

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-827



Archaea des bioaérosols de fermes laitières, des poulaillers et des usines d'épuration des eaux usées

Leur rôle dans l'inflammation pulmonaire

*Pascale Blais Lecours
Marc Veillette
David Marsolais
Yvon Cormier
Shelley Kirychuk
Caroline Duchaine*



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

travaillent pour vous !

Mission

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;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

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

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 : www.csst.qc.ca/AbonnementPAT

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2014
ISBN : 978-2-89631-734-9 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
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,
juillet 2014

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-827

Archaea des bioaérosols de fermes laitières, des poulaillers et des usines d'épuration des eaux usées Leur rôle dans l'inflammation pulmonaire

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.

*Pascale Blais Lecours, Marc Veillette,
David Marsolais, Yvon Cormier,
Shelley Kirychuk, Caroline Duchaine*

Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



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

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

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

Les auteurs remercient les partenaires de ce projet. Premièrement, le D^r Robert Forster (Agriculture et Agroalimentaire Canada) qui nous a fourni des souches d'*archaea* et offert de la formation et du soutien pour la culture des *archaea* méthanogènes.

Les auteurs tiennent à remercier les personnes et les organismes suivants :

L'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour le financement obtenu pour la réalisation de ce projet de recherche.

Le Réseau en santé respiratoire du Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) pour nous avoir attribué une bourse de stage de formation courte durée dans le laboratoire du D^r Robert Forster, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Lethbridge.

L'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) ainsi que le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FQRNT) pour le financement qui a permis d'amasser des échantillons ainsi que des données préliminaires à la réalisation de ce projet.

Le Canadian Centre for Health and Safety in Agriculture (CCHSA) pour les fonds nécessaires au développement du modèle murin.

La Fondation canadienne pour l'innovation (FCI) pour le parc d'équipements en biologie moléculaire.

Le D^r William Lindsley du National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) pour le prêt des échantillonneurs deux étages.

Les infirmières Gaétane Racine et Annie Girard pour avoir effectué les ponctions sanguines chez les travailleurs.

M. Serge Simard pour avoir réalisé les analyses statistiques des données du projet.

Enfin, nous remercions aussi les producteurs laitiers qui nous ont accueillis dans leur établissement et pour leur participation à l'étude santé. La participation des travailleurs est toujours une condition essentielle au succès de nos projets de recherche.

SOMMAIRE

Les bioaérosols, c'est-à-dire des aérosols composés de particules solides ou liquides de 0,002 µm à 100 µm transportant des microorganismes vivants ou des molécules dérivées d'organismes vivants, se trouvent en fortes concentrations dans plusieurs milieux de travail. Beaucoup de maladies respiratoires professionnelles y sont associées, mais leur étiologie n'est souvent pas connue. La composition exacte des bioaérosols responsables de ces maladies respiratoires doit être clairement définie afin de bien comprendre ce à quoi sont exposés les travailleurs.

Nous avons récemment documenté des microorganismes insoupçonnés dans l'air des porcheries, les *archaea*. Dans la présente étude, afin de définir l'exposition des travailleurs aux bioaérosols, nous avons utilisé des méthodes de biologie moléculaire pour décrire la biodiversité des bactéries et des *archaea* de l'air de plusieurs environnements de travail. Nous avons donc caractérisé le contenu en bactéries et en *archaea* des bioaérosols de fermes laitières, de poulaillers et d'établissements de traitement des eaux usées et nous avons déterminé l'exposition des travailleurs de fermes laitières à *Saccharopolyspora rectivirgula*, l'agent responsable du poumon du fermier. De plus, nous avons caractérisé l'immunogénicité de deux espèces d'*archaea* retrouvées dans l'air de différents milieux de travail, les *Methanobrevibacter smithii* (MBS) et les *Methanosphaera stadtmanae* (MSS), à l'aide d'un modèle murin d'exposition chronique des voies respiratoires.

La technique de [réaction en chaîne par polymérase](#) (PCR) quantitative a été utilisée pour déterminer les quantités de bactéries et d'*archaea* présentes dans l'air de fermes laitières, des poulaillers et des établissements de traitement des eaux usées. La caractérisation de la biodiversité de ces microorganismes a été effectuée par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou DGGE. La technique d'ELISA a permis de mesurer les anticorps spécifiques à MBS, à MSS et à *S. rectivirgula* dans le plasma des travailleurs. Pour étudier l'effet pro-inflammatoire des *archaea*, trois concentrations de deux espèces d'*archaea*, MBS et MSS, ont été instillées par voie intranasale à des souris C57Bl/6, trois jours consécutifs durant trois semaines.

Jusqu'à 10^8 bactéries et 10^6 *archaea* totales par m^3 ont été retrouvées dans l'air des fermes laitières. Des quantités similaires d'*archaea* ont été retrouvées dans l'air des poulaillers, alors que jusqu'à 10^8 bactéries et 10^4 *archaea* totales par m^3 ont été trouvées dans l'air des établissements de traitement des eaux usées. MBS et MSS, deux espèces d'*archaea* immunogènes, ont aussi été détectées dans l'air de fermes échantillonnées. Malgré les recommandations formulées aux fermiers quant à l'entreposage de leur foin, jusqu'à 10^7 copies du gène de l'ARNr 16S de *S. rectivirgula* par m^3 d'air y ont été mesurées. De fait, les travailleurs de fermes laitières sont davantage exposés à cet actinomycète que les sujets contrôles. Des études histopathologiques sur les poumons des souris exposées aux *archaea* ont démontré des altérations pulmonaires, qui étaient plus intenses chez les souris instillées avec MSS. Le modèle murin a aussi permis de démontrer que MSS induit une production plus élevée de cellules dendritiques myéloïdes activées que MBS dans les poumons.

Ces résultats établissent la complexité des bioaérosols des milieux agricoles et des industries dont certaines composantes telles les *archaea* pourraient avoir un rôle à jouer dans le développement de maladies respiratoires professionnelles. Ces microorganismes peuvent induire une inflammation pulmonaire dont l'intensité est dépendante de l'espèce d'*archaea*. L'exploration de la présence des *archaea* dans notre environnement et la compréhension de notre réponse à ces agents méconnus n'en sont qu'à leurs balbutiements. Leur rôle en tant qu'agents protecteurs, immunostimulateurs, pro-inflammatoires ou agents tolérés mérite d'être approfondi.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------------|
| REMERCIEMENTS..... | I |
| SOMMAIRE | III |
| 1. INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Les bioaérosols | 1 |
| 1.2 Méthodes d'échantillonnage des bioaérosols..... | 1 |
| 1.3 Les <i>archaea</i> : une composante importante des bioaérosols..... | 1 |
| 1.3.1 Description des archaea | 1 |
| 1.3.2 Présence d'archaea dans les bioaérosols..... | 2 |
| 1.4 Le potentiel immunogène des <i>archaea</i> | 2 |
| 1.5 Les maladies respiratoires associées aux bioaérosols | 3 |
| 1.6 Problématique | 4 |
| 1.7 Hypothèse..... | 4 |
| 2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES | 5 |
| 3. MÉTHODE | 7 |
| 3.1 Saisie d'échantillons..... | 7 |
| 3.1.1 Fermes laitières | 7 |
| 3.1.2 Usines de traitement d'eau usée..... | 7 |
| 3.1.3 Poulaillers | 7 |
| 3.2 Traitement des échantillons | 7 |
| 3.2.1 IOM..... | 7 |
| 3.2.2 NIOSH 251 | 8 |
| 3.2.3 Coriolis μ | 8 |
| 3.3 Extraction d'ADN | 8 |
| 3.4 PCR quantitative..... | 8 |
| 3.5 PCR DGGE..... | 10 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.6 | Évaluation de l'exposition des travailleurs aux <i>archaea</i> et à SR par la présence d'IgG spécifiques..... | 10 |
| 3.6.1 | Culture des méthanogènes | 10 |
| 3.6.2 | Évaluation du taux d'IgG dans le sang des travailleurs..... | 11 |
| 3.7 | Évaluation de l'immunogénicité des <i>archaea</i> MBS et MSS dans les voies respiratoires d'un modèle murin..... | 11 |
| 3.8 | Analyses statistiques | 12 |
| 3.8.1 | Données obtenues dans les fermes laitières | 12 |
| 3.8.2 | Données obtenues dans les poulaillers..... | 12 |
| 3.8.3 | Données obtenues à partir du modèle de souris..... | 12 |
| 4. | RÉSULTATS..... | 14 |
| 4.1 | <i>Archaea</i> et bactéries dans l'air des environnements à l'étude | 14 |
| 4.1.1 | Fermes laitières | 14 |
| 4.1.2 | Poulaillers | 18 |
| 4.1.3 | Établissements de traitement des eaux usées | 21 |
| 4.2 | Présence d'IgG spécifiques à MBS, à MSS et à SR dans le sérum des travailleurs de porcheries, de fermes laitières et d'usines d'épuration des eaux usées..... | 22 |
| 4.3 | Caractériser l'immunogénicité de MBS et de MSS chez un modèle murin | 23 |
| 4.3.1 | Histologie et dommages pulmonaires..... | 23 |
| 4.3.2 | Présence des leucocytes dans les lavages bronchoalvéolaires | 24 |
| 4.3.3 | Caractérisation de lymphocytes dans les lavages bronchoalvéolaires | 25 |
| 4.3.4 | Quantification d'anticorps (IgG) spécifiques dans le plasma | 26 |
| 4.3.5 | Réponse des cellules dendritiques myéloïdes | 26 |
| 5. | DISCUSSION..... | 29 |
| 5.1 | Présence des <i>archaea</i> dans l'air des établissements visités | 29 |
| 5.2 | Corrélations d'<i>archaea</i> et de bactéries aéroportées..... | 29 |
| 5.3 | Comparaison d'échantillonneurs | 30 |
| 5.4 | Biodiversité des <i>archaea</i> dans l'air des établissements visités | 30 |
| 5.5 | Présence de MBS et de MSS dans l'air des établissements visités | 30 |
| 5.6 | Présence de SR dans l'air des fermes laitières | 30 |
| 5.7 | IgG spécifiques à MBS, à MSS et à SR dans le sang des travailleurs | 31 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.8 | Potentiel inflammatoire des <i>archaea</i> et leur possible impact sur la santé respiratoire | 31 |
| 6. | CONCLUSION | 33 |
| 7. | APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS | 34 |
| 8. | RETOMBÉES ÉVENTUELLES | 35 |
| | BIBLIOGRAPHIE..... | 37 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées pour réaliser les différentes réactions de PCR et qPCR au cours de l'étude. | 9 |
| Tableau 2 : Séquences appariées pour les bandes de gels DGGE contenant l'ADN des <i>archaea</i> et des bactéries retrouvées dans les fermes laitières. | 17 |
| Tableau 3 : Séquences appariées pour les bandes de gels DGGE contenant l'ADN d' <i>archaea</i> trouvées dans les bioaérosols de poulaillers où les animaux sont gardés en cage. | 21 |
| Tableau 4 : Séquences correspondantes aux bandes de gels DGGE contenant de l'ADN d' <i>archaea</i> provenant d'établissements de traitement des eaux usées. | 22 |
| Tableau 5 : IgG spécifiques à <i>S. reactivigula</i> dans le plasma des travailleurs des fermes laitières comparativement aux sujets contrôles. | 23 |
| Tableau 6 : Altérations histopathologiques des poumons de souris exposés à MBS ou à MSS. | 24 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Protocole d'instillation du modèle murin d'évaluation de l'immunogénicité..... | 12 |
| Figure 2 : Concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d' <i>archaea</i> provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM), prélevés avec trois échantillonneurs différents..... | 14 |
| Figure 3 : Absence de corrélation entre les concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d' <i>archaea</i> provenant d'échantillons d'air de fermes laitières..... | 15 |
| Figure 4 : Concentrations du gène de l'ARNr 16S de <i>S. rectivirgula</i> provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM), obtenues grâce à l'échantillonneur IOM..... | 15 |
| Figure 5 : Distribution des particules de l'air de fermes laitières selon leur taille : concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries (A) et d' <i>archaea</i> (B) provenant d'échantillons de fermes laitières (moyenne \pm SEM). *: $p < 0,005$ | 16 |
| Figure 6 : Concentrations de MSS et MBS provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM). La limite de détection de la PCR est représentée par la ligne pointillée. | 18 |
| Figure 7 : Quantification des <i>archaea</i> par PCR quantitative dans l'air de poulaillers à cages et de poulaillers où les poules sont gardées en liberté..... | 19 |
| Figure 8 : Moyennes des concentrations d' <i>archaea</i> , de bactéries, d'endotoxines et de poussières retrouvées dans les bioaérosols des poulaillers à cages et en liberté. | 20 |
| Figure 9 : Concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d' <i>archaea</i> provenant d'échantillons d'air de deux établissements de traitement des eaux usées (moyenne \pm SEM)..... | 21 |
| Figure 10 : MBS et MSS induisent des altérations histopathologiques dans les poumons. | 23 |
| Figure 11 : Quantification des types de leucocytes dans le LBA de souris instillées avec des doses croissantes de deux espèces d' <i>archaea</i> durant 3 semaines : (A) Nombre de cellules immunes totales; (B) Compte des différents types de leucocytes dans le LBA de souris exposées aux MBS; et (C) Compte des différents types de leucocytes dans le LBA de souris exposées aux MSS..... | 25 |
| Figure 12 : Majorité de lymphocytes T CD4 ⁺ et de lymphocytes B CD19 ⁺ dans le LBA de souris instillées avec deux espèces d' <i>archaea</i> : (A) MBS et (B) MSS. | 26 |
| Figure 13 : Production d'IgG spécifique à l'antigène dans le plasma de souris exposé aux (A) MBS et (B) MSS. (C) Titres exprimés en logarithme inverse des dilutions de plasma. | 27 |
| Figure 14 : Réponse des cellules dendritiques myéloïdes dans les voies respiratoires des souris exposées à MBS et à MSS. | 28 |

1. INTRODUCTION

1.1 Les bioaérosols

Les bioaérosols sont des particules organiques en suspension dans l'air ayant un diamètre aérodynamique de 0,002 à 100 µm et qui proviennent d'organismes vivants ou dépendants de la vie (plantes, champignons, bactéries, *archaea*, animaux, humains, protistes, virus)¹. Ces particules peuvent être composées de microorganismes entiers ou en fragments, de protéines, de toxines, de résidus métaboliques ou bien de structures végétales microscopiques (ex. pollen, spores, fragments végétaux). Les bioaérosols sont considérés comme ayant des propriétés infectieuses, allergéniques, toxiques ou bien pharmacologiques² et peuvent donc affecter la santé des êtres vivants qui y sont exposés.

1.2 Méthodes d'échantillonnage des bioaérosols

Les bioaérosols ont été étudiés dans l'air de plusieurs environnements de travail tels les bâtiments agricoles³⁻⁵, les scieries^{6, 7}, les cabinets de dentiste⁸, les tourbières⁹ ainsi que les ateliers d'usinage^{10, 11}. Cependant, les méthodes traditionnelles d'échantillonnage par culture utilisées dans ces études ne permettent pas une description complète des microorganismes retrouvés dans l'air, puisque la majorité de ceux-ci sont non cultivables¹². Il est maintenant possible d'utiliser plusieurs types d'échantillonneurs en combinaison avec des méthodes de biologie moléculaire afin de décrire la biodiversité microbienne complète de l'air. En effet, des impacteurs liquides tels le Coriolis (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France)¹³ ou bien le BioSampler (SKC Inc.), des cyclones à deux étages tel le BC 251 (NIOSH)¹⁴ ainsi que des échantillonneurs à filtre comme la cassette IOM (Institute of Occupational Medicine) permettent la capture de tous les microorganismes de l'air (cultivables ou non), qui peuvent ensuite être identifiés par approches moléculaires.

1.3 Les *archaea* : une composante importante des bioaérosols

1.3.1 Description des *archaea*

Les *Archaea* sont un des trois grands domaines de la vie avec les *Eucarya* et les *Bacteria*¹⁵. Ces microorganismes sont classés en plusieurs phylums, dont les deux principaux sont les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota*. Le groupe des *Euryarchaeota* contient à lui seul toutes les espèces méthanogènes et halophiles ainsi que plusieurs microorganismes thermophiles et psychrophiles. Le groupe des *Crenarchaeota*, quant à lui, regroupe les *archaea* hyperthermophiles¹⁶⁻¹⁸. En plus du phylum *Korarchaeota* ne comprenant à ce jour qu'une espèce cultivée, Brochier-Arman et coll. ont suggéré en 2008 un quatrième phylum d'*archaea*, les *Thaumarchaeota*, comprenant les *Crenarchaeota* mésophiles¹⁶.

Les *archaea* possèdent des caractéristiques à la fois des bactéries et des eucaryotes. En effet, leur système de traitement de l'information (réplication, transcription, traduction et réparation de l'ADN) ressemble à celui des eucaryotes tandis que leur métabolisme rappelle davantage celui des bactéries¹⁷⁻¹⁹. Les *archaea* ont aussi des caractéristiques qui leur sont propres, telle la capacité de plusieurs d'entre elles à croître dans des environnements extrêmes, leur résistance à plusieurs antibiotiques, une paroi cellulaire dépourvue de peptidoglycane et des lipides

membranaires uniques. Les *archaea* possèdent effectivement des lipides que l'on ne retrouve pas dans d'autres formes de vie, les archaeols et les caldarchaeols étant les principaux. Ce sont des lipides polaires dont la chaîne carbonée est habituellement saturée et reliée au glycérol par des liens éther^{20, 21}. Les caldarchaeols ont la caractéristique de former une monocouche lipidique dans la membrane des *archaea*, contrairement aux archaeols qui eux forment une bicouche lipidique²²⁻²⁴. La composition lipidique de la membrane des *archaea* varie largement selon l'espèce^{25, 26} et Choquet et coll. ont démontré qu'une plus grande proportion de caldarchaeols dans la membrane assurait une plus grande stabilité archaebactérienne à l'hydrolyse et à l'oxydation²⁶.

1.3.2 Présence d'archaea dans les bioaérosols

La communauté scientifique a longtemps pensé que les *archaea* n'étaient présentes que dans les environnements extrêmes tels les sources d'eaux acides ou thermales, les bassins hypersalés ou bien les grands fonds marins. En raison des exigences de croissance et de culture très ardues de ces microorganismes, les *archaea* ont été et sont encore peu étudiées par les microbiologistes.

Cependant, grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire, il a été possible de détecter des *archaea* dans des environnements beaucoup moins hostiles à l'humain. En effet, des méthanogènes ont été retrouvées dans le lisier de porc^{27, 28}, dans le fumier des vaches²⁹ ainsi que dans les fèces humaines³⁰. Ces *archaea* sont alors susceptibles d'être aérosolisées et donc d'être présentes en grand nombre dans les bioaérosols de plusieurs milieux de travail tels les milieux agricoles (porcheries, fermes laitières, poulaillers) et les usines d'épuration des eaux usées. De fait, en 2009, Nehme et coll. ont démontré la présence de jusqu'à 10^8 *archaea* par m³ d'air dans les porcheries³¹. Les bioaérosols étudiés étaient composés principalement de deux espèces d'*archaea* méthanogènes, soit *Methanobrevibacter smithii* (MBS) et *Methanophaera stadmanae* (MSS). Cette étude était la première à faire état de la présence d'*archaea* dans l'air, et sa réalisation a été possible grâce aux approches moléculaires. En effet, il était impossible de détecter les méthanogènes avec les méthodes traditionnelles de culture puisque ces microorganismes sont extrêmement sensibles à l'oxygène et sont donc très affectés par l'aérosolisation.

1.4 Le potentiel immunogène des archaea

Les *archaea* sont composées de molécules potentiellement immunogènes tels les lipides et les protéines membranaires. Les lipides des *archaea* possèdent des caractéristiques très différentes de ceux des bactéries et des cellules eucaryotes. Stables, ils sont davantage ingérés par les cellules phagocytaires comparativement aux liposomes conventionnels^{26, 32}. Les lipides d'*archaea*, aussi appelés archaeosomes, font d'ailleurs l'objet d'études quant à leur potentiel immunogène et à leur utilisation comme adjuvant dans des vaccins. De plus, il a été démontré que les lipides de certaines *archaea* induisent une réponse immunitaire caractérisée par un recrutement et l'activation de macrophages et de cellules dendritiques au site d'injection ainsi que le développement d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire de type à la fois T_{H1} et T_{H2}³³⁻³⁷. Krishnan et coll. ont démontré que les lipides de MBS induisent une réponse immunitaire plus importante que les lipides MSS³⁶.

Récemment, Yamabe et coll. ont identifié la première protéine antigénique d'*archaea* capable d'être reconnue par le système immunitaire humain³⁸. En effet, ils ont pu démontrer que la protéine de choc thermique Cpn II (chaperonine du groupe II) de *Methanobrevibacter oralis*, une *archaea* possiblement impliquée dans les parodontites, induit la production d'anticorps spécifiques dans le sérum de patients atteints de cette maladie. Les chaperonines du groupe I, aussi appelées Hsp60, sont retrouvées chez les bactéries alors que les chaperonines du groupe II sont associées aux *archaea* (thermosomes) et aux eucaryotes (CCT-TRiC)^{38, 39}. La Hsp60 est reconnue pour être un puissant antigène chez les bactéries et serait même une des principales molécules immunogènes lors d'une infection. De fait, lors d'un stress de la bactérie, il y aurait accumulation de cette protéine à la surface de la cellule ce qui augmenterait son immunogénicité^{40, 41}.

1.5 Les maladies respiratoires associées aux bioaérosols

Les poussières organiques, aussi appelées bioaérosols, se trouvent dans plusieurs environnements de travail tels les milieux agricoles, les tourbières, les scieries et les ateliers d'usinage et sont la cause de problèmes respiratoires chez les travailleurs^{10, 42-45}. Les particules contenues dans les bioaérosols ont un diamètre aérodynamique inférieur à 200µm et celles plus petites que 5µm sont susceptibles, lorsque respirées, d'atteindre les bronches et les alvéoles, où elles exercent leur potentiel toxique et/ou inflammatoire.

Les personnes travaillant dans un milieu fortement contaminé par les bioaérosols telles les porcheries et les fermes laitières sont sujettes à respirer une quantité très élevée de particules biologiques. À titre d'exemple, à l'intérieur d'une porcherie, considérant qu'un travailleur inhale jusqu'à 42 m³ d'air lors d'une journée de travail et que les bioaérosols contiennent en moyenne 10⁸ bactéries par m³, un producteur de porcs respire jusqu'à 10¹⁰ bactéries par journée de travail^{46, 47}. L'inhalation de poussières organiques peut causer des maladies infectieuses si certains microorganismes pathogènes sont présents dans l'air. L'exposition aux bioaérosols peut de même déclencher des réactions toxiques et être à l'origine de bronchites chroniques et de syndromes toxiques d'exposition aux poussières organiques. Finalement, l'exposition aux bioaérosols peut être associée à des réactions d'hypersensibilité et à des maladies respiratoires telles l'asthme allergique, la rhinite et l'alvéolite allergique extrinsèque. Par exemple, les porcheries sont davantage associées au développement de bronchites chroniques alors que les fermes laitières sont liées à des maladies respiratoires telles que le poumon du fermier qui est une alvéolite allergique extrinsèque. La réponse inflammatoire de ces maladies peut être classée en deux groupes. Les maladies à réponse de type T_H1 sont caractérisées par une réponse immune cellulaire impliquant les cytokines IFN γ , IL-12 et IL-6. Les maladies à réponse de type T_H2 activent davantage la réponse immune humorale et impliquent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13⁴⁸. L'alvéolite allergique extrinsèque est une maladie de type T_H1 démontrant une forte accumulation de lymphocytes dans les poumons ainsi que de la fibrose et des granulomes. L'asthme allergique quant à lui est une maladie de type T_H2 caractérisée par une forte infiltration de granulocytes dans les poumons où il peut survenir un remodelage tissulaire et de l'hyperréactivité bronchique⁴⁹⁻⁵¹.

1.6 Problématique

Les bioaérosols ont fait l'objet de plusieurs études pour démontrer l'effet de certaines de leurs composantes sur la santé des travailleurs. De fait, plusieurs pathologies telles le syndrome toxique d'exposition aux poussières organiques et la bronchite chronique, sont attribuées à la présence d'endotoxines, une composante de la paroi des bactéries à Gram négatif, dans l'air des établissements agricoles⁵²⁻⁵⁴. Par ailleurs, une bactérie du groupe des actinomycètes, *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR), a été décrite comme l'agent étiologique dans l'alvéolite allergique extrinsèque (poumon du fermier)⁵⁵. Cependant, l'étiologie de plusieurs maladies respiratoires causées par les bioaérosols chez les travailleurs reste à être déterminée. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis de faire des découvertes surprenantes quant à la composition des lisiers de porc et des bioaérosols associés. En effet, Nehme et coll. ont démontré en 2008 la présence majoritaire des bactéries à Gram positif dans l'air des porcheries, ces dernières provenant du lisier de porc⁴⁷. Cette découverte atténuait alors l'importance des endotoxines comme composante étiologique des maladies respiratoires associées aux bioaérosols. C'est grâce à la découverte en 2009 d'un très grand nombre d'*archaea* dans l'air de porcheries³¹ que le rôle des composantes jusqu'alors inconnues des bioaérosols a pris de l'importance. Cette dernière étude a été la première à démontrer la présence d'*archaea* dans l'air et a ouvert de nombreuses perspectives quant à l'implication des *archaea* et des composantes non cultivables des bioaérosols dans le développement des maladies respiratoires professionnelles. Jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur l'impact des *archaea* sur la santé respiratoire.

1.7 Hypothèse

Le présent projet propose l'hypothèse que les *archaea* sont une composante majeure des bioaérosols trouvés dans plusieurs milieux de travail et qu'elles jouent un rôle dans les maladies pulmonaires causées par les bioaérosols.

2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Afin de vérifier l'hypothèse du présent projet de recherche, trois objectifs spécifiques ont été réalisés :

1. Caractériser les bactéries et les *archaea* des bioaérosols présents dans les fermes laitières, les usines d'épuration des eaux usées et les poulaillers:
 - a. Développer des méthodes moléculaires de détection des *archaea* efficaces pour l'ensemble des espèces de ce phylum;
 - b. Comparer l'efficacité de trois échantillonneurs d'air dans les fermes laitières.
2. Évaluer la présence d'IgG spécifiques à *Methanobrevibacter smithii*, à *Methanosphaera stadtmanae* et à *Saccharopolyspora rectivirgula* dans le sérum des travailleurs de porcheries, de fermes laitières et d'usines d'épuration des eaux usées.
3. Caractériser l'immunogénicité de *Methanobrevibacter smithii* et de *Methanosphaera stadtmanae* chez un modèle murin d'exposition chronique des voies respiratoires.

3. MÉTHODE

3.1 Saisie d'échantillons

3.1.1 Fermes laitières

Les bioaérosols ont été échantillonnés dans l'air de 13 fermes laitières de l'est du Québec. Les échantillons étaient prélevés dans les aires où les animaux sont gardés et soignés. L'échantillonnage a eu lieu pendant la période hivernale assurant ainsi un confinement maximal. Positionnés à un mètre du sol, les échantillonneurs d'air étaient utilisés pendant une période de quatre à cinq heures pendant la période de traite du matin ou du soir. Trois modèles différents ont été utilisés. Premièrement, le NIOSH 251, utilisé à un débit de 10 L/minute relié à des pompes AirCon-2 (Gilian). Deuxièmement, trois cassettes IOM (SKC, Ancaster, ON, Canada) chargées avec des membranes de gélatine de 25 mm à un débit de 2 L/minute, reliées à des pompes Giliar-5 (Levitt- Sécurité Limitée, Dorval, QC, Canada). Le troisième étant un échantillonneur Coriolis μ (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) utilisé à 100 L/minute. Une comparaison de la capacité de capture des bactéries et des *archaea* a été effectuée entre les trois échantillonneurs utilisés.

3.1.2 Usines de traitement d'eau usée

Un protocole identique à celui utilisé dans les fermes laitières a été mis en œuvre, à l'exception qu'un seul type d'échantillonneur a été utilisé, soit les cassettes IOM. Huit sites répartis dans deux établissements de traitements des eaux usées furent visités en période hivernale. Pour chaque établissement, quatre sites différents étaient à l'étude soit celui du dégrillage, les bassins de dessablage, les bassins de sédimentation et finalement celui de la biofiltration.

3.1.3 Poulaillers

Les échantillons furent prélevés en Saskatchewan dans 15 établissements où les animaux sont élevés en cages superposées et 15 autres où les animaux sont élevés librement au sol. Des échantillons stationnaires ainsi que personnels furent prélevés. Des impacteurs en cascade de type Marple (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) chargés de filtres de PVC de 5 μ m furent utilisés à 2 L/min⁵⁶. Les étages 3, 4 et 5 (>3,5 μ m) ont servi pour les analyses.

3.2 Traitement des échantillons

3.2.1 IOM

Les trois filtres de gélatine provenant des cassettes IOM ont été solubilisés dans un volume de 15 ml de tampon phosphate. La solution fut divisée en fractions aliquotes de 1,5 ml et centrifugée 10 minutes à 21 000 g. Les culots de cellules ainsi obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à ce que l'ADN soit extrait.

3.2.2 NIOSH 251

Les filtres des échantillonneurs NIOSH (étage 3) ont été transférés dans des tubes de plastique stériles contenant 2 ml d'une solution de 0,9 % NaCl et 0,05 % Tween 20. La même solution a été ajoutée au premier étage (2 ml) et au deuxième étage (1 ml) de l'échantillonneur. Après homogénéisation de 15 min au vortex, les suspensions obtenues des trois étages ont été divisées en fractions aliquotes et centrifugées. Les culots ont été conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

3.2.3 *Coriolis* μ

Les échantillons liquides ont été divisés en fractions aliquotes de 1,5 ml et centrifugés à 21 000 *g* pendant 10 minutes. Les culots ont été conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

3.3 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN total des microorganismes présents dans les échantillons fut réalisée en utilisant une trousse QIAamp DNA extraction kit (Qiagen, Mississauga, Canada) en suivant le protocole du fabricant pour l'isolation de l'ADN bactérien, incluant une digestion protéinase K de 1,5 h.

3.4 PCR quantitative

Toutes les PCR quantitatives en temps réel furent réalisées avec un appareil DNA Engine Opticon 2 (Bio-Rad, Mississauga, Canada). Les trousse iQ SYBR green Supermix et iQ Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) étaient utilisées afin de réaliser la quantification des échantillons. Le tableau 1 fait état des amorces, des sondes et des références ainsi que des thermoprotocoles utilisés.

Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées pour réaliser les différentes réactions de PCR et qPCR au cours de l'étude.

| Amorces | Cible | Séquence nucléotidique (5'-3') | Référence |
|--------------------|---|--|-----------|
| A751F | Amorces sens quantification <i>archaea</i> totales | CCG ACG GTG AGR GRY GAA | 57 |
| A976R | Amorces anti-sens quantification <i>archaea</i> totales | YCC GGC GTT GAM TCC AAT T | 58 |
| EUB F | Amorce sens quantification bactéries totales | GGT AGT CYA YGC MST AAA CG | 59 |
| EUB R | Amorce anti-sens quantification bactéries totales | GAC ARC CAT GCA SCA CCT G | 59 |
| Probe EUB | Sonde fluorescente quantification bactéries totales | FAM-TKC GCG TTG CDT CGA ATT AAW CCA C-TAMRA | 59 |
| Sac-86F | Amorce sens quantification SR | TGT GGT GGG GTG GAT GAG T | 60 |
| Sac-183R | Amorce sens quantification SR | ACC ATG CGG CAG AAT GTC CT | 60 |
| A333F | Amorce sens DGGE <i>archaea</i> | TCC AGG CCC TAC GGG | 58 |
| A751R (GC) | Amorce anti-sens DGGE <i>archaea</i> | TTC RYC YCT CAC CGT CG | 57 |
| GC <i>archaea</i> | Pince GC amorce anti-sens DGGE <i>Archaea</i> | CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C | 61 |
| 341F | Amorce sens DGGE bactéries | CCT ACG GGA GGC AGC AG | 61 |
| 907R | Amorce anti-sens DGGE bactéries | CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT | 62 |
| GC <i>bacteria</i> | Pince GC amorce sens DGGE bactéries | CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G | 61 |
| Mnif 202 F | Amorce sens MBS | GAA AGC GGA GGT CCT GAA | 63 |
| Mnif 353R | Amorce anti-sens MBS | ACT GAA AAA CCT CCG CAA AC | 63 |
| Mnif Probe | Sonde fluorescente MBS | FAM- CCG GAC GTG GTG TAA CAG TAG CTA -BHQ-1 | 63 |
| MSS 122F | Amorce sens MSS | CTA ACA TCA AAG TAG CTC C | 64 |
| MSS 414R | Amorce anti-sens MSS | TCC TCT AAG ACC GTT T | 64 |

3.5 PCR DGGE

Pour l'analyse des bactéries, les régions variables V3 à V5 du gène codant pour l'ARNr 16S furent amplifiées par PCR (586pb) en utilisant les amorces GC-341f et 907r (tableau 1), selon les conditions PCR publiées par Yu et Morrisson⁶². La biodiversité des *archaea* quant à elle fut évaluée en utilisant les amorces A333F et GC-A751R résultant en une région de 418 pb, selon les conditions PCR publiées par Blais Lecours et coll.⁶⁵. Après visualisation des amplicons sur gel d'agarose 1,5 %, la quantité d'ADN générée était estimée à l'aide d'un standard moléculaire EZ Load Precision Molecular Mass Ruler (Bio-Rad) et du logiciel Gene Tools (SynGen).

Les profils DGGE furent produits selon la méthode décrite par Muyzer et coll.⁶¹ en utilisant un appareil Dcode (Bio-Rad). Ainsi, 100 ng de produits PCR furent déposés sur un gel de polyacrylamide, 0.5X TAE, ayant un gradient dénaturant de 30-55 % (100 % étant 7 mol/L d'urée et 40 % v/v formamide). L'électrophorèse fut réalisée dans un tampon TAE 0.5X à 60 V pendant 16 heures à 60°C. Les fragments d'ADN furent colorés pendant 15 minutes avec le fluorochrome SybrGold (Invitrogen) et visualisés à l'aide d'un appareil Chemigenius 2Xe (SynGen). Les bandes d'ADN présentes furent prélevées et ré-amplifiées par PCR avant d'être envoyées au séquençage.

Le logiciel GelCompar II version 6.05 (AppliedMaths, Belgique) fut utilisé pour normaliser et comparer tous les profils obtenus. Pour ce faire, un standard moléculaire a été exploité en utilisant une tolérance de 1 % relative à la position des bandes. La similitude entre les différents profils a été calculée en ayant recours à un coefficient de corrélation de Pearson et le regroupement a été fait en utilisant la méthode UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages).

La séquence de chaque bande DGGE prélevée dans les gels fut comparée aux séquences disponibles dans la base de données Genbank à l'aide de l'outil de recherche BlastN⁶⁶ du National Center for Biotechnology Information (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/]. L'affiliation des isolats fut déterminée en lien avec la similarité des séquences.

3.6 Évaluation de l'exposition des travailleurs aux *archaea* et à SR par la présence d'IgG spécifiques

3.6.1 Culture des méthanogènes

La culture des méthanogènes *Methanosphaera stadtmanae* (MSS) et *Methanobrevibacter smithii* (MBS), les deux espèces d'*archaea* retrouvées en majorité dans l'air des porcheries, a permis d'obtenir des antigènes représentatifs de ceux respirés par les travailleurs. Pour ce faire, la technique de culture des microorganismes anaérobiques de Hungate et les connaissances acquises lors d'un stage dans le laboratoire du docteur Robert Forster d'Agriculture Canada ont été exploitées⁶⁷. Les culots de culture ont été lavés, congelés et lyophilisés pour une utilisation ultérieure.

3.6.2 Évaluation du taux d'IgG dans le sang des travailleurs

Les travailleurs des fermes laitières et des usines d'épuration des eaux usées ont été recrutés pour subir une ponction de sang veineux. Le regroupement stratégique Bioaérosols et santé respiratoire a permis d'avoir recours à des sérums de travailleurs de porcheries prélevés lors d'un projet précédent. Cette étape du projet sur les sujets humains a été approuvée par le Comité d'éthique de la recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ - CER-20508). La technique d'ELISA a été utilisée pour déterminer l'exposition des travailleurs de fermes laitières et d'usines d'épuration des eaux usées à MSS, à MBS et à *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR). En effet, les travailleurs inhalant quotidiennement ces espèces microbiennes présentes dans les bioaérosols sont sujets à développer des anticorps (IgG) spécifiques à ces microorganismes. Ceux-ci ont donc été détectés par ELISA selon un protocole publié par l'équipe de la D^{re} Duchaine^{44, 68}. La limite de détection a été déterminée en fonction de la réponse des sujets contrôles constitués d'individus n'ayant pas de contact avec des fermes laitières et des usines d'épuration des eaux usées. Les sujets contrôles pouvaient toutefois avoir été en contact avec MSS et/ou MBS et/ou SR d'une autre façon (milieu de travail contaminé, contact fréquent avec des fèces animales, etc.). Ils pouvaient donc posséder des IgG spécifiques à ces microorganismes dans leur sérum, ce qui est susceptible d'affecter les résultats. Pour pallier ce problème, le nombre de sujets contrôles a été augmenté dans l'étude et il y a eu comparaison entre la fréquence de résultats positifs de chacun des groupes.

3.7 Évaluation de l'immunogénicité des *archaea* MBS et MSS dans les voies respiratoires d'un modèle murin

Un modèle murin d'exposition pulmonaire chronique largement étudié pour sa propriété à développer des symptômes semblables à ceux d'une alvéolite allergique extrinsèque a été utilisé afin de caractériser la réponse inflammatoire pulmonaire aux *archaea*⁶⁹⁻⁷¹. Des groupes de six souris C57Bl/6 ont été instillés par voie intranasale avec de la saline, MBS ou MSS à raison de trois fois par semaine durant trois semaines consécutives puis elles ont été euthanasiées quatre jours après la dernière instillation (fig. 1). Des lavages bronchoalvéolaires (BAL) ont été effectués sur chaque souris (trois lavages de 1 ml avec une solution saline) afin de récolter les cellules et les médiateurs cellulaires produits dans les voies respiratoires. Le sang des souris a aussi été prélevé de la jugulaire afin de détecter les anticorps produits après exposition à MBS ou à MSS. Des comptes totaux et des comptes différentiels ont été effectués sur les cellules récoltées dans les fluides des lavages bronchoalvéolaires. Un poumon par souris fut aussi prélevé pour analyses histopathologiques.

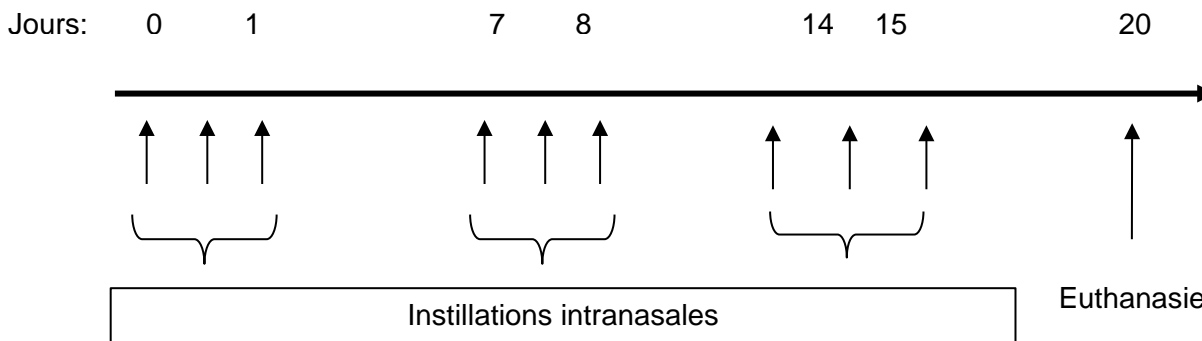


Figure 1 : Protocole d'instillation du modèle murin d'évaluation de l'immunogénicité.

3.8 Analyses statistiques

3.8.1 Données obtenues dans les fermes laitières

Les données quantitatives sont exprimées en utilisant la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les données des *archaea* totales et des bactéries totales ont été analysées en utilisant une analyse de variance mixte (ANOVA) avec deux facteurs expérimentaux ; le premier (facteur fixe) associé avec la comparaison des différents échantillonneurs et le deuxième (variable bloquée) analysé comme effet randomisé associé aux différentes fermes échantillonnées. Cette approche statistique a aussi été utilisée pour comparer les données obtenues à partir des différents étages du NIOSH. Les données des travailleurs et des sujets contrôles ont été analysées en utilisant le test *t* de Student. Pour certaines variables, des valeurs ont été transformées en \log_{10} pour stabiliser la variance. L'hypothèse de normalité a été vérifiée en utilisant les tests Shapiro-Wilk après une factorisation Cholesky. La variation de Brown et Forsythe du test de Levene a été utilisée pour vérifier l'homogénéité des variances. Les relations entre les variables ont été exprimées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Les résultats sont considérés comme significatifs avec des valeurs *P* de $\leq 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel statistique SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3.8.2 Données obtenues dans les poulaillers

Les concentrations d'*archaea* sont exprimées sous forme de valeurs brutes. Cependant, la transformation log de ces données a été requise avant l'analyse statistique. Le test *t* de Student non pairé a été utilisé pour comparer les différents environnements.

3.8.3 Données obtenues à partir du modèle de souris

Les données quantitatives sont exprimées en utilisant la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM), ou bien la médiane et l'intervalle interquartile (variables continues). Pour les données continues, une ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour comparer les groupes. Pour certaines variables, des valeurs ont été transformées en \log_{10} pour stabiliser la variance. L'hypothèse de normalité a été vérifiée en utilisant les tests Shapiro-Wilk après une factorisation Cholesky. La variation de Brown et Forsythe du test de Levene a été utilisée pour vérifier

l'homogénéité des variances. Les données histopathologiques ont été traitées en utilisant une ANOVA unidirectionnelle avec une distribution de Poisson. Les résultats sont considérés significatifs avec des valeurs P de $\leq 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel statistique SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Les lettres différentes sur les tableaux et figures démontrent une différence significative entre les groupes comparés.

4. RÉSULTATS

4.1 *Archaea* et bactéries dans l'air des environnements à l'étude

4.1.1 Fermes laitières

4.1.1.1 Quantification des *archaea* totales et des bactéries totales dans l'air des fermes laitières

Nous avons premièrement démontré par PCR quantitative que les bioaérosols des fermes laitières contiennent jusqu'à 10^6 *archaea* et 10^8 bactéries par m^3 d'air, et que les résultats obtenus en ayant recours à trois types d'échantillonneurs étaient comparables (fig. 2). Pour ce qui est de la comparaison de l'efficacité des échantillonneurs d'air IOM, NIOSH et Coriolis ($n=13$ pour chacun), aucune différence statistique n'a été observée (*archaea* : $p = 0,3$, bactérie : $p = 0,5$). Les limites de détection étaient de 4×10^2 gènes de l'ARNr 16S pour les *archaea* et de 2×10^3 gènes de l'ARNr 16S pour les bactéries.

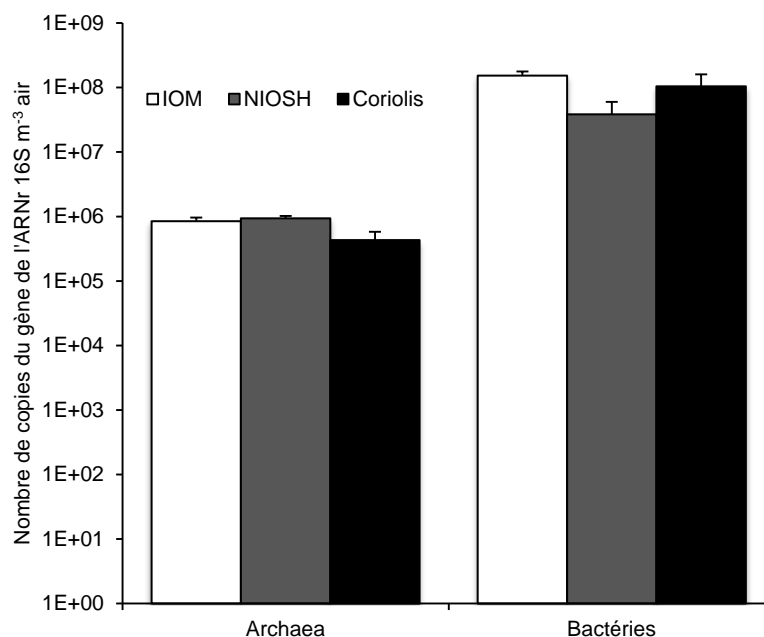


Figure 2 : Concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d'*archaea* provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM), prélevés avec trois échantillonneurs différents.

De plus, les concentrations d'*archaea* dans l'air de ce milieu ne corrént pas avec celles des bactéries (fig. 3) pour aucun des trois échantillonneurs d'air testés, soit IOM ($r = 0,262$, $p = 0,4$), NIOSH ($r = 0,083$, $p = 0,8$) et Coriolis ($r = 0,046$, $p = 0,9$) ($n=13$ chacun). Les données d'une même ferme sont représentées par la même couleur à la figure 3.

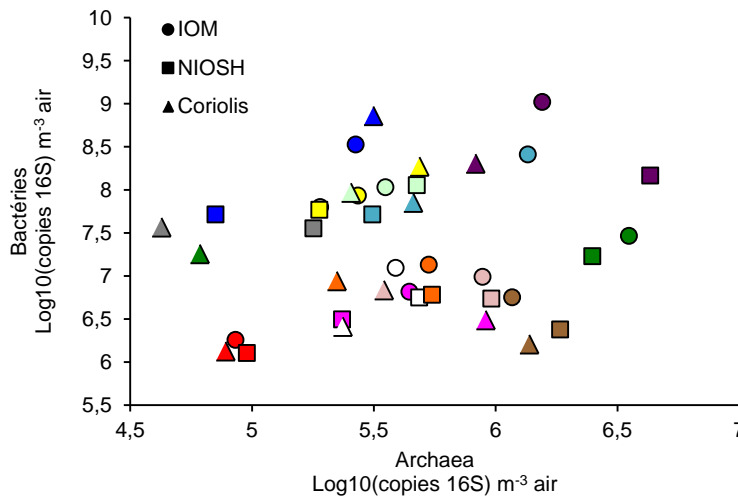


Figure 3 : Absence de corrélation entre les concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d'*archaea* provenant d'échantillons d'air de fermes laitières.

4.1.1.2 Quantification spécifique de SR dans l'air des fermes laitières

S. rectivirgula a aussi été quantifié dans les bioaérosols, puisque c'est un microorganisme fréquemment retrouvé dans les fermes laitières et qu'il peut causer une maladie pulmonaire appelée « poumon du fermier ». Ainsi, nous avons démontré, par PCR quantitative, qu'il existe une grande différence des concentrations de ce microorganisme dans l'air des fermes laitières échantillonnées (n=13) (fig. 4). Une moyenne de $1,4 \times 10^6$ gènes de l'ARNr 16S par m^3 d'air ont été détectés, mais l'air de certaines fermes contenait des concentrations de *S. rectivirgula* sous la limite de détection (2×10^3 gènes/ m^3 d'air), alors que pour d'autres, la concentration s'élevait à $1,3 \times 10^7$ gènes de l'ARNr 16S par m^3 d'air (fig. 4).

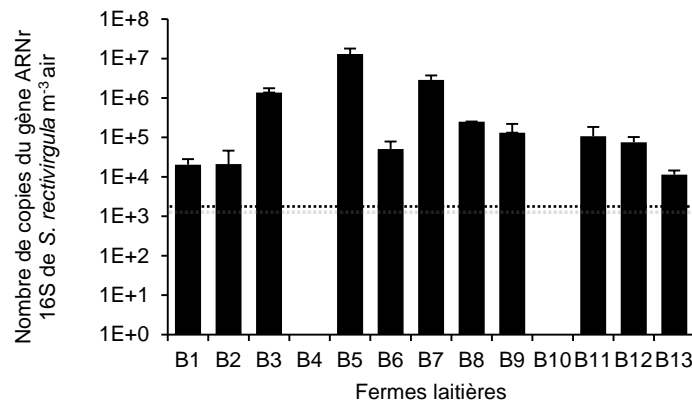


Figure 4 : Concentrations du gène de l'ARNr 16S de *S. rectivirgula* provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM), obtenues grâce à l'échantillonneur IOM. La ligne pointillée, positionnée à 2×10^3 gènes/ m^3 d'air, représente la limite de détection de la PCR.

4.1.1.3 Granulométrie des *archaea* totales et des bactéries totales dans l'air des fermes laitières

De plus, la figure 5 montre que la majeure partie des *archaea* et des bactéries trouvées dans l'air des fermes laitières ont été échantillonnées dans le premier étage de l'échantillonneur NIOSH, soit des particules de plus de 2,1 μm de diamètre aérodynamique (aérosols thoraciques et respirables). Le deuxième étage a échantillonné des particules de plus de 0,41 μm alors que le troisième étage a filtré les plus petites particules. En effet, une comparaison de la quantité d'*archaea* et de bactéries a été effectuée par PCR quantitative entre les trois étages de l'échantillonneur d'air NIOSH (n=13 chacun). Les limites de détection étaient de 1×10^2 gènes de l'ARNr 16S pour les *archaea* et 6×10^2 gènes de l'ARNr 16S pour les bactéries.

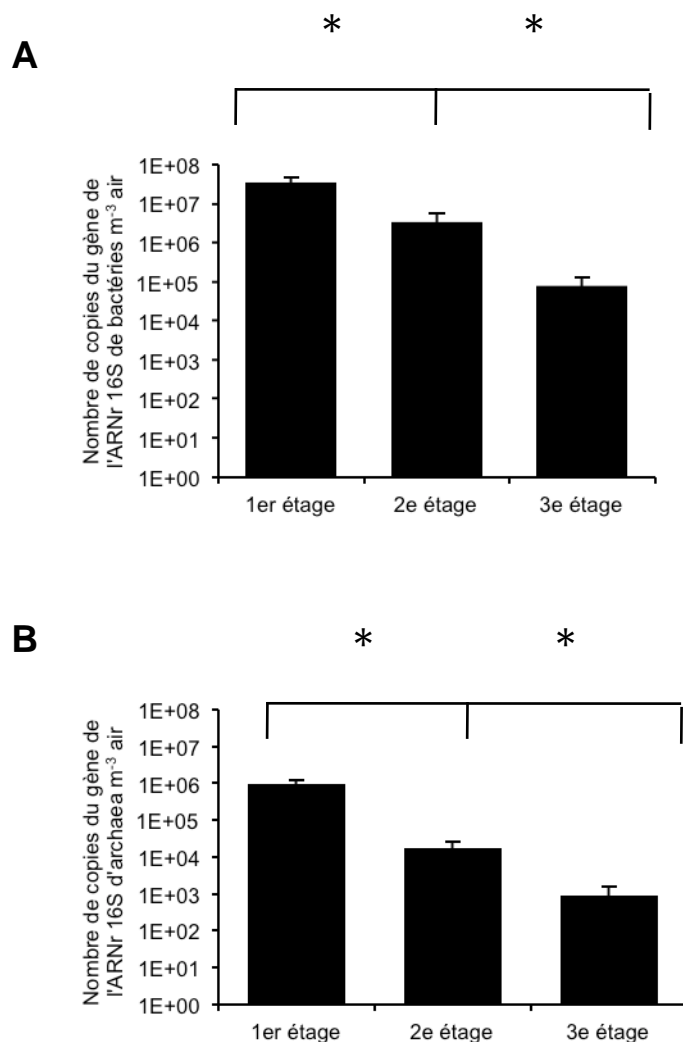


Figure 5 : Distribution des particules de l'air de fermes laitières selon leur taille : concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries (A) et d'*archaea* (B) provenant d'échantillons de fermes laitières (moyenne \pm SEM). *: $p < 0,005$

4.1.1.4 Principaux phylotypes d'archaea et de bactéries trouvées dans l'air des fermes laitières par la PCR DGGE

Des espèces d'*archaea* méthanogènes ainsi que plusieurs espèces bactériennes sont aérosolisées dans les fermes laitières. En effet, il a été possible d'identifier les différentes espèces d'*archaea* et de bactéries présentes dans les échantillons d'air prélevés dans les 13 fermes laitières échantillonnées grâce à la technique de la PCR DGGE (tableau 2).

Tableau 2 : Séquences appariées pour les bandes de gels DGGE contenant l'ADN des *archaea* et des bactéries retrouvées dans les fermes laitières.

| Type d'ADN | No. bande | Fréquence (Nombre échantillons positifs) ^α | Séquence la plus similaire | Longueur (pb) | % similarité |
|-----------------|-----------|---|---|---------------|--------------|
| Archaea | | | | | |
| | 1 | 5 | <i>Methanobrevibacter sp.</i> JQ267743 | 302 | 97 |
| | 2 | 2 | <i>Methanobrevibacter smithii</i> JQ267744 | 313 | 97 |
| | 3 | 9 | <i>Methanobrevibacter sp.</i> JQ267745 | 300 | 95 |
| | 4 | 12 | <i>Methanobrevibacter sp.</i> JQ267746 | 305 | 95 |
| | 5 | 13 | <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> JQ267747 | 316 | 98 |
| Bactérie | | | | | |
| | 1 | 13 | <i>Staphylococcus gallinarum</i> JQ267748 | 570 | 99 |
| | 1 | 13 | <i>Crocebacterium ilecola</i> JQ267749 | 549 | 99 |
| | 2 | 12 | <i>Oxalobacter sp.</i> JQ267750 | 507 | 97 |
| | 3 | 13 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> JQ267751 | 543 | 99 |
| | 4 | 12 | <i>Clostridium quinii</i> JQ267752 | 542 | 99 |
| | 4 | 12 | <i>Staphylococcus sp.</i> JQ267753 | 564 | 99 |
| | 5 | 2 | <i>Agrobacterium sp.</i> JQ267754 | 435 | 94 |
| | 6 | 12 | <i>Corynebacterium variabile</i> JQ267755 | 550 | 98 |
| | 7 | 13 | <i>Corynebacterium xerosis</i> JQ267756 | 484 | 98 |
| | 8 | 13 | <i>Corynebacterium sp.</i> JQ267757 | 482 | 95 |

^α Sur un total de 13 fermes laitières

4.1.1.5 Quantification spécifique de MSS et de MBS par qPCR dans l'air des fermes laitières

Deux espèces de méthanogènes fréquemment retrouvées dans les intestins des animaux, soit *Methanosphaera stadtmanae* (MSS) et *Methanobrevibacter smithii* (MBS), ont été quantifiées par PCR quantitative dans les échantillons récoltés avec l'échantillonneur Coriolis dans l'air de 13 fermes laitières (fig. 6). En effet, MSS a été détecté dans l'air de cinq fermes laitières à des concentrations variant de $3,4 \times 10^2$ à $2,0 \times 10^3$ microorganismes/m³ d'air, alors que MBS était présente à des concentrations de $1,3 \times 10^3$ à $7,9 \times 10^3$ microorganismes/m³ d'air, dans l'environnement de quatre des 13 fermes laitières échantillonnées. La limite de détection était de $3,3 \times 10^2$ gènes spécifiques de chacun des microorganismes par m³ d'air.

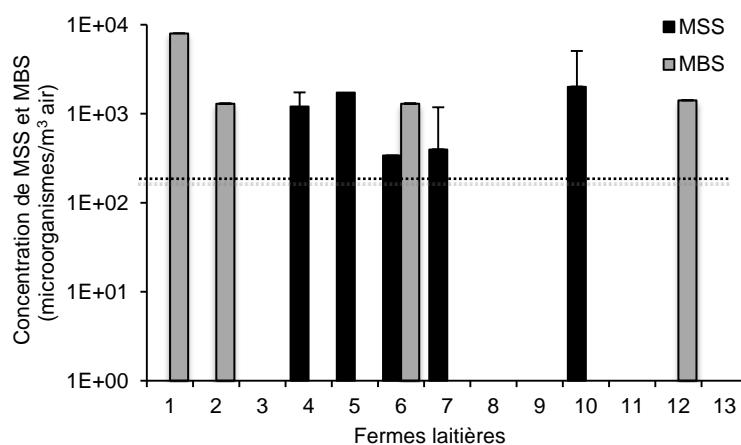


Figure 6 : Concentrations de MSS et MBS provenant d'échantillons d'air de fermes laitières (moyenne \pm SEM). La limite de détection de la PCR est représentée par la ligne pointillée.

4.1.2 Poulaillers

4.1.2.1 Quantification des *archaea* totales dans l'air des poulaillers

Des *archaea* ont été retrouvées en plus grande concentration dans l'air des poulaillers où les animaux sont gardés en cages plutôt qu'en liberté, et ce, pour les deux types d'échantillonnage d'air testés soit l'échantillonnage stationnaire des poulaillers ainsi que l'échantillonnage personnel de l'air auquel sont exposés les travailleurs (fig. 7). Les symboles le long de l'axe des x représentent les fermes dans lesquelles aucune *archaea* n'a été détectée dans l'air.

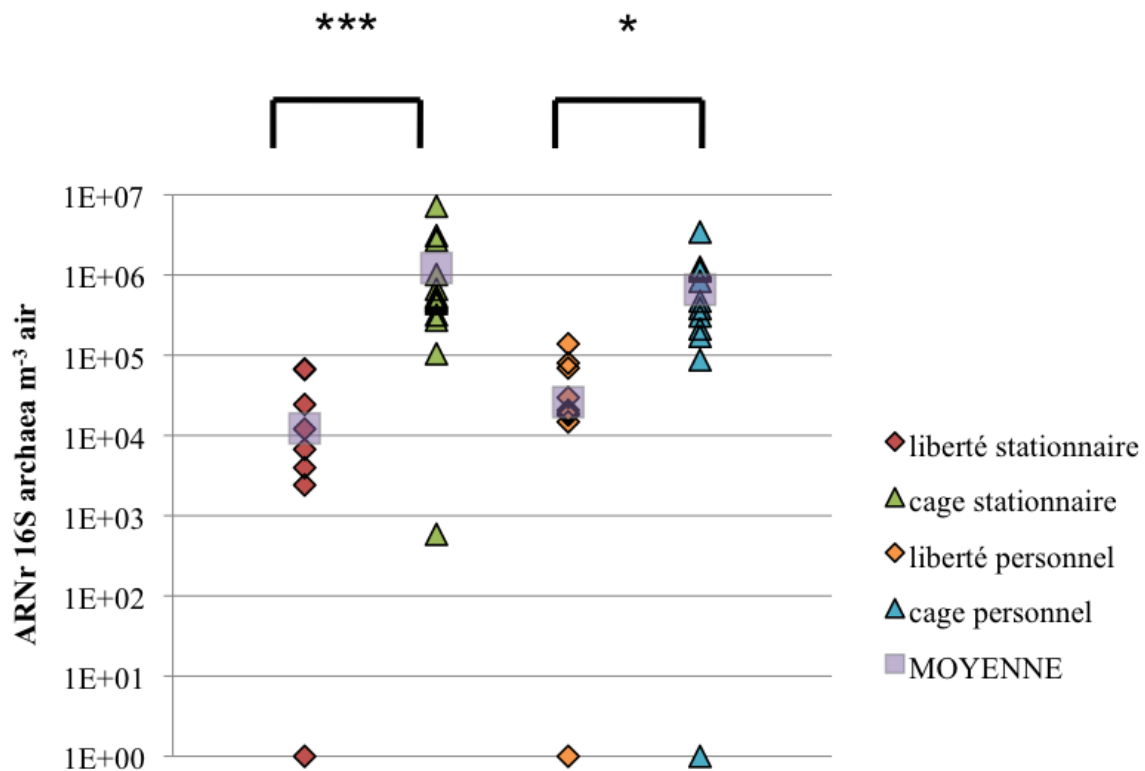


Figure 7 : Quantification des *archaea* par PCR quantitative dans l'air de poulaillers à cages et de poulaillers où les poules sont gardées en liberté. Chaque point sur le graphique représente les données d'une ferme, avec la moyenne des fermes indiquée par un carré gris. Les données ont été transformées en log avant de faire les analyses statistiques. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$

4.1.2.2 Comparaison des poulaillers à cages et ceux où les poules sont en liberté pour les *archaea*, bactéries, endotoxines et poussières dans des échantillons personnels et stationnaires d'air de poulaillers

Les concentrations d'*archaea*, de bactéries, d'endotoxines et de poussières ont été comparées selon les deux types de poulaillers échantillonnés, pour des échantillons stationnaires (fig. 8A) et personnels (fig. 8B). Les concentrations d'*archaea* sont les seules à être plus élevées dans les poulaillers à cages que dans les poulaillers où les poules sont gardées en liberté et ce, pour les échantillons stationnaires et personnels. Pour ce qui est des autres données (bactéries, endotoxines et poussières), les valeurs sont toujours plus élevées dans les poulaillers où les poules sont gardées en liberté.

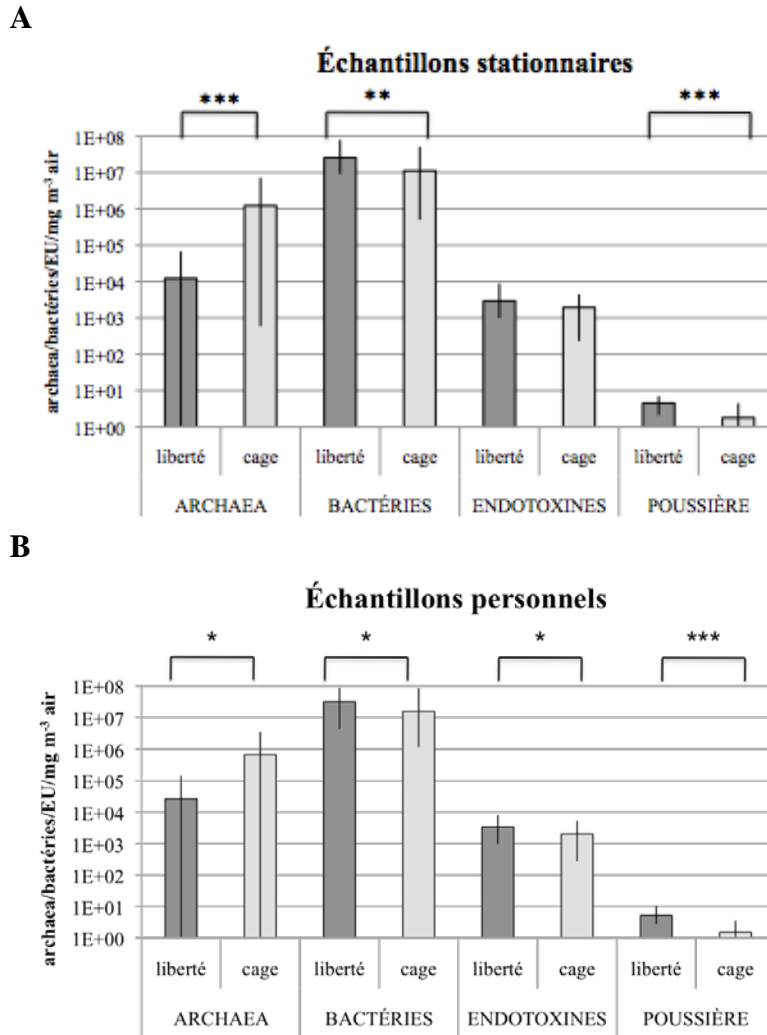


Figure 8 : Moyennes des concentrations d'*archaea*, de bactéries, d'endotoxines et de poussières retrouvées dans les bioaérosols des poulaillers à cages et en liberté. Les données ont été transformées en log avant l'analyse statistique et sont exprimées en quantité de microorganismes (*archaea* et bactéries), d'unité d'endotoxines ou de mg (poussières) par m³ d'air. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

4.1.2.3 Principaux phylotypes d'*archaea* trouvés dans l'air des poulaillers par la PCR DGGE

Deux espèces d'*archaea* méthanogènes ainsi qu'une espèce d'*archaea* halophile ont été détectées dans l'air des poulaillers (tableau 3). En effet, il a été possible d'identifier les différentes espèces d'*archaea* dans l'air des poulaillers échantillonnés grâce à la technique PCR DGGE. Aucune des deux espèces d'*archaea* méthanogènes (MBS et MSS) retrouvées dans l'air des fermes laitières, n'a été détectée dans l'air des poulaillers.

Tableau 3 : Séquences appariées pour les bandes de gels DGGE contenant l'ADN d'*archaea* trouvées dans les bioaérosols de poulaillers où les animaux sont gardés en cage.

| No. bande | Affiliation | Longueur (pb) | % similarité |
|-----------|--|---------------|--------------|
| 1 | <i>Methanobrevibacter woesei</i> (DQ445724.1) | 321 | 100 |
| 2 | <i>Methanosarcina mazei</i> (JN413085.1) | 321 | 100 |
| 3 | <i>Haloquadratum walsbyi</i> (FR746099.1) | 217 | 100 |

4.1.3 Établissements de traitement des eaux usées

4.1.3.1 Quantification par qPCR des *archaea* totales et des bactéries totales dans l'air des établissements de traitement des eaux usées

Pour ce qui est des usines d'épuration des eaux usées, jusqu'à 10^4 *archaea* par m^3 d'air ont été détectées dans deux des quatre sites échantillonnés de la première usine seulement (fig. 9). Les limites de détection de cette quantification étaient de 4×10^2 gènes de l'ARNr 16S pour les *archaea* et 2×10^3 gènes de l'ARNr 16S pour les bactéries.

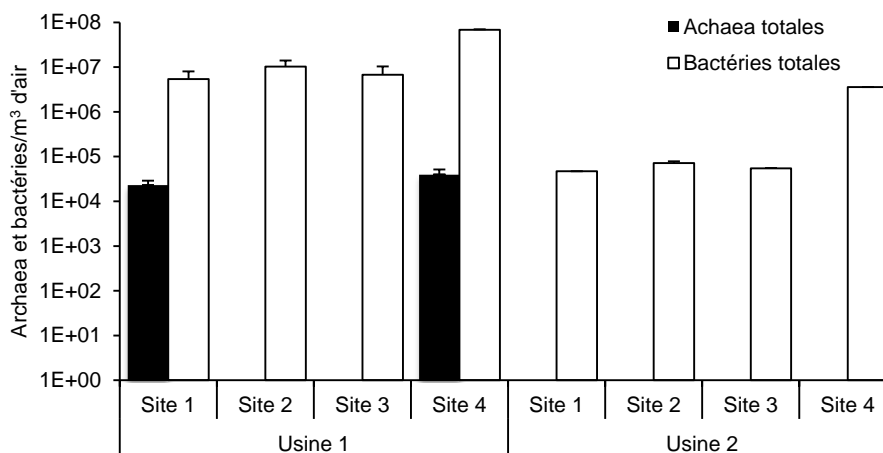


Figure 9 : Concentrations des gènes de l'ARNr 16S de bactéries et d'*archaea* provenant d'échantillons d'air de deux établissements de traitement des eaux usées (moyenne ± SEM).

4.1.3.2 Principaux phylotypes d'*archaea* trouvés dans l'air des établissements de traitement des eaux usées par la PCR DGGE

Deux espèces d'*archaea* méthanogènes ainsi qu'une espèce d'*archaea* halophile ont été détectées dans l'air d'un des deux établissements de traitement des eaux usées échantillonnés (tableau 4). En effet, il a été possible d'identifier les différentes espèces d'*archaea* dans l'air des établissements de traitement des eaux usées échantillonnés grâce à la technique PCR DGGE.

Tableau 4 : Séquences correspondantes aux bandes de gels DGGE contenant de l'ADN d'*archaea* provenant d'établissements de traitement des eaux usées.

| No. bande | Séquence la plus similaire | Longueur (pb) | % similarité |
|-----------|-------------------------------------|---------------|--------------|
| 1 | <i>Methanospirillum sp.</i> | 228 | 94 |
| 2 | <i>Methanocorpusculum labreanum</i> | 285 | 98 |
| 3 | <i>Haloarcula sp.</i> | 248 | 96 |

1 = usine 1, site 4, NIOSH étage 1

2 = usine 1, site 1, IOM

3 = usine 1, site 4, NIOSH étage 3

4.1.3.3 Quantification spécifique de MSS et de MBS par qPCR dans l'air des établissements de traitement des eaux usées

MSS et MBS ont été détectées dans l'air d'un des deux établissements de traitement des eaux usées échantillonnés. En effet, une concentration de $8,2 \times 10^3$ MSS/m³ d'air a été obtenue avec l'échantillonneur IOM pour MSS dans le site 1 de l'usine 1, alors qu'une concentration de $1,59 \times 10^4$ MBS/m³ d'air a été obtenue pour MBS dans le site 4 de l'usine 1 avec le même échantillonneur. La limite de détection pour ces deux microorganismes était de 4×10^2 microorganismes par m³ d'air.

4.2 Présence d'IgG spécifiques à MBS, à MSS et à SR dans le sérum des travailleurs de porcherie, de fermes laitières et d'usines d'épuration des eaux usées

Aucun résultat significatif n'a été obtenu quant à la présence d'IgGs spécifiques à MBS et à MSS dans le plasma des travailleurs par rapport à celui de sujets contrôles, peu importe l'environnement de travail. En effet, le pourcentage de plasma positif chez les travailleurs n'est pas plus élevé que celui chez les sujets contrôles. Cependant, nous avons démontré que les travailleurs des fermes laitières possèdent davantage d'IgG spécifiques à *S. rectivirgula* que le groupe contrôle (tableau 5).

Tableau 5 : IgG spécifiques à *S. rectivirgula* dans le plasma des travailleurs des fermes laitières comparativement aux sujets contrôles*.

| | Intensité de la réponse immune | | |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| | Négative | Positive (total) | Fortement positive |
| Sujets contrôles (n=35) | n | 30 | 5 |
| | % | 85,7 | 14,3 |
| Travailleurs (n=29) | n | 18 | 11 |
| | % | 62,1 | 37,9 |

* Fréquence de distribution entre les travailleurs et les sujets contrôles significativement différente (p<0,05)

4.3 Caractériser l'immunogénicité de MBS et de MSS chez un modèle murin

4.3.1 Histologie et dommages pulmonaires

Des sections de poumons colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été obtenues de souris instillées avec de la saline, de la MBS ou de la MSS, trois fois par semaine durant trois semaines (fig. 10). MSS induit fortement la formation de structures lymphoïdes tertiaires (flèches) comparativement à MBS. Les spécimens présentés sont représentatifs de l'observation réalisée auprès des six individus par groupe.

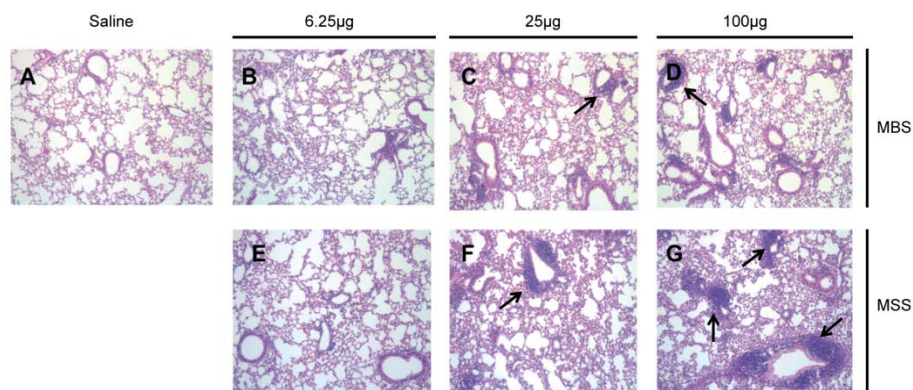


Figure 10 : MBS et MSS induisent des altérations histopathologiques dans les poumons. Souris instillées avec (A) de la saline; (B) 6,25, (C) 25 ou (D) 100 µg de MBS trois fois par semaine durant trois semaines; (E) 6,25, (F) 25 ou (G) 100 µg de MSS trois fois par semaine durant trois semaines. Les flèches représentent des structures lymphoïdes tertiaires.

Le tableau 6 contient les moyennes des scores histopathologiques donnés pour cinq différents critères à chacun des groupes de souris testés. Ainsi, pour l'infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires et pour l'accumulation de macrophages, aucune différence significative n'a été observée entre MBS et MSS, peu importe la dose. Toutefois, ces deux critères ont démontré des altérations significativement plus élevées lorsque les poumons étaient exposés à une dose de 100 µg de MBS ou de MSS en comparaison avec les doses plus faibles d'*archaea* de la même espèce. En ce qui concerne l'infiltration péribronchiale de cellules mononucléaires ainsi que l'épaississement du septum alvéolaire, les degrés d'altérations sont significativement différents entre MBS et MSS pour toutes les doses, mais aucune différence n'a été observée entre les doses pour une même espèce. Enfin, aucune altération significative de l'infiltration périvasculaire de granulocytes n'a été observée lorsque les poumons de souris ont été exposés à MBS ou à MSS, peu importe la dose.

Tableau 6 : Altérations histopathologiques des poumons de souris exposés à MBS ou à MSS.

| Critères | Saline | MBS (µg) | | | MSS (µg) | | |
|--|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 6,25 | 25 | 100 | 6,25 | 25 | 100 |
| Infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires | 0 | 1 | 2 | 3 ^a | 2 | 3 | 4 ^a |
| Infiltration périvasculaire de granulocytes | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| Infiltration péribronchiale de cellules mononucléaires | 0 | 0 ^a | 1 ^a | 0 ^a | 1 ^b | 1 ^b | 1 ^b |
| Épaississement du septum alvéolaire | 0 | 1 ^a | 1 ^a | 2 ^a | 2 ^b | 2 ^b | 3 ^b |
| Accumulation de macrophages | 0 | 0,5 | 1,5 | 2 ^a | 1,5 | 1 | 2 ^a |

Résultats exprimés en score médian pour chaque groupe, gradé sur une échelle de 0 (aucune altération) à 5 (altération sévère). Les lettres représentent les différences statistiques entre chaque dose de MBS et de MSS pour chaque critère. Six souris par groupe ont été analysées. $p < 0,05$.

4.3.2 Présence des leucocytes dans les lavages bronchoalvéolaires

Les différents types de leucocytes récoltés dans le liquide des lavages bronchoalvéolaires (LBA) ont été décrits pour chacun des groupes de souris testés. Pour chacune des deux espèces d'*archaea*, les sous-types cellulaires du LBA étaient principalement composés de macrophages et de lymphocytes (fig. 11). MSS induit aussi une accumulation significative d'éosinophiles et de neutrophiles. Les résultats présentés sont ceux de deux expériences groupées dont les résultats sont similaires et 14 à 22 souris par groupe ont été analysées.

4.3.3 Caractérisation de lymphocytes dans les lavages bronchoalvéolaires

Le nombre de cellules T CD4⁺, de cellules T CD8⁺ et de cellules B CD19⁺ ont été analysés dans les LBA de souris exposées durant trois semaines à des doses spécifiques de MBS et de MSS (fig. 12). Comparativement à MBS, MSS induit une forte réponse des cellules T CD4⁺ et B CD19⁺ dans les voies respiratoires, qui atteint un plateau dès la plus faible dose instillée.

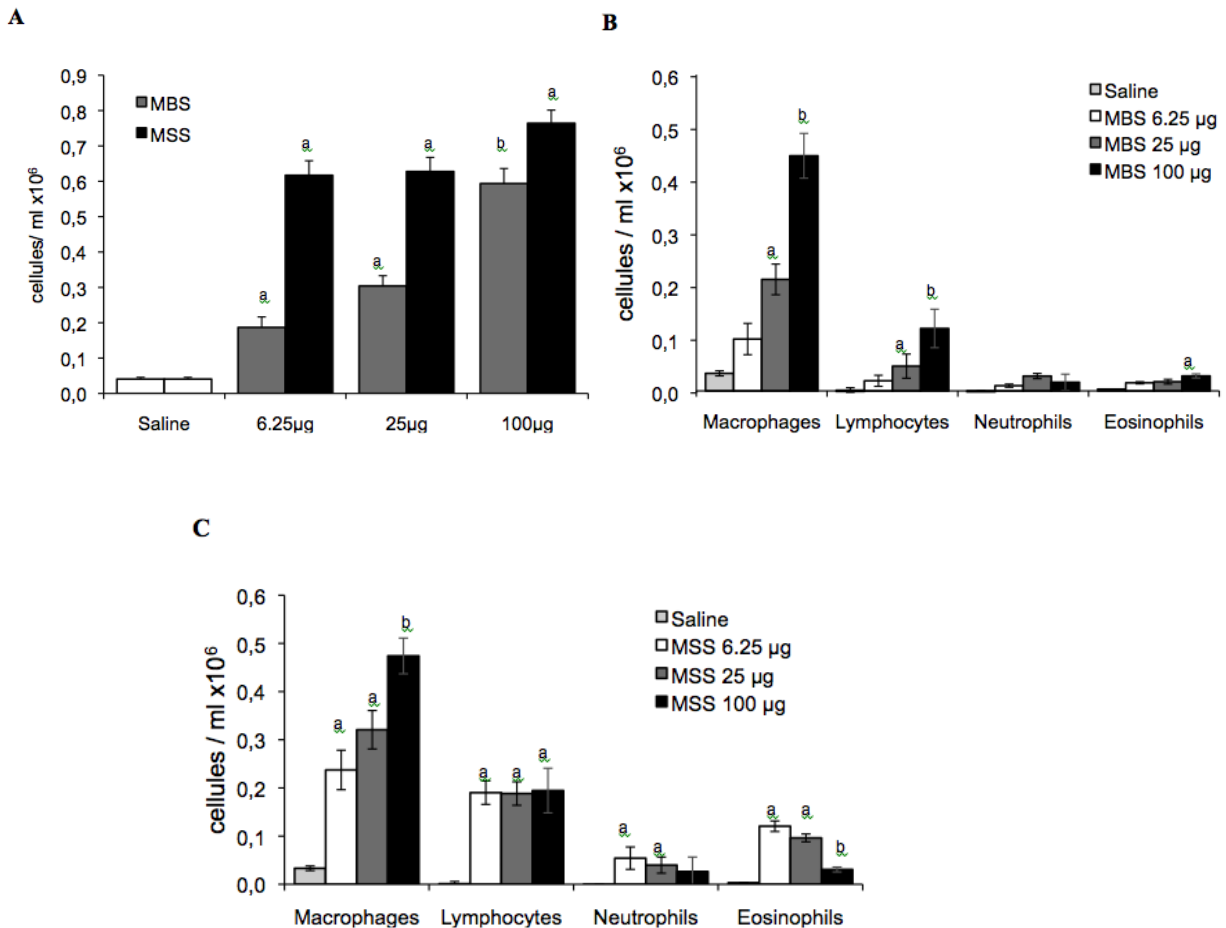


Figure 11 : Quantification des types de leucocytes dans le LBA de souris instillées avec des doses croissantes de deux espèces d'archaea durant 3 semaines : (A) Nombre de cellules immunes totales; (B) Compte des différents types de leucocytes dans le LBA de souris exposées aux MBS; et (C) Compte des différents types de leucocytes dans le LBA de souris exposées aux MSS. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les lettres a et b représentent des différences statistiques entre les traitements pour un même type de cellule. $p < 0,05$.

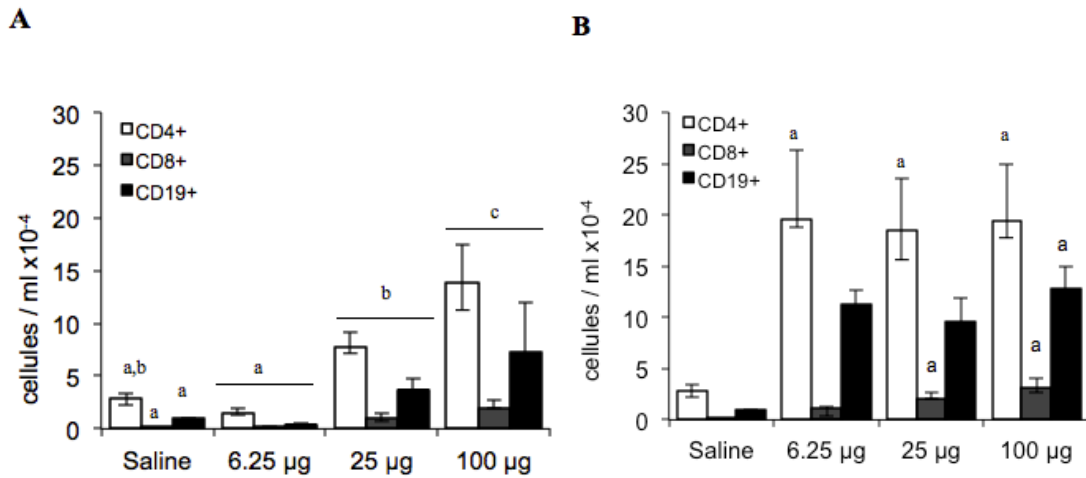


Figure 12 : Majorité de lymphocytes T CD4⁺ et de lymphocytes B CD19⁺ dans le LBA de souris instillées avec deux espèces d'*archaea* : (A) MBS et (B) MSS. Les résultats sont exprimés en médiane \pm intervalles. Les lettres a, b et c représentent des différences statistiques entre les divers traitements pour un même type de cellule. Six souris par groupe ont été analysées. $p < 0,05$.

4.3.4 Quantification d'anticorps (IgG) spécifiques dans le plasma

Les titres d'IgG spécifiques à l'antigène ont été mesurés par ELISA dans le plasma de souris exposées à des doses spécifiques de MBS et de MSS (fig. 13). Chacune des deux *archaea* induit une génération dose-réponse d'anticorps spécifiques à l'*archaea*.

4.3.5 Réponse des cellules dendritiques myéloïdes

Des analyses de cytométrie en flux ont été effectuées sur les cellules du LBA de souris exposées à MBS et à MSS durant trois semaines (fig. 14). Comparativement aux souris ayant reçu de la saline, MBS et MSS ont induit une accumulation significative de cellules dendritiques myéloïdes dans les voies respiratoires ($p < 0,05$). La réponse des cellules dendritiques myéloïdes tend, par contre, à être augmentée avec MSS ($p = 0,08$).

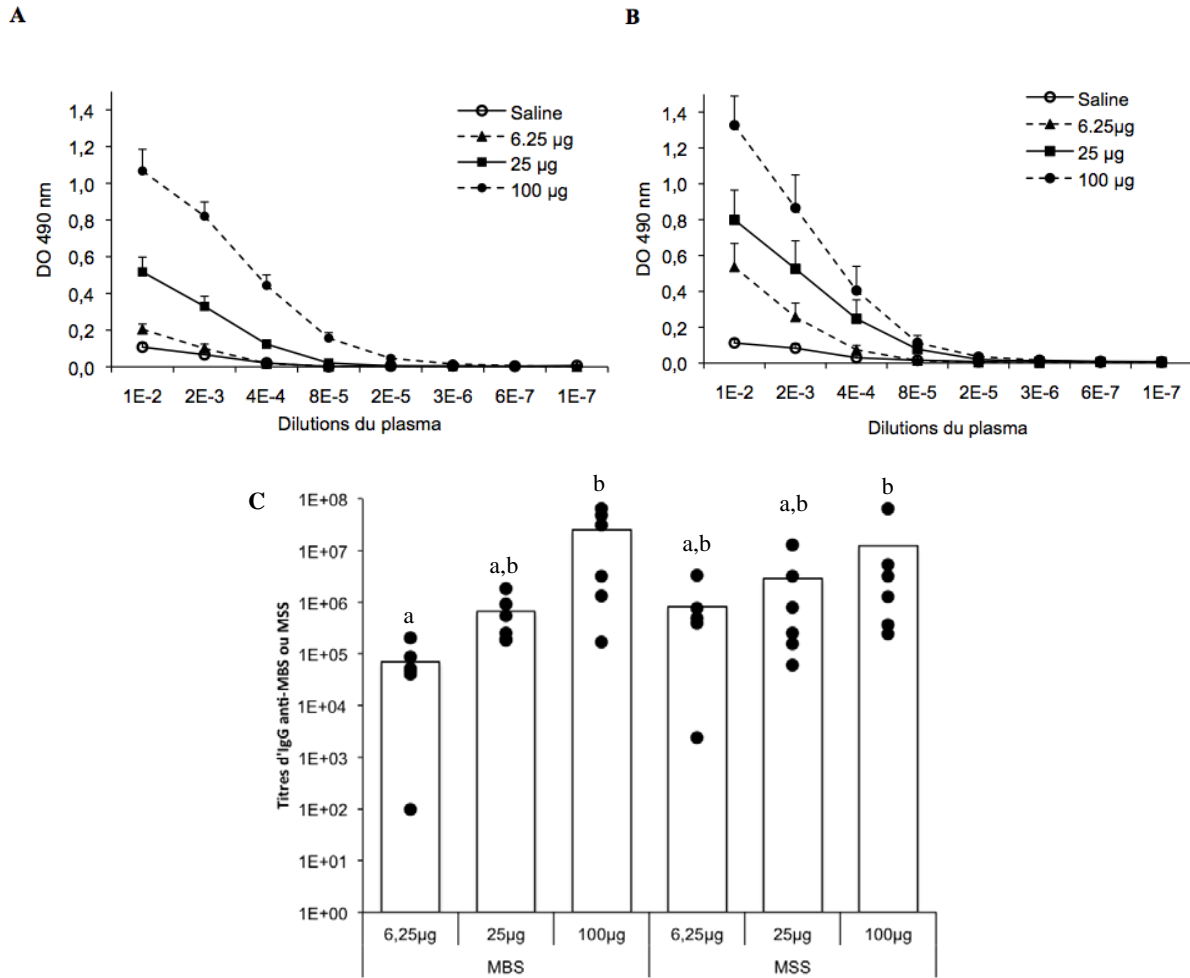


Figure 13 : Production d'IgG spécifique à l'antigène dans le plasma de souris exposé aux (A) MBS et (B) MSS. (C) Titres exprimés en logarithme inverse des dilutions de plasma. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les lettres a et b représentent des différences statistiques entre les différents traitements. Six souris par groupe ont été analysées. $p < 0,05$.

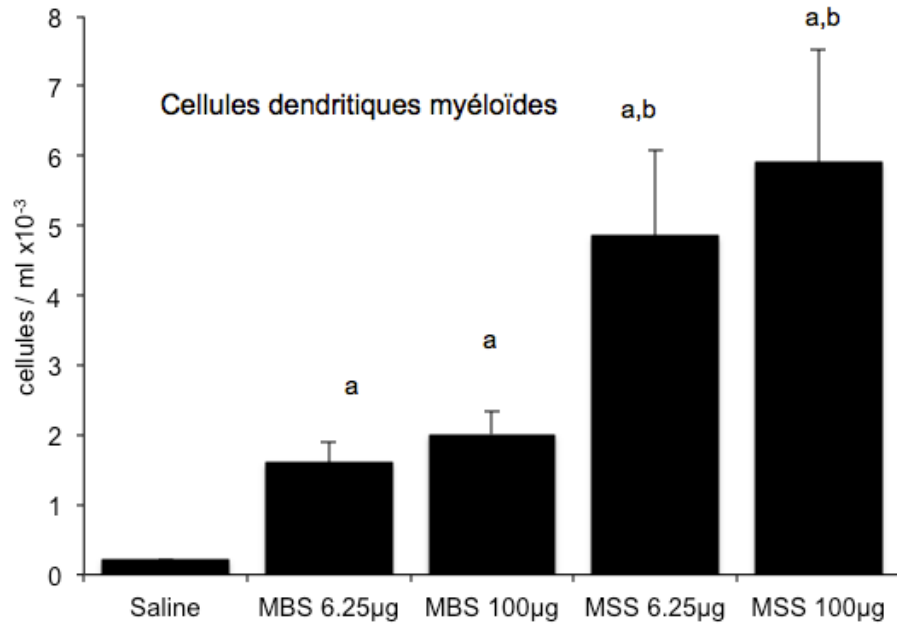


Figure 14 : Réponse des cellules dendritiques myéloïdes dans les voies respiratoires des souris exposées à MBS et à MSS. Les résultats sont exprimés en nombre absolu de cellules (moyenne \pm SEM). Six souris par groupe ont été analysées. a: $p \leq 0,05$, représente une différence significative comparée à la saline. b: $p = 0,08$, représente la différence non statistiquement significative de MSS comparée à MBS.

5. DISCUSSION

5.1 Présence des *archaea* dans l'air des établissements visités

Un protocole de détection des *archaea* en général utilisant la biologie moléculaire a été développé dans cette étude. En effet, contrairement aux protocoles similaires trouvés dans la littérature, la méthode mise au point et décrite ci-dessus ne favorise pas un groupe spécifique d'*archaea* par rapport aux autres, ce qui évite les biais lors de leur quantification.

Des *archaea* ont été trouvées en grande concentration dans l'air des fermes laitières et des poulaillers, ainsi qu'en quantité plus faible dans des établissements de traitement des eaux usées. Ces microorganismes sont donc non seulement présents dans l'air d'établissements agricoles, mais aussi dans celui de certains établissements industriels. Ils sont donc une composante importante des bioaérosols de plusieurs milieux de travail.

Pour ce qui est des *archaea* trouvées dans l'air des poulaillers, elles étaient présentes en plus grande concentration dans l'air des poulaillers à cages que dans celui des poulaillers où les poules sont gardées en liberté. À l'inverse, les concentrations des autres composantes des bioaérosols étudiées (bactéries, endotoxines et poussières) étaient plus élevées dans les poulaillers où les poules sont gardées en liberté. Puisque les travailleurs rapportent davantage de symptômes respiratoires (phlegme chronique)⁷² lorsqu'ils travaillent dans les poulaillers à cages, peut-on faire un lien entre les *archaea* dans l'air et ces symptômes?

La nature et la concentration des bioaérosols échantillonnés dans les établissements de traitement des eaux usées ont pu être influencées par la composition des effluents d'eau. En effet, ces effluents sont différents d'une journée à l'autre et peuvent donc contenir plus ou moins de matière organique ce qui peut avoir une influence sur les particules organiques aérosolisées. Les résultats obtenus dans cette étude proviennent d'un échantillonnage ponctuel. De plus, les différences de concentration de bactéries et d'*archaea* entre les deux usines échantillonnées peuvent probablement être expliquées par le fait que les effluents de l'usine 1 sont à majorité d'origine domestique, alors que l'usine 2 traite des eaux à prédominance d'origine industrielle.

5.2 Corrélations d'*archaea* et de bactéries aéroportées

Les concentrations d'*archaea* et de bactéries ne corrèlent pas dans l'air des fermes laitières, contrairement à ce qui avait été observé dans l'air des porcheries³¹. En effet, les concentrations d'*archaea* dans l'air sont similaires pour chacune des fermes visitées, ce qui n'est pas le cas pour les quantités de bactéries dans l'air, qui elles varient beaucoup de ferme en ferme. Cela peut être expliqué par le fait que la communauté archaebactérienne dans le rumen des vaches demeure constante et est moins variable que celle des bactéries dans le même environnement⁷³. De plus, il existe davantage de sources bactériennes (fumier, eau, foin, paille) que de sources d'*archaea* (fumier) dans les fermes laitières ce qui peut aussi moduler les concentrations de ces deux types de microorganismes dans l'air. Les différences observées entre les porcheries et les fermes laitières quant à la corrélation des quantités de bactéries et d'*archaea* dans l'air peuvent être attribuables aux différentes microflore intestinales des porcs et des vaches. En effet, les quantités d'*archaea* dans le rumen des vaches sont très constantes comparativement à celles retrouvées dans l'intestin des porcs^{28,73}.

5.3 Comparaison d'échantillonneurs

Trois échantillonneurs d'air avec différents principes de capture de particules ont été utilisés lors de toutes les visites dans les fermes laitières afin de déterminer l'efficacité de chacun d'eux dans des environnements fortement contaminés en bioaérosols. En effet, un impacteur sur surface liquide (Coriolis), un impacteur à trois étages sur surfaces solides (NIOSH) ainsi que des filtres en gélatine (cassettes IOM) ont été comparés. Nous avons pu déterminer que les trois échantillonneurs possèdent une efficacité de capture de particules comparable dans des environnements fortement contaminés en bioaérosols. Ce résultat n'est pas surprenant puisque nous avons démontré à l'aide de l'échantillonneur NIOSH que la majorité des particules échantillonnées avaient un diamètre aérodynamique supérieur à 2,1 µm, ce qui est dans l'échelle de capture des particules des trois échantillonneurs testés.

5.4 Biodiversité des *archaea* dans l'air des établissements visités

La biodiversité des *archaea* a été étudiée dans l'air des trois secteurs d'activité visités, soit les fermes laitières, les poulaillers et les établissements de traitement des eaux usées. Nous avons pu constater que les espèces d'*archaea* les plus fréquemment retrouvées dans l'air des milieux de travail étaient des espèces méthanogènes, soit des microorganismes provenant habituellement de milieux anaérobiques tels les systèmes digestifs animaux et humains. En effet, les méthanogènes *Methanobrevibacter smithii*^{74, 75}, *Methanosphaera stadtmanae*^{74, 75}, *Methanobrevibacter ruminantium*⁷⁴ et *Methanobrevibacter woesei*⁷⁶ sont toutes des espèces archaebactériennes retrouvées dans les systèmes digestifs de bétails, de poules et d'humains. Cela peut donc expliquer leur présence dans l'air des établissements visités puisque ces derniers contiennent des fèces humaines ou animales. Pour ce qui est des *archaea* détectées dans l'air des établissements de traitement des eaux usées, les espèces *Methanospirillum hungatei* ainsi que *Methanocorpusculum labreanum* sont reconnues pour être retrouvées dans les bioréacteurs tels les biofiltres qui étaient présents dans les sites 4 des établissements visités^{77, 78}.

5.5 Présence de MBS et de MSS dans l'air des établissements visités

L'utilisation de méthodes contemporaines comme la qPCR a permis de détecter à la fois les MBS et les MSS dans l'air des fermes laitières et des établissements de traitement des eaux usées, ce qui aurait été impossible par culture. En effet, ces microorganismes sont sensibles à l'oxygène et sont donc non cultivables après leur aérosolisation. Cependant, alors que la PCR quantitative a permis la détection de MSS, ce microorganisme n'a été associé à aucune bande d'ADN avec la technique de PCR DGGE. Cela est probablement dû à une meilleure spécificité et à une meilleure efficacité d'amplification de l'ADN lorsqu'un microorganisme en particulier est ciblé avec des amorces PCR spécifiques plutôt qu'avec des amorces PCR universelles, qui permettent une description de la biodiversité microbienne d'un échantillon.

5.6 Présence de SR dans l'air des fermes laitières

Des recommandations sont fréquemment formulées aux travailleurs de fermes laitières quant à l'entreposage du foin pour éviter que du foin humide soit conservé dans les granges⁷⁹⁻⁸². En

effet, ces milieux sont chauds et donc propices au développement et éventuellement à l'aérosolisation de l'actinomycète responsable du poumon du fermier, *Saccharopolyspora rectivirgula*. Nous démontrons dans cette étude que des quantités moindres de SR que ce qui était retrouvé auparavant par culture ont été détectées dans l'air des fermes laitières³. Cependant, malgré les recommandations faites aux fermiers, l'air de certaines fermes contient encore des concentrations élevées de SR.

5.7 IgG spécifiques à MBS, à MSS et à SR dans le sang des travailleurs

Étant donné la présence de microorganismes de types MBS, MSS et SR dans l'air des établissements visités, il était pertinent de déterminer si les travailleurs de ces milieux y étaient exposés. Pour ce faire, un marqueur d'exposition présent dans le sang est fréquemment utilisé^{83, 84}, soit l'IgG spécifique au microorganisme étudié. Aucune différence en termes de quantité d'IgG spécifiques à MBS et à MSS chez les travailleurs de fermes laitières et d'usines d'épuration des eaux usées comparativement à des sujets contrôles n'a été démontrée. Cela peut être dû à plusieurs facteurs, telle l'exposition constante des travailleurs aux *archaea* des bioaérosols qui pourrait induire une forme de tolérance immune. De plus, la présence de ces deux espèces de méthanogènes dans la microflore intestinale humaine normale pourrait expliquer la faible quantité d'anticorps spécifiques à ces microorganismes dans le sang des sujets de l'étude. De plus, des échantillonnages personnels n'ont pas été effectués (seulement des échantillonnages stationnaires), ce qui rend difficile l'interprétation des résultats de l'exposition des travailleurs. Les échantillonnages stationnaires servent à qualifier la qualité de l'air, mais ne permettent pas l'estimation de la dose d'exposition.

Puisque l'air des fermes laitières contient encore de grandes concentrations de SR, cela se traduit par une production plus élevée d'anticorps IgG spécifiques à ce microorganisme dans le plasma des travailleurs de fermes laitières comparativement au plasma de sujets contrôles. Ces anticorps étant utilisés dans le diagnostic de la maladie du poumon du fermier, il est donc possible d'affirmer que les travailleurs de fermes laitières sont toujours à risque de développer cette maladie respiratoire.

5.8 Potentiel inflammatoire des *archaea* et leur possible impact sur la santé respiratoire

Nous avons démontré que les *archaea* sont une composante importante des bioaérosols de plusieurs milieux de travail. Les bioaérosols peuvent être à l'origine de plusieurs maladies respiratoires, mais les composantes des bioaérosols responsables de ces maladies ne sont pas toutes connues. Le modèle de souris utilisé dans cette étude nous a permis de démontrer que deux espèces d'*archaea* trouvées fréquemment dans l'air de milieux de travail, MSS et MBS, possèdent un potentiel immunogène. En effet, bien que ces microorganismes soient extrêmement sensibles à l'oxygène et donc non viables et non infectieux dans les bioaérosols, ils peuvent stimuler le système immunitaire et induire une réponse immune complète menant à la production d'anticorps spécifiques. Cette étude a permis de démontrer que MSS et MBS possèdent différentes propriétés immunogéniques. Elles peuvent donc moduler différemment la nature et le type de la réponse immune. En effet, MSS induit une réponse de type inflammatoire caractérisée

par l'induction de granulocytes dans les lavages bronchoalvéolaires, ce qui n'est pas le cas pour MBS. L'intensité de la réponse immunitaire spécifique à MSS était aussi plus marquée que celle induite par MBS. La capacité de MSS à induire une forte réponse immunitaire a été confirmée par une forte accumulation de cellules dendritiques myéloïdes, des cellules centrales dans l'immunité acquise, comparativement à MBS.

Par ailleurs, les résultats obtenus chez les souris exposées aux *archaea* peuvent être comparés à ceux produits dans un même modèle de souris exposées à *S. rectivirgula*, un agent causant le poumon du fermier qui, selon nos résultats, sont encore présents dans l'air des fermes laitières. En effet, des études sur l'impact de ce microorganisme sur les voies respiratoires ont démontré que cet agent provoque une forte lymphocytose dans les poumons^{55, 70}, mais n'induit que très peu de granulocytes, cellules caractéristiques de la réponse inflammatoire causée par MSS. Il semble donc que la réponse immunitaire pulmonaire induite par l'exposition à différentes espèces d'*archaea* soit spécifique à ces agents.

Les études effectuées dans ce rapport ont permis de démontrer le potentiel immunogène de deux espèces de méthanogènes, mais l'impact de ces microorganismes sur la santé respiratoire n'est pas encore bien compris. Les résultats obtenus démontrent qu'il est nécessaire de rechercher les *archaea* lors d'études sur la caractérisation des bioaérosols, puisque ces microorganismes représentent une fraction importante des agents dans l'air et qu'ils pourraient avoir un impact sur la santé respiratoire des humains exposés. Cependant, le rôle des *archaea* dans l'étiologie des maladies respiratoires reste à être évalué.

6. CONCLUSION

Les travaux décrits dans ce rapport permettent de mettre en évidence un nouvel agent immunogène des bioaérosols. En effet, la caractérisation des *archaea* dans les bioaérosols permet de mettre en évidence l'importance de ces microorganismes dans l'air de certains environnements. De plus, l'étude des *archaea* dans l'inflammation pulmonaire chez la souris fournit une des premières preuves quant au potentiel pathogénique des *archaea* chez l'humain. Finalement, le projet a servi de tremplin à un nouveau champ de recherche que sont les effets des *archaea* dans l'inflammation humaine. Nous ne commençons qu'à explorer la présence des *archaea* dans notre environnement et notre réponse à ces agents méconnus. Leur rôle en tant qu'agents protecteurs, immunostimulateurs, pro-inflammatoires ou agents tolérés mérite d'être approfondi dans des études futures.

Ce projet a aussi permis la démonstration que les divers échantillonneurs d'air utilisés dans les fermes laitières (Coriolis, IOM et NIOSH) fournissent des résultats similaires. Cette donnée est de première importance puisqu'aucune méthode d'échantillonnage standardisée n'existe et que nous avons démontré la robustesse des résultats.

7. APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS

Bien que les résultats issus de cette recherche soient plutôt fondamentaux, il n'en demeure pas moins qu'il apparaît évident que la composition des bioaérosols des environnements à l'étude est plus complexe qu'anticipée. Grâce à ce projet de recherche, notre équipe a confirmé son rôle de leader dans l'étude de l'exposition humaine aux *archaea*. Nous avons été les premiers à décrire ce phénomène (porcheries) et ce projet a permis de confirmer l'étendue du phénomène (poulaillers, usines de traitement des eaux usées et fermes laitières).

Les technologies contemporaines permettent de mettre en lumière des composantes des bioaérosols qui, jusqu'à maintenant, n'avaient jamais été décrites dans ces environnements. L'application principale des résultats de cette recherche est issue de la démonstration que d'autres composés, comme certaines *archaea*, peuvent agir sur le système immunitaire pulmonaire. De façon traditionnelle, lors d'investigations portant sur la caractérisation de tels environnements, les endotoxines sont habituellement la mesure choisie pour illustrer le potentiel immunogène et inflammatoire. Pour leur part, les *archaea* peuvent agir en synergie ou en l'absence d'endotoxines ou autres composantes des bioaérosols.

Une autre application des résultats de cette recherche repose sur le choix des échantillonneurs d'air utilisés pour collecter les bioaérosols destinés à être analysés à l'aide de méthodes moléculaires. En effet, nous observons que le choix du biocollecteur dans ce type d'environnement n'a que peu d'influence sur les quantifications réalisées. Toutefois, l'efficacité de collection doit être optimale pour les particules de tailles inhalables étant donné les résultats obtenus avec l'échantillonneur NIOSH, soit un diamètre aérodynamique de 2,1 μm et plus.

8. RETOMBÉES ÉVENTUELLES

Les résultats de cette étude ont permis de poser de nouvelles hypothèses quant à la réalisation d'un test rapide visant à mesurer le potentiel d'induction d'une réponse immunitaire chez les travailleurs exposés aux bioaérosols, en utilisant un modèle cellulaire et ainsi engendrer une collaboration entre les D^{TS} Caroline Duchaine et David Marsolais du Centre de recherche de l'institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (CRIUCPQ).

De plus, nous avons participé à une étude des échantillons de fermes variées du Danemark (vison, laitières, porcheries). Nous aurons également l'opportunité de caractériser des échantillons de provenance internationale, en utilisant les méthodes mises au point dans le projet actuel (études européennes asthme-agriculture). Tout ceci est rendu possible grâce à l'expertise développée dans le présent projet.

Lors d'investigations visant la caractérisation des bioaérosols dans les milieux de travail, nous proposons d'ajouter des paramètres autres que la quantification des endotoxines et des bactéries totales, par exemple la quantification des *archaea* par qPCR.

Bien que nous ayons démontré que les *archaea* ont un fort potentiel immunogénique chez la souris, il n'en demeure pas moins qu'elles représentent une seule des composantes d'un mélange complexe des bioaérosols retrouvés dans les environnements à l'étude. Il est donc possible que d'autres composantes comme les endotoxines combinées avec les *archaea* puissent avoir un effet synergique et représenter des risques pour la santé respiratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ruzer LS, Harley NH. *Aerosols Handbook: Measurement, Dosimetry, and Health Effects*. Second ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group, 2013.
2. Cox CS, Wathes CM. *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1995.
3. Duchaine C, Meriaux A, Brochu G, et al. Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J* 1999;60:89-95.
4. Just N, Kirychuk S, Gilbert Y, et al. Bacterial diversity characterization of bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations. *Environ Res* 2011;111:492-8.
5. Letourneau V, Nehme B, Meriaux A, et al. Human pathogens and tetracycline-resistant bacteria in bioaerosols of swine confinement buildings and in nasal flora of hog producers. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:444-9.
6. Duchaine C, Meriaux A, Thorne PS, et al. Assessment of particulates and bioaerosols in eastern Canadian sawmills. *AIHAJ* 2000;61:727-32.
7. Duchaine C, Meriaux A. Airborne microfungi from eastern Canadian sawmills. *Can J Microbiol* 2000;46:612-7.
8. Dutil S, Meriaux A, de Latremaille MC, et al. Measurement of airborne bacteria and endotoxin generated during dental cleaning. *J Occup Environ Hyg* 2009;6:121-30.
9. Meriaux A, Pageau P, Cormier Y, et al. Bioaerosols in peat moss processing plants. *J Occup Environ Hyg* 2006;3:408-17.
10. Gilbert Y, Veillette M, Meriaux A, et al. Metalworking fluid-related aerosols in machining plants. *J Occup Environ Hyg* 2010;7:280-9.
11. Gilbert Y, Veillette M, Duchaine C. Metalworking fluids biodiversity characterization. *J Appl Microbiol* 2010;108:437-49.
12. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143-69.
13. Bertin Technologies. Coriolis brochure. Bertin Technologies. Montigny-le-Bretonneux, France.
14. Lindsley WG, Schmechel D, Chen BT. A two-stage cyclone using microcentrifuge tubes for personal bioaerosol sampling. *J Environ Monit* 2006;8:1136-42.
15. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4576-9.
16. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:245-52.
17. Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:479-88.
18. Allers T, Mevarech M. Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* 2005;6:58-73.

19. Forterre P, Brochier C, Philippe H. Evolution of the Archaea. *Theor Popul Biol* 2002;61:409-22.
20. Sprott GD, Patel GB, Krishnan L. Archaeobacterial ether lipid liposomes as vaccine adjuvants. *Methods Enzymol* 2003;373:155-72.
21. Kates M. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochem Soc Symp* 1992;58:51-72.
22. Patel GB, Sprott GD. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol* 1999;19:317-57.
23. Patel GB, Chen W. Archaeosome immunostimulatory vaccine delivery system. *Curr Drug Deliv* 2005;2:407-21.
24. Patel GB, Chen W. Archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery system. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:431-40.
25. Sprott GD, Brisson J, Dicaire CJ, et al. A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440:275-88.
26. Choquet CG, Patel GB, Beveridge TJ, et al. Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;42:375-84.
27. Whitehead TR, Cotta MA. Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol Lett* 1999;179:223-6.
28. Snell-Castro R, Godon JJ, Delgenes JP, et al. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;52:229-42.
29. Gattinger A, Hofle MG, Schlöter M, et al. Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil. *Environ Microbiol* 2007;9:612-24.
30. Nottingham PM, Hungate RE. Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *J Bacteriol* 1968;96:2178-9.
31. Nehme B, Gilbert Y, Letourneau V, et al. Culture-independent characterization of archaeal biodiversity in swine confinement building bioaerosols. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:5445-50.
32. Tolson DL, Latta RK, Patel GB, et al. Uptake of archaeobacterial liposomes and conventional liposomes by phagocytic cells. *Journal of liposome research* 1996;6:755-776.
33. Krishnan L, Sad S, Patel GB, et al. The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activation of macrophages and dendritic cells in vivo. *J Immunol* 2001;166:1885-93.
34. Krishnan L, Sad S, Patel GB, et al. Archaeosomes induce long-term CD8+ cytotoxic T cell response to entrapped soluble protein by the exogenous cytosolic pathway, in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol* 2000;165:5177-85.

35. Krishnan L, Sad S, Patel GB, et al. Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer Res* 2003;63:2526-34.
36. Krishnan L, Dicaire CJ, Patel GB, et al. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun* 2000;68:54-63.
37. Patel GB, Zhou H, Ponce A, et al. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 2007;25:8622-36.
38. Yamabe K, Maeda H, Koikeguchi S, et al. Antigenic group II chaperonin in *Methanobrevibacter oralis* may cross-react with human chaperonin CCT. *Mol Oral Microbiol* 2010;25:112-22.
39. Ruggero D, Ciammaruconi A, Londei P. The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1998;17:3471-7.
40. Zugel U, Kaufmann SH. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 1999;201:22-35.
41. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:19-39.
42. National Institute for Occupational Safety and Health. Respiratory disease in agricultural workers: mortality and morbidity statistics. DHHS (NIOSH) Publication Number 2007-106, 2007.
43. ATS. Respiratory Health Hazards in Agriculture. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Volume 158: American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association, 1998:S1-S76.
44. Meriaux A, Cormier Y, Pageau P, et al. Sensitization to airborne molds and its health effects in peat moss processing plant workers. *J Occup Environ Hyg* 2006;3:442-7.
45. Cormier Y, Meriaux A, Duchaine C. Respiratory health impact of working in sawmills in eastern Canada. *Arch Environ Health* 2000;55:424-30.
46. Hinds WC. *Aerosol Technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1999.
47. Nehme B, Letourneau V, Forster RJ, et al. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ Microbiol* 2008;10:665-75.
48. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008;123:326-38.
49. Greenberger PA. 7. Immunologic lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:S393-7; quiz S418.
50. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-62.

51. Girard M, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:99-103.
52. Zejda JE, Barber E, Dosman JA, et al. Respiratory health status in swine producers relates to endotoxin exposure in the presence of low dust levels. *J Occup Med* 1994;36:49-56.
53. Dosman JA, Fukushima Y, Senthilselvan A, et al. Respiratory response to endotoxin and dust predicts evidence of inflammatory response in volunteers in a swine barn. *Am J Ind Med* 2006;49:761-6.
54. Rylander R, Carvalheiro MF. Airways inflammation among workers in poultry houses. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;79:487-90.
55. Cormier Y, Israel-Assayag E, Fournier M, et al. Modulation of experimental hypersensitivity pneumonitis by Sendai virus. *J Lab Clin Med* 1993;121:683-8.
56. Kirychuk SP, Reynolds SJ, Koehncke NK, et al. Endotoxin and dust at respirable and nonrespirable particle sizes are not consistent between cage- and floor-housed poultry operations. *Ann Occup Hyg* 2010;54:824-32.
57. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 2003;55:541-55.
58. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. In *Archaea: A Laboratory Manual - Thermophiles* (Robb FT, Place AR, eds.). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1995:101-107
59. Bach HJ, Hartmann A, Schloter M, et al. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J Microbiol Methods* 2001;44:173-82.
60. Schafer J, Kampfer P, Jackel U. Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative real-time PCR. *Ann Occup Hyg* 2011;55:612-9.
61. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:695-700.
62. Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4800-6.
63. Johnston C, Ufnar JA, Griffith JF, et al. A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *J Appl Microbiol* 2010;109:1946-56.
64. Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, et al. Increased Prevalence of *Methanosphaera stadtmanae* in Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS One* 2014;In press.
65. Blais Lecours P, Veillette M, Marsolais D, et al. Characterization of Bioaerosols From Dairy Barns: Reconstructing the Puzzle of Occupational Respiratory Diseases Using Molecular Approaches. *Appl Environ Microbiol* 2012.

66. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
67. Hungate, RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology* (Norris JR and Ribbons DW, eds.), New York: Academic Press, 1969;3B:117-132.
68. Cormier Y, Israel-Assayag E, Bedard G, et al. Hypersensitivity pneumonitis in peat moss processing plant workers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:412-7.
69. Gudmundsson G, Hunninghake GW. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 1997;99:2386-90.
70. Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:903-9.
71. Nance S, Cross R, Fitzpatrick E. Chemokine production during hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Immunol* 2004;34:677-85.
72. Kirychuk SP, Dosman JA, Reynolds SJ, et al. Total dust and endotoxin in poultry operations: comparison between cage and floor housing and respiratory effects in workers. *J Occup Environ Med* 2006;48:741-8.
73. Jeyanathan J, Kirs M, Ronimus RS, et al. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiol Ecol* 2011;76:311-26.
74. King EE, Smith RP, St-Pierre B, et al. Differences in the Rumen Methanogen Populations of Lactating Jersey and Holstein Dairy Cows under the Same Diet Regimen. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5682-7.
75. Dridi B, Henry M, El Khechine A, et al. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 2009;4:e7063.
76. Saengkerdsud S, Anderson RC, Wilkinson HH, et al. Identification and quantification of methanogenic Archaea in adult chicken ceca. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:353-6.
77. Kampmann K, Ratering S, Baumann R, et al. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:404-13.
78. Keyser M, Witthuhn RC, Lamprecht C, et al. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. *Syst Appl Microbiol* 2006;29:77-84.
79. Canadian Centre for Occupational Health and Safety. 10/15/2008, posting date. Farmer's Lung. [Online] http://www.ccohs.ca/oshanswers/diseases/farmers_lung.html.
80. Farm Safety Association. Farmer's Lung: It Takes Your Breath Away! In: National AG Safety Database, 1990, posting date [Online] <http://nasdonline.org/document/1663/d001538/farmer-039-s-lung-it-takes-your-breath.html>.

81. Fontanier F, Luminet S, Colin D, et al. Le séchage en grange du foin conditionné en grosses bottes. Pôle fromager AOC Massif Central 2008.
82. Samson M, Choinière Y. Recommandations pour les entrepôts à foin. Équi-Libre 2007;pp. 27-28-29.
83. Duchaine C, Meriaux A, Brochu G, et al. *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns: application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease. *J Med Microbiol* 1999;48:173-80.
84. Cayer MP, Veillette M, Pageau P, et al. Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can J Microbiol* 2007;53:92-9.