailles variées devaient avoir un système de ventilation mécanique et la plupart étaient en engraissement sur lattes, des études précédentes ayant démontré que ceux-ci avaient un niveau de poussières organiques plus élevé que les maternités (Cormier *et al.*, 1990). Parmi les porcheries précédentes, deux utilisaient un système de séparation à la source. Quatre porcheries faisaient de l'engraissement sur litières et le tableau 1 dresse un portrait de l'étalement des visites dans les entreprises. Le choix du parc dans l'entreprise était déterminé par l'âge des porcs. En principe le parc où les porcs étaient en fin d'engraissement était choisi, ce qui devait donner un maximum de contamination dans l'air. En général, les trois visites se faisaient dans le même type de parc (% de lattes similaire), mais des circonstances indépendantes de notre volonté (ex : âge des porcs) nous ont forcés à changer de type de parc comme dans les porcheries 5, 13 et 14.

Tableau 1- Calendrier des visites dans les porcheries et type d'entreprise

# ID porcherie	Date de visite (B)	Date de visite (P)	Date de visite (E)	Situation géographique	Type d'entreprise
1	1-B 08/02/05				Engraissement 66% lattes
2	2-B 05/04/05	2-P 22/02/05	2-E 17/06/05	St-Bernard	Engraissement 100% lattes
3M	3M-B 03/03/06	3M-P 20/01/06	3M-E 20/06/06	St-Lambert	Maternité 100% lattes
4	4-B 26/04/05	4-P 15/03/05	4-E 09/08/05	St-Bernard	Engraissement 66% lattes
5	5-B 06/01/06	5-P 22/03/05	5-E 16/06/05	St-Bernard	Gestation 66% lattes (B et E) 50% (P)
6		6-P 29/03/05	6-E 14/06/05	St-Bernard	Engraissement 33% lattes
7	7-B 29/11/05	7-P 12/04/05	7-E 05/07/05	Honfleur	Engraissement 100% lattes
8	8-B 14/03/06	8-P 19/04/05	8-E 31/05/05	St-Gabriel	Engraissement 100% lattes
9	9-B 24/01/06	9-P 18/10/05	9-E 28/06/05	Beaumont	Engraissement 66% lattes
10	10-B 09/01/06	10-P 6/12/05	10-E 13/07/05	Deschambault	Engraissement 100% lattes
11	11-B 7/02/06	11-P 08/11/05	11-E 19/07/05	St-Bernard	Engraissement 66% lattes

Tableau 1- Calendrier des visites et types d'entreprise (suite)

12	12-B 13/12/05	12-P 17/11/05	12-E 21/07/05	St Elzéar	Engraissement 33% lattes
13	13-B 03/02/06	13-P 11/11/05	13-E 02/08/05	Frampton	Engraissement 66% latté (E et B) 1% (P)
14	14-B 21/02/06	14-P 9/12/05	14-E 16/08/05	St-Bernard	Engraissement 33% lattes (P et E) 50% (B)
15	15-B₂				Engraissement/latte Séparation à la source
15	15-B 07/04/06	15-P 28/03/06	15-E 14/09/05	St-Isidore	Engraissement 100% lattes
16	16-B 21/03/06	16-P 25/10/05	16-E 30/08/05	St-Bernard	Engraissement 33% lattes
17	17-B 1/11/05			St-Louis de Blandford	Engraissement/lattes Séparation à la source
18	18-B 15/11/05				Engraissement 33% lattes
19	19-B 28/02/06	19-P 25/11/05	19-E 30/05/06	Ste Brigitte des saults	Engraissement 33% lattes
20	20-B 07/03/06	20-P 17/01/06		Ste-Croix	Engraissement 33% lattes
21	21-B 17/03/06	21-P 30/01/06	21-E 02/06/06	Deschambault	Engraissement 33% lattes(B et E) 50% (P)
22	22-B 31/03/06	22-P 14/02/06	22-E 14/07/06	Ste-Catherine	Engraissement 33% lattes
3	3-L 10/03/05			St Lambert	Engraissement Sur litière profonde
23	23-L 07/03/06			St Bernard	Engraissement Sur litière
24	24-L 17/03/06			St Narcisse de Beau rivage	Engraissement Sur litière
25	25-L 31/03/06			Ste Hénédine	Engraissement Sur litière

Les parties ombrées représentent les entreprises où la biodiversité (bactéries et archaebactéries) a été étudiée

B = niveau de base hiver (**en gras** = visite avec échantillonnage protocole 1 (cf tableau 2))

P = 2ème visite d'hiver

E = visite été

L= visite hiver dans engraissement sur litière

3.2 Protocoles de prélèvement

Pour la plupart des visites, l'échantillonnage s'est toujours déroulé en poste fixe sur des tables à une hauteur de 1m par rapport au niveau du sol et de la même façon, selon 2 protocoles possibles dont les conditions sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2- Types et conditions d'échantillonnages

Échantillonneurs	Nature de l'échantillonnage	Postes fixes (Temps d'échantillonnage)	
		Protocole 2	Protocole 1
Cassettes 37mm Filtre PVC	Poussières totales	2 h	4h
IOM 25mm Filtre PVC	Poussières inhalables		4h
IOM 25mm Filtre gélatine	Biodiversité (qPCR) Pathogènes par biologie moléculaire	2h	4h
Cassettes 37mm Filtre Fibre de verre	Endotoxines		4h
AGI-30	Culture Quantification pathogènes humains par PCR quantitatif		3x3 barboteurs x 16min
Andersen	Culture Identification par biologie moléculaire des colonies de pathogènes isolées		2x10 milieux de culture milieux et temps variant selon le microorganisme recherché
Toxi-Ultra	NH ₃	2h en continu	En continu/ journée
Q-Track plus	CO ₂	2h en continu	En continu/ journée
Q-Track plus	Température	2h en continu	En continu/ journée
Q-Track plus	Humidité	2h en continu	En continu/ journée

Les parties ombrées représentent les échantillons qui ont servi pour la comparaison culture/biologie moléculaire

3.2.1 Protocole 1 ou caractérisation exhaustive

Il s'agit du protocole où l'environnement a été décrit de la façon la plus exhaustive possible grâce à différents échantillonneurs qui permettent soit la culture soit l'analyse par biologie moléculaire.

Échantillonnage avec AGI-30

À trois reprises au cours de la journée (10h, 13h et 15h) l'échantillonnage a été effectué à l'aide de 3 AGI-30 (Ace Glass Inc, Vineland, NJ, USA) en parallèle contenant 20ml d'H₂O physiologique (0,9% NaCl) stérile et filtrée. Les AGI-30 étaient reliés à une pompe Gast (Gast manufacturing, Benton Harbor' MI, USA) fonctionnant à un débit de 12.5L/min pendant 16 minutes. Le liquide de tous les barboteurs de la journée (9) a été regroupé et complété à un volume final de 200ml, les barboteurs ayant été rincés avec une solution d'H₂O physiologique stérile et filtrée contenant 0,1% de Tween 20 ce qui résulte en une concentration finale de Tween 20 entre 0,02 et 0,025%. Ce dernier sert à humidifier les spores de moisissures et à disperser les agrégats. Deux barboteurs non échantillonnés traités de la même façon ont servi de témoins ou de blancs selon les analyses effectuées ultérieurement. Ces solutions ont servi à faire de la culture directe de bactéries et moisissures par dilutions sériées sur des milieux de culture appropriés répertoriés dans le tableau 3. Ce liquide a également servi à l'analyse par biologie moléculaire des différents pathogènes ainsi qu'à la quantification des bactéries totales.

Échantillonnage avec impacteurs Andersen

Des impacteurs Andersen 6-étages reliés à une pompe Gast tirant à un débit de 28,3L/min, ont été montés en parallèle avec différents milieux de culture à différents temps d'échantillonnage pour dénombrer par culture selon les milieux et les températures appropriés, les microorganismes répertoriés au tableau 3. Les temps d'échantillonnage ont varié selon le microorganisme recherché. Les échantillonnages ont été faits à deux reprises dans la journée, soit une fois en matinée et une fois en après-midi. Après incubation, les comptes totaux des différents microorganismes ont été déterminés par la méthode des trous positifs (Andersen, 1958). Les moisissures ont été comptées, mais leur présence étant négligeable par rapport aux bactéries, il n'en a pas été tenu compte dans les résultats. Les pathogènes ciblés ont été isolés, purifiés et contrôlés à l'aide de tests biochimiques comme Gram, catalase, oxydase, *Campylobacter* test kit-Oxoid, Salmonella latex kit-Oxoid, lactose broth, tryptone broth, enterococcosel broth, brain heart infusion broth + 6.5%NaCl. Pour confirmer l'identification de *C. perfringens*, MUP-ONPG a été utilisé. Celui-ci consiste en 4-Methylumbelliferyl phosphate Disodium salt et 2-Nitrophenyl beta-D-galactopyranoside dont l'hydrolyse indique respectivement la présence d'une phosphatase acide et d'une beta-galactosidase (enzymes produites par *C. perfringens*). Tous les pathogènes suspectés ont également été conservés par congélation à -80°C pour identification ultérieure par biologie moléculaire.

Tableau 3- Milieux et conditions de culture des microorganismes

Nature du microorganisme recherché	Temps d'échantillonnage /Andersen	Milieu de culture	Température d'incubation °C	Temps d'incubation
Bactéries mésophiles		Brain Heart Infusion Agar +Amphotéricine B (BHIA)	25	48 h
Moisissures mésophiles	5	Rose Bengal Agar + Chloramphenicol (RBA)	25	7 jours
<i>Escherichia coli</i>	20	mFC-5-bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-b-d-Glucuronic acid Agar (mFC-BCIGA)	42	O/N*
<i>Clostridium perfringens</i>	20	modified Clostridium Perfringens Agar (mCPA)	44,5 Anaérobie	O/N
<i>Campylobacter</i> sp.	20	modified Cefoperazone Charcoal Desoxycholate Agar (mCCDA)	42 Microaéro.	48 h
<i>Enterococcus</i> sp.	5	mEnter. agar	37	48 h
<i>Yersinia enterocolitica</i>	20	Cefsulodin Irgasanâ Novobiocin Agar (CINA)	25	48 h
<i>Salmonella</i> sp.	20	Brilliant Green Sulpha Agar (BGSA)	42	O/N
<i>Salmonella</i> sp.	20	modified Lysine Iron Agar (mLIA)	42	O/N

* O/N: incubation toute la nuit

Échantillonnage pour l'étude de la biodiversité par biologie moléculaire

Trois filtres en gélatine (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA) de 25mm de diamètre ont été montés sur des cassettes IOM reliées à des pompes Gilair 5 tirant à un débit de 2L/min. Un filtre monté de la même façon a servi de témoin. Les filtres échantillonnés ont été gardés sur glace jusqu'à leur traitement au laboratoire. Dès retour au laboratoire, les trois filtres ont été regroupés et solubilisés dans 15ml d'H₂O physiologique stérile et filtrée, le filtre témoin étant solubilisé dans 5 ml. Les solutions ont été agitées au vortex durant 30 minutes à température pièce pour être ensuite aliquotées en 1,5ml (ce volume correspond à un volume précis d'air échantillonné), centrifugées à 21 000g pendant 10 minutes. Le culot a été congelé à -20°C jusqu'à analyse ultérieure.

Mesure de la température et l'humidité

L'enregistrement de la température et de l'humidité a été réalisé en même temps que la mesure du CO₂ à l'aide du même appareil (QTrack plus)

Les mesures de poussières totales, inhalables, endotoxines et de gaz ont également été effectuées.

3.2.2 Protocole 2 ou caractérisation partielle

Dans ce protocole les filtres en gélatine, montés sur des cassettes IOM ont servi à l'étude de la biodiversité. Aucune culture n'a été réalisée et certains autres paramètres comme la poussière totale, les gaz et les endotoxines ont été analysés.

3.3 Analyse des échantillons par biologie moléculaire

3.3.1 Extraction de l'ADN total

L'extraction d'ADN total a été effectuée à l'aide de la trousse de Qiagen™ (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) QIAamp® DNA Mini kit selon les recommandations du fabricant, modifiées par notre laboratoire. Il s'agit d'une première digestion au lysozyme, suivie d'une seconde à la protéinase K et finalement d'une précipitation de l'ADN. Cet ADN a ensuite été purifié à l'aide des différents tampons fournis dans la trousse de Qiagen.

3.3.2 Quantification des bactéries totales et des différents pathogènes

Les bactéries totales et les différents pathogènes ont été quantifiés par PCR sur un appareil DNA Engine Opticon de MJ Research (Bio-rad life science, Mississauga, Ont, Canada) à partir des extractions d'ADN total des échantillons prélevés à l'aide des AGI-30 et des filtres en gélatine sur IOM qui ont été centrifugés à 21 000g et dont le culot a été conservé à -20°C.

À partir de cet ADN, la quantification des bactéries totales a été effectuée par 5'-nuclease PCR en utilisant une sonde marquée avec un fluorochrome (Bach *et al.*, 2002) tandis que les pathogènes humains ont été quantifiés à l'aide de la trousse de Qiagen SYBR Green I fluorochrome (Mississauga, ON, Canada) et des amorces spécifiques aux différentes bactéries

recherchées : *Campylobacter* sp. (Rinttila *et al.*, 2004), *Clostridium perfringens* (Wise et Siragusa, 2005), *Enterococcus* sp. (Rinttila *et al.*, 2004), *Escherichia coli* (Daum *et al.*, 2002), *Salmonella* sp. (Chiu *et al.*, 2005), *Yersinia enterocolitica* (Neubauer *et al.*, 2000). Des contrôles négatifs ont toujours été ajoutés pour permettre d'évaluer les contaminations éventuelles des produits PCR.

3.3.3 Identification des bactéries pathogènes

L'identification des pathogènes humains par amplification de l'ADN ribosomal 16S par PCR terminal a été effectuée sur les bactéries isolées sur les différents milieux de culture spécifiques à ces bactéries avec les amorces spécifiques énumérées précédemment.

3.3.4 Analyse de la biodiversité des bactéries totales

La biodiversité a été étudiée de façon exhaustive (Nehmé *et al.*, 2008) sur 8 porcheries (2 visites en hiver + 1 visite en été) parmi les 26 porcheries visitées. Cette évaluation a été effectuée à partir de filtres en gélatine (tableau 2) par l'application de différents outils de biologie moléculaire soit, la technique du DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) et la création d'une banque d'ADNr16S par clonage vectoriel chez *E.coli*.

La technique du DGGE consistait en l'amplification par PCR de l'ADN total extrait des membranes en gélatine en utilisant une paire d'amorces dont l'une d'elles avait une pince G-C en 5'. Les amorces utilisées ciblaient la région V3 de l'ADNr16S (Muyzer *et al.*, 1993). Par la suite, les amplicons obtenus ont été quantifiés et migrés sur un gel de 8% polyacrylamide comportant un gradient d'agents dénaturants (urée, formamide désionisée). La migration a été réalisée à l'aide d'un appareil DCode™ (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) à 60V pendant 16 heures à 60°C. La migration terminée, le gel de polyacrylamide a été coloré par le fluorochrome SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) et l'image des gels a été observée à l'aide du système d'imagerie ChemiGenius 2 (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) et du logiciel d'imagerie GeneSnap (SynGen, Cambridge, England). Les bandes d'ADN composant les différents patrons de migration ont été excisées puis de nouveau amplifiées par PCR à l'aide des mêmes amorces utilisées précédemment mais ne comportant pas de pinces G-C. Finalement, les amplicons ont été clonés à l'aide du TOPO-TA Cloning kit® for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA) dans *E.coli* puis, la séquence d'ADN cloné a été déterminée à l'aide de la plateforme ABI 3730xl (Applied Biosystems, CA) par le service de séquençage du centre de recherche du CHUL (CHUL, Québec, QC, Canada).

Pour créer la banque d'ADNr16S, l'ADN total extrait des membranes en gélatine a été amplifié à l'aide d'amorces 16S universelles précédemment publiées (Marchesi *et al.*, 1998), puis le produit PCR a été cloné chez *E.coli* à l'aide du TOPO-TA Cloning kit® for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les doubles brins des inserts ont été séquencés dans les deux directions (CHUL, Québec, QC, Canada) et comparés aux séquences des différentes banques de données à l'aide de l'application BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990). Les séquences ont été criblées à l'aide du logiciel CHIMERA CHECK (RDP-II) (Cole *et al.*, 2003), afin de vérifier la présence de séquences chimériques. Toutes les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) et les alignements ont ensuite été corrigés manuellement avec Seaview (Galtier *et al.*, 1996). Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de PHYLO WIN (Galtier *et al.*, 1996).

3.3.5 Analyse des archaebactéries

Pour l'étude des archaebactéries, le même protocole que pour les bactéries a été utilisé. La seule différence réside dans le choix des amorces et la nécessité d'effectuer une PCR imbriquée.

La liste des amorces est représentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résumé des séquences des amorces et sondes utilisées

Nom	Fonction	Séquence Nucleotide ^a	Références
<i>PCR Quantitative</i>			
ARC787f	F amorce	5'-ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC-3'	Yu 2005
ARC915f	Sonde TaqMan	5'-(FAM)-AGG AAT TGG CGG GGG AGC AC- (TAMRA)-3'	Yu 2005
ARC1059r	R amorce	5'-GCC ATG CAC CWC CTC T-3'	Yu 2005
<i>PCR Imbriquée (DGGE et clonage)</i>			
Ar3f	F amorce	5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3'	Jurgens 1997
Ar9r	R amorce	5'-CCC GCC AAT TCC TTT AAG TTT C-3'	Jurgens 1997
1492r	R amorce	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Lane 1991
Parch340f-GC ^b	DGGE F amorce	5'-CCC TAC GGG G(C/T)G CA(G/C) CAG-3'	Øvreås 1997
519r	DGGE R amorce	5'-TTA CCG CGG CKG CTG-3'	Øvreås 1997

^a FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxy-tetramethylrhodamine

^b Pour le DGGE, cette amorce a la pince G-C suivante en 5', CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG (Muyzer *et al.*, 1993)

La figure 1 permet de mieux comprendre les méthodes utilisées pour évaluer la quantification par qPCR ainsi que la biodiversité.

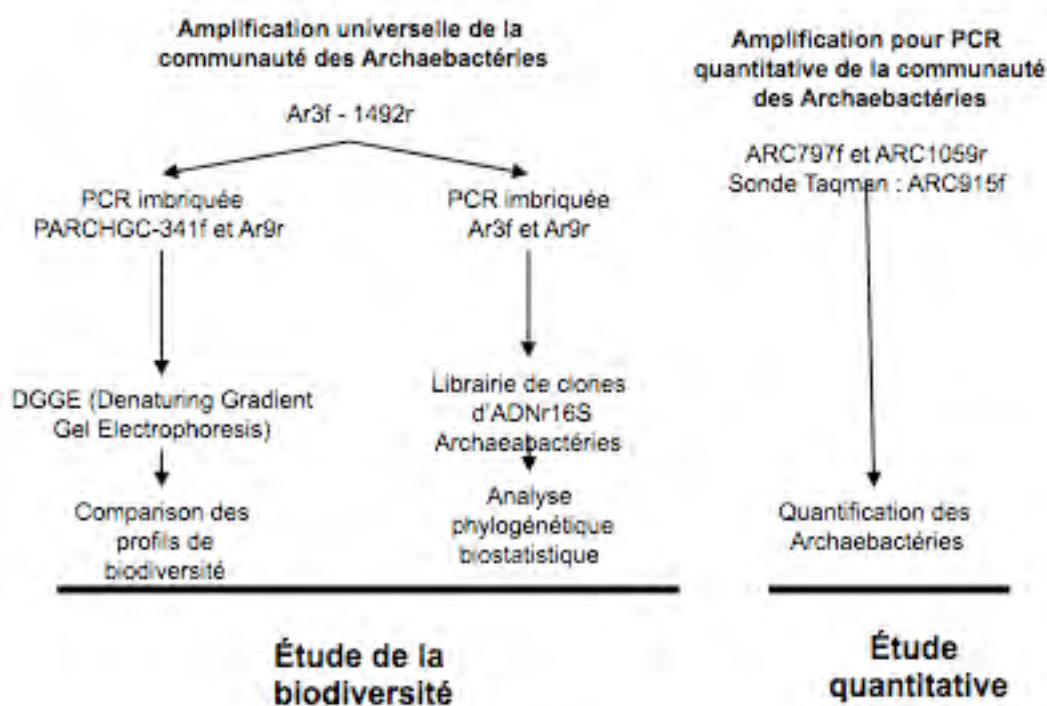


Figure 1 : Représentation schématique des méthodes utilisées pour quantifier les archaebactéries et analyser la biodiversité (de Nehmé *et al.* en préparation)

3.4 Tests statistiques

Pour les paramètres environnementaux, des mesures ont été prises aux périodes suivantes : Visite de base (B); Visite hiver 2 (P); Visite durant la période estivale (E). Il s'agit d'une analyse à mesures répétées à deux facteurs. Le premier facteur est défini comme étant l'effet « Ferme » et il est aléatoire pour le modèle statistique. Ce facteur a été traité comme une variable de blocage. Le second facteur « Visite » est la comparaison entre certaines saisons. Ce facteur a été analysé en utilisant un modèle statistique mixte avec mesures répétées en définissant une structure de dépendance de la forme CS. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour mesurer le degré d'association entre les paramètres (p. ex. température vs bactéries; bactéries totales vs bactéries totales). La plupart des paramètres ont subi une transformation logarithmique pour respecter les critères d'homogénéité des variances et de normalité.

Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus des différents modèles statistiques, des tests de normalité multivariée et d'homogénéité des variances ont été faits pour chaque paramètre à l'étude. Les seuils d'observation <0.05 ont été considérés significatifs.

Les données ont été analysées avec le logiciel SAS v9.2.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RÉSULTATS

4.1 Impact du type de gestion du lisier sur la température et les concentrations en bactéries dans l'air

4.1.1 Comparaison de la température et de l'humidité dans les 2 types de porcheries

Dans les dix-huit porcheries étudiées de façon exhaustive (voir tableau 1), on observe une différence de température ($p < 0,0001$) entre les engraissements sur lattes et les engraissements sur litière, la température de ces derniers étant plus froide ($14,05 \pm 1,05^\circ\text{C}$ contre $19,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ l'été). Il n'existe par contre aucune différence significative pour l'humidité (figure 2).

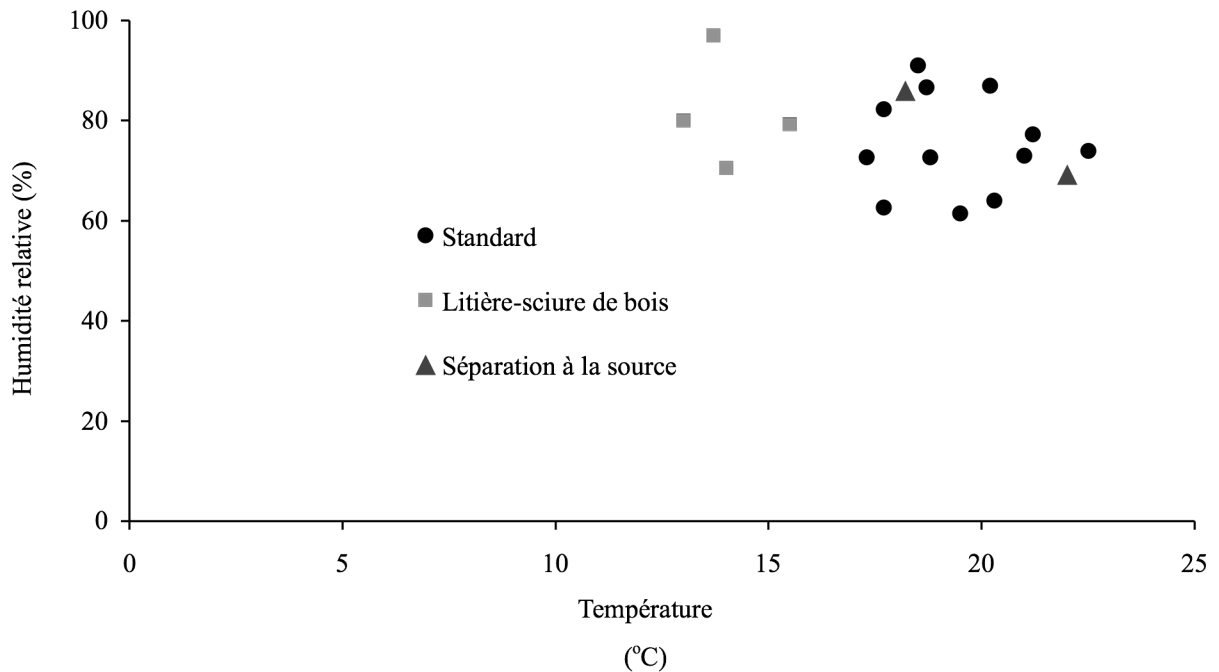


Figure 2 – Température et humidité relative à l'intérieur des 18 porcheries étudiées

4.1.2 Détermination de la concentration par culture (bactéries cultivables) et par biologie moléculaire (bactéries totales) des bactéries aérosolisées dans les deux types de porcheries

La culture (à partir des impacteurs Andersen ou impingers AGI-30) révèle que les aérosols des porcheries en engraissement sur litière sont plus chargés ($p = 0,01$) en bactéries mésophiles ($1,5 \times 10^6$ contre $1,7 \times 10^5$ UFC/m³). Par contre, comme le montre la figure 3, il n'y a aucune différence entre les deux types de porcheries lorsque les concentrations de bactéries totales sont déterminées par biologie moléculaire (à partir des échantillons des impingers AGI-30).

Lorsqu'on utilise la biologie moléculaire pour déterminer les concentrations de bactéries totales dans les porcheries lattées, les concentrations sont approximativement 1000X plus élevées que lorsqu'on utilise la culture. Par contre, elles ne sont que 10 fois plus élevées dans les élevages sur litière.

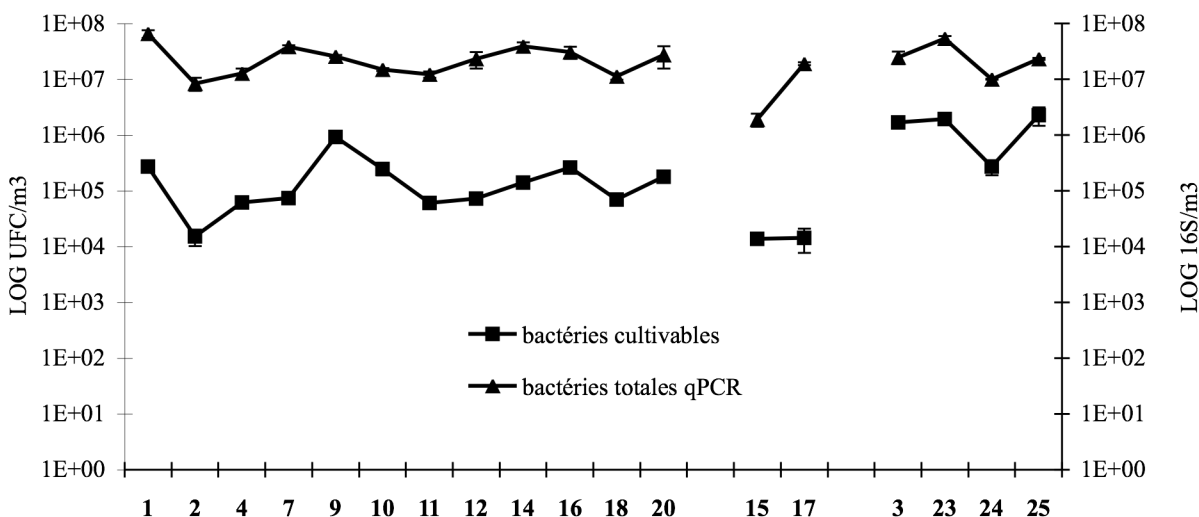


Figure 3 – Comparaison des concentrations des bactéries par culture et PCR dans les deux types de porcheries

4.1.3 Détermination de la concentration des pathogènes humains dans l'air

La concentration des pathogènes humains (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *C. perfringens*, *Enterococcus* sp. et *Y. enterocolitica*) dans l'air a été déterminée par culture (impacteurs Andersen ou impingers AGI-30) et qPCR (impingers AGI-30) dans les 18 porcheries étudiées.

Aucune *Salmonella* sp. ni *Y. enterocolitica* n'ont été détectées par culture dans l'air. L'analyse par qPCR de cette dernière n'a pas confirmé sa présence dans l'air.

Par contre, si *Campylobacter* sp. n'a pas été détectée par culture, la concentration totale par qPCR peut atteindre jusqu'à 10^5 ADN_{r16S}/m³ comme le montre la figure 4. Le type de porcherie n'influence pas les concentrations de bactéries totales. Dans une porcherie où le système de séparation à la source du lisier est utilisé, la concentration totale était en dessous du seuil de détection de la méthode d'analyse qui était de 10^3 ADN_{r16S}/m³. Les porcheries équipées d'un tel système ont tendance à voir leur niveau de contamination dans l'air plus bas que les engraissements traditionnels sur lattes, cependant le trop petit nombre de résultats ne permet pas de confirmer cette tendance.

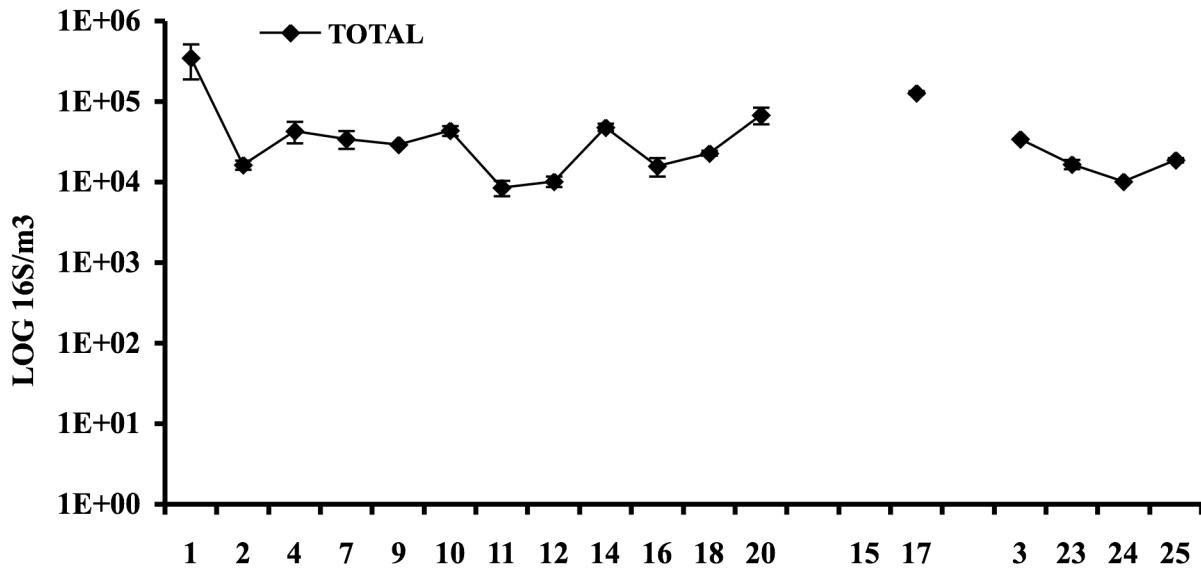


Figure 4- Concentrations de *Campylobacter* sp. dans les porcheries visitées

C. perfringens a par contre été quantifiée par culture dans 16 des 18 porcheries étudiées (figure 5) et les concentrations totales (qPCR) étaient souvent en dessous du seuil de détection de la méthode (2469 ADN_r16S /m³).

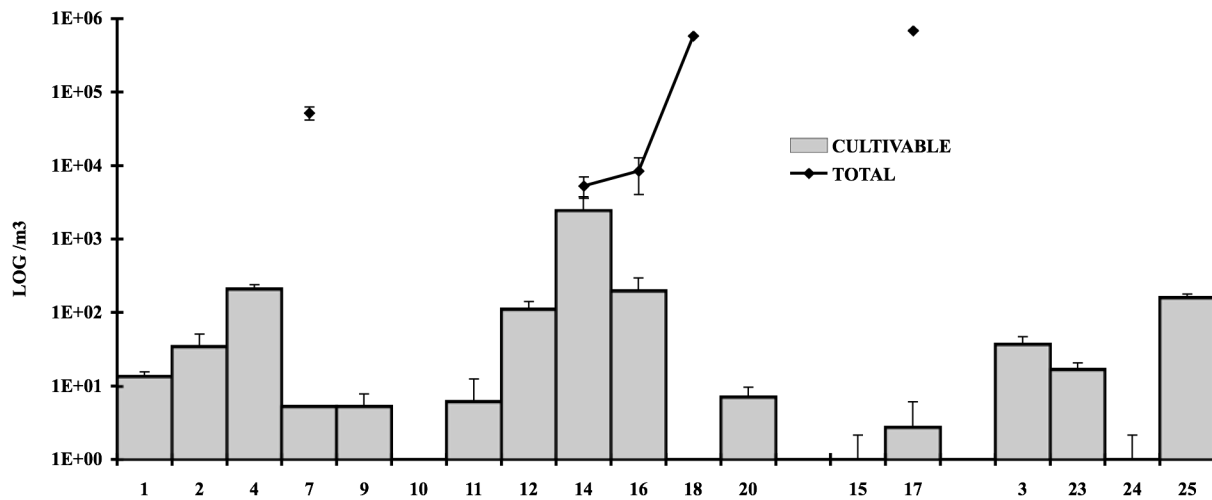


Figure 5- Concentrations de *C. perfringens* dans les porcheries étudiées

Les concentrations par culture d'*Enterococcus* sp. (figure 6) corrént avec les bactéries mésophiles cultivables ($r_2 = 0,7$, $p < 0,01$). Quant aux concentrations totales déterminées par qPCR, elles sont moins élevées dans les élevages sur litière ($p < 0,05$).

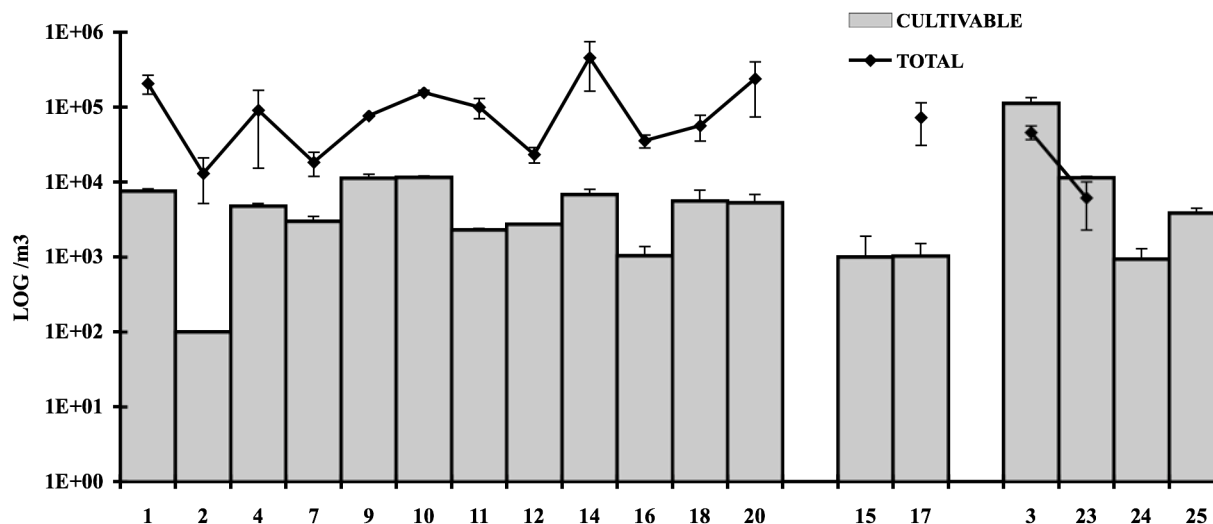


Figure 6- Concentrations d'*Enterococcus* sp. dans les porcheries étudiées

Finalement, les concentrations d'*E. coli* (figure 7) cultivables ont tendance ($p = 0,07$) à être plus élevées dans les porcheries avec litière comme l'étaient les concentrations de bactéries mésophiles cultivables ($p < 0,01$). Les concentrations totales (qPCR) de *E. coli* corrént avec les concentrations totales de bactéries (qPCR) ($p < 0,0001$).

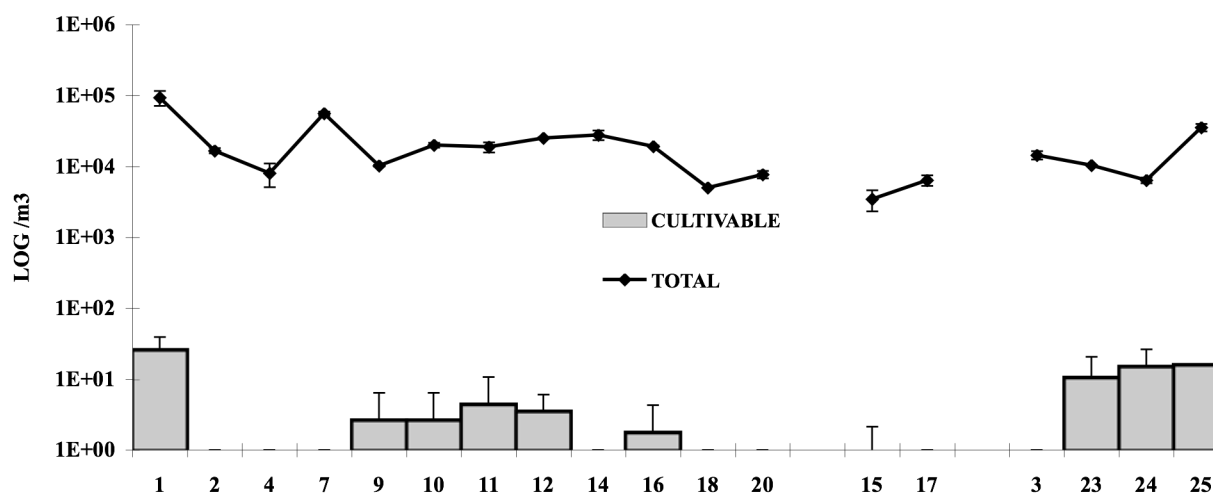


Figure 7- Concentrations d'*E. coli* dans les porcheries étudiées

4.2 Influence des saisons sur les concentrations de bactéries totales, la biodiversité et les archaebactéries

4.2.1 Concentrations de bactéries totales

Cette analyse a été effectuée à partir des échantillons prélevés sur filtre de gélatine (voir tableau 2), sur toutes les entreprises ayant été visitées en hiver et en été pour permettre la comparaison. Le tableau 5 démontre que les concentrations de bactéries totales (qPCR) sont moins élevées en été qu'en hiver ($p=0,004$). Cette affirmation se confirme pour *Enterococcus* sp. ($p=0,0002$) et *E. coli* ($p=0,03$) deux espèces dont les concentrations corrèlent avec les bactéries totales.

Tableau 5- Comparaison des concentrations de bactéries totales et des différents pathogènes selon les saisons

	Bactéries totales x 10 ⁷ /m ³		<i>Clostridium</i> sp. x 10 ⁴ /m ³		<i>Enterococcus</i> sp. x 10 ⁴ /m ³		<i>E. coli</i> x 10 ⁴ /m ³		<i>Yersinia enterocolitica</i> x 10 ⁴ /m ³	
	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E
Moyenne ± écart- type	11,8 ±10,2	6,35 ±5,4	15,3 ±16,5	12,5 ±0,9	22,3 ±34,9	6,1 ±9,1	16,0 ±20,2	11,5 ±19,6	0,52 ±0,17	0,43 ±0,12
n	30	36	18	14	31	36	30	34	10	6
p	0,0040		0,3580		0,0002		0,0318		0,3178	

p= probabilité que la différence soit significative dans 95% des cas entre hiver et été

n= nombre de répliqués

4.2.2 Biodiversité des bactéries

Pour l'analyse de la biodiversité, l'étude a porté sur huit porcheries visitées à trois reprises comme indiqué dans le tableau 1 (zones ombrées)

Le détail des résultats est rapporté dans la publication « Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of seasonal effect » (Nehmé *et al.*, 2008). La biodiversité à l'intérieur des 8 bâtiments visités a été étudiée par DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis). La figure 8 suggère que certaines bandes sont présentes dans toutes les porcheries étudiées autant en hiver qu'en été. Même si tous les échantillons ont le même profil, quelques différences peuvent cependant être observées. Les profils A,B,C,D,G et H montrent les bandes principales (1,2,3,6), la bande 3 étant présente mais d'intensité plus faible pour les porcheries E et F.

Si les profils des porcheries sont comparés selon les saisons, les deux hivers ne montrent pas de différence pour chacune des porcheries. Par contre, on observe un profil légèrement différent en été pour la porcherie E où les bandes 13 et 17 ont une intensité plus forte qu'en hiver.

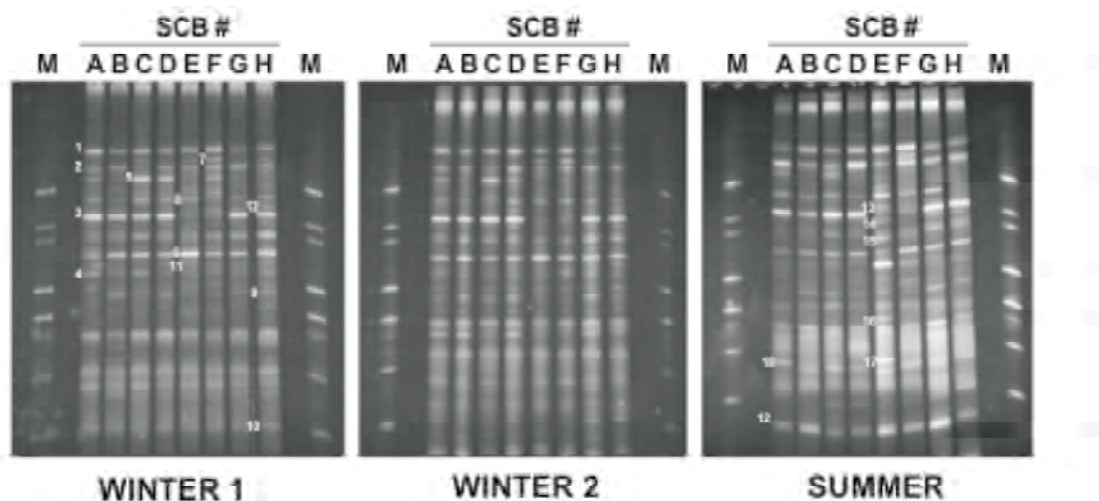


Figure 8- Profils DGGE de l'ADNr16S bactérien extrait des bioaérosols de 8 porcheries (A,B,C,D,E,F,G,H) durant deux hivers et un été. M= contrôle de migration de standard d'ADN (reproduit de Nehmé et al., 2008)

Après excision des différentes bandes (1 à 18) des gels DGGE, l'analyse par séquençage a mené aux identifications les plus probables représentées dans le tableau 6.

Il s'agit principalement de bactéries à gram-positif de l'ordre des *Lactobacillales* regroupées avec celles de l'ordre des *Bacillales*. Ce groupe est composé d'*Aerococcus* sp., de *Lactobacillus* sp. et de deux séquences de *Streptococcus* sp. (bandes 6 et 11). Ces 2 séquences ne diffèrent que par un seul site où une thymidine (bande 6) remplace une cystéine (bande 11). D'autre part, pour les bactéries de l'ordre des *Bacillales*, deux séquences ont été retrouvées : une pour *Bacillus* sp. (bande 8) et une autre pour une espèce non caractérisée. Finalement, trois séquences de *Lactobacillales* non cultivées ont été retrouvées (bandes 2, 7 et 16).

Un autre groupe de bactéries à gram-positif a été retrouvé, il s'agit des *Clostridia*. Ce groupe est principalement composé d'*Anaerococcus* sp., *Oribacterium sinus* et *Clostridium* sp. (bandes 5, 10, 12 et 17). Deux séquences de *Clostridia* non cultivé ont également été obtenues (bandes 4 et 14).

Les deux dernières bandes correspondent à une bactérie de la classe des *Bacteroidetes* (bande 9) et à une actinobactérie dont la séquence a 96% de similarité avec celle de *Corynebacterium kroppenstedtii*.

Tableau 6- Identification la plus probable obtenue suite à l'excision, ré-amplification et séquençage des bandes des gels DGGE (ADNr16S bactériens)

Band	Closest match in GenBank (Accession No.)	% Similarity
1	Aerococcus sp. sequences including: Aerococcus viridans (AY707773) Aerococcus urinaeequi (D87677)	100%, 194/194
2	> 100 uncultured bacterium sequences	100%, 184/184
3	Lactobacillus sp. sequences including: Lactobacillus acidophilus (AY763430) Lactobacillus suntoryensis (AY675248) Lactobacillus crispatus (AY339181) Lactobacillus helveticus (AY369116)	100%, 194/194
4	Uncultured bacterium clone X402 (AY980530)	100%, 169/169
5	Anaerococcus tetradius (AF542233) Anaerococcus prevotii (AF371617)	100%, 168/168
6 (T/C)	Streptococcus sp. sequences including: Streptococcus bovis (AY324610) Streptococcus equinus (AF429765) Streptococcus macedonicus (AF459431) Streptococcus gallolyticus (AY858648)	99%, 194/195
7	Firmicutes sp. oral clone BX005 (AY005049)	98%, 188/190
8	Bacillus sp. 34hs (AF526913)	100%, 194/194
9	Uncultured bacterium clone p-816-a5 (AF371917)	95%, 181/189
10	Oribacterium sinus (AY323228)	98%, 167/169
11 (C/C)	Streptococcus sp. sequences including: Streptococcus bovis (AY324610) Streptococcus equinus (AF429765) Streptococcus macedonicus (AF459431) Streptococcus gallolyticus (AY858648)	100%, 195/195
12	Clostridium bifementans (DQ680025)	100%, 169/169
13	17 uncultured bacterium sequences including: Uncultured bacterium clone p-2330-s962-2 (AF371536) Uncultured bacterium clone C179 (DQ326249) Uncultured bacterium clone AKIW764 (DQ129406)	99%, 193/194
14	Uncultured bacterium clone Thompsons81 (AY854359) Uncultured rumen bacterium (AB185557)	99%, 170/171
15	Uncultured bacterium (Clostridium sp. Cluster I)	100%, 169/169
16	Uncultured bacterium clone pb06 (DQ203252)	98%, 192/194
17	Clostridium sp. sequences including: Clostridium quinii (X76745) Clostridium disporicum (Y18176) Clostridium aurantibutylicum (X68183) Clostridium cadaveris (M59086)	99%, 168/169
18	Corynebacterium kroppenstedtii isolate BK5689-2003 (AY524775)	96%, 172/179

Tableau extrait de Nehmé *et al.*, 2008

Les profils en DGGE étant similaires (figure 8), deux échantillons environnementaux prélevés en hiver ont été choisis au hasard pour effectuer l'analyse phylogénétique.

Deux-cent quarante cinq clones ont été séquencés et sont repartis en trois principales classes de microorganismes : la classe des *Bacteroidetes* (4,6%), divisée en deux sous-groupes (la famille des *Porphyromonacae* et celle des *Prevotellaceae*), la classe des *Lactobacillales* (1,5%) elle-même divisée en 2 sous groupes (la famille des *Lactobacillaceae* et celle des *Streptococcaceae*). La dernière classe, de loin la plus nombreuse (93,8%), appartient à la classe des *Clostridia*.

Cette classe a été analysée par regroupement (Figure 9) dont la description exhaustive est consignée dans la publication « Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of seasonal effect » (Nehmé *et al.*, 2008).

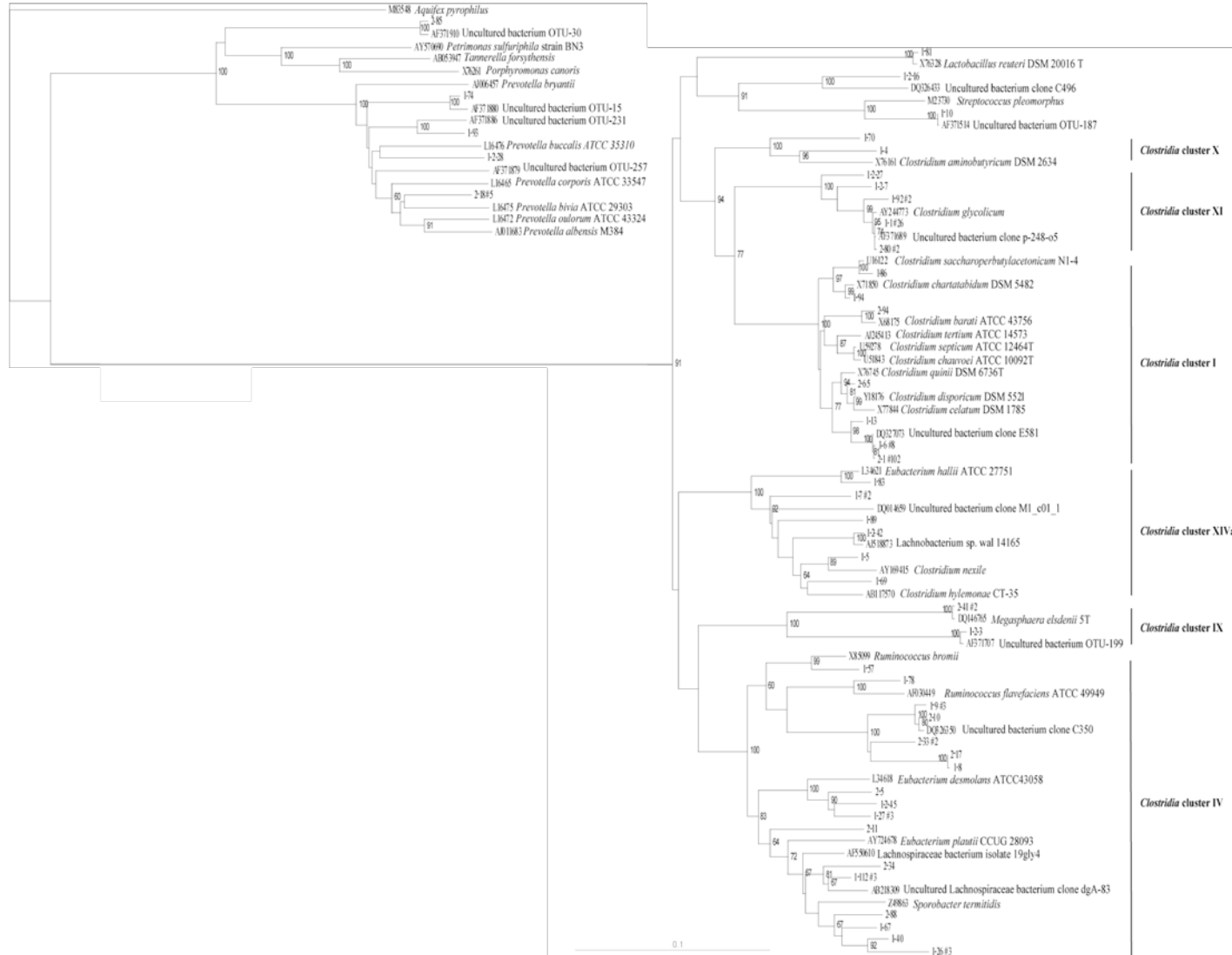


Figure 9 : Arbre phylogénétique dérivé de 2 échantillons de bioaérosols prélevés durant l'hiver (extrait de Nehmé *et al.*, 2008)

Le regroupement I est de loin le plus important et représente 56,3% des séquences d'ADNr 16S. On y retrouve *Clostridium disporicum*, *C. celanum*, *C. quini*, *C. barati*, *C. chartabidum* et *C. saccharoperbutylacetanicum*. Dans le regroupement XI (14,9% des séquences) on retrouve *Clostridium glycolicum* et *Megasphaera elsdenii*, *Phascolarbacterium feacium* appartenant au regroupement IX (1% des séquences). Les derniers regroupements sont représentés par les regroupements IV (12,4% des séquences), XIVa et X (*Clostridium aminobutyrium*) où se retrouvent respectivement *Ruminicoccus bromii*, *Ruminicoccus flavefaciens*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium plaudii*, *Sporobacter termidis* et *Eubacterium halii*, *Clostridium hylemonae*, *Clostridium nexile*.

4.2.3 Archaeobactéries

Différentes études antérieures (Whitehead *et al.*, 1999; Snell-Castro *et al.*, 2005) ayant révélé la présence d'archaebactéries dans le lisier de porc, il a paru intéressant de voir si ces bactéries pouvaient être aérosolisées et se retrouver dans l'air de la porcherie et ainsi être détectée grâce à l'analyse par biologie moléculaire.

L'analyse de la biodiversité des archaebactéries a été faite à partir des mêmes échantillons que pour les bactéries c'est-à-dire les filtres en gélatine (voir tableau 2 zones ombrées).

Les mêmes sondes et amorces ont été utilisées.

Les concentrations d'archaebactéries dans l'air, analysées par qPCR, peuvent atteindre jusqu'à 10^8 copies de gène d'ADNr 16S/m³ d'air, et peuvent diminuer de 3,5 fois durant la période d'été (p = 0,01).

Il existe une forte corrélation entre les concentrations de bactéries totales dans l'air et les concentrations d'archaebactéries retrouvées dans ce même environnement (figure 10)

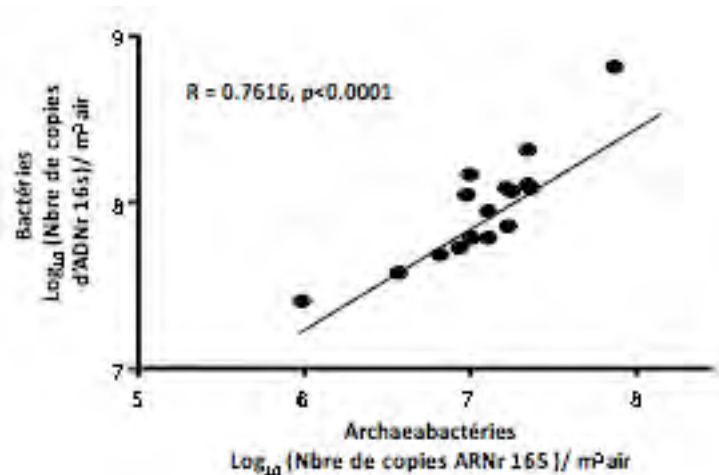


Figure 10 : corrélation entre les concentrations de bactéries totales dans l'air et les concentrations d'archaebactéries

Comme pour les bactéries, des gels DGGE visant à l'analyse de la biodiversité en archaebactéries (figure 11) ont été réalisés sur les échantillons des huit porcheries étudiées (porcherie A à H).

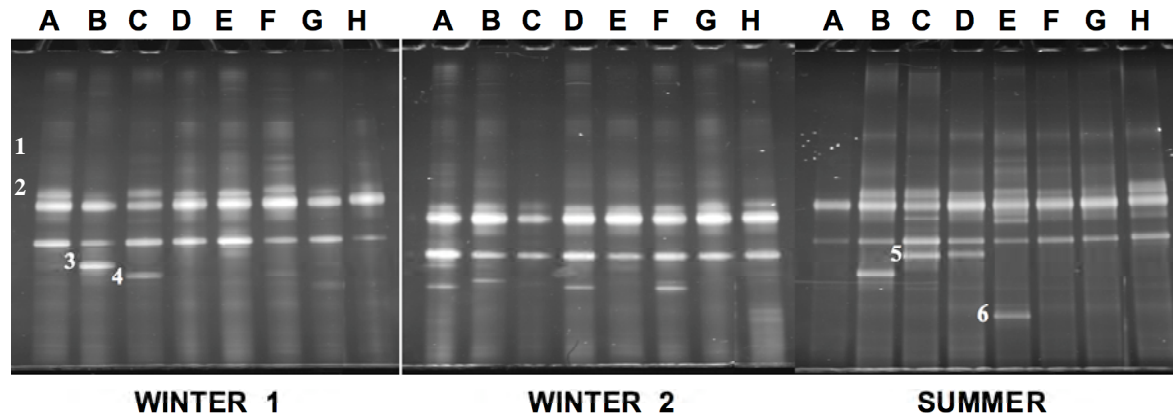


Figure 11 : Profils DGGE de l'ADN extrait des bioaérosols de 8 porcheries (A,B,C,D,E,F,G,H) durant deux hivers et un été

Ces gels montrent que certaines bandes (1 et 2) sont présentes dans tous les échantillons, que ce soit en hiver ou en été avec, peut-être, une intensité moins forte en été. Ceci démontre une certaine similitude dans tous les échantillons indépendamment de la saison. Par contre, certaines bandes semblent plus spécifiques à certains échantillons (bandes 3 à 6). Toutes ces bandes ont été excisées et séquencées et démontrent une grande similarité avec les *Methanobacteriaceae*, le plus proche appariement pouvant être fait avec *Methanosphaera stadtmanae*.

Pour construire l'arbre phylogénétique, trois échantillons prélevés durant l'hiver (les gels DGGE démontrant une grande similarité entre les 2 hivers et l'été) ont été choisis de façon aléatoire. L'arbre est représenté par la figure 12 où 350 clones ont été analysés par séquençage et les séquences comparées aux bases de données pour identification.

méthanogènes. En outre, 94,7% des séquences récupérées à partir des clones étaient affiliées avec *Methanosphaera stadtmanae* (> 96% de similarité).

5. DISCUSSION

5.1 Influence du type de gestion du lisier sur les concentrations de bioaérosols dans l'air

Comme il a été démontré, la concentration des bactéries mésophiles déterminée par culture est plus élevée dans les porcheries pratiquant l'élevage sur litière que dans les entreprises d'élevage sur latte. Cette différence n'apparaît cependant pas lorsqu'on fait l'analyse par biologie moléculaire. Ceci s'explique par le fait que les litières sont composées de matières organiques qui fournissent des nutriments pour maintenir le métabolisme des bactéries et permettre leur culture par la suite. D'autre part, la température plus froide pourrait expliquer cet accroissement des bactéries cultivables. En effet, il existe une corrélation négative entre les concentrations bactériennes et la température ($p=0,01$); les porcs ayant tendance à dormir davantage lorsque la température est plus élevée, cela pourrait engendrer une réduction de leur activité et ainsi diminuer l'aérosolisation des bactéries mésophiles.

En général, les concentrations de bactéries totales sont de 10 à 1000 fois plus élevées que les concentrations de bactéries cultivables. En effet, dans l'analyse par PCR quantitative les concentrations sont exprimées en copies d'ADN16S/m³; les bactéries non-cultivables, les bactéries mortes et même les débris composés de matériel génétique bactérien entrent donc dans le calcul de cette concentration, alors que pour la culture, seules les bactéries cultivables sur un milieu donné sont comptabilisées.

L'analyse par culture de certains pathogènes dans l'air ne démontre pas de différence entre les deux types d'élevage. Parfois aucune bactérie, comme *Campylobacter* sp. par exemple, n'a pu être détectée par culture alors que la PCR quantitative montrait sa présence dans presque toutes les porcheries visitées. *Campylobacter* sp. étant un genre microaérophile, il est fort probable que les bactéries ne puissent survivre dans l'air et être cultivées par la suite.

Par contre, par l'analyse en biologie moléculaire, si les concentrations sont en dessous du seuil de détection de la méthode (2469 ADN16S/m³) comme pour *C. perfringens*, ce microorganisme n'a pas été détecté par biologie moléculaire alors que la culture a démontré sa présence dans toutes les porcheries. Les spores de *Clostridium* favorisent certainement leur survie à l'aérosolisation et l'échantillonnage et nuisent probablement à l'extraction de son matériel génétique.

Pour d'autres pathogènes, comme pour *Enterococcus* sp., les concentrations totales déterminées par qPCR démontrent que, dans les engraissements sur litières, on retrouve moins de ces bactéries dans l'air que dans les engraissements réguliers. Ici, un changement de microflore causé par la présence d'un écosystème différent (litière) pourrait expliquer ces résultats.

5.2 Influence de la saison sur les concentrations de bactéries totales, la biodiversité des bactéries et des archaebactéries

Il a été démontré que les concentrations de bactéries totales dans les bâtiments sont plus importantes en hiver qu'en été. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence; il pourrait s'agir de la quantité de poussières totales dans l'air qui est moins importante l'été que l'hiver

(Létourneau *et al.* en préparation), les bactéries étant collées aux particules de poussières, il est logique qu'il y ait moins de bactéries dans l'air, le second facteur étant la température. En effet, la température à l'intérieur des bâtiments est plus élevée durant l'été, ce qui inciterait les porcs à être moins actifs et donc à moins relâcher de poussières dans l'air. D'autre part, la ventilation joue probablement un rôle important dans la concentration de poussière dans l'air. En été, la ventilation est à son maximum pour maintenir une température la plus confortable possible pour les porcs à l'intérieur des bâtiments. Idéalement, la température visée est de 19°C comme il a été constaté en hiver ($19,1 \pm 1,9^\circ\text{C}$) dans les porcheries qui ont été visitées, mais elle monte à $24,7 \pm 2,7^\circ\text{C}$ en été (Létourneau *et al.* en préparation).

L'analyse de la biodiversité bactérienne par gel DGGE démontre que les patrons de bande ne sont pas différents pour les 8 porcheries visitées. Même s'il y avait une différence de température et de ventilation à l'intérieur des bâtiments entre l'hiver et l'été, les patrons de bandes restent semblables ce qui suggère que la nature des bioaérosols reste constante. La séquence de bande DGGE révèle la présence de *Lactobacillales* et de *Clostridia*, cependant l'identification des bactéries par biologie moléculaire reste complexe. En effet, d'une part, les profils DGGE contiennent beaucoup de bandes d'ADN qui sont difficiles à purifier et d'autre part, l'identification de microorganismes avec une courte séquence doit être réalisée avec prudence. L'approche par clonage/séquençage permet une identification plus rigoureuse des espèces en présence. En effet, la longueur de la séquence accessible pour l'identification (254 pb pour le DGGE vs 1324 pb pour le clonage) a un effet très important sur le succès de l'identification par comparaison aux bases de données. Les profils DGGE, bien que moins intéressants d'un point de vue identification, sont un outil précieux de comparaison rapide de biodiversité globale, tandis que le clonage est plus fastidieux mais permet des identifications plus précises. Cette étude démontre que ces 2 outils sont complémentaires, qu'ils permettent de dire que la biodiversité des porcheries est relativement constante qualitativement et que ce sont les concentrations de bactéries qui fluctuent entre les saisons et les bâtiments.

Jusqu'à présent, les études sur la biodiversité des bactéries dans les porcheries étaient essentiellement basées sur la culture et démontraient la prévalence des bactéries à gram-positif comme *Aerococcus* sp. *Bacillus* sp. *Micrococcus* sp. *Streptococcus* sp. et *Staphylococcus* sp. (Cormier *et al.*, 1990), les bactéries à gram-négatif étant essentiellement représentées par *Enterococcus* sp., *Moraxella* sp. et *Pseudomonas* sp. Les outils de biologie moléculaire montrent que la population de bactéries qui a été identifiée appartient à 94% aux bactéries à gram-positif avec une majorité de *Clostridium* sp. L'analyse phylogénétique de la biodiversité des échantillons d'air appuie les résultats obtenus lors d'études de la microbiologie du tractus gastro-intestinal du porc (Leser *et al.*, 2002) et du lisier (Snell-Castro *et al.*, 2005). En effet, même si les proportions sont différentes, les phylotypes trouvés dans la présente étude appartiennent principalement au groupe des bactéries fermentaires provenant de l'intestin du porc.

Les mêmes outils appliqués à l'étude des archaebactéries ont permis de mettre en évidence des concentrations allant jusqu'à 10^8 copies de gène d'ARNr 16S/m³ d'air, ces concentrations pouvant diminuer de 3,5 fois durant l'été. Cette diminution durant l'été suit les conclusions de l'étude par biologie moléculaire des bactéries totales (Nehmé *et al.*, 2008). Quant aux concentrations d'archaebactéries, elles sont du même ordre que les concentrations de bactéries.

En outre, comme il a été démontré que les concentrations d'archaebactéries sont directement proportionnelles aux concentrations de bactéries totales, ni l'une ni l'autre ne serait aérosolisée préférentiellement. C'est la première fois qu'une étude révèle l'exposition humaine aux archaebactéries aérosolisées. L'impact de ces microbes sur la santé respiratoire et leur rôle dans le processus inflammatoire reste à étudier.

6. CONCLUSION

Cette étude a permis de révéler, pour la première fois, la biodiversité des bioaérosols des porcheries et d'étudier l'impact des saisons et du type d'engraissement sur la nature des contaminants de l'air. En effet, la mesure de bactéries totales, de bactéries cultivables, de pathogènes totaux, de pathogènes cultivables, d'archaebactéries totales a été effectuée et 2 approches permettant d'étudier la biodiversité ont été utilisées. Il a été démontré que :

- La concentration de bactéries totales est, en général, 1000 fois plus élevée que les comptes cultivables; par contre la culture réussit à mettre en évidence que les bactéries présentes dans l'air des engraissements sur litière sont plus facilement cultivables que dans les engraissements sur lattes.
- Certains pathogènes humains sont présents dans l'air des porcheries et les approches moléculaires en complément à la culture permettent leur détection et quantification, certains pathogènes étant présents en moindre concentration dans l'air l'été que l'hiver.
- Les archaebactéries sont présentes en grandes concentrations dans les porcheries, ces concentrations diminuant durant l'été. Leur impact sur la santé des travailleurs reste à étudier.
- Il existe une corrélation entre les concentrations de bactéries totales et d'archaebactéries totales suggérant une aérosolisation non spécifique, c'est-à-dire indifférente de la nature des organismes.
- Il existe une corrélation entre les concentrations des entérocoques, *E. coli* et les bactéries totales, suggérant que les niveaux d'exposition à ces pathogènes pourraient être contrôlés par une baisse du niveau d'exposition total.

À titre de conclusions techniques, cette étude a permis de démontrer la faisabilité de l'approche moléculaire pour la caractérisation des bioaérosols en milieu agricole et a permis de mettre au point des protocoles robustes et transférables à d'autres projets. Cependant, les analyses par biologie moléculaire se heurtent à certaines limites techniques qui peuvent jouer sur l'étendue de la biodiversité observée, et jouer également sur la détection de bactéries présentes en trop petite quantité dans l'air pour atteindre la limite de détection de la méthode. Les méthodes de culture demeurent, à notre avis, un complément essentiel aux études moléculaires.

7. LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS

7.1 Articles publiés ou en préparation

Nehmé, B., V. Létourneau, R.J. Forster, M. Veillette, and C. Duchaine. 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, p. 665-675.

Nehmé, B., Glibert, Y., V. Létourneau, R.J. Forster, M. Veillette, and C. Duchaine. Culture-independent Characterisation of Archaeobacteria Biodiversity in Bioaerosols from Swine Confinement buildings. En préparation.

Létourneau, V., Nehmé, B., Mériaux, A., Massé, D., and C. Duchaine. Bioaerosols exposure in industrialized Eastern Canadian swine confinement buildings using standard or newly developed manure management practices. En préparation.

7.2 Communications

Nehmé, B., Letourneau, V., Morissette-Rouleau, H., Foster, R., Veillette, M., Caroline Duchaine. 2007. Culture-independent Characterisation Archaeobacteria in the Bioaerosol of Swine confinement Buildings. American Society for Microbiology 107th annual meeting, Toronto, Canada, May 21-25

Letourneau, V., Nehmé, B., Meriaux, A., Letellier, A., Massé, D., Caroline Duchaine. 2007. Exposure to airborne microorganisms in swine confinement buildings of Eastern Canada according to the production system in use. 57^e Congrès de la Société Canadienne des microbiologistes. Université Laval, Québec, Canada, 17-20 Juin.

Nehmé, B., Letourneau, V., Foster, R., Meriaux, A., Veillette, M., Caroline Duchaine. 2006. Caractérisation microbienne des bioaérosols des porcheries du Québec à l'aide d'outils de biologie moléculaire : une nouvelle vision de cet environnement de travail. Réunion annuelle conjointe Association des pneumologues du Québec et Réseau en santé respiratoire du FRSQ. Québec, Canada, 1-2 Décembre.

Nehmé, B., Letourneau, V., Caroline Duchaine. 2006. Detection and characterization of archaeobacteria as bioaerosols in swine confinement buildings. 7th National Conference of the Canadian Rural Health Society. Prince George, BC, Canada, October 19-21.

Nehmé, B., Letourneau, V., Foster, R., Massé, D., Caroline Duchaine. 2006. Molecular ecological characterization of bacterial bioaerosols of swine confinement buildings. American Society for Microbiology 106th annual meeting, Orlando, Florida, May 21-25

Nehmé, B., Letourneau, V., Meriaux, A., Veillette, M., Caroline Duchaine. 2005. Caractérisation des bioaérosols dans les porcheries du Québec par analyse DGGE (denaturing

gradient gel electrophoresis). Journée scientifique de la recherche universitaire, Hôpital Laval, Québec, Canada, 1^{er} Mai.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Altschul, S.F., Gish, W. Miller, W. Myers, E.W. and D.J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, p. 403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and K.H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 (1), p. 143-169.
- Bach, H.J., Tomanova, J., Schloter, M. and J.C. Munch.** 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J Microbiol Methods* 49, p. 235-245.
- Chiu, T.H., Chen, T.R., Hwang, W.Z. and H.Y. Tsen.** 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiol.* 97, p. 259-265.
- Cole, J.R., B. Chai, T.L. Marsh, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, S. Chandra, D.M. Mcgarrell, T.M. Schmidt, G.M. Garrity and J.M. Tiedje, Ribosomal Database Project.** 2003. The ribosomal database project (RDP-II): *previewing* a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 1, p. 442-443.
- Cormier, Y., Tremblay, G., Meriaux, A., Brochu, G., and J. Lavoie.** 1990. Airborne microbial contents in two types of swine confinement building in Quebec. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51, p. 304-309.
- Daum, L.T., Barnes, W.J., McAvin J.C., Neidert, M.S., Cooper, L.A., Huff, W.B. et al.** 2002. Real-time PCR detection of *salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr county, Texas. *J Clin Microbiol.* 40, p. 3050-3052.
- Duchaine, C., Meriaux, A., Brochu, G., Bernard, K., and Y. Cormier.** 1999. *Saccharopolyspora rectivirgula* from dairy barns : application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's disease. *J. Med. Microbiol.* 48, p. 173-180.
- Galtier, N., M. Gouy, and C. Gautier.** 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS.* 12, p. 543-548.
- Heidelberg, JF., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., and RR. Colwell.** 1997. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 3585-3588.
- Jurgens, G., K. Lindström, and A. Saano.** 1997. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 803-805.

- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. p. 115-175. *In* E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York.
- Leser, T.d., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Linderrona, R.H., Boye, M. et K. Moller.** 2002. Culture-independant analysis of gut bacteria: the piggastrintestinal tract microbia revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, p. 673-690.
- Létourneau, V., Nehmé, B., Mériaux, A., Massé, D., and C. Duchaine.** Bioaerosols exposure in industrialized Eastern Canadian swine confinementbuildings using standard or newly developed manure management practices. En préparation.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., et al.** 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p. 795-799.
- Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S Ribosomal-RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, p. 695-700.
- Melbostad E., and W Eduard.** 2001. Organic dust-related respiratory and eye irritation in Norwegian farmers. *Am J Ind Med.* Feb;39(2), p. 209-217.
- Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S., and H. Meyer.** 2000. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. *Syst Appl Microbiol.* 23, p. 58-62.
- Nehmé, B., V. Létourneau, R.J. Forster, M. Veillette, and C. Duchaine.** 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, p. 665-675.
- Øvreås, L., L.J. Forney, F.L. Daae, and V.L Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 3367-3373
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., and A. Palva.** 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 97, p. 1166-1177.
- Snell-Castro, R., J.-J. Godon, J.-P. Delgenès, and P. Dabert.** 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, p. 229-242.

- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, p. 4680.
- Whitehead, TR., and MA. Cotta.** 1999. Phylogenetic diversity of methanogenic archae in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, p. 223-226.
- Wise, M.G., and G.R. Siragusa.** 2005. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 71, p. 3911-3916.
- Yu, Z., Michel, F.C., Jr., Hansen, G., Wittum, T., and M. Morrison.** 2005. Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance. *Appl Environ Microbiol.* 71, p. 6926-6933.

9. ANNEXE

Acceptation du contenu par les auteurs