



UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

**UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques
Doctorat d'Université en Sciences de la Vie et de la Santé**

ECOLE DOCTORALE HOMME ENVIRONNEMENT SANTE

**UMR-CNRS 6249 Chrono environnement
Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie**

NORMAND Anne-Cécile

Née le 23 avril 1981

Thèse dirigée par le Professeur Renaud PIARROUX

***Etude des flux microbiens dans les étables de
production laitière de Franche-Comté et de Bavière.***

Intérêts dans les domaines de l'asthme et de l'allergie.

Permis d'imprimer n°25.10.07

Thèse soutenue le 01/ 07 /2010 à Besançon devant la commission d'examen:

Henri Dumon (Professeur, Université de Marseille) Rapporteur

Denis Charpin (Professeur, Université de la Méditerranée) Rapporteur

Renaud Piarroux (Professeur, Université de Franche Comté) Directeur de thèse

Xavier Bertrand (Professeur, Université de Franche Comté) Examineur

Yvette Bouton (Chargée de recherche, INRA de Poligny) Examineur

Dédicace.

Il est toujours difficile de se souvenir de toutes les personnes à qui l'on doit quelque chose dans le cadre d'un travail précis. Dans mon cas, je crois que je dois beaucoup et à de très nombreuses personnes. La rédaction des remerciements d'un travail de plusieurs années est donc quelque chose de très délicat puisque de nombreuses personnes œuvrent dans l'ombre et que le travail qu'ils font, bien que différent de celui présenté dans les quelques pages qui suivent, a pu contribuer, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de ce projet.

Je pourrais adresser mes remerciements à chacun, en essayant de trouver une formule appropriée à chaque cas, je remercie untel pour sa bonne humeur, une telle pour m'avoir aidée dans tel domaine, mais je n'ai jamais aimé faire comme tout le monde. On m'a dit, quand j'étais jeune (ouh-là, ça date), que je devais cultiver mon don pour l'écriture romancée, chose qu'il est difficile de concilier avec un travail de recherche. Et comme à mon habitude, comme la tête de Normand que je suis (non, Durupt dirait mon père !!!), j'ai laissé tomber, par manque de temps, et surtout par esprit de contradiction. En effet, pourquoi entretenir quelque chose, si ce quelque chose est un don et donc naturel et ne devrait pas disparaître avec le temps. Je vais donc voir, dans cette partie dédicace, si mes talents de narratrice sont toujours intacts.

Pour éviter d'oublier de remercier quiconque, j'ai donc décidé de vous narrer mes trois années de recherche, non pas du point de vue scientifique, mais du point de vue personnel. Au lieu de vous exposer la diversité fongique et bactérienne que certains d'entre vous auront le courage de lire jusqu'au bout, je vais vous exposer la diversité anthropologique et sociale qui m'a permis d'arriver jusqu'au bout.

Chapitre 1, Le début...

Tout a commencé très tôt. Ce désir de faire de la recherche. J'ai toujours été comparée à mon frère, scientifique lui aussi et qui a de nombreuses facilités dans le domaine de la recherche. Depuis ma plus tendre enfance, on m'a dit que je lui ressemblais en de nombreux points. Alors quoi de plus normal que de suivre son exemple. C'est donc grâce à mes parents qui m'ont toujours abreuvée de noms latins (herbus simplex diraient mes frères) et de leur connaissance de la nature (mon dieu, que je détestais ça à l'époque), que je me suis lancée dans une carrière scientifique. Je leur dois beaucoup, c'est vrai, mais quelques autres personnes, alors que j'étais à l'université de Nancy, m'ont également beaucoup aidée. Je pense surtout à Madame Trabalon, qui m'a permis d'entrer en contact avec Patrick Giraudoux pour faire un Master à Besançon, à Madame Bel avec qui les discussions éthologiques étaient intenses à l'époque et aussi à Madame Duval, professeur d'anglais, qui m'a incitée à partir une année aux Etats-Unis « ça t'ouvrira des portes, les chercheurs qui parlent anglais, on en recherche partout... ». C'est vrai que c'était un moment très intéressant de ma vie. J'y ai rencontré des personnes qui m'ont permis de me voir comme quelqu'un d'utile pour les autres, même si quelques maëurs que l'on m'a fait partager n'ont pas toujours été pour mon plaisir (ceux à qui j'ai raconté mon périple américain comprendront). J'y ai rencontré des amis qui m'ont aidée à m'intégrer et à améliorer mon anglais, ce qui n'a pas toujours été facile, les jumelles Marcie et Michelle, Lisa et Katherine pourraient vous en dire quelque chose... Et des professeurs, proches de leurs élèves, qui

n'hésitent pas à répondre à des questions encore cinq ans plus tard (spéciale dédicace au professeur Tom Jones (non, pas le chanteur) qui m'a encore envoyé quelques aides de vocabulaire agricole dernièrement. Qui sait comment on dit une étable entravée en anglais ?). Malheureusement, Madame Duval n'avait pas totalement raison et le fait d'être partie outre atlantique pendant une année, même si cela m'a fait rencontrer des gens exceptionnels et que maintenant, je peux m'exprimer presque normalement en anglais, ne m'a pas ouvert grand-chose, sauf peut être l'esprit.

Chapitre 2, le début du milieu...

Mon retour des Etats-Unis a donc été quelque peu mouvementé. Sans diplôme obtenu là-bas malgré ma photo sur le tableau des honor-students, il a fallu justifier d'un trou d'une année dans mon cursus. Ma rencontre avec Patrick Giraudoux, alors que je commençais à chercher un emploi de caissière pour une année en espérant pouvoir reprendre mes études plus tard, a été une sorte de révélation. La formation de Master "environnement santé société" est quelque chose que je n'oublierai jamais. Les professeurs qui m'ont encadrée durant cette année, entre autres et principalement messieurs Giraudoux, Richard, Mudry, Viel, et Piarroux, m'ont permis d'avoir une vision globale d'un problème, sans me focaliser sur un aspect unique, et grâce à eux, j'aime à pouvoir me considérer comme une passeuse de frontières (spéciale dédicace aux professeurs Giraudoux et Viel dont c'est l'expression favorite). Un passage de quelques mois dans le service d'hygiène hospitalière, sous le regard bienveillant des docteurs Talon et Bertrand, m'a permis de reprendre contact avec la biologie moléculaire, le travail en laboratoire et surtout, m'a incitée à m'imposer dans la vie de ce même laboratoire. Les personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler pendant ce stage et qui m'ont montré les bases du travail de laboratoire hospitalier (Catherine, Véronique, Rolande, Mimi, Aurélie, Arno, Houssein et Sophie) sont des personnes exceptionnelles de bonté et resteront dans mon cœur comme mes premiers véritables collègues. C'est surtout pendant ce stage que j'ai eu la chance d'être repérée par le Professeur Piarroux, dont je suivais des cours dans le cadre de ma formation et qui était directeur à l'époque, du service de Parasitologie - Mycologie de l'hôpital. Je me souviendrai toujours du jour où il est venu me voir à ma paillasse pour me demander si j'avais trouvé un sujet de thèse pour l'année suivante, et que si non, il avait quelque chose pour moi. C'était, je crois, une très belle journée pour moi. Grâce à une recommandation de la part de Monsieur Talon, à partir de ce moment, j'ai eu l'honneur de travailler sous la coupe de cette personne que je considère comme mon mentor. J'ai rarement vu, de ma vie, quelqu'un s'investir autant dans son travail et connaître autant de choses dans tellement de domaines (je vais peut-être arrêter là les compliments, ou il va y avoir des chaussures qui vont se trouver d'un coup trop petites). J'ai donc commencé là mon travail de thèse. Lors de mon premier jour, je me suis fait promener de salle en salle par Abdellah, la personne de qui je continuais le travail et par une personne qui m'a parlé sans arrêt (ça, ça n'a pas changé depuis) du labo, me donnant des conseils sur l'attitude à avoir envers telle ou telle personne, à qui demander des services, et autres et qui est depuis devenue l'un de mes principaux collègues et amis, avec qui les discussions de travail et les discussions ornithologiques (je reprends ici une phrase des remerciements de ta propre thèse...) n'ont jamais cessé, j'ai nommé monsieur Bertrand Sudre, un ami comme on en a peu. Dès les premiers jours dans ce labo, j'ai donc fait la connaissance de personnes qui m'ont aidée dans mon travail et dans mon

insertion, Ma'am Martin, Anne, Jacqueline, Karine, Isabelle et Alice, comme quoi une thèse ne se fait pas toute seule. Dans le laboratoire, la vie était bien rangée, le chef laissait ses ouailles aller et venir comme bon leur semblait, sa devise (devenue la mienne depuis) étant que peu importent les horaires de travail tant qu'il est fait... Le problème avec cette devise, c'est qu'elle marche dans les deux sens. Je me suis vite fait prendre à mon propre jeu, cherchant toujours à en faire plus, ce que mes trois stagiaires successifs (Mike, Camille et Vincent) n'ont pas toujours apprécié. Vive les horaires décalés. Au début d'un travail de thèse, il y a une étape qu'il est difficile de shunter. La recherche de fonds. Sous les conseils de Monsieur Piarroux, j'ai donc postulé pour une bourse de la région Franche-Comté. Je tiens encore une fois à mettre en avant le boulot incroyable de mon chef qui a réussi à me sortir d'un joli pétrin sur ce coup là. Jamais plus je ne passerai d'oral juste après avoir changé mon diaporama et après une semaine de boulot d'interprète. Très mauvaise idée. Quoi qu'il en soit, je crois que je dois dire un grand merci (mince, je l'ai fait quand même) aux personnes qui constituaient le jury à cette époque et qui ont quand même décidé de me faire confiance. Dans le brouillard qui entoure cette journée, je crois me souvenir d'une phrase qui m'a beaucoup marquée, prononcée par l'un des membres du jury pour, je pense, me sortir de ma léthargie : « mais pourquoi avoir perdu une année à aller aux Etats-Unis si vous n'en avez même pas rapporté de diplôme ? ». Aïe, ça fait mal quand ça tombe... Que voulez vous répondre à ça ? J'aurais pu dire que si je suis allée là-bas, c'était parce que je bénéficiais d'une bourse pour pratiquer le lancer à haut niveau, mais je ne suis pas certaine que de mettre en avant mes gros bras aurait été une bonne idée à ce moment (faut-il rappeler que l'on m'a longtemps surnommée "frappe qu'un coup" ?). Mais je n'ai évoqué que la partie langue du voyage et c'est passé. Ouf.

Chapitre 3, le milieu...

Au bout de quelques mois, un projet de recherche est venu s'ajouter au projet initial sur lequel je travaillais. J'ai dû commencer à travailler avec une personne tous les jours. Un travail en équipe. En permanence. Jours... et nuits. Je peux vous dire que dans ces conditions, il vaut mieux bien s'entendre avec la personne. Et je dois dire que ça s'est plutôt bien passé. Très bien même. A tel point que l'on nous avait donné des surnoms dans le labo. Laurel et Hardy, les Vamps des fermes, Tic et Tac... Astérix et Obélix... Pas toujours cool. Mais on a toujours pris ça avec le sourire, surtout quand, de retour des fermes où nous avions eu des contacts prolongés avec les vaches, ces mêmes personnes devaient supporter notre proximité olfactive. Et NA !!! Est-il besoin que je nomme mon double ? Peut-être, pour ceux qui ne nous connaissent pas personnellement. Donc voilà, ma sœur de boulot, c'est Mallo. On en a fait ensemble, des journées de boulot, des lapsus, des échanges de dialectes. Savez-vous d'ailleurs comment on appelle un pis en Charente ? Je vous le donne en mille... Un r'meuil... Peut être même avec deux ou trois r. Un rrr'meuil. Ça râpe en bouche.

Bref, nous avons donc visité ensemble nos seize fermes dont les agriculteurs étaient tous plus gentils les uns que les autres et sans qui ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est. Un très très grand merci à eux et à leur très bon lait que nous avons goûté dans tous les cas (mince, je l'ai encore fait !!! Promis, j'arrête là.). Pendant cette période, nous avons partagé le fruit de nos voyages franc-comtois avec Philippe Guyot et Yvette Bouton, deux membres du "Comité Interprofessionnel du Gruyère à Comté" sans qui l'élaboration de tout le projet n'aurait pas pu avoir lieu.

Le travail sur deux sites est quelque chose de souvent difficile à concilier. Heureusement, dans mon cas, les deux sites sont assez proches physiquement. Une fois le travail d'analyse effectué à l'hôpital, et ce souvent grâce au travail exceptionnel des filles de l'ombre (Dominique, Marie-Claude, Edith, Florence, Suzanne et Véronique), le travail d'analyse de biologie moléculaire pouvait avoir lieu. Là, ce sont d'autres personnes qui sont entrées en jeu. Tout d'abord, le groupe des Echinococcasiens, Jean-Mathieu dont les conseils techniques et les discussions sur tout et rien m'ont beaucoup aidée principalement pendant une période de contamination de matériel, Martine, pour le travail informatique, Jenny, notre écolo locale qui n'a jamais hésité à donner un coup de main et avec qui je restais souvent tard au labo (j'avoue, tu m'as souvent battue en la matière, mais je m'améliore) et Stéphane, un très bon ami avec qui, comme avec tout ami qui se respecte, il y a eu beaucoup de hauts et de bas (mais en ce moment, c'est des hauts...). La virologue, Stéphanie, qui n'a jamais hésité à donner des conseils sur les techniques d'identification bactériennes et qui a accepté de jeter un œil, quand je ne pouvais pas le faire, sur le travail de celui qui s'est autoproclamé mon esclave. Le groupe des Africains avec Hamidou (Doudou), qui malgré sa présence occasionnelle au labo ces derniers mois, est l'une des figures emblématiques de la fac de ces dernières années, et Didier, mon double en plus foncé, avec qui nous avons respectivement toujours répondu présents et pour qui je n'arrêterai jamais de l'être (pour lui, sa femme et ses enfants). Le groupe des mycologues. Un groupe uni dont je ne fais partie que superficiellement à mon grand désarroi. Pendant presque un an, j'ai partagé un bureau avec Eméline, une fille extra, que je ne connaissais pas avant mais qui s'est avérée avoir passé une partie de son enfance à quelques centaines de mètres de là où j'ai moi-même grandi. Incroyable non ? Dans ce groupe, il y a également Sandrine, dont les conseils en écriture sont précieux, Pauline qui nous surprend toujours avec ses changements d'apparence, Fred, un monument à lui tout seul, Gabi dont les connaissances en microorganismes, quels qu'ils soient, sont une véritable mine d'or, Laurence, directrice actuelle du service depuis le départ de mon mentor vers le soleil, Coralie, nouvelle venue mais dont la bonne humeur apporte tous les jours du soleil à une région dont la réputation est de ne connaître que deux saisons (pour ceux qui ne connaissent pas l'adage, c'est l'hiver et le 15 Août) et Bénédicte, dont le sourire et la bonne humeur font que tout le monde voudrait prendre sa place... Je sais, la quantité de personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont influencée à cet endroit est tellement grande que je suis en train de tomber dans une énumération des personnes du labo. Mais c'est le risque dans ces circonstances. En parlant de circonstances, le dernier groupe de personnes que je vais citer est sans doute le plus important et s'est révélé à la suite d'un petit différent au centre duquel je me suis trouvée dans le laboratoire. Le groupe des bactériologistes. Je dirais que le terme de famille leur convient mieux que celui de groupe. J'ai énormément apprécié que Patrick Plésiat, directeur du service de Bactériologie, m'accepte dans ce petit cercle d'initiés à un moment où j'avais quelques difficultés à me trouver une place d'un point de vue social dans ma nouvelle équipe. Le fait qu'il prenne ma défense ou du moins qu'il se propose de le faire si besoin était m'a permis d'avoir envie de me battre pour montrer que, malgré le qu'en dira t'on, le travail que je réalisais pouvait donner un résultat très intéressant. Katy aussi a été d'une grande aide pour moi, mais pas seulement à ce moment là. Elle m'a donné de nombreux conseils (que j'ai toujours suivis ou presque) sur mes protocoles, mes graphiques et a toujours accepté de répondre à mes questions. En retour, j'ai toujours beaucoup apprécié la confiance qu'elle m'a accordée et c'est quand elle

veut que mon bureau se retransformera en \mathbb{R}^2 de campagne... Angelín, dont le rythme de déplacement, digne d'un Antillais, m'a beaucoup fait rire et continuera de le faire dès que je penserai à lui. Catherine, m'a elle aussi fait partager ses connaissances dans de nombreux domaines et je la remercie (mince, c'était donc pas fini) d'avoir été là pour me conseiller dans les modifications inhérentes à ma publication. Les nouvelles arrivantes, Marie-Cécile et Marjorie, que je n'ai pas eu le temps de bien connaître mais dont la joie de vivre a tout de suite été communicative. Enfin, Cédric et Sophie, qui sont devenus de véritables amis, qui comme moi, n'ont pas de montre et dont les encouragements réguliers m'ont fait tenir jusqu'au bout.

Chapitre 4, La fin...

Voilà pour ce qui est de l'histoire de ma thèse. En fait de narration, je me rends compte que j'ai terminé par remercier les gens que j'ai rencontrés, mais leur apport journalier à mon travail et à ma vie sociale est tel qu'il m'était difficile de raconter mon histoire avec eux en quelques lignes. Toutes les personnes citées ici sont celles qui ont joué un rôle quotidien dans mon travail et sans qui rien n'aurait été possible.

Pour conclure cette dédicace, je vais tout de même remercier quelques personnes qui ne pouvaient pas l'être dans la narration en tant que telle.

Je remercie mes parents, mes frères et belles-sœurs, ma sœur (la vraie) et son compagnon, ainsi que mon neveu et mes nièces pour leur soutien, leur compréhension et leur présence continue à mes côtés. En particulier, je tiens à remercier ma mère qui, malgré sa soi-disant incompréhension totale du sujet, a accepté de relire chaque chapitre plusieurs fois en quête de phôttes d'autographe (tu les as ratées celles-là).

Je remercie tous mes collègues ornithologues qui m'ont permis de voir autre chose que les quatre murs de mon bureau durant ces derniers mois et avec lesquels j'ai pu passer des moments exceptionnels pendant ces trois années et qui ont accepté que je réalise quelques prélèvements de déjections à des fins d'études. Au fait, il serait sympa de ne plus m'appeler tînette, ça va cinq minutes...

Je remercie les membres de la chambre régionale et des chambres départementales d'agriculture (Thierry Dubief et Michel Billot plus particulièrement) pour leur accompagnement dans la réalisation des prélèvements, ainsi que les membres du projet Gabriel.

Un grand merci à Dick Heederik et à Inge Wouters pour leurs relectures, commentaires et corrections des articles nés de ce sujet. Merci à Charlotte Braun-Fahrlander pour les commentaires échangés à propos du lait.

Je tenais particulièrement à adresser mes remerciements les plus sincères à Erika Von Mutius qui n'a pas hésité à nous adresser, à Mallo et à moi-même, des messages personnels d'encouragement pour la réalisation de notre travail.

Merci à vous, membres du jury, qui n'allez pas pouvoir éviter la lecture des quelques dizaines (voire centaines) de pages qui suivent...

Enfin, depuis quelques mois maintenant, et afin de terminer la rédaction de cette thèse, j'ai migré vers le Sud, comme la plupart des oiseaux quand l'hiver est trop rude (ce qui a été le cas cette année, vous en conviendrez). Je voulais donc remercier ma nouvelle équipe pour son accueil, sa gentillesse et sa disponibilité. Un grand merci en particulier à Carole, Gérald, Benoît, Joëlle, Stéphane, Annie, Martine 1, Martine 2, Mireille, Jérémy, Chantal, Nathalie, Momo et tous les autres.

Merci à tous et à chacun d'entre vous, ceux que j'ai cités et ceux que j'ai oubliés. Vous êtes tous importants pour moi et resterez dans ma mémoire comme une part intégrale de tout ce travail. Sans vous, rien n'aurait été possible.

Cette thèse est la nôtre.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	5
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION.....	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I/ Généralités	16
A/ Santé	17
1/ Asthme	17
a/ définitions	17
b/ symptômes.....	18
c/ diagnostic.....	19
d/ traitements.....	19
2/ Atopie	20
a/ Définition.....	20
b/ Symptômes.....	21
c/ Diagnostic.....	21
d/ Traitements.....	21
3/ Allergies	21
a/ définition.....	22
b/ symptômes.....	23
c/ diagnostic.....	23
d/ traitements.....	25
4/ mécanismes immunitaires	25
a/ allergies	25
b/ asthme.....	26
c/ rhinite allergique	26
d/ prédisposition génétique.....	26
5/ facteurs environnementaux.....	26
6/ Hypothèse hygiéniste	27
a/ le concept.....	27
b/ arguments en faveur de l'hypothèse hygiéniste	28
c/ arguments en défaveur ou limitant la portée de l'hypothèse hygiéniste	29
B/ Etude bibliographique sur la microflore de l'environnement fermier.....	30
1/ Microflore aéroportée et sédimentée dans les poussières.....	30
a/ méthodes de prélèvement.....	31
b/ analyses microbiennes.....	32
a/ analyses bactériennes	32
b/ analyses fongiques	34
c/ poussière et maladies respiratoires	35
2/ lait.....	35
a/ contamination du lait de vache et provenance des micro-organismes	35
b/ lait cru et allergies.....	37
3/ les composants microbiens qui ont montré leur intérêt	38
a/ les endotoxines.....	38
a/ effets négatifs	39
b/ effets bénéfiques	39
b/ les 1,3 β -D-glucanes	40
a/ effets négatifs.....	40
b/ effets bénéfiques	41
4/ études menées sur l'environnement des sujets asthmatiques	42
II/ Présentation des projets auxquels ce travail de recherche a contribué.....	43
A/ Etude pilote, Projet AgriSanté	43
B/ Projet GABRIEL.....	45
C/ Projet GABRIEL-A.....	45

MATERIEL ET METHODES	47
A/ Population de l'étude et prélèvements analysés au laboratoire.....	49
1/ Projet AgriSanté.....	49
a/ population.....	49
b/ prélèvements.....	51
a/ population.....	55
b/ prélèvements environnementaux	57
B/ Premiers traitements.....	57
1/ Mise en suspension des micro-organismes	57
a/ à partir des filtres	57
b/ nourriture.....	57
c/ poussière sédimentée (récoltée avec une spatule ou dans une boîte).....	58
d/ poussière sédimentée sur des lingettes électrostatiques.....	58
f/ surface de trayons	58
g/ lait.....	58
2/ Culture	60
a/ milieux de culture fongique	60
α / DG18.....	60
β / Malt sel.....	60
b/ milieux de culture bactériens.....	60
α / Mueller-Hinton.....	61
β / Drigalski.....	61
γ / Slanetz.....	61
δ / CHROMagar Orientation.....	61
ε / R8.....	62
ζ / Difco	62
η / milieux pour la flore d'intérêt dans la fabrication des fromages	65
c/ dilutions utilisées pour l'ensemencement des différents milieux	66
C/ Identification des espèces fongiques et des actinomycètes.....	67
1/ critères macroscopiques	67
2/ critères microscopiques	68
D/ Identification bactérienne.....	74
1/ Coloration de Gram	74
2/ Extraction d'ADN.....	75
3/ Conservation.....	75
4/ Amplification de l'ARN 16S.....	76
5/ Purification de l'ADN.....	79
6/ Séquençage	81
7/ Précipitation de l'ADN.....	83
8/ Identification.....	83
E/ Méthode d'identification des bactéries totales	87
1/ choix des échantillons.....	87
a/ AgriSanté.....	87
b/ GABRIEL	87
2/ extraction de l'ADN	88
3/ PCR ARN 16S	89
4/ purification.....	89
5/ clonage.....	91
6/ PCR M13	92
7/ PCR de séquençage.....	93
8/ séquençage.....	93
9/ détermination phylogénétique.....	95
F/ Analyses statistiques.....	95

RESULTATS	99
A/ Validation des méthodes	101
1/ validation de la méthode de prélèvement par poussière	101
a/ identification des genres et des espèces.....	101
b/ microflore aéroportée et sédimentée	102
2/ reproductibilité des prélèvements de poussière collectés au moyen de boîtes et de lingettes	106
3/ Conditions de conservation de la poussière	108
a/ poussière sédimentée dans une boîte ou ramassée à la spatule.....	108
b/ poussière sédimentée sur une lingette	108
4/ comparaison de deux approches dans l’inventaire microbien de la poussière des fermes franc-comtoises	114
a/ identification micro et macroscopique par culture.....	114
b/ identification bactérienne par approche métagénomique	114
B/ Composition de la flore microbienne dans les différents environnements étudiés	123
1/ AgriSanté, composition des différents compartiments de l’étable	123
a/ caractéristiques des exploitations	123
b/ composition microbienne des différents compartiments	124
2/ AgriSanté, flux microbiens de l’étable vers le lait.....	129
a/ composition des laits	129
b/ identification des flux microbiens à l’origine de la première flore du lait.....	130
c/ transferts bactériens de l’étable à la salle de traite.....	134
3/ AgriSanté, flux microbiens du matériel de traite vers le lait (résultats partiels).....	136
4/ GABRIEL, transferts microbiens de l’étable à la chambre	139
a/ sélection des <i>taxa</i> microbiens	139
b/ répartition des micro-organismes dans les différentes strates environnementales.	140
c/ flore microbienne des différents types de logements.....	141
d/ transfert microbien au sein de l’environnement fermier.....	141
5/ GABRIEL, analyse de la flore des étables par clonage de produit de PCR	147
a/ identification des clones	147
<i>α</i> / résultats globaux	147
<i>β</i> / répartition des <i>taxa</i> bactériens	147
b/ diversité bactérienne.....	148
6/ GABRIEL, impact de l’environnement sur la santé des enfants.	154
a/ rappels numériques	154
b/ asthme et maladies allergiques au sein de la population étudiée.	155
c/ asthme et maladies allergiques ; exposition et environnement	155
DISCUSSION	169
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXE 1 : Questionnaire AgriSanté	213
ANNEXE 2 : Questionnaire Gabriel Phase I	217
ANNEXE 3 : Questionnaire Gabriel Phase II	219
ANNEXE 3 : Questionnaire Gabriel Phase III	231
ANNEXE 5 : Article “Assessment of dust Sampling Methods for the study of Cultivable Microorganism Exposure in Stable”	235
ANNEXE 6 : Article “Airborne cultivable microflora and microbial transfers in farm buildings and rural dwellings.”	243
ANNEXE 7 : Article “Microbial cultivable communities of raw cow milk, and potential transportations in the stables of sixteen French farms responding to Comté cheese regulation”	258
ANNEXE 8 : Article “High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environnement?”	271

ABREVIATIONS

<u>ABPA</u> :	Aspergillose B roncho- P ulmonaire A llergique
<u>ADN</u> :	Acide D ésoxyribo N ucléique.
<u>DGGE</u> :	D enaturing G radient G el E lectrophoresis
<u>dNTP</u> :	D ésoxy ribo N ucléotide T ri P hosphate
<u>ddNTP</u> :	D i D ésoxy ribo N ucléotide T ri P hosphate
<u>ECRHS</u> :	E uropean C ommunity R espiratory H ealth S urvey.
<u>ESPS</u> :	Enquête Santé et P rotection S ociale.
<u>E.F.R.</u> :	Epreuve F onctionnelle R espiratoire.
<u>H</u> :	Heure
<u>IgE</u> :	I mmunoglobuline de type E
<u>IgG</u> :	I mmunoglobuline de type G
<u>ISAAC</u> :	I nternational S tudy on A sthma and A llergy in C hildhood.
<u>LAL</u> :	L imulus A emoebocyte L ysate
<u>LPS</u> :	L ipopolysaccharide
<u>Min</u> :	Minute
<u>ODTS</u> :	O rganic D ust T oxic S yndrome
<u>ORL</u> :	O to- R hino- L aryngologie
<u>PAARC</u> :	P ollution A tmosphérique et A ffections R espiratoires C hroniques.
<u>PCR</u> :	P olymerase C hain R eaction
<u>PFGE</u> :	P ulsed F ield G el E lectrophoresis (Electrophorèse en champ pulsé)
<u>R32AE</u> :	R éseau R égional de R echerche en A gro- A limentaire et E nvironnement.
<u>Rpm</u> :	R otation p ar m inute.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 :	projets d'étude et problématique abordée	50
Figure 2 :	stabulation libre, nourrissage des animaux.....	50
Figure 3 :	stabulation libre, salle de traite.....	50
Figure 4 :	étable entravée, disposition du bétail.....	50
Figure 5 :	étable entravée, traite des animaux.....	50
Figure 6 :	dispositif de prélèvement de poussière aéroportée	52
Figure 7 :	prélèvement de foin	52
Figure 8 :	prélèvement de la poussière sédimentée à l'aide d'une spatule.....	52
Figure 9 :	boîte de récolte de poussière.....	52
Figure 10 :	positionnement de la boîte de récolte de poussière dans l'étable.....	52
Figure 11 :	prélèvement de la surface de trayons.....	52
Figure 12 :	schéma du matériel de traite et des différents prélèvements effectués.....	54
Figure 13 :	dispositif de récolte de la poussière sédimentée sur des lingettes	54
Figure 14 :	traitement des filtres d'air dans le laboratoire.....	59
Figure 15 :	traitement des prélèvements de nourriture dans le laboratoire	59
Figure 16 :	traitement des lingettes de poussière sédimentée dans le laboratoire.....	59
Figure 17 :	ensemencement des différents milieux de culture.....	63
Figure 18 :	culture sur milieu DG18	64
Figure 19 :	culture sur milieu Malt sel.....	64
Figure 20 :	culture sur milieu Mueller-Hinton.....	64
Figure 21 :	isolement sur milieu drigalski	64
Figure 22 :	culture sur milieu Slanetz	64
Figure 23 :	culture sur milieu CHROMagar Orientation	64
Figure 24 :	culture sur milieu R8	64
Figure 25 :	culture sur milieu Difco.....	64
Figure 26 :	identification macroscopique des principales espèces fongiques de l'environnement ...	69
Figure 27 :	morphologie microscopique des champignons	69
Figure 28 :	aspect microscopique des principaux champignons de l'environnement	72
Figure 29 :	illustration de la diversité bactérienne macroscopique.....	77
Figure 30 :	colorations de Gram	77
Figure 31 :	cheminement des expériences et constitutions des banques de données.....	77
Figure 32 :	principe de la PCR.....	80
Figure 33 :	photographie d'une migration en gel d'agarose	80
Figure 34 :	synthèse d'un brin d'ADN.....	82
Figure 35 :	synthèse des brins d'ADN lorsqu'il y a présence de ddNTPs dans le mélange réactionnel	82
Figure 36 :	fonctionnement du séquenceur	84
Figure 37 :	exemple de chromatogramme.....	84
Figure 38 :	capture d'écran lors d'une recherche de correspondance d'une séquence sur le site ncbi.gov	84

Figure 39 :	capture d'écran de la description de l'alignement sur ncbi.gov	86
Figure 40 :	capture d'écran de l'alignement sur ncbi.gov.....	86
Figure 41 :	mode d'action de la topoisomérase	94
Figure 42 :	schéma d'un clonage.....	94
Figure 43 :	séquence entourant le site de clonage dans le plasmide	96
Figure 44 :	gel d'agarose des produits clonés puis soumis à une PCR.....	96
Figure 45 :	profils microbiens en box-plots des quatre types d'échantillons pour le premier hiver : Air (avant et après travail) et poussière sédimentée (boîte et spatule).....	104
Figure 46 :	courbes d'accumulation pour les quatre types d'échantillons du premier hiver. Représentation de l'accumulation des espèces fongiques et bactériennes.	105
Figure 47 :	courbes d'accumulation des échantillons de poussières sédimentées pour le premier hiver. Effet d'une conservation de la poussière pendant trois mois à température ambiante.	107
Figure 48 :	profils microbiens des 6 prélèvements effectués en parallèle dans deux étables en fonction du mode de conservation.....	110
Figure 49 :	profils microbiens en fonction du mode de conservation des lingettes de poussière. 112	
Figure 50 :	représentation graphique moyenne de la contamination microbienne des six prélèvements en fonction du mode de conservation.....	113
Figure 51 :	liste alphabétique et fréquence des différents <i>taxa</i> microbiens identifiés par culture dans les 3 types d'échantillons (air avant et après travail, et poussière sédimentée).....	116
Figure 52 :	fréquence d'identification des différents genres bactériens obtenus par clonage et contribution de la méthode de clonage par rapport à la culture sur MH.	119
Figure 53 :	Arbre phylogénétique indiquant les liens entre les différents clones identifiés.	120
Figure 54 :	courbes d'accumulation d'espèces identifiées à partir des clones pour les trois poussières analysées.	121
Figure 55 :	profils microbiens des huit compartiments fermiers étudiés.	132
Figure 56 :	représentation graphique des flux bactériens potentiels de l'étable vers le lait.	133
Figure 57 :	profils microbiens des 9 compartiments en contact avec le matériel de traite.	137
Figure 58 :	représentation graphique de la contamination du matériel de traite en micro- organismes identifiés dans le lait.....	138
Figure 59 :	profils microbiens des cinq différentes strates environnementales pour chacun des <i>taxa</i> microbiens.	146
Figure 60 :	représentation graphique des genres bactériens les plus fréquemment identifiés par clonage des pools de lingettes.	149
Figure 61 :	courbes d'accumulation des genres et espèces bactériennes pour les six pools.....	152
Figure 62 :	premières expositions aux caractéristiques de la ferme calculées en tant que proportion de sujets exposés par catégorie d'âge.....	160
Figure 63 :	<i>taxa</i> fongiques et bactériens détectés dans les échantillons de poussière sédimentée des chambres d'enfants en fonction de leur statut fermier.....	164

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I :	population de l'étude GABRIEL	56
Tableau II :	récapitulatif des prélèvements disponibles et des milieux utilisés pour l'analyse de chacun d'eux.	63
Tableau III :	tableau des dilutions pour les différents prélèvements et milieux de culture.....	66
Tableau IV:	caractéristiques macro et microscopiques des principaux genres fongiques	73
Tableau V :	constitution des pools de poussière d'étable pour le projet Gabriel	90
Tableau VI :	coefficients de corrélation appariés pour les différents types d'échantillons de poussières du premier hiver pour les 16 fermes.	105
Tableau VII :	coefficients de corrélation appariés pour la comparaison des prélèvements de poussières sédimentées du second hiver.....	107
Tableau VIII :	comparaison par un test de student des quantités moyennes de micro-organismes de chacun des 12 <i>taxa</i> microbiens pour les échantillons de poussière analysés immédiatement après prélèvement et de ceux analysés après trois mois de conservation à température ambiante et comparaison de la contamination de l'air avant et après affouragement.	109
Tableau IX :	coefficients de corrélation appariés en fonction du mode de conservation des lingettes de poussière.	111
Tableau X :	coefficients de corrélation des prélèvements en fonction du mode de conservation des lingettes.....	111
Tableau XI :	quantités moyennes dans les trois types de prélèvements des espèces microbiennes les plus fréquentes (>10% du total des prélèvements).....	117
Tableau XII :	<i>taxa</i> bactériens identifiés par la méthode de clonage et par la méthode de culture sur les différents milieux bactériens pour les trois échantillons de poussière sélectionnés.	118
Tableau XIII :	origine, fréquence et position taxonomique des séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage des trois poussières de ferme.	122
Tableau XIV :	caractéristiques des fermes décrites par les agriculteurs dans les questionnaires.....	126
Tableau XV :	fréquence d'identification des micro-organismes sur les différents milieux de culture	127
Tableau XVI :	moyennes géométriques et intervalles de confiance pour les 15 <i>taxa</i> microbiens dans les huit types d'échantillons.	128
Tableau XVII :	coefficients de corrélation de Spearman entre l'air de l'étable et l'air de la salle de traite.....	135
Tableau XVIII :	quantité et fréquence des micro-organismes détectés, stratifiés en fonction de la strate d'exposition et de la localisation dans la ferme. Tests statistiques du Chi ² pour les différences entre les fréquences observées pour les strates d'exposition.	142
Tableau XIX :	moyennes géométriques et déviation standard pour les <i>taxa</i> microbiens (en UFC/m ²) par strate d'exposition et par localisation dans la ferme	143
Tableau XX :	coefficient de corrélation de Spearman entre les niveaux microbiens de la chambre de l'enfant et les niveaux dans les étables ou dans les granges.	144

Tableau XXI :	nombre d'échantillons avec ou sans la présence des micro-organismes dans la chambre de l'enfant et/ou dans les autres localisations de la ferme	144
Tableau XXII :	moyennes arithmétiques (en 10^3 UFC/m ²) et ratio de moyennes pour les micro-organismes retrouvés dans les étables et dans les logements fermiers..	145
Tableau XXIII :	liste et fréquence d'identification des genres bactériens les moins fréquemment identifiés par clonage.	150
Tableau XXIV :	coefficients de corrélation entre les genres et les espèces bactériens identifiés dans les différents pools d'étables.	151
Tableau XXV :	diversité observée des six pools de poussière d'étable	153
Tableau XXVI :	prévalence de l'asthme et de l'atopie chez les enfants fermiers comparés aux enfants exposés et aux contrôles	158
Tableau XXVII :	paramètres des fonctions respiratoires chez les enfants asthmatiques et chez les non-asthmatiques	159
Tableau XXVIII :	Expositions à la ferme (de la grossesse à la troisième année) associée avec une décroissance du risque d'asthme infantile et d'atopie dans une analyse bivariée pesée, ajustée par centre et selon la variable ferme.....	161
Tableau XXIX :	effets combinés de différentes caractéristiques de fermes sur l'asthme infantile. Analyses de régression logistiques ajustées en fonction des centres et de la ferme.....	162
Tableau XXX :	modèles de régression logistique ajustée avec une sélection de variables pour l'asthme et pour l'atopie. Toutes les variables d'exposition significatives à partir de l'analyse bivariée ont été incluses dans le processus de sélection.....	163
Tableau XXXI :	Champignons et bactéries cultivables et effets combinés associés avec un risque décroissant d'asthme infantile et d'atopie dans une analyse bivariée ajustée sur l'effet ferme.	165
Tableau XXXII :	Associations entre les expositions actuelles et antécédentes et les bactéries et champignons les plus influents en fonction de l'exposition.	166
Tableau XXXIII :	modèles de régression logistique finaux selon les variables importantes en fonction des questionnaires et des bactéries et champignons importants montrés dans le tableau XXVIII.....	167

INTRODUCTION

L'asthme et les maladies allergiques représentent un problème de santé majeur dans les pays industrialisés. Les allergies, caractérisées par une réaction excessive du système immunitaire à une substance étrangère, touchaient, en 2004, environ 20% de la population mondiale (8, 11). Des revues de la littérature récentes suggèrent que la prévalence des maladies allergiques est actuellement en augmentation en Europe et que ces maladies ne sont plus limitées à une exposition à des allergènes saisonniers ou à des environnements particuliers (10, 120). L'asthme, maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires, a maintenant une prévalence qui varie entre 5 et 25% chez les enfants de moins de 14 ans en Europe en fonction des pays considérés. De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer cette augmentation, faisant intervenir soit une exposition plus importante à des facteurs favorisant la sensibilisation des sujets (la pollution atmosphérique, par exemple), soit une exposition plus faible à des facteurs protecteurs. Il a été notamment observé que certains modes de vie « traditionnels » semblent associés à une protection contre ces maladies. Par exemple, une étude menée sur des enfants américains a montré que les enfants mormons avaient un risque environ trois fois inférieur aux autres enfants de souffrir d'asthme, de rhume des foies et d'eczéma atopique (2). Pour les auteurs de cette étude, cette diminution des manifestations allergiques serait probablement due au fait que les Mormons ne prennent jamais d'antibiotiques. En 1999, une étude menée en Suède par Alm et al. a montré des résultats similaires chez des enfants fréquentant une école prônant la pensée anthroposophique (14). Cette étude a permis de mettre en évidence une relation entre la diminution des manifestations allergiques et la durée de l'allaitement maternel, le fait de ne jamais avoir consommé d'antibiotiques, le fait d'avoir contracté la rougeole, de consommer des légumes fermentés et l'hérédité.

C'est dans ce contexte qu'à la fin des années 80, a été formulée l'hypothèse hygiéniste. Une association négative entre l'atopie et les maladies infectieuses avait déjà été suggérée durant la décennie précédente par Gerrard et al. d'après une étude menée sur des habitants d'une communauté du nord du Saskatchewan (Canada) (115). Cette hypothèse met en avant l'importance des contacts réguliers avec un environnement riche en micro-organismes dans le développement de mécanismes de protection contre les maladies allergiques. A l'appui de cette hypothèse, des études portant sur des populations agricoles du nord de l'Arc Alpin ont montré que le contact avec l'environnement de l'étable était associé à une incidence plus faible des manifestations allergiques et asthmatiques chez les enfants d'agriculteurs. Ces

mêmes études ont aussi mis en évidence une association protectrice entre la consommation de lait cru issu de ces fermes et la protection contre ces mêmes maladies.

L'environnement fermier a dès lors fait l'objet d'études destinées à évaluer la composition microbienne et antigénique de l'atmosphère des fermes. Plusieurs approches ont été adoptées pour rendre compte de l'exposition aux micro-organismes des enfants vivant dans des fermes d'élevage bovin. Ces approches incluaient soit des prélèvements d'air, soit plus souvent la collecte de poussière sédimentée, dans l'étable, dans le bâtiment d'habitation fréquenté par les enfants de fermiers ou même sur le matelas de l'enfant. Cependant, la grande majorité de ces études s'est focalisée sur le dosage de molécules considérées comme représentatives de la flore microbienne aéroportée et des poussières sédimentées (endotoxines, ergostérol, bêtaglucanes) et l'on manque d'information sur la diversité de la flore microbienne des étables et des logements fermiers. Or, s'il est établi que la protection contre les maladies allergiques et certaines formes d'asthme est associée à une exposition à de grandes quantités d'endotoxines et de bêtaglucanes, rien ne permet d'affirmer que ces molécules agissent par elles-mêmes et qu'elles ne sont pas simplement les marqueurs d'une exposition microbienne particulière qui constituerait le véritable facteur protecteur.

Le travail que nous présentons ici avait donc pour but de connaître la composition microbienne d'un environnement complexe : celui des étables et des fermes d'élevage bovin du nord de l'Arc Alpin. Il s'agit tout particulièrement de mettre en évidence les flux de circulation de la microflore aéroportée au sein de l'étable puis vers la chambre de l'enfant, d'une part, et vers la salle de traite et le lait, d'autre part. En effet, nous avons posé comme hypothèse pour ce travail qu'il existe trois moyens principaux pour l'enfant d'entrer en contact avec les microbes de l'environnement fermier. Le premier est de respirer directement l'air des étables, le second est d'inhaler les micro-organismes transportés depuis les étables jusque dans les logements fermiers, le troisième est d'ingérer ces microbes via la consommation de lait cru, dont la microflore pourrait refléter en partie la flore microbienne circulant dans l'étable. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats d'une étude multicentrique mettant en évidence une association très prononcée entre l'exposition d'enfants à certains micro-organismes présents dans les fermes et la diminution de l'incidence de l'asthme et de l'atopie. Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet Européen GABRIEL « A multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the European Community » Project no. LHSB-CT-2006-018996.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I/ Généralités

A/ Santé

1/ Asthme

Comparée à d'autres maladies chroniques, l'asthme a un taux de létalité relativement faible. En effet, cette maladie sévit dans tous les pays, quel que soit leur niveau de développement mais la plupart des décès qui lui sont imputables surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. L'asthme ne se guérit pas facilement mais on peut juguler les troubles et assurer une qualité de vie satisfaisante à ceux qui en souffrent. De nos jours, on estime que 300 millions de personnes souffrent d'asthme dans le monde. En Europe, l'asthme touche en moyenne un enfant sur dix et engendre un coût très important pour la société, estimé à plus d'un milliard d'euros par an (4). D'après le centre de contrôle et de prévention des maladies, la prévalence de l'asthme aux Etats Unis était de 3.6% en 1980 et de 5.8% en 2003. Des augmentations similaires de la prévalence de l'asthme ont été observées dans d'autres pays durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle. En Australie, ce taux est passé de 19% en 1964 à 46% en 1990 chez les moins de 7 ans (241, 260), à Cardiff (Pays de Galles) la prévalence cumulée de l'asthme a été multipliée par 2 entre 1973 et 1988 (51), et à Aberdeen (Ecosse) la prévalence de l'asthme est passée de 5% en 1964 à 10% en 1989 (201) pour la même tranche d'âge.

a/ définitions

D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'asthme est une maladie chronique dont la gravité et la fréquence varient d'une personne à l'autre. Cette maladie se caractérise par des crises récurrentes où l'on observe des difficultés respiratoires et une respiration sifflante. En 1992, le ministère de la santé des Etats-Unis en énonçait la définition suivante : « l'asthme est un désordre inflammatoire des voies aériennes ; cette inflammation est secondaire à un infiltrat inflammatoire polymorphe, comprenant des mastocytes et des polynucléaires éosinophiles. Sur un terrain particulier, cette inflammation entraîne des symptômes qui sont en général en rapport avec une obstruction bronchique diffuse et variable, réversible spontanément ou sous l'effet du traitement ; par ailleurs cette inflammation est la cause d'une hyper-réactivité bronchique à de nombreux stimuli. »

L'asthme n'est pas une maladie au sens pasteurien du terme dans la mesure où il n'existe pas de cause unique facilement identifiable dont le traitement spécifique conduirait à la guérison.

Il s'agit plutôt d'un syndrome multifactoriel pouvant se déclencher sous l'influence de facteurs variant d'un patient à l'autre et même chez un même patient à différents moments de sa vie. Classiquement on considérait qu'il existait deux types d'asthme : l'asthme extrinsèque (ancienne dénomination), qui correspond à un asthme allergique, et l'asthme intrinsèque (ancienne dénomination) ou asthme non-allergique, dont la composante allergique n'est pas décelable. Des études ont récemment rapporté que 80% des cas d'asthme infantile et 40 à 50% des cas d'asthme chez l'adulte sont liés à des mécanismes allergiques. Trois types d'asthmes sont maintenant différenciés dans la littérature récente. On parlera d'asthme allergique IgE médié lorsqu'il est prouvé que les IgE sont à l'origine des réactions allergiques immédiates ou retardées, d'asthme allergique non-IgE médié (ce sont alors les lymphocytes T qui vont reconnaître l'antigène combiné au complexe majeur d'histocompatibilité et induire la lyse de la cellule infectée) et enfin, d'asthme non-allergique pour lequel aucun mécanisme immunologique n'est impliqué.

b/ symptômes

L'asthme peut s'exprimer de différentes manières, la plus fréquente étant la crise d'asthme avec sifflements se produisant à l'expiration. Cette crise est caractérisée par des épisodes de dyspnée sibilante survenant le soir ou dans la deuxième moitié de la nuit. Il s'agit classiquement d'une bradypnée expiratoire : l'expiration est difficile, lente et prolongée. La crise évolue en deux phases :

- la phase sèche est caractérisée par une bradypnée expiratoire qui réveille la personne brutalement par une impression d'étouffement. Au début de cette phase se crée un spasme de la musculature bronchique, un œdème de la muqueuse et une sécrétion d'un mucus épais et adhérent qui s'accumule dans la lumière de la bronche. Il s'ensuit une obstruction des voies respiratoires. Tout l'air inspiré ne peut être expiré et demeure dans les alvéoles. La personne doit s'asseoir, ce qui lui facilite la respiration. Le thorax est bloqué en inspiration.
- La phase humide catarrhale est le deuxième temps. Lorsque l'hypersecretion des glandes muqueuses s'est déversée dans les bronches de petit calibre, les sibilants apparaissent. Ce sont des sifflements expiratoires souvent perçus spontanément par le malade et son entourage.

Au bout d'un certain temps, spontanément ou sous l'effet du traitement, la crise cesse mais les sibilants persistent quelques heures.

La production d'un effort physique peut également provoquer un asthme. Cela peut même être parfois la seule manifestation apparente de la maladie. La crise débute souvent après l'arrêt de l'exercice physique, à la récupération et cède spontanément en quelques minutes. Les causes du bronchospasme sont multiples : l'hyperventilation, la libération de médiateurs chimiques lors des mouvements respiratoires amples, ou encore la respiration buccale d'un air plus froid et plus sec que celui inspiré par respiration nasale.

c/ diagnostic

Le diagnostic pose surtout des problèmes pour la première crise d'asthme chez une personne jusqu'alors épargnée par cette maladie. Les symptômes respiratoires évocateurs entraîneront, de la part du médecin, une recherche des antécédents familiaux d'allergie, d'asthme et d'eczéma ; d'épisodes infectieux ORL à répétition ayant entraîné des prescriptions d'antibiotiques ; de la répétition d'épisodes respiratoires selon un mode stéréotypé ; de la survenue de crises lors d'exposition aux allergènes ; de l'amélioration des symptômes par les médicaments. L'étude des fonctions respiratoires (E.F.R.) avec des tests de provocation bronchique est particulièrement utile et l'on ne peut suivre l'évolution d'une maladie asthmatique sans pratiquer ces tests au moins une fois par an. L'étude de la fonction respiratoire a pour but de mesurer différents volumes et débits mobilisés au cours de la respiration au moyen de spiromètres informatisés. Ces examens d'une durée d'environ 20 minutes, non invasifs, permettent d'évaluer l'importance du déficit de la fonction respiratoire, de rechercher d'éventuelles anomalies fonctionnelles associées, d'évaluer la réversibilité de l'obstruction et de suivre l'évolution de la maladie.

d/ traitements

La prise en charge de la maladie asthmatique repose sur l'utilisation d'un certain nombre de médicaments. La participation active de l'asthmatique et de sa famille à la gestion de la maladie et du traitement est une part essentielle de cette prise en charge. Le traitement de l'asthme comprend deux éléments : le traitement de la manifestation aiguë et le traitement préventif de la survenue de la crise. Les médicaments de la crise d'asthme doivent être actifs sur l'obstruction bronchique (broncho-dilatateurs) et sur l'inflammation des voies aériennes (anti-inflammatoires). Les broncho-dilatateurs utilisés dans les cas d'asthme sont de deux types. Les plus utilisés sont de la famille des bêta-2-mimétiques. Ils permettent le relâchement du muscle lisse bronchique et ont un effet très rapide. L'autre médicament utilisé en cas de

crise d'asthme est la théophylline. C'est le plus ancien des médicaments de l'asthme. C'est un broncho-dilatateur moins efficace que les bêta-2-mimétiques et son utilisation est limitée par le risque de toxicité puisque les concentrations toxiques sont proches des concentrations thérapeutiques. Pour traiter l'inflammation bronchique et en prévention d'autres crises, deux types d'anti-inflammatoires peuvent être utilisés. Les corticoïdes, qui sont l'un des traitements majeurs de l'asthme et les anti-allergiques, qui ne sont actifs que dans le cadre d'un traitement préventif des asthmes allergiques.

2/ Atopie

a/ Définition

Définition de WAO/EAACI : « L'atopie est une prédisposition personnelle et/ou familiale, se manifestant le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence, à devenir sensibilisé et à produire des anticorps IgE spécifiques en réponse à une exposition naturelle à des allergènes, en général des protéines. En conséquence, les sujets atopiques peuvent développer des symptômes typiques d'asthme, de rhino-conjonctivite ou d'eczéma. Les termes "atopie" et "atopique" devraient être réservés pour décrire la prédisposition génétique à devenir sensibilisé par l'intermédiaire d'IgE spécifiques vis-à-vis d'allergènes rencontrés communément dans l'environnement et auxquels chacun est exposé. Les sujets atopiques synthétisent des IgE spécifiques de ces allergènes alors que la majorité de la population ne réagira pas à cette exposition. Ainsi, l'atopie est une définition clinique d'une personne prédisposée à synthétiser de grandes quantités d'anticorps IgE. Le terme "atopie" ne doit donc pas être utilisé à moins qu'une sensibilisation IgE dépendante ait été documentée par la présence d'anticorps IgE dans le sérum ou par la présence de tests cutanés (Prick-tests) positifs. Plus simplement, l'atopie est une prédisposition héréditaire à produire de manière excessive des immunoglobulines de type E, au contact d'allergènes, et à développer des manifestations d'hypersensibilité immédiate comme l'asthme ou le rhume des foins. Bien que d'origine différente, l'atopie est souvent confondue avec l'allergie du fait de la similitude des symptômes. L'atopie serait actuellement responsables d'environ 80% des cas d'asthme en Occident.

b/ Symptômes

Ils sont semblables aux symptômes de l'allergie. Leur manifestation est souvent précoce, commençant par une dermatite vers l'âge d'un mois à deux ans, et pouvant évoluer en asthme puis en rhino-conjonctivites avec l'âge. Cependant, l'évolution et la persistance des symptômes à l'âge adulte ne semblent concerner qu'une minorité des enfants malades.

c/ Diagnostic

Le diagnostic de l'atopie en tant que telle, repose sur le diagnostic de la dermatite atopique, premier symptôme clinique et anamnestique de l'atopie. L'atopie étant une maladie chronique et ayant une évolution aléatoire, le diagnostic précoce est difficile à rendre et peut nécessiter une prise de sang pour mettre en évidence une hyper-éosinophilie et une augmentation des IgE. Cependant, la nature héréditaire de la maladie reste un argument important du diagnostic.

d/ Traitements

Aucun traitement ne permet actuellement de guérir de l'atopie. Tout comme pour l'asthme, seuls les symptômes peuvent être traités. Des mesures de prévention semblables à celles préconisées pour l'allergie peuvent limiter ou prévenir l'apparition des symptômes en contrôlant l'environnement du malade. Les formes légères de l'atopie peuvent disparaître au bout de quelques années, même si des rechutes à l'adolescence peuvent avoir lieu sous l'influence des hormones ou suite à un stress important.

3/ Allergies

Les allergies respiratoires couvrent un éventail de pathologies sous-tendues par des mécanismes immunologiques de divers types. Les plus fréquentes sont dues à des mécanismes IgE-dépendants, qui associent des manifestations aiguës, en relation avec la dégranulation des mastocytes en présence d'allergènes de l'environnement, et des manifestations chroniques, liées à l'infiltration des muqueuses respiratoires par des cellules inflammatoires, tout particulièrement les éosinophiles.

a/ définition

L'allergie est une réaction anormale et excessive du système immunitaire de l'organisme consécutive à un contact avec un allergène, substance d'origine protéique appartenant à l'environnement. Cet allergène est souvent un élément de la vie quotidienne qui est bien toléré par la plupart des membres de la population. Lorsqu'au contact de cet allergène, l'organisme réagit excessivement, on parle d'allergie ou d'hypersensibilité. Les maladies allergiques ont été notées depuis des siècles et l'asthme, l'urticaire et l'eczéma ont été décrits dans la littérature médicale de la Chine, de l'Égypte et de la Grèce (68, 265). Le premier cas d'allergie relaté dans l'histoire mondiale semblerait être le Pharaon Menes, qui, selon les hiéroglyphes, serait mort en 2641 avant notre ère d'une piqûre de guêpe (20). Avant cela, dans la littérature chinoise, Huang Ti, en 2698 avant JC, avait décrit des symptômes de respiration bruyante. Hippocrate, en 460 av JC, décrit pour la première fois une hypersensibilité au fromage de chèvre et la première description de l'asthme allergique apparaît en 25 av JC, par Aulus Cornelius Celsus, médecin romain.

Le mot allergie a fait son apparition dans la littérature médicale le 24 juillet 1906 dans un article écrit par Clemens Von Pirquet, un pédiatre officiant à Vienne, pour le *Münchener Medizinische Wochenschrift* (299). Von Pirquet décrit alors le phénomène comme étant une réactivité spécifique altérée de l'organisme. Sa définition inclut les réactions d'hypersensibilité mais aussi la baisse de réponse immunitaire, aspect devenu depuis obsolète puisque l'allergie est maintenant définie comme une hypersensibilité immunologique spécifique qui conduit à une maladie. Un nouveau consensus de l'organisation mondiale de l'allergie (World Allergy Organization) sur la terminologie de l'allergie a été publié en 2004 (146) : « L'allergie est une réaction d'hypersensibilité provoquée par des mécanismes immunologiques. L'allergie peut être médiée par des anticorps ou par des cellules. Le plus souvent, les anticorps responsables appartiennent à la classe des IgE et les patients souffrent d'une allergie IgE-médiée. Les allergies associées aux IgE ne surviennent pas uniquement chez les patients atopiques. Dans les cas d'allergies non IgE-médiées, les anticorps peuvent être des IgG. C'est le cas de l'anaphylaxie due aux immun-complexes contenant du dextran. L'intervention d'IgG est aussi notée au cours des réactions dites de type III. Ainsi, on peut trouver à la fois des IgE et des IgG dans les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA). L'allergie de contact est représentative des allergies médiées par les lymphocytes. ».

Depuis 1873 et les tests cutanés réalisés par Blackley (32) à partir de pollens, de nombreux pas ont été faits pour la compréhension du phénomène allergique. La découverte des mastocytes en 1877, de l'histamine en 1910, de la cortisone en 1949, et plus récemment, en 1996, du rôle des anti-IgE dans la thérapie ont permis de mieux comprendre les allergies. De plus, la description et la définition de maladies comme l'allergie en 1906, l'atopie en 1923 et la maladie du poumon de fermier en 1961, ainsi que la découverte des immunoglobulines E en 1966 par Kimishige Ishizaka sont des avancées qui ont grandement amélioré notre compréhension de ces phénomènes.

b/ symptômes

Les symptômes de l'allergie peuvent prendre plusieurs formes : les formes cutanées dont font partie l'eczéma de contact, la dermatite atopique, l'urticaire et l'œdème angioneurotique ; les formes pulmonaires : asthme, pneumopathie interstitielle, pneumopathie à éosinophiles ; les formes oculaires : conjonctivite et kératite ; les formes oto-rhino-laryngologiques : rhinite, sinusite ; les formes digestives : vomissements, diarrhées, douleurs abdominales ; et enfin les formes hématologiques : anémie, thrombopénie, leucopénie et hyperéosinophilie. La crise d'allergie peut avoir plusieurs niveaux d'expression comme par exemple une gêne respiratoire avec ou sans éternuements ; une sensation de malaise allant jusqu'aux vertiges, syncopes, évanouissements ; de l'urticaire dû à des piqûres d'insectes, des médicaments, du latex, certains produits de beauté ; un œdème de Quincke, un gonflement des lèvres, paupières, doigts ou des démangeaisons dans tout le corps ; ou encore un choc anaphylactique, réaction extrême, brutale et pouvant conduire à la mort.

c/ diagnostic

Les allergènes sont des antigènes, pour la plupart des protéines, pouvant être responsables de réaction exagérée faisant intervenir les IgE et les IgG. Poussière, pollens, spores de moisissures, poils d'animaux sont les allergènes les plus fréquemment responsables d'allergies respiratoires, bien que de nombreuses autres substances puissent devenir des allergènes pour un sujet donné. Il est assez rare que la réaction allergique se produise dès le premier contact avec l'allergène. Ainsi, une personne pourra se faire piquer dix fois par une guêpe et ne déclarer d'allergie qu'à la onzième piqûre. Même si le premier contact n'entraîne aucune réaction visible, les cellules responsables de l'allergie deviennent hypersensibles à une substance normalement inoffensive. Aux contacts suivants, l'allergène entraînera une cascade

de réactions aboutissant à une manifestation allergique (du simple rhume des foins au choc anaphylactique). Au contact de ces allergènes, les mastocytes vont libérer des molécules chimiques comme l'histamine (qui peut entraîner, entre autres, une vasodilatation, une broncho-constriction, ou un prurit), la sérotonine (augmentation de la perméabilité vasculaire et inflammation), les leucotriènes (vasodilatation et broncho-constriction), ou encore les prostaglandines (vasodilatation, broncho-constriction et induction de la contraction des muscles lisses).

On estime que l'allergie alimentaire touche entre 4 et 6% des enfants aux Etats-Unis (262), 9% des enfants entre 1 et 4 ans en Finlande (226), 1,7% des jeunes adultes de 22 ans au Danemark (207) et 7,4% des patients visitant les cliniques d'allergologie en Espagne (104). Les principaux allergènes alimentaires sont les arachides et les légumes (20% des allergies alimentaires recensées par le Allergo Vigilance Network de 2002 à 2004), les noix (14%), les crustacés (10%), les allergies aux aliments dits à latex (possédant des protéines semblables à celles du latex et donc provoquant des allergies alimentaires chez les personnes déjà sensibles au latex : avocat, banane, châtaigne, pomme de terre, tomate, kiwi, ananas, papaye, aubergine) (7%) (189). Les allergies alimentaires sont l'une des principales causes de chocs anaphylactiques. Dans certains pays, comme en Italie, elles sont en cause dans 38,5% des cas de choc anaphylactique (212). Les allergies médicamenteuses sont elles aussi très importantes dans certains pays (28% des cas en Australie (47) et 62% au Royaume Uni (263, 264)) tandis que les allergies aux piqûres d'insectes restent la principale cause de chocs anaphylactiques en France (24%) (25) et en Suisse (58,8%) (128). Comme pour le cas des fruits à latex, il peut y avoir un phénomène d'allergie ou de sensibilisation croisée, avec reconnaissance par le mastocyte de l'épitope d'un allergène, identique à la séquence d'acides aminés d'un autre allergène. Dans ce cas, la réaction de l'organisme à un allergène peut se faire dès le premier contact, sans qu'il y ait eu de sensibilisation préalable. On peut ainsi assister à une sensibilisation croisée entre l'inhalation de pollen d'ambroisie et l'ingestion de céleri, entre l'inhalation de pollens de graminées et l'ingestion de tomates, pommes de terre ou de poivrons, ou encore une sensibilisation croisée entre les acariens, les escargots et les crevettes ou entre la viande de porc et les poils de chat (5).

d/ traitements

Quatre types de traitements de l'allergie sont actuellement proposés.

- Pour lutter contre les manifestations allergiques, des comportements d'évitements peuvent être recommandés. Ainsi, en fonction des calendriers polliniques, l'usage de masques anti-pollens peut contribuer à diminuer le risque d'allergies aux pollens ; le fait d'aérer les maisons régulièrement, de ne pas utiliser d'aspirateur mais plutôt une serpillière, de ne pas installer de moquettes permet de lutter contre les allergies aux acariens ; l'évitement systématique des contacts avec les animaux ou le fait de froter leur pelage une fois par jour avec un chiffon humide diminue le risque d'une manifestation allergique aux animaux à poils.
- La prise d'antihistaminiques comme la cétirizine (commercialisée sous le nom de Zyrtec[®]), ou la méquitazine (Primalan[®]) peut être conseillée dans certains cas d'allergie. Ils agissent directement sur le mécanisme de l'allergie en se fixant sur les récepteurs à histamine des cellules, inhibant ainsi les effets vasodilatateurs de l'histamine.
- La prise d'anti-inflammatoires locaux (solution nasale ou collyre) permet de traiter les symptômes. Dans les cas difficiles, il peut être prescrit des corticoïdes et en cas de choc ou d'œdème de Quincke, de l'adrénaline.
- Une désensibilisation peut être aussi tentée visant l'induction d'une tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'allergène.

4/ mécanismes immunitaires

En réponse à un contact avec un élément étranger à l'organisme, le système immunitaire de chacun va réagir de manière différente. Ainsi, dans de nombreux cas, l'organisme se défend contre les dysfonctions de ses cellules et les agressions, c'est-à-dire des processus qui ont pour conséquence de détruire des êtres vivants.

a/ allergies

La première étape de la cascade d'événements aboutissant à la manifestation allergique est la fixation de l'allergène à son récepteur spécifique sur la paroi de la cellule lymphocytaire T *helper* (Th). La poursuite de l'activation du système immunitaire nécessite une co-stimulation et la présence d'un ensemble de cytokines favorisant une orientation des sous-populations lymphocytaires autrement appelée polarisation (Th1, Th2, Th17 ou Treg).

b/ asthme

La présentation de l'allergène aux lymphocytes T *helper* est réalisée par les cellules présentant les épitopes. Lors de la première présentation d'un antigène, les lymphocytes Th0 appartiennent à une population lymphocytaire naïve vis-à-vis de la reconnaissance de cet antigène. Ces lymphocytes Th0 vont se différencier soit en suivant la voie Th1 soit la voie Th2 en fonction des cytokines présentes dans l'environnement cellulaire. Suite à des travaux réalisés sur le modèle murin (49, 110, 124, 259), il a été observé que certains malades asthmatiques ont une augmentation des cytokines de type Th2 (dont IL-4) associée à une augmentation de la production d'IgE, d'IL-4 et d'IL-5 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (125, 126, 242).

c/ rhinite allergique

Les symptômes cliniques initiaux sont dus à la libération de cytokines par les mastocytes de la muqueuse nasale. Dans un deuxième temps, l'inflammation entraîne une congestion nasale accompagnée par une infiltration cellulaire de polynucléaires neutrophiles puis à la phase tardive de polynucléaires éosinophiles et basophiles (65).

d/ prédisposition génétique

Elle reste un facteur conséquent de risque d'allergie alimentaire. Il a été montré qu'elle est plus fréquente chez les atopiques (57%) que chez les non-atopiques (17 %) (155).

5/ facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux qui peuvent conduire à l'apparition de symptômes asthmatiques incluent la pollution atmosphérique (229), l'exposition à l'environnement professionnel (168), le style de vie, le régime alimentaire (290), l'exposition in-utero au tabac (295), le contact avec des animaux domestiques (130, 206) et avec des allergènes aéroportés (266). Les polluants de l'air incluent les agents de l'intérieur (fumée de cigarette (267) et acariens) et la pollution extérieure (fumées de véhicules et aéroallergènes). Les différences de style de vie, incluant les habitudes alimentaires, doivent aussi être considérées. Il est probable que l'asthme soit causé par une combinaison de facteurs environnementaux qui sont influencés par les allergènes, les agents pathogènes, le climat, les habitudes alimentaires, le

style de vie et par la pollution de l'air, de l'eau et de la nourriture. Le lien entre la pollution de l'air, particulièrement les fumées de voitures, et l'asthme reste à identifier plus clairement. Il existe des endroits où la pollution de l'air est importante et où la prévalence de l'asthme est faible (Santiago du Chili) et des endroits où le niveau de pollution est faible dans l'air mais où la prévalence de l'asthme est élevée (Nouvelle Zélande) et les effets de différents types de pollution de l'air (intérieur et extérieur) restent à déterminer (270).

6/ Hypothèse hygiéniste

a/ le concept

En 1989, David Strachan, de l'université Saint-Georges de Londres, est à l'origine de la formulation de l'hypothèse hygiéniste. Lors d'une étude épidémiologique sur les relations entre la taille de la fratrie et la prévalence de la rhinite allergique, Strachan a proposé que les infections de la petite enfance, transmises par contact avec les autres membres de la fratrie ou acquises pendant la période prénatale, sont des facteurs de prévention du développement de maladies allergiques. Cette hypothèse permet d'expliquer l'augmentation des maladies allergiques au sein de sociétés dans lesquelles les enfants en bas âge évoluent dans un environnement surprotégé et sont moins exposés aux facteurs environnementaux. Des études ultérieures ont mis en avant plusieurs faits à l'appui de cette hypothèse hygiéniste, notamment l'impact des infections humaines liées aux virus ou aux bactéries et le rôle des expositions microbiennes qui semblent tous deux diminuer le risque allergique chez les enfants. Cependant ces effets ne semblent pas constants et varient en fonction de la période de contact. L'hypothèse hygiéniste implique donc de connaître la fenêtre temporelle d'exposition, d'utiliser une unique définition des phénotypes des maladies allergiques et d'étudier les interactions du patrimoine génétique individuel avec ces deux précédents facteurs. Depuis que l'hypothèse hygiéniste a été proposée, un nombre croissant d'études épidémiologiques ont cherché à mettre en évidence des facteurs protecteurs ou aggravants des maladies allergiques. L'hypothèse hygiéniste a reçu, au cours des dernières années, une attention croissante. Elle part du principe que les enfants qui entrent en contact avec des agents microbiens infectieux ou avec des substances telles que les produits du métabolisme des bactéries ou des champignons, lors des premières années de leur vie sont protégés contre l'apparition de l'asthme et des allergies. Le meilleur modèle actuellement, pour ce type de relations, est constitué par les enfants de la ferme. Il a été montré que les enfants qui grandissent dans une

ferme souffrent plus rarement d'asthme bronchique, de rhume des foins et de sensibilisation atopique (45, 81, 217, 240, 295, 297, 304).

Les raisons de cet "effet de ferme" ne sont cependant pas complètement connues.

Les résultats d'études récentes montrent qu'il existe un effet protecteur de la poussière de l'étable sur le développement de l'allergie. Des arguments complémentaires ont été apportés par l'étude de modèles animaux. Ainsi, les souris BALB/c, après un traitement avec des extraits de la poussière de l'étable, sont protégées contre le développement de l'allergie (219).

Du point de vue de la réponse immunitaire, selon l'hypothèse hygiéniste, le contact microbien pourrait induire un statut immunitaire favorable à la tolérance des allergènes par le biais soit de l'augmentation de la réponse immune des lymphocytes Th1, soit de la diminution de l'expression d'une réponse des lymphocytes Th2 (139, 182). Récemment, il a été montré que le principe de l'hypothèse hygiéniste peut également être appliqué au cas du cancer, avec une diminution significative du risque de cancer du poumon chez les agriculteurs lorsque le nombre de vaches augmente dans une étable (183). Cette diminution du risque pourrait alors être imputée à la balance TH1/TH2 influencée par la quantité d'endotoxines de l'environnement.

b/ arguments en faveur de l'hypothèse hygiéniste

Il a été observé de façon reproductible dans différentes études menées dans plusieurs pays d'Europe, que les enfants ayant grandi à la ferme, en particulier dans de petites exploitations de production laitière très traditionnelles d'Europe centrale, présentaient moins d'asthme, de rhume des foins et de sensibilisation allergique que leurs homologues qui n'avaient jamais vécu à la ferme (43-45, 240, 295). Les résultats de ces études suggèrent de surcroît qu'une présence très régulière dans les étables de bovins et que la consommation de lait cru non-pasteurisé sont les facteurs les plus significativement en relation avec la tolérance vis-à-vis des allergènes environnementaux et que l'acquisition de cette tolérance débute probablement *in utero* (240). Une étude de Braun-Fahrlander (45) suggère qu'il existe une protection liée à la présence de l'enfant dans l'étable indépendante de l'exposition aux endotoxines. Il y aurait donc intervention d'autres facteurs tels que la présence de microbes, d'allergènes comme les pollens (273) ou encore des substances d'origine bovine.

c/ arguments en défaveur ou limitant la portée de l'hypothèse hygiéniste

Des études récentes dans le domaine de l'épidémiologie de l'asthme ont montré que l'"épidémie" d'asthme dans les pays industrialisés a commencé à décliner (222). Des auteurs ont montré que moins de 50% des cas d'asthme étaient liés à un terrain atopique (216) ou à une infiltration des voies respiratoires par les éosinophiles (signe d'une allergie) (82). Ainsi, l'importance de l'hypothèse hygiéniste est minimisée puisqu'elle ne permet alors d'expliquer qu'une partie réduite des cas d'asthme. Il est d'ailleurs montré dans une étude récente que les cas d'asthme non-atopique auraient été en augmentation plus importante que l'asthme atopique (282).

Le fait que la prévalence de l'asthme ait décliné chez les enfants (19, 214) mais également chez les adultes (57) dans les pays industrialisés, irait aussi à l'encontre de l'hypothèse hygiéniste puisqu'il est difficile d'envisager à l'heure actuelle une baisse de l'hygiène ou une augmentation de la taille des familles dans les pays concernés (85). Pour une raison inexplicée, la prévalence de l'asthme est élevée dans des pays d'Amérique latine dépassant celle observée en Espagne ou au Portugal, deux pays européens partageant de nombreuses similitudes culturelles avec les pays latino-américains (215).

L'hypothèse hygiéniste insiste sur le fait qu'une exposition lors des premiers mois de la vie est souvent génératrice de protection contre l'asthme atopique. Cependant, des études récentes ont suggéré qu'une exposition régulière et se prolongeant tout au long de la vie aux facteurs protecteurs, dont les agents microbiens, peut être requise pour maintenir une protection optimale contre la maladie (84, 88).

De manière générale, aucune de ces remarques ne contredit complètement l'hypothèse hygiéniste. Seul l'aspect concernant la période d'exposition semble être ici remis en question. Les personnes qui doutent de la véracité de cette théorie insistent sur le fait que l'hypothèse hygiéniste à elle seule ne peut pas expliquer l'augmentation de la prévalence de l'asthme observée pendant ces dernières décennies ou le déclin observé plus récemment (86).

B/ Etude bibliographique sur la microflore de l'environnement fermier

Les agriculteurs travaillent souvent dans une atmosphère chargée en poussières. Une partie de cette poussière est minérale. Elle est composée en grande partie de matériaux provenant du sol, quartz, silicates, argiles. Certains composés non organiques peuvent déclencher ou aggraver des problèmes respiratoires en fonction de la concentration à laquelle on les retrouve dans l'environnement (1). La poussière générée par les travaux à la ferme est aussi, en grande partie composée de matériaux biologiques. La manipulation de fourrages dans une étable produit en effet une grande quantité de poussière organique contenant des débris végétaux issus du fourrage, mais il y a également de nombreux autres composants. Ainsi, on peut y identifier des champignons et des spores, des bactéries, des mycotoxines (aflatoxine produites par les *Aspergillus*, zearalenone émises par les *Fusarium*, ochratoxine par les *Penicillium...*), des composants bactériens (endotoxines, peptidoglycanes, enzymes protéolytiques), des acariens, des insectes, d'autres matières animales (membres d'insectes, poils de rongeurs, plumes d'oiseaux et excréments). La mesure de l'exposition à ces composants organiques en milieu agricole est d'autant plus compliquée que l'exposition des agriculteurs est très variable qualitativement et quantitativement d'un lieu à un autre et d'un moment à un autre (247, 249).

1/ Microflore aéroportée et sédimentée dans les poussières

Les micro-organismes des différents environnements agricoles ont fait l'objet d'études diverses en relation avec les activités qui y sont pratiquées. En effet, dans tout environnement, la réalisation d'une activité, que ce soit simplement le déplacement d'un individu dans une pièce ou la distribution de foin dans une étable, modifie la quantité de micro-organismes présents dans l'air, et par conséquent l'exposition aux micro-organismes.

Les micro-organismes aéroportés peuvent être de taille variable (des plus petits virus de 0.003 microns jusqu'aux spores de pollen et de champignon mesurant jusqu'à 500 microns). Les organismes les plus petits peuvent s'agglomérer, s'attacher à des particules de poussière ou à des gouttelettes et ainsi se comporter comme des aérosols de plus grande taille, mais pour la plupart, les micro-organismes qui sont présents dans l'air constituent des particules aéroportées dont la taille leur permet d'être directement inhalés.

a/ méthodes de prélèvement

Les méthodes de prélèvement de l'air reposent sur deux éléments clé : le mode de prélèvement et sa durée. En effet, si l'on considère un appareil prévu pour reproduire la respiration humaine, il ne devra pas recueillir de particules excédant 10 μ m (le dépôt optimal, par impaction, sédimentation ou diffusion, dans les voies aériennes se fait pour des particules de taille comprise entre 0.5 μ m et 10 μ m). D'un autre côté, si l'on utilise un appareil prévu pour recueillir un grand volume d'air sur une longue durée, il deviendra rapidement surchargé dans un environnement agricole. Le calcul de la durée optimale d'échantillonnage est particulièrement problématique pour les bio-aérosols subissant des variations temporelles de concentration (41, 163). En effet, la concentration des aérosols varie considérablement dans le temps et elle reste rarement stable pendant la durée du prélèvement sauf si la période d'échantillonnage est courte (de l'ordre de la minute) ou si l'atmosphère n'est pas du tout perturbée par une quelconque activité. L'échantillonnage pose également le problème de récupérer les particules biologiques sans en altérer leur viabilité ou leur activité.

Les méthodes les plus souvent utilisées pour échantillonner l'environnement sont des méthodes d'échantillonnage d'air, de poussière sédimentée sur un dispositif installé à cet effet, ou encore des échantillonnages de poussière sur la surface de certains matériaux situés dans le local à échantillonner (78, 79). Les échantillons de surface, obtenus à l'aide d'écouvillons, de scotchs ou encore de boîtes de contact sont fréquemment utilisés dans la détection de la contamination fongique des logements (63). L'alternative qui consiste à réaliser un échantillonnage de poussière sédimentée est généralement privilégiée dans les études environnementales. Il permet d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats et ces derniers sont plus représentatifs d'une exposition sur le long terme que les échantillons d'air (79, 292).

Plusieurs études ont ainsi été menées pour vérifier si les micro-organismes cultivables retrouvés dans la poussière sont des indicateurs stables de la contamination microbienne. Ainsi, en 1988, Miller *et al.* a trouvé que les concentrations en champignons cultivables dans la poussière présente dans un aspirateur était similaire à celle collectée fraîchement (188). En 1994, Takatori *et al.* a trouvé que la concentration en espèces fongiques cultivables dans la poussière de dix résidences était similaire d'un mois à un autre sur cinq années consécutives (276). D'autres études ont cependant montré que les concentrations et types de micro-organismes dans la poussière pouvaient varier avec le temps (137, 293).

Diverses méthodes ont été décrites dans la littérature afin d'échantillonner et d'analyser les bio-aérosols (3, 17, 33, 145, 176, 198, 283, 284). Certaines prennent en compte les composants, microbiens ou chimiques, tandis que d'autres se focalisent sur les microbes eux-mêmes qu'ils soient cultivables ou non. Avec les méthodes basées sur la culture, le milieu utilisé est formulé pour cultiver un large spectre de micro-organismes ou pour sélectionner certains d'entre eux (3, 33, 50). Il est assez rare que des méthodes de biologie moléculaire telles que la PCR, le clonage ou le séquençage soient utilisées pour identifier les micro-organismes de l'environnement (172, 307) du fait de la charge de travail et du budget nécessaire. Ces différentes méthodes ont cependant souvent été utilisées pour la caractérisation de la flore des laits ou celle des fromages (38, 52, 53, 69, 93, 129, 180, 190).

b/ analyses microbiennes

Un certain nombre d'études se sont intéressées aux micro-organismes auxquels les agriculteurs sont exposés. En général, les bactéries identifiées sont des bactéries communes du sol ou des plantes. Quelques-uns des micro-organismes en question ont été retrouvés dans quasiment tous les prélèvements d'air échantillonnés dans les granges étudiées. Ces micro-organismes font partie des genres *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus* et *Corynebacterium* pour les bactéries et des genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* et *Fusarium* pour les champignons (94, 164, 313).

α/ analyses bactériennes

Dans la plupart des études publiées jusqu'ici, les bactéries sont identifiées par culture sur des milieux spécifiques. Ces méthodes de culture sont principalement utilisées dans la recherche de bactéries pathogènes, en milieu hospitalier où le nombre de bactéries recherchées est limité et connu. Selon le tribunal canadien du commerce extérieur, il existe plus de 800 milieux de culture bactériologiques (7). Les différents ingrédients des milieux de culture peuvent aussi varier en fonction des bactéries recherchées (par exemple ajout de sel pour les bactéries halophiles). Cette méthode peut également être complétée par des galeries d'identification bactérienne.

Cependant les bactéries de l'environnement fermier appartiennent pour la plupart à des espèces différentes de celles ciblées par les systèmes d'identification utilisés en pratique médicale. Il faut alors passer à l'identification de l'isolat par des techniques de biologie moléculaire impliquant une extraction de l'ADN à partir de la culture, une Polymerase Chain

Reaction (PCR) et un séquençage de la région 16S de l'ADN ribosomal. Cette technique a été étendue à divers domaines allant de l'analyse de bactéries non identifiables par culture en routine hospitalière à la détermination de la diversité bactérienne cultivable dans les hauts fonds marins, en passant par la détermination de la diversité bactérienne dans la croûte des fromages (129, 172, 213, 220, 224, 307). Mais même en procédant ainsi, il a été prouvé, dans la littérature, que les inventaires bactériens d'un échantillon donné, basés sur une étape de culture, sous-estiment largement la diversité bactérienne réelle (15, 140), sachant que dans les environnements naturels, moins de 1% des organismes sont cultivables (208).

La méthode d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE = Pulsed Field Gel Electrophoresis), couplée à la méthode de fingerprinting est, quant à elle, basée sur la répartition des sites de restriction sur le génome de la bactérie. Après une phase de culture pure de la bactérie, le génome est digéré par une enzyme de restriction spécifique ce qui aboutira à un profil d'une trentaine de bandes par souche bactérienne. Cette méthode est souvent utilisée pour identifier la diversité clonale au sein d'une même espèce (27, 28, 66, 91, 277).

Ainsi, d'autres techniques doivent être utilisées pour éviter la sélection par l'étape de culture. Elles font appel en premier lieu au clonage de produits de PCR après extraction de l'ADN total de l'échantillon et permettent de mieux apprécier la diversité réelle d'un environnement (42, 103, 157, 210). En s'affranchissant de la phase de culture, la méthode de clonage permet d'aborder la diversité bactérienne réelle de l'environnement mais elle exige des manipulations lourdes à effectuer puisqu'elle implique le séquençage systématique de chaque clone obtenu. Les fragments issus d'une PCR d'ADNr 16S sont tous de taille similaire et une électrophorèse en gel d'agarose aboutit à la visualisation d'une bande unique. La méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet de séparer les produits de PCR en fonction des différences au niveau des séquences qui se traduisent par des variations dans les conditions de dénaturation des molécules et donc par une vitesse de migration modifiée dans un gradient dénaturant. Pendant une DGGE, les produits de PCR sont mis en contact avec des concentrations croissantes de produits chimiques dénaturants au travers d'un gel de polyacrylamide. Les séquences d'ADN de différentes bactéries vont se dénaturer à des concentrations spécifiques, ce qui aboutira à un profil de bandes, chacune représentant théoriquement une population de bactéries différentes. Cette méthode a déjà été utilisée pour apprécier la diversité bactérienne lors d'infections dentaires ou encore pour évaluer la diversité dans la rhizosphère ou dans les milieux marins (77, 173, 174). Elle a pour limite de ne pas distinguer deux bactéries dont la teneur en GC est identique. Cette technique peut être

appliquée à des échantillons d'ADN totaux extraits de prélèvements ou d'ADN extraits d'une culture.

La technique de PCR en temps réel permet de connaître la concentration en certaines bactéries dans un échantillon donné. Cette technique a notamment été utilisée pour rechercher les salmonelles dans le lait cru ou dans l'eau, certains champignons des sols, *Mycobacterium leprae* sur des échantillons de tissus épidermiques ou encore *Mycoplasma hominis* dans des prélèvements de laparoscopie chez des femmes cherchant à recevoir un traitement de fertilité (21, 29, 106, 245, 287).

La méthode des puces à ADN, aussi appelée microarray, a été développée initialement dans le but de déterminer le profil d'expression de certains gènes dans diverses conditions naturelles ou expérimentales (6). Cette méthode, qui repose sur l'hybridation du génome à des molécules d'ADN fixées à une plaque de verre, a également été utilisée pour détecter dans certains milieux (bouche, foie...), le génome de bactéries pathogènes (58, 179, 225, 274, 309). Seules les bactéries spécifiquement recherchées peuvent être identifiées ainsi.

Mis à part la méthode de clonage, chacune de ces méthodes sous-entend de connaître les bactéries que l'on recherche.

β/ analyses fongiques

Plusieurs études ont déjà été menées sur la diversité fongique dans l'environnement agricole, dans le cadre de maladies professionnelles (maladie du poumon de fermier). De nombreuses espèces fongiques sont régulièrement isolées dans les fermes. L'utilisation de milieux de culture différents, à plusieurs températures d'incubation, permet souvent d'obtenir une composition acceptable de la diversité fongique d'un échantillon environnemental (16, 121, 136, 234, 235, 244).

Lorsque le but de l'étude est d'évaluer la concentration de certains micro-organismes dans l'environnement, comme par exemple connaître la concentration de *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata* et *Stachybotrys chartarum* dans différents types de logements (24), une méthode de PCR en temps réel, ciblée sur chaque espèce fongique grâce à des sondes spécifiques, est applicable. Comme pour les bactéries, des méthodes de biologie moléculaire faisant intervenir le séquençage de produits de PCR existent pour les champignons. La PCR est alors ciblée sur l'ADNr 18S du génome. Des techniques de DGGE, de clonage ou de séquençage ont ainsi été utilisées pour identifier la diversité fongique des sols, de la rhizosphère, mais aussi pour identifier les pathogènes dans le cas de kératites microbiennes (67, 100, 205, 268).

c/ poussière et maladies respiratoires

L'impact sur le système respiratoire de l'exposition aux différentes poussières varie en fonction de leur composition. L'exposition à des poussières organiques peut affecter les voies respiratoires et, en fonction des antigènes portés par les matériaux et de la susceptibilité de l'hôte, résulter en des manifestations d'asthme, de pneumopathies d'hypersensibilité ou d'infections chroniques des voies respiratoires. Les endotoxines et les autres composants des poussières organiques peuvent également générer un ensemble de symptômes constitutionnels connus sous le nom d'ODTS (pour Organic Dust Toxic Syndrome) dont les symptômes se rapprochent des formes aiguës de pneumonies d'hypersensibilité (12, 184, 311).

2/ lait

De nombreuses études ont montré le rôle de la flore naturelle du lait cru, dans sa globalité, sur les caractéristiques biochimiques et organoleptiques des fromages (36, 119). Plus récemment, des travaux de biologie moléculaire portant sur la description de l'écosystème microbien du Comté suggèrent qu'une part importante de la flore d'affinage provient du lait cru (26, 37). Les rares études réalisées sur la flore d'intérêt technologique montrent d'une part que la composition microbiologique des laits est globalement stable d'année en année (72) et d'autre part que la diversité des pratiques de traite influence le niveau des flores microbiennes et la proportion entre les flores d'intérêt technologique et les flores d'altération (187). Ces observations suggèrent que le niveau et la nature de la flore microbienne des laits crus dépendraient des facteurs en amont de la production (pratiques comportementales de l'exploitant, éléments structuraux du milieu).

Ainsi, l'aspect santé, qu'il s'agisse de rechercher des facteurs protecteurs ou au contraire susceptibles de favoriser la survenue de maladies, n'est pas le seul débouché des études portant sur la flore microbienne des étables.

a/ contamination du lait de vache et provenance des micro-organismes

Le lait contient de façon naturelle environ 1000 bactéries par litre de lait dans des conditions de traite optimales (300). En fonction de la température de conservation du lait, en 24 heures, cette quantité peut doubler ou augmenter de façon exponentielle.

La qualité bactériologique du lait de vache est très réglementée dans de nombreux pays (102, 286). La quantité de bactéries contenues dans le lait peut varier en fonction de la température de conservation mais aussi de la propreté du matériel de traite et de l'environnement ou encore du fait qu'un ou plusieurs animaux du cheptel souffrent d'infection (mammite ou autre) (286). Des études ont été menées pour évaluer la diversité bactérienne dans le lait de vache (71), mais aussi sur le lait de chèvre (52). Certaines espèces bactériennes sont communément retrouvées dans le lait ; c'est le cas de *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc sp.*, *Kocuria sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus equorum*, et *Micrococcus sp.*. D'autres genres bactériens identifiés dans les fromages sont parfois également retrouvés dans le lait, comme par exemple *Corynebacterium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Brachybacterium sp.*, *Clostridium sp.*, et *Rothia sp.*. Parfois, des genres atypiques du lait ont également pu être isolés dans le lait : *Jeotgalicoccus sp.* (bactéries halotolérantes), *Exiguobacterium sp.* (bactéries du permafrost sibérien). Certaines levures sont fréquemment retrouvées dans le lait : *Debaryomyces sp.*, *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*. Il a en outre été montré que la composition en micro-organismes du lait, dans une étable pour laquelle les règles d'hygiène sont parfaitement respectées, varie avec les saisons (72).

Ainsi, les bactéries que l'on retrouve dans le lait sont nombreuses et ont plusieurs origines possibles. Une étude publiée par Delbès en 2007 (69) fait état de la présence d'au moins 35 espèces bactériennes obtenues par clonage à partir de lait cru de vache, produit en vue de fabrication de Saint-Nectaire. D'autres études ont été menées pour trouver la provenance des bactéries pathogènes qui contaminent le lait, comme les salmonelles (132, 133, 192), *Listeria sp.* (252-254), *E. coli* (271), ou encore *S. aureus* (105). Ainsi, il a été montré que la majorité de la flore pathogène du lait provient des matières fécales des vaches. Après que les vaches ont souillé leur litière, ces micro-organismes peuvent contaminer la peau de leurs trayons. Bien que plusieurs équipes de recherche aient étudié et suivi la flore bactérienne du lait dans sa totalité, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude investiguant non seulement la flore du lait mais aussi la flore de l'environnement qui entoure sa production. Il a également été observé que la diversité microbienne dans les laits crus serait un atout pour faire barrière aux pathogènes tel que *Listéria sp.* (80, 101, 180), et cette constatation peut être renforcée par le fait que ces dernières auraient une croissance plus faible dans le lait cru que dans le lait stérilisé (46). La mise en place de normes sur les bactéries pathogènes dans le lait a conduit à diminuer le risque de présence de bactéries pathogènes, mais a également entraîné une diminution globale des concentrations en micro-organismes dans les laits (291), sans pour

autant que les conséquences sur la diversité des populations microbiennes présentes dans le lait soient connues.

Il est reconnu que le trayon constitue un réservoir potentiel majeur de flore microbienne : en effet, avant préparation, la surface des trayons abrite une forte diversité de groupes microbiens avec une forte prédominance des groupes d'intérêt technologique. Les conditions de logement des animaux (extérieur en été, intérieur en hiver, litière constituée de paille ou autre) jouent un rôle important dans la charge microbienne présente sur les trayons (40).

Plusieurs enquêtes épidémiologiques, l'une conduite entre 1997 et 1999 sur les facteurs de risque de la contamination du lait lors de la production, l'autre menée au début des années 1990 en Bretagne, ont montré que les principales sources de contamination du lait, au sein de l'élevage, sont les déjections des bovins. En règle générale, il est montré que l'application de mesures d'hygiène appropriées permet de prévenir la dissémination des bactéries pathogènes dans les étables, sur les mamelles et dans le lait. Une étude menée en 1983 sur des élevages dont les laits n'étaient pas de bonne qualité bactériologique (239), a montré que les principaux vecteurs sont la peau des trayons, souillée par les fèces, et le matériel de traite qui, mal conçu, se nettoie mal et permet l'installation des pathogènes entre deux traites. Il peut également y avoir une contamination intra-mammaire ou une contamination de l'eau utilisée pour les différentes opérations de nettoyage (matériel et mamelles).

b/ lait cru et allergies

Des groupes d'études sur le lait ont été mis en place à travers le monde afin de mettre en évidence des relations éventuelles avec l'état de santé des consommateurs. Bien que de nombreuses personnes, à l'âge adulte, avouent ne plus pouvoir digérer le lait, qu'il soit cru ou pasteurisé, ces études ont montré quelques bienfaits de la consommation de lait cru sur la santé des consommateurs.

En effet, cette hypothèse de l'influence de la consommation de lait cru sur la santé des consommateurs a été, depuis une dizaine d'années, étendue pour suggérer que la flore microbienne qui s'établit dans les intestins dès le plus jeune âge est cruciale pour la bonne maturation du système immunitaire naif. Les probiotiques que l'on retrouve dans le lait jouent un rôle de stimulateur dans cette maturation. Une étude réalisée en double aveugle a montré que l'administration périnatale de probiotiques (par ingestion par la mère de deux capsules contenant soit une dose de *Lactobacillus rhamnosus*, soit un placebo) diminue de moitié le risque de développement d'eczéma atopique chez les jeunes enfants (150, 151, 153, 154). Compte tenu de l'effet bénéfique des probiotiques sur la maturation du système immunitaire

de l'enfant, des études ont été menées pour définir l'effet de *Lactobacillus rhamnosus* sur la production d'interférons- γ chez des enfants allergiques au lait de vache dont le niveau d'interférons- γ est faible (148, 301). Dans ces études, l'augmentation d'interférons- γ induite par *Lactobacillus rhamnosus* chez les enfants allergiques au lait de vache provoque un signal immunomodulateur bénéfique lorsque la bactérie est administrée pure (les résultats sont différents si *Lactobacillus rhamnosus* est donné à l'enfant avec un mélange d'autres bactéries) (218, 221).

L'étude transversale PARSIFAL (Prevention of Allergy—Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic Lifestyle) a recruté près de 14 900 enfants, fermiers et contrôles (sans contact avec le milieu fermier), âgés de cinq à treize ans et vivant en Europe. Un questionnaire sur les habitudes alimentaires de chaque enfant, sur les antécédents familiaux de maladies atopiques, sur les comportements spéciaux dus à des allergies au sein de la famille, sur les activités de l'enfant dans la ferme et sur le diagnostic de maladies respiratoires a été renseigné et une prise de sang a été réalisée afin de doser les IgE allergène-spécifiques. Les résultats de cette étude ont montré que la consommation de lait de ferme pouvait offrir une protection contre l'asthme et les maladies allergiques (302). Dans la même optique, plusieurs études autour du globe (Nouvelle-Zélande, Crète, Autriche, Suisse, Allemagne, Angleterre...) ont montré cette même association négative entre la consommation de lait cru et la manifestation d'asthme et de maladies allergiques (23, 217, 228, 240, 302, 304).

3/ les composants microbiens qui ont montré leur intérêt

Dans l'étude des maladies allergiques et particulièrement de l'asthme, ainsi que des mécanismes de protection, les scientifiques ont souvent focalisé leurs travaux sur certains composants microbiens car ils sont abondants dans l'environnement et facilement dosables dans les prélèvements.

a/ les endotoxines

Les endotoxines sont des composants bactériens issus de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Composées de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides (LPS), elles sont ubiquitaires et représentent une part importante de la poussière organique. Elles sont facilement dosables dans des échantillons de poussière prélevés dans l'environnement par la méthode LAL (Limulus Amoebocyte Lysate), une technique maintenant bien maîtrisée et

fiable. Les LPS qui les composent sont amphiphiles, stables aux variations de température et solubles dans l'eau, ce qui confère aux endotoxines leurs propriétés biologiques. Des expositions importantes aux endotoxines se produisent dans les environnements ruraux et dans plusieurs lieux de travail comme l'industrie du textile ou le milieu agricole (169). Il a également été remarqué que les concentrations en endotoxines augmentaient dans l'environnement avec la présence de fumée de tabac (167, 261). Des effets antagonistes ont été notés sur la santé humaine liés à l'inhalation d'endotoxines et ont fait l'objet de diverses études (170, 227). En effet, d'un côté, certains experts préconisent le port de dispositifs de protection sur les lieux de travail à risques pour éviter la diminution des fonctions respiratoires du fait de l'exposition aux endotoxines, et de l'autre, des équipes scientifiques ont observé un effet protecteur sur le développement des allergies lié à cette même exposition. La réponse immunologique individuelle serait en fait déterminée par l'interaction entre la dose et le moment de l'exposition (288).

α / effets négatifs

L'*organic Dust Toxic Syndrome*, une maladie aiguë, non allergique, ressemblant à la grippe, pourrait se développer à cause d'une exposition importante aux endotoxines (269) et à des composés d'origine fongique, probablement de façon simultanée (35, 231). De plus, une exposition à des inhalations chroniques d'endotoxines, à divers degrés et dans divers lieux de travail, a été associée à une détérioration de la santé, avec des symptômes comme de la fièvre, des maux de tête, irritation du nez et de la gorge, de la toux, un souffle court, des éternuements, une broncho-constriction et une inflammation des poumons (22, 83, 246).

β / effets bénéfiques

Des effets bénéfiques des endotoxines sur l'organisme ont été décrits, notamment dans la prévention du développement des allergies (45, 98, 296). D'autres effets bénéfiques ont été notés. Ainsi plus un agriculteur est en contact avec un nombre élevé de têtes de bétail, moins il présente de risques de développer un cancer du poumon, laissant supposer que les endotoxines constituent un facteur important de la stimulation du système immunitaire (165, 166, 183). Les endotoxines agiraient comme un puissant stimulateur de médiateurs endogènes susceptibles d'activer, entre autres, les macrophages tumoricides (162). Cependant, cette relation reste à ce jour toujours hypothétique et le lien statistique entre l'exposition aux endotoxines et la protection contre le cancer du poumon n'a pas encore été complètement

élucidé. Concernant l'asthme, l'atopie et l'allergie, des études épidémiologiques suggèrent un effet protecteur de l'exposition aux endotoxines environnementales (237, 250, 296). Ces études viennent appuyer l'hypothèse hygiéniste qui confère aux expositions microbiennes un lien avec l'incidence faible de l'atopie dans certains milieux. Cependant, si les endotoxines ont un effet bénéfique sur l'allergie, les personnes fortement exposées aux endotoxines peuvent aussi développer des maladies liées à cette exposition. Par exemple, il a été observé que le risque d'atopie était réduit chez les enfants exposés aux endotoxines, mais que cette exposition augmente le risque de respiration sifflante chez ces mêmes enfants (54).

Récemment, les endotoxines ont été testées sur un modèle murin montrant que les endotoxines agissaient sur le système immunitaire en empêchant la production d'IgE et de cytokine T_H2 chez les souris sensibilisées (113, 114). De plus, si un sujet sain est exposé aux endotoxines, sa prédisposition à la sensibilisation à une variété d'allergènes communs sera réduite (112).

b/ les 1,3 β-D-glucanes

Les β-D-glucanes sont des composants fongiques pouvant représenter jusqu'à la moitié de la masse des parois de certains champignons (159). Ils peuvent être excrétés dans le milieu de culture, ce qui en rend la purification et la caractérisation faciles (257, 258). Ils sont reconnus pour être des stimulants importants du système immunitaire chez l'homme et sont déjà utilisés en clinique au Japon et en Chine lors de traitements contre certains cancers (195). Cependant, tous les β-D-glucanes n'ont pas une capacité identique à induire une réponse immunitaire lorsqu'ils sont mis en contact avec les récepteurs cellulaires. (196)

α/ effets négatifs

Sur les divers modèles murins testés, l'utilisation des β-D-glucanes pour soigner diverses maladies, n'a pas entraîné la notification d'effets défavorables sur l'organisme, lorsqu'ils sont employés isolément. Cependant, l'admission simultanée d'un panel de β-D-glucanes et d'anti-inflammatoires aurait provoqué le décès de plusieurs souris testées lors de ces expériences (275, 310).

La formation de micro-embols, la survenue d'une inflammation et de douleurs peuvent également être observées lorsque les β-D-glucanes qui sont difficilement solubles sont injectés par voie intraveineuse (55, 75, 76, 312). Certains champignons utilisés pour produire des β-D-glucanes présentent une concentration non négligeable de métaux toxiques comme

l'arsenic, le plomb, le cadmium et le mercure (34). De plus les préparations médicamenteuses contenant des β -D-glucanes et des protéines peuvent être à l'origine de réactions allergiques et d'asthme. Enfin, certaines études ont montré que les β -D-glucanes peuvent interférer avec les fonctions des macrophages, activer les fonctions lymphocytaires et induire, en synergie avec d'autres agents, une inflammation des voies respiratoires (74, 108, 204, 305).

β / effets bénéfiques

Certains β -D-glucanes participent à l'activation des phagocytes dont le rôle est d'éliminer les pathogènes de l'organisme (48). En interagissant avec les récepteurs des macrophages, les β -D-glucanes stimulent la production de cytokines qui, à leur tour, activent la réponse immunitaire (48, 256).

Depuis que les β -D-glucanes ont montré leur potentiel dans le traitement de certains cancers, de nombreuses expériences sur les animaux ont été réalisées afin de mieux comprendre leurs actions sur différentes cellules tumorales (294). L'utilisation de différents β -D-glucanes dans le traitement contre des maladies infectieuses a également été proposée. Certains d'entre eux permettraient une modulation des réponses immunitaires humorales et cellulaires dans le cas de l'hépatite B (149), d'autres, en interagissant avec le vaccin contre le VIH, augmenteraient la réponse immunitaire de l'organisme (18).

Certains β -D-glucanes seraient aussi efficaces contre les infections bactériennes. Ainsi, certains cas d'infections causées par *Mycobacterium tuberculosis* (181), *Bacillus anthracis* (161), ou *Streptococcus pneumoniae* (131), sur des modèles murins, ont pu bénéficier de l'administration de β -D-glucanes qui agiraient par l'augmentation de l'activité des macrophages ou de la production de cytokines.

Actuellement, la prise en charge des infections fongiques opportunistes pose des problèmes chez les patients immunodéprimés. Comme les champignons pathogènes sont aussi producteurs de β -D-glucanes, ils pourraient induire une réponse immunitaire contre eux-mêmes (196, 251, 279). Suivant cette hypothèse, certains chercheurs ont montré l'efficacité des β -D-glucanes dans la protection contre les infections à *Candida albicans* ou à *Pneumocystis carinii* (109, 135, 272) sur le modèle murin. Les β -D-glucanes ont également montré leur intérêt dans le traitement de maladies cardiovasculaires en liaison avec le taux de cholestérol dans le sang (199), dans le traitement du diabète en réduisant la concentration de glucose dans le sang (171), dans le contrôle de la pression sanguine (278) ou encore dans la guérison de plaies et la réduction des cicatrices (185, 223).

Des études menées par Rylander et Folgelmark ont montré que les β -D-glucanes pourraient agir en synergie avec les endotoxines sur les symptômes pulmonaires (107, 108, 118, 248), du fait de leur action sur les macrophages. La réduction du risque allergique et asthmatique chez les agriculteurs et leurs enfants pourrait ainsi passer par les contacts répétés avec une combinaison de β -D-glucanes et d'endotoxines.

4/ études menées sur l'environnement des sujets asthmatiques

De nombreuses études ont été menées sur les composants microbiens retrouvés dans la poussière des fermes afin de rechercher, sur un modèle animal, les mécanismes sous-jacents à l'effet protecteur constaté par des études épidémiologiques effectuées dans certains pays. Ainsi, des expériences ont été menées sur un modèle murin à partir d'endotoxines ou de β -D-glucanes extraits de l'environnement fermier. Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, des effets différents peuvent être obtenus selon l'origine des composés extraits de divers micro-organismes. Il apparaît donc nécessaire de mieux connaître les populations microbiennes dans les différents environnements, fermiers et non fermiers, et d'identifier les principales espèces qui composent les populations microbiennes des environnements associés à une moindre incidence de l'asthme et de l'atopie parmi les populations exposées. De nombreuses cohortes d'enfants et d'adultes ont été suivies ces dernières années afin de collecter des informations reliant leur santé à leur mode de vie, mais ce n'est que récemment que des études environnementales ont été entreprises dans le but d'inventorier les micro-organismes avec lesquels ces enfants et ces adultes sont en contact régulier. Dans la plupart des cas, il s'agissait de définir les contextes environnementaux associés à des prévalences différentes des symptômes asthmatiques. Plusieurs études de grande envergure ont ainsi été menées, aussi bien à l'échelle d'un pays (PAARC (289), ECRHS (197), ESPS (59), ISAAC (13, 230), Etude nationale sur les adolescents de 15 ans (191)), qu'à celle d'un continent (ECRHS (314)) ou même de la planète entière (ISAAC (13)).

Nous avons vu précédemment que l'environnement des étables, par le biais des pratiques des agriculteurs, de la configuration de l'étable, du système de conservation du lait et des mesures d'hygiène prises par les exploitants, avait une incidence non négligeable sur la composition microbienne des laits et des fromages. De même, la flore microbienne des aliments distribués aux animaux mais aussi celle de l'air de l'étable, de la salle de traite et de la laiterie peuvent

avoir une influence sur la première flore du lait. Dans ces circonstances, il importe de bien connaître l'environnement dans lequel évolue le bétail et de comprendre le fonctionnement des flux microbiens qui amènent à la contamination du lait ou à l'inhalation par voie respiratoire de micro-organismes par les exploitants agricoles et leur famille.

III/ Présentation des projets auxquels ce travail de recherche a contribué

A/ Etude pilote, Projet AgriSanté

Notre travail s'inscrit tout d'abord dans le cadre du réseau R32AE (Réseau Régional de Recherche en Agro-Alimentaire et Environnement) dont le but est d'établir un pont entre les besoins exprimés des professionnels et les compétences régionales en matière de recherche. Depuis plusieurs années, une évolution nette de la perception du risque sanitaire par le grand public a été observée, se traduisant notamment par une suspicion croissante des consommateurs à l'égard de la qualité sanitaire des produits alimentaires. Ce contexte incite le monde agricole à s'interroger sur l'impact de leurs pratiques professionnelles non seulement sur la qualité des produits proposés aux consommateurs mais également sur la santé des exploitants eux-mêmes. L'attachement des producteurs franc-comtois au maintien des pratiques traditionnelles de fabrication les rend particulièrement sensibles aux exigences croissantes des consommateurs en matière d'absence totale de risque. Ceci est particulièrement vrai pour les fromages au lait cru, dans un contexte international de plus en plus méfiant à l'égard de ces produits.

Suite aux observations sur les niveaux et la nature de la flore microbienne des laits crus, une étude de l'environnement microbiologique situé en amont de la production de lait a été envisagée. Cet environnement microbien d'amont pourrait être lié à la flore muqueuse du bétail, retrouvée sur le trayon mais aussi aux bio-aérosols des étables, eux-mêmes fortement influencés par les pratiques agricoles. De plus, des études antérieures ont montré une grande variabilité journalière et saisonnière de l'ambiance des étables (233, 234). Il a ainsi été montré qu'il existait un lien entre la flore microbiologique du foin et les conditions de la récolte, du stockage et de la distribution du fourrage (taille de la coupe d'herbe, techniques de séchage et de stockage du foin, conditions météorologiques durant la fenaison, techniques de distribution du fourrage, pratiques de traite, système d'aération et autres) (243). Il est donc légitime de s'interroger sur l'influence de l'alimentation des vaches dans la composition de la première flore colonisant le lait pendant et juste après la traite. Il est cependant nécessaire de rappeler

que l'influence des micro-organismes présents dans les étables n'est pas forcément négative et que la notion de terroir repose notamment sur la composante microbiologique de l'alimentation des vaches. Dans ce contexte, le projet AgriSanté visait à analyser le lien entre l'alimentation des vaches, les pratiques agricoles lors de la récolte et de la gestion des fourrages d'une part et la composition microbiologique du lait, d'autre part.

De plus, ce projet affiche une double motivation :

- renforcer les relations établies entre le monde agricole et le monde de la recherche, sur une thématique qui lie intimement l'observation des pratiques agricoles et la recherche appliquée sur la problématique des fromages au lait cru,
- disposer d'éléments fiables et précis permettant de mettre en avant les atouts des modes de production traditionnels mis en œuvre en Franche-Comté.

En retour, des éléments concrets pourront être valorisés dans le conseil agricole de terrain, relatifs notamment aux pratiques agricoles de récolte, de séchage et de manipulation des fourrages. Enfin ce projet avait également pour but de valider les méthodes de prélèvement de poussière pour la réalisation d'une analyse microbiologique de la poussière sédimentée dans les étables.

B/ Projet GABRIEL

Le projet GABRIEL, financé par l'Union Européenne, regroupe 60 organismes de recherche différents. Son objectif général est d'étudier comment et dans quelle mesure, les gènes et certains facteurs environnementaux sont impliqués dans la survenue ou la prévention de signes cliniques d'asthme. Ainsi, le consortium GABRIEL se propose d'étudier un nombre important de gènes candidats dans des populations de patients et de témoins issus de diverses études épidémiologiques afin de quantifier l'influence respective de la susceptibilité génétique et de l'exposition à des facteurs environnementaux tels que les allergènes, la fumée de tabac, et autres. Les données épidémiologiques liant l'environnement rural à une protection contre l'asthme sont très nombreuses et le projet GABRIEL s'est aussi donné pour but de rechercher de nouveaux déterminants de l'asthme chez les enfants de populations rurales en portant un intérêt particulier à l'identification des micro-organismes et des autres facteurs susceptibles de conférer une protection contre l'asthme dans les environnements ruraux. La connaissance de ces mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles pistes pour la mise en place de méthodes efficaces de prévention de l'asthme et des maladies allergiques chez les enfants.

C/ Projet GABRIEL-A

Le projet Gabriel comprend un volet intitulé GABRIEL-A (pour Advanced studies) destiné à étudier l'environnement dans lequel évoluent des enfants asthmatiques, atopiques et témoins vivant en milieu rural. Ce volet doit permettre d'identifier l'impact sur l'asthme et l'atopie de différents facteurs environnementaux tels que le régime alimentaire des enfants, la consommation de lait cru, la survenue d'infections durant la petite enfance et l'exposition à la fumée de cigarette, à la pollution de l'air en éléments chimiques, à des animaux domestiques, à la poussière de maison et à ses composants microbiens et allergéniques.

Cette thèse sera composée en trois parties. La première traitera de la validation des stratégies de prélèvements de poussières aéroportées et d'analyses microbiologiques permettant d'effectuer un inventaire microbien de l'ambiance des fermes. La deuxième partie s'attachera à caractériser les transports microbiens entre les étables, les salles de traite, le lait et l'ambiance des chambres où vivent les enfants. La troisième partie aura pour but d'identifier un éventuel lien entre l'exposition aux micro-organismes dans les fermes et dans des logements ruraux non fermiers et la survenue de symptômes atopiques ou asthmatiques chez les enfants. Les prélèvements environnementaux correspondant aux fermes franc-comtoises et l'ensemble des études microbiologiques présentées ici ont été réalisés dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie de la faculté de médecine de Besançon (Unité de recherche SERF EA 2276 jusqu'en 2007 puis dans l'UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement depuis 2008). Les prélèvements environnementaux correspondant aux autres fermes allemandes, les études cliniques et les analyses statistiques ont été réalisées par les autres équipes de recherche impliquées dans le projet GABRIEL (www.gabriel-fp6.org).

MATERIEL
&
METHODES

Les différents projets sur lesquels est basé le travail de cette thèse ont pour but de répondre à plusieurs problématiques allant de la validation des techniques à la mise en évidence de flux microbiens dans les fermes (figure 1).

A/ population de l'étude et prélèvements analysés au laboratoire

1/ Projet AgriSanté

a/ population

Les prélèvements de l'étude AgriSanté ont tous été réalisés entre Février 2006 et Mai 2008. Seize fermes franc-comtoises ont été sélectionnées en fonction de leur système de traite, et de leur appartenance à l'AOC Comté. Pour dix d'entre elles, les enfants avaient participé à l'étude PASTURE (Protection against Allergy : STUdy in Rural Environments). Les fermes étaient situées entre 46°35'04" et 47°21'09" Nord et entre 5°29'55" et 6°43'04" Est, entre 200 et 880 mètres d'altitude. Sur les seize fermes, neuf correspondaient à des stabulations libres et sept à des étables entravées. Dans les stabulations libres, les vaches sont totalement libres de leurs mouvements dans l'étable (figure 2) et sont dirigées vers la salle de traite (figure 3) deux fois par jour pour être traitées. L'étable est plus vaste et plus aérée et les troupeaux sont souvent plus gros que dans le cas d'une étable entravée. Dans les étables entravées, les vaches sont attachées à une place fixe durant toute la saison hivernale (figure 4) et la trayeuse se déplace entre elles pour la traite (figure 5).

Un questionnaire sur les habitudes et les mesures prises par l'agriculteur dans l'étable et pendant la traite ainsi que sur les caractéristiques de l'étable (nombre de vaches, heures de travail, taille du bâtiment) et de l'installation à été rempli par des membres des chambres départementales d'agriculture du Doubs et du Jura (annexe 1)

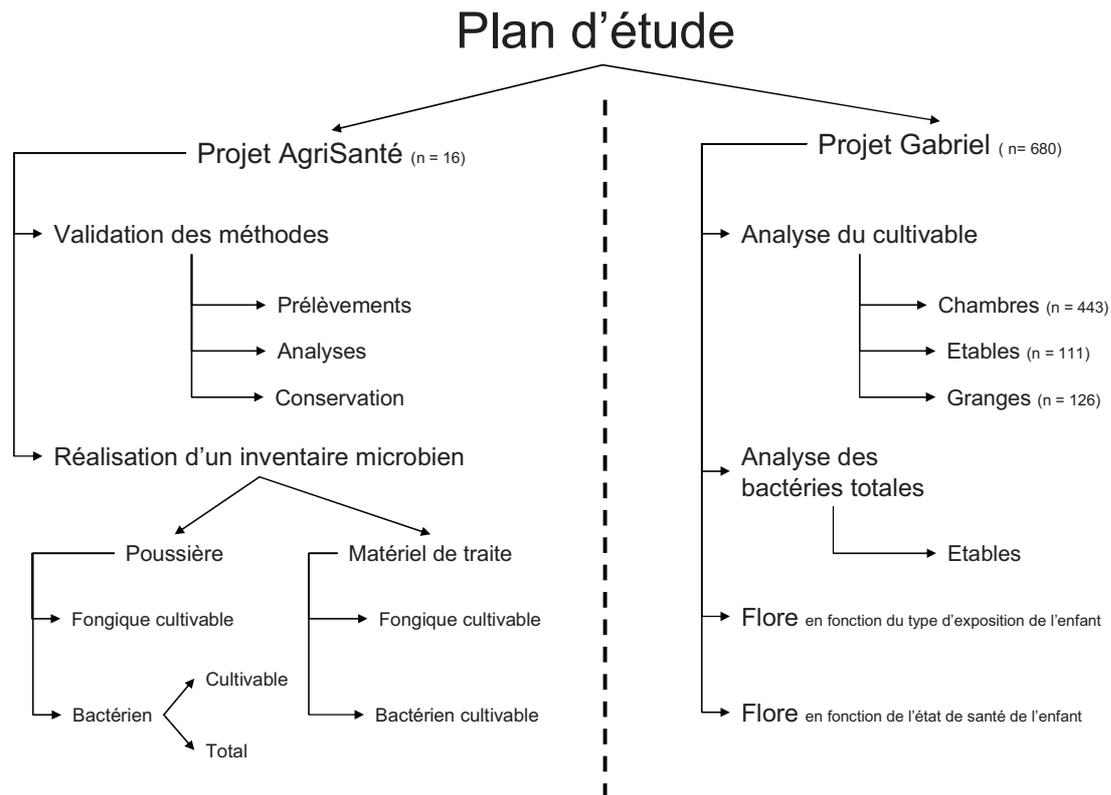


Figure 1 : projets d'étude et problématique abordée



Figure 2 : stabulation libre, nourrissage des animaux



Figure 3 : stabulation libre, salle de traite



Figure 4 : étable entravée, disposition du bétail



Figure 5 : étable entravée, traite des animaux

b/ prélèvements

Un minimum de 9 prélèvements par ferme a été effectué pour les besoins de l'étude, tant pour apporter des réponses à la problématique de l'allergie qu'à celle des micro-organismes du lait. Dans un premier temps, entre 2 et 4 prélèvements d'air par ferme ont été réalisés sur le principe de l'impaction active (avec un flux de 3 litres par minute) des particules de l'air à l'aide d'une pompe GilAir3 (Sensidyne, Clearwater, USA) sur laquelle était montée une cassette en plastique (37 mm; Sensidyne, Clearwater, U.S.A) contenant un filtre Teflon® (pores de 0.45 microns de diamètre - Millipore Sensidyne, Clearwater, U.S.A). Le matériel était fixé sur un trépied (fait maison) de 75 centimètres de hauteur et placé au centre de l'étable (figure 6).

- un prélèvement d'air de l'étable avant nourrissage, pendant 20 minutes ;
- un prélèvement d'air de l'étable après nourrissage, pendant 20 minutes ;
- un prélèvement d'air pendant la traite, durant 20 minutes, pour les étables possédant une salle de traite.

Ensuite, des prélèvements de diverses sources microbiennes ont été réalisés :

- un prélèvement de toute nourriture distribuée avant et après la traite. Ce prélèvement a été réalisé avec des gants pour prévenir le transfert de micro-organismes des mains du préleveur à l'échantillon. Il a été conservé dans un bocal en plastique stérile d'une contenance de 200ml (figure 7);
- un prélèvement de poussière sédimentée prélevée à l'aide d'une spatule propre, sur des fenêtres ou sur les barres d'attache des vaches. Il a été conservé dans un bocal en plastique stérile d'une contenance de 100 ml (figure 8);
- un prélèvement de poussière sédimentée récoltée pendant un mois dans une boîte en plastique fixée dans l'étable hors d'atteinte du bétail (figures 9 et 10);
- Des prélèvements de poussière sédimentée sur une lingette stérile déposée dans une boîte en plastique dans l'étable, à côté de la précédente boîte en plastique, pendant quinze jours.



Figure 6 : dispositif de prélèvement de poussière aéroportée



Figure 7 : prélèvement de foin



Figure 8 : prélèvement de la poussière sédimentée à l'aide d'une spatule



Figure 9 : boîte de récolte de poussière



Figure 10 : positionnement de la boîte de récolte de poussière dans l'étable



Figure 11 : prélèvement de la surface de trayons

Des prélèvements en relation directe avec les contaminants du lait ont été réalisés :

- Des prélèvements de surface de trayon de dix vaches, effectués avec des lingettes stériles imprégnées de Tween 80 dilué, entre le lavage habituel du trayon par l'agriculteur et la traite (figure 11). Pour des raisons d'hygiène, les prélèvements de surface de trayons ont été réalisés avec des gants, et les lingettes ont été groupées dans un sac en plastique stérile fermé hermétiquement une fois les prélèvements effectués.
- Des prélèvements de lait dans le tank à la fin de la traite, réalisés à l'aide d'une seringue stérile de 50 ml, une fois la température du tank stabilisée à la température habituelle de conservation (température variant entre 4 et 12°C d'une ferme à une autre)

Enfin, des prélèvements réalisés à l'aide d'écouvillons stériles sur le matériel de traite à différents niveaux entre l'animal et le tank à lait (figure 12):

- Un écouvillon de la partie métallique de deux des quatre manchons, parties de la machine à traite qui est contact avec l'animal pendant la traite.
- Un écouvillon de deux sorties de lait, parties situées entre les manchons et le gobelet à lait.
- Un écouvillon de l'arrivée d'air, partie caoutchouteuse entre le pipeline et le système de distribution d'air pour chaque machine à traite.
- Un écouvillon de l'intérieur du gobelet à lait, partie dans laquelle se rencontrent le lait et l'air servant à l'acheminement du lait jusqu'au tank.
- Un écouvillon de l'arrivée de lait dans le tank.
- Un écouvillon de surface du tank.
- Enfin, un prélèvement de l'eau résiduelle stagnante dans le tank, principalement au niveau de l'évacuation du tank.

Les prélèvements sur le matériel de traite ont été effectués après son lavage et avant la traite.

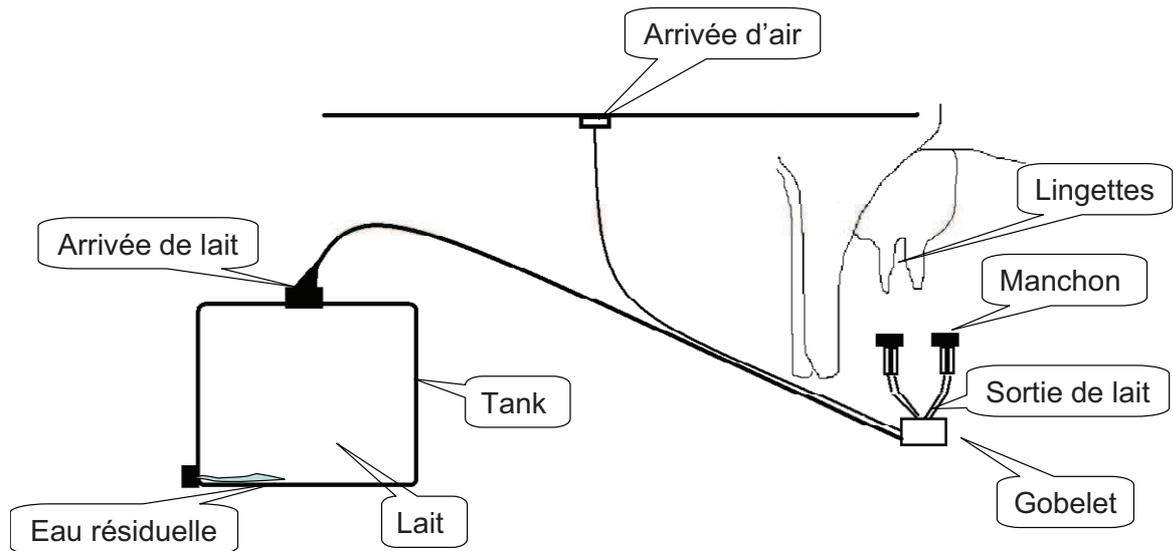


Figure 12 : schéma du matériel de traite et des différents prélèvements effectués

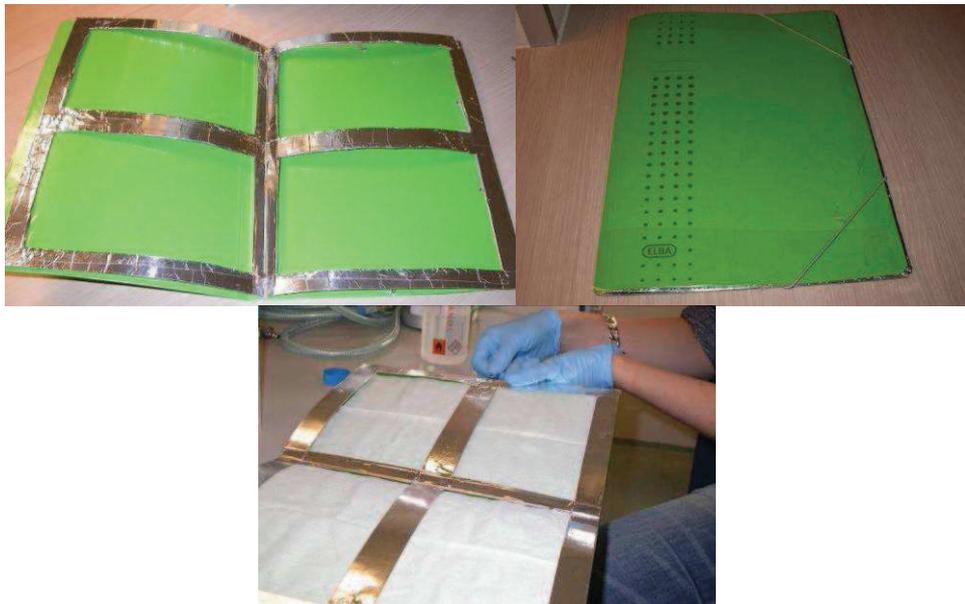


Figure 13 : dispositif de récolte de la poussière sédimentée sur des lingettes
(photos fournies par l'institut d'évaluation des risques de l'université d'Utrecht aux Pays-Bas, service d'épidémiologie environnementale)

3/ Projet GABRIEL

a/ population

Phase 1 : Un total de 39.983 questionnaires a été distribué dans les cinq centres d'étude et 34.491 ont été complétés et renvoyés (tableau I).

Phase 2 : Sur les 2573 enfants sélectionnés au hasard en Bavière, 2317 ont accepté de participer à l'examen physique et aux tests environnementaux. Pour 1914 participants, les données physiques et les poussières de matelas sont disponibles.

Phase 3 : 895 enfants pour lesquels toutes les données sont disponibles ont été choisis de manière stratifiée selon le statut clinique pour participer à la troisième phase de l'étude : la phase d'étude environnementale approfondie.

Les questionnaires accompagnant chacune des 3 phases comportaient des questions de plus en plus précises sur les habitudes des enfants et de leur famille (annexes 2, 3 et 4). Ainsi, le questionnaire concernant la phase II comporte des questions sur la petite enfance de l'enfant participant à l'étude (poids à la naissance, alimentation lors des premiers mois, contact avec d'autres enfants à la crèche...), des questions sur sa santé (bruits de sifflements, rhumes, hospitalisations...), sur ses contacts avec une ferme (lors de vacances, contacts alors que la mère était enceinte, présence d'animaux lors des contacts...), sur les contacts réguliers avec les animaux (chiens, vaches, moutons, cochons, volaille, chevaux...), sur les activités auxquelles l'enfant participe dans la ferme (traite, nourrissage des différents animaux, affouragement...), sur la consommation de lait (de l'étable, du commerce...), sur l'alimentation de l'enfant en général (jus de fruit, produits frais, lavage des mains avant le repas...), sur l'environnement général de l'enfant (circulation de véhicules, type de chauffage, présence d'animaux dans la chambre, comportement des parents induit par des allergies dans la famille...), sur son bien-être actuel (état de santé, état mental, relations avec les membres de la famille...), sur les pratiques sportives (fréquence, type...) et enfin, des questions sur le comportement de la mère pendant la grossesse. Pour la phase III, chacun des dispositifs de récolte de la poussière était accompagné par un questionnaire assez court dans lequel des questions étaient posées sur l'âge du bâtiment, ce que l'on y trouve (fourrages, animaux...), la position du dispositif dans la pièce... Un questionnaire accompagnait également le prélèvement de lait réalisé lors de la phase III, insistant particulièrement sur ses conditions de stockage et sa provenance.

Tableau I : population de l'étude GABRIEL

Phase de l'étude	Région géographique concernée	Population concernée	Effectifs totaux	Effectifs Fermiers	Effectifs Exposés	Effectifs Contrôlés
Phase I ↓	4 centres (Autriche, Allemagne (Baden-Wuerttemberg et Bavière) et Suisse)	Population générale	n = 34 491 ^a	n = 4 533	n = 8 666	n = 21 292
Phase III	Bavière	Sous-échantillon stratifié selon l'exposition et l'état de santé Spirométrie Echantillonnage de poussière	n = 895 ^d n = 711 ^e n = 444 ^f	n = 298 n = 233 n = 145	n = 300 n = 242 n = 149	n = 297 n = 259 n = 150

Légende : ^a = nombre de questionnaires remplis et de consentements à la poursuite de l'étude (11 183 en Bavière);

^b = sélection aléatoire en fonction des strates d'exposition, pour les questionnaires détaillés et les examens physiques ;

^c = participation aux prélèvements sanguins et analyse spécifique des IgE ;

^d = sélection aléatoire à partir d'un effectif de 2 573 enfants bavarois, des strates d'exposition et de santé de la Phase II, pour les études environnementales ;

^e = participation aux tests de spirométrie et résultats satisfaisants ;

^f = sélection aléatoire pour les analyses de poussière.

b/ prélèvements environnementaux

Presque toutes les familles d'agriculteurs participant à la phase III de l'étude ont renvoyé les lingettes électrostatiques du logement et de la ferme, identiques à celles utilisées dans le projet AgriSanté, mais déposées sur un support de pochette plastifiée. Ce système a été mis en place afin que les agriculteurs pouvaient envoyer les prélèvements par courrier au bout de quinze jours, sans avoir à les toucher (figure 13). Ces lingettes ont été placées dans trois endroits différents : dans la chambre de l'enfant (dans tous les cas), dans l'étable et dans la grange (pour les enfants fermiers).

B/ Premiers traitements

1/ Mise en suspension des micro-organismes

a/ à partir des filtres

La mise en suspension du matériel déposé sur le filtre a été réalisée par rinçage de la cassette et du filtre avec 6 mL d'une solution de Tween 80 dilué à 0,1% dans du sérum physiologique, et par brassage de la cassette au vortex pendant 30 secondes. La cassette était ensuite ouverte, le filtre transféré avec la solution de rinçage dans un sac stérile pour appareil Stomacher[®] (AES laboratoire, Combourg, France), la cassette lavée avec 4 mL de la solution de Tween diluée et le liquide transféré dans le sac stomacher. Le sac stérile contenant le filtre et 10mL de solution de Tween dilué était ensuite brassé pendant 10 minutes dans un Stomacher[®] afin de détacher les micro-organismes du filtre. Enfin, le liquide contenu dans le sac Stomacher[®] était transféré dans un tube stérile (figure 14).

b/ nourriture

Cinq grammes de foin, de paille et des substrats d'alimentation ont été prélevés de l'échantillon global et transférés dans un sac stérile pour Stomacher[®] avec 80mL de Tween 80 à 0,1%. Le sac a ensuite été brassé pendant six minutes dans le Stomacher[®] et le liquide a été transféré dans un tube stérile (figure 15).

c/ poussière sédimentée (récoltée avec une spatule ou dans une boîte)

La poussière contenue dans les boîtes en plastique a été recueillie à l'aide d'un pinceau et transférée dans un pot stérile conservé à température ambiante.

0,3 grammes de poussière ont été prélevés et vortexés pendant une minute avec 20 mL de solution Tween 80 à 0.1%.

d/ poussière sédimentée sur des lingettes électrostatiques

Les lingettes de poussière ont été transférées stérilement, dans un sac Stomacher[®] stérile, avec une pince (figure 16). Si la lingette était pliée, l'ouverture du pliage était dirigée vers le bas de sorte que les particules de poussières tombaient plus facilement au fond du sac. 20mL de Tween 80 à 0,1% ont ensuite été ajoutés dans le sac et le tout a été brassé pendant dix minutes dans le Stomacher[®]. Le liquide a enfin été transféré dans un tube stérile.

f/ surface de trayons

Pour l'analyse des lingettes, 100mL de Tween 20 à 0,1% additionné de poudre de lait G (laboratoires Standa, Caen, France) à 0.5% (préparé extemporanément) sont ajoutés dans le sac contenant les lingettes et celui-ci est passé au Stomacher[®] pendant une minute (9, 186).

g/ lait

Les prélèvements de lait de l'étude AgriSanté ont été analysés dès leur arrivée au laboratoire, sous deux formes : une solution pure et une solution diluée au dixième dans de l'eau stérile.



Lavage de la cassette avec la solution



Transfert de la solution de lavage dans un sac stérile



Second rinçage de la cassette et transfert du liquide



Transfert du filtre dans le sac stérile



Décollement des micro-organismes par stomachage



Transfert de la solution de lavage dans des cryotubes

Figure 14 : traitement des filtres d'air dans le laboratoire



Mise en suspension des substrats d'alimentation



Décollement des micro-organismes par stomachage

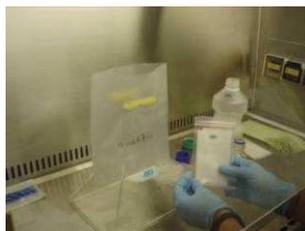


Transfert du liquide de lavage dans des tubes

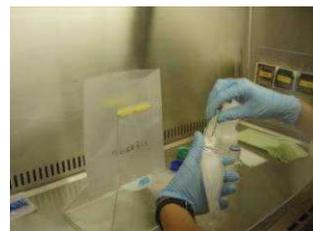
Figure 15 : traitement des prélèvements de nourriture dans le laboratoire



Préparation du sac stérile sous une hotte



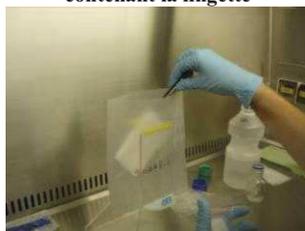
Prise en main du sac contenant la lingette



Sortie de la lingette du sac avec une pince stérile



Transfert de la lingette dans le sac stérile



Disposition ouverture vers le bas



Ajout de 20 mL de Tween 80

Figure 16 : traitement des lingettes de poussière sédimentée dans le laboratoire

2/ Culture

Les divers prélèvements ainsi traités ont ensuite été ensemencés sur différents milieux de culture (figure 17 et tableau II).

a/ milieux de culture fongique

Deux milieux fongiques, choisis d'après des études réalisées antérieurement au laboratoire (234, 243, 244), ont été utilisés pour cultiver les différents champignons de l'environnement.

α/ DG18

La gélose au Dichloran-Glycérol (DG18) est un milieu qui est recommandé pour l'identification et le dénombrement des levures et des moisissures se développant sur un milieu à faible activité en eau. Ce milieu permet de diminuer la taille des thalles de moisissures et des colonies de levure afin de faciliter leur comptage.

Le milieu Dichloran-Glycérol (Oxoid LTD, Basingstoke, England) a été incubé à 30°C pour l'identification des moisissures en général. Après une semaine d'incubation, des espèces fongiques comme *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, mais également des levures ont pu être cultivées sur ce milieu (figure 18).

β/ Malt sel

Le milieu Agar à l'extrait de malt est un milieu qui est utilisé pour la mise en évidence, l'isolement et la numération des levures et des moisissures. En milieu acide, l'extrait de malt, riche en glucides, apporte tous les éléments nutritifs nécessaires au métabolisme des levures et des moisissures et l'acidité du milieu inhibe le développement de la plupart des germes contaminants.

Ce milieu, utilisé avec un ajout de sel à température ambiante pendant sept jours, permet la croissance des espèces fongiques osmophiles comme les différentes espèces d'*Aspergillus* (figure 19).

b/ milieux de culture bactériens

Compte tenu de la diversité des bactéries environnementales, un nombre important de milieux a été utilisé pour permettre la croissance d'une grande quantité d'espèces bactériennes. Deux de ces milieux ont été utilisés au long des trois études pour tous les prélèvements. Il s'agit des

milieux R8 et Difco. D'autres milieux bactériens ont été utilisés pour certaines parties de ce travail. Il s'agit des milieux Mueller-Hinton, Drigalski, Slanetz, Chromagar Orientation, MRS, SLAC, FH et ME.

α/ Mueller-Hinton

La gélose Mueller-Hinton est une gélose riche qui permet la culture de nombreuses bactéries pathogènes et environnementales. Nous l'avons incubée à température ambiante (20°C) pour favoriser la croissance des bactéries environnementales et avons effectué la lecture au bout de six jours d'incubation pour les échantillons appartenant à l'étude AgriSanté (figure 20).

β/ Drigalski

Le milieu Drigalski est un milieu sélectif permettant l'isolement des bactéries Gram négatif non exigeantes. Il est souvent utilisé pour l'isolement de germes urinaires et pour les coprocultures. Il contient deux inhibiteurs de la flore Gram positif : le désoxycholate de sodium et le cristal violet. Sa composition permet également de sélectionner les bactéries qui métabolisent le lactose. Les colonies qui apparaissent jaunes sont des colonies lactose⁺ et les bleues sont lactose⁻. L'incubation a été réalisée pendant 48 heures à 30°C pour les échantillons du premier hiver du projet AgriSanté (figure 21).

γ/ Slanetz

C'est un milieu de dénombrement des entérocoques en microbiologie alimentaire. Habituellement, son emploi est réservé aux eaux après filtration. Il contient un inhibiteur des bactéries Gram négatif, l'azide de sodium, qui sélectionne les streptocoques, et le TTC (chlorure de 2-3-5 triphényl-tétrazolium), lors de sa réduction, donne une coloration rouge aux bactéries. Sur ce milieu, après une incubation de 48 heures à 42°C, les entérocoques donnent des colonies de taille moyenne, roses ou rouges. Certains *Bacillus* peuvent pousser et donner le même aspect de colonies mais de taille plus importante. Nous avons utilisé ce milieu pour les échantillons du premier hiver du projet AgriSanté (figure 22).

δ/ CHROMagar Orientation

Le milieu CHROMagar TM Orientation est un milieu utilisé en routine hospitalière pour la détection et la différenciation des pathogènes du tractus urinaire, que ce soient des bactéries Gram négatif ou Gram positif. C'est un milieu chromogène que nous avons testé sur les

bactéries non pathogènes en partenariat avec le groupe CHROMagar. La cible majeure de ce milieu est donc la détection de pathogènes mais son application peut être étendue à l'isolation de nombreux micro-organismes puisque c'est un milieu considéré comme nutritif. Il présente une large palette de couleurs (rouge, bleu turquoise, bleu métallique, brun, crème, translucide, doré, opaque, rose, avec un halo de couleur, ...), en fonction de la réaction enzymatique mise en œuvre par la bactérie, qui élargit le spectre de différenciation des espèces bactériennes. Il peut être additionné d'antibiotiques ou, dans notre cas, d'antifongiques, puisque les prélèvements environnementaux sont concentrés en espèces fongiques qui peuvent également se développer, faiblement, sur ce milieu. L'incubation s'est faite à température ambiante pendant six jours (figure 23).

ε/ R8

Le milieu R8 est un milieu mis en place en 1989 par W. Amner du département de Génétique et de Microbiologie de l'université de Liverpool au Royaume-Uni. Ce milieu a été développé pour l'isolement et la numération des actinomycètes thermophiles, comme par exemple *Saccharomonospora viridis*, pour lequel il a été mis en place mais aussi pour *Thermoactinomyces spp.* ou *Saccharopolyspora rectivirgula* (figure 24), à 52°C pendant sept jours.

ζ/ Difco

Le milieu Difco Actinomyces Isolation Agar est utilisé pour la culture et la conservation d'actinomycètes du sol, de la poussière et de l'eau. L'incubation se fait à 30°C pendant sept jours. Les colonies qui s'y développent ont un aspect sec plus ou moins étalé et de couleur blanche à jaune-orange (figure 25).



Dépôt de solution de lavage sur une boîte de culture



Ensemencement par étalement en conditions stériles

Figure 17 : ensemencement des différents milieux de culture

<i>Etudes</i>									
<i>AgriSanté</i>							<i>GABRIEL</i>		
<i>Prélèvements</i>									
Poussière sédimentée	Poussière aéroportée	Lait	Trayons	Foin	Nourriture	Matériel de traite	Lingette chambre	Lingette étable	Lingette grange
spatule	avant travail			du jour	farine	écouvillons			
lingette	après travail			du mois	tourteaux	de surface			
boîte	salle de traite				céréales	divers			
	chambre				paille				
					autres				
<i>Milieux de culture</i>									
R8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Difco	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DG18	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Malt + sel	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mueller-Hinton	x	x	x	x	x	x	x		
Drigalski	x	x	x	x	x	x			
Slanetz	x	x	x	x					
MRS	x	x	x	x					
SLAC	x	x	x	x					
FH	x	x	x	x					
CHROMagar Orientation							x	x	x
<i>Identification par biologie moléculaire</i>									
Coloration de Gram	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PCR 16S d'après culture	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Clonage des ADN bactériens	x							x	

Tableau II : récapitulatif des prélèvements disponibles et des milieux utilisés pour l'analyse de chacun d'eux.

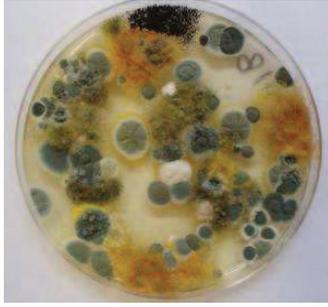


Figure 18 : culture sur milieu DG18

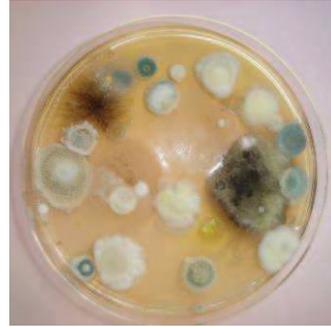


Figure 19 : culture sur milieu Malt sel

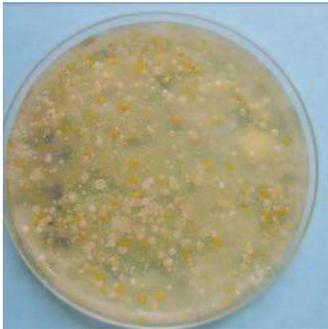


Figure 20 : culture sur milieu Mueller-Hinton



Figure 21 : isolement sur milieu drigalski

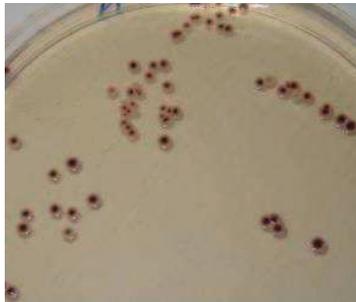


Figure 22 : culture sur milieu Slanetz

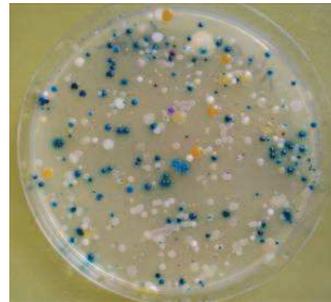


Figure 23 : culture sur milieu CHROMagar Orientation



Figure 24 : culture sur milieu R8



Figure 25 : culture sur milieu Difco

η/ milieux pour la flore d'intérêt dans la fabrication des fromages

Pour la croissance des bactéries lactiques et des bactéries propioniques acides, l'ensemencement a été réalisé à l'aide d'un spiral plateur (DS model, Interscience, France) après une étape d'enrichissement pour les échantillons autres que le lait. Un bouillon Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco) a été utilisé pour l'enrichissement des lactoBacilles thermophiles et du lait stérile (Lait G, laboratoires Standa, Caen, France) a été utilisé pour la croissance de lactoBacilles hétérofermentaires facultatifs. Ces deux solutions ont été incubées pendant deux jours respectivement à 45°C et 30°C. Un bouillon YEL a été utilisé pour l'enrichissement en bactéries propioniques acides et incubé pendant 2 jours à 30°C. Trois milieux de culture solides ont été utilisés pour la croissance de bactéries connues pour avoir la faculté de se développer dans le lait : i) le milieu MRS pour l'isolation des lactoBacilles thermophiles présumés, après incubation pendant 72 heures à 45°C sous des conditions anaérobies générées par un système Merck Anaerocult[®], ii) un milieu SLAC agar selon Drinan (90), après incubation à 30°C pendant 6 jours pour la croissance des bactéries propioniques, et iii) un milieu FH ("Facultativ Heterofermentativen Laktobazillen") selon Isolini (142) additionné de 40g/l d'acide nalidixique pour l'isolation des lactoBacilles hétérofermentaires après une incubation de 72 heures à 38°C sous des conditions anaérobies. Une quinzaine de bactéries susceptibles de se développer dans le lait ont été prélevées au hasard pour chaque prélèvement et pour chaque milieu de culture et ont été purifiées sur milieu MRS ou sur un milieu YEL. Tous les isolats ont été observés microscopiquement. La croissance à 15°C et la production de gaz à partir de D-gluconate ont été vérifiées pour les lactoBacilles mésophiles et pour les lactoBacilles hétérofermentaires facultatifs. L'ADN total a été extrait à partir de 1,5 mL de solution fraîche MRS ou YEL en phase exponentielle de croissance, par la méthode décrite par Godon (116) avec une lyse cellulaire réalisée par traitement au four à micro-ondes. Des amorces genre-spécifique pour *Lactobacillus* sp. et *Propionibacterium* sp. et des amorces espèce-spécifiques pour *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* ssp., *P. jensenii*, *P. freudenreichii* ssp. et *P. acidipropionici* ont été utilisées comme décrit précédemment (64, 70, 92, 285). Les souches qui n'ont pas pu être identifiées par ces méthodes l'ont été par PCR d'ADNr 16S et séquençage.

c/ dilutions utilisées pour l'ensemencement des différents milieux

Différentes dilutions ont été utilisées en fonction du type d'échantillon étudié et du milieu de culture considéré. Le tableau III regroupe les différents milieux ainsi que les divers prélèvements et indique à quelles dilutions les solutions de lavage ont été analysées.

volume déposé	Air				Poussières			Produits		Nourritures									
	250 µL				100 µL			100 µL		100 µL									
	Avant travail	Après travail	Chambre	Salle de traite	Spatule	Boîte	Lingette	Lingette	Trayon	Lait	Foin du jour	Foin du mois	Paille du jour	Paille du mois	Céréales	Farine	Regain du mois	Son	Granulés
DG18		pur			1/100 1/1000	1/100 1/1000		pur 1/10	pur						pur 1/10				
Ma It+sel		pur			1/100 1/1000	1/10 1/100		pur 1/10	pur						pur 1/10				
Mueller-Hinton		pur			1/100 1/1000 1/10000	pur 1/10 1/100		pur 1/10 1/100	pur 1/10						1/100 1/1000				
Driga lski		pur			pur 1/10	/		pur 1/10 1/100	pur 1/10						pur 1/10				
Sla netz		pur			pur 1/10	/		pur 1/10 1/100	pur 1/10						pur 1/10				
CHROMagar Orientation		/			1/1000 1/10000	pur 1/10 1/100		/						/					
R8		pur			1/10 1/100	1/10		pur 1/10	pur						pur				
Di fco		pur			1/10 1/100	1/10		pur 1/10	pur						pur				

Tableau III : tableau des dilutions pour les différents prélèvements et milieux de culture

C/ Identification des espèces fongiques et des actinomycètes

L'analyse des espèces fongiques et des actinomycètes se fait par identification macroscopique et un comptage des colonies après sept jours d'incubation, suivis, si nécessaire, par une confirmation microscopique.

L'identification des espèces fongiques repose sur des critères morphologiques qui accordent une grande importance à l'aspect macroscopique (aspect, couleur,...), et à l'aspect microscopique [morphologie et ontogénie des spores (conidiogénèse : aspect, couleur et structure des conidiophores)].

1/ critères macroscopiques (236)

Une première lecture est faite à J7 pour identifier, et/ou repiquer certaines colonies pour obtenir une culture pure, et une lecture complémentaire à J14 permet d'identifier les colonies à croissance lente, ou que l'on n'aurait pas pu identifier à J7.

Pour identifier les différentes espèces fongiques, il faut tout d'abord décrire l'aspect macroscopique de la culture :

- le recto : couleur, aspect (cotonneuse, poudreuse, velouteuse, plane, cratériforme...),
- le verso : couleur, existence de crêtes, présence de pigments qui diffusent dans la gélose.

De nombreuses colonies fongiques sont ainsi différenciables grâce à leur aspect macroscopique (figure 26) mais dans plusieurs cas, une identification microscopique sera nécessaire.

Ainsi, entre autres, les petites colonies levuriformes se développant sur Malt salé orientent vers une identification de *Wallemia sebi* (brune), d'*Aureobasidium sp.* (rose), de *Blastobotrys nivea* (blanc) ou d'*Acremonium sp.* (blanc à rouge).

Les colonies extensives broussailleuses peuvent appartenir aux espèces *Absidia corymbifera*, *Absidia cylindrospora*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Syncephalastrum racemosum*, *Botrytis cinerea* et il faudra procéder à une confirmation microscopique.

Les colonies extensives, parfois zonées sont généralement du genre *Trichoderma*.

Les champignons appartenant au genre *Eurotium* (*amstelodami*, *herbariorum*, *umbrosum*...) et à sa forme asexuée, *Aspergillus glaucus* auront un aspect en forme de disque, feutré, à dominance jaune.

Le genre *Epicoccum* se présente sous la forme de colonies plutôt extensives, duveteuses, aux couleurs rouge orangé.

Les colonies feutrées plus ou moins veloutées sombres correspondront à des champignons des genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Stachybotrys*, et *Humicola*.

Scopulariopsis brevicaulis et *Scopulariopsis candida* apparaîtront sous la forme de colonies granuleuses beiges ou blanches.

Enfin, les colonies d'aspect duveteux et/ou cotonneux blanches sont les colonies les plus difficiles à identifier. Ce sont le plus souvent des mycéliums stériles non identifiables mais d'autres espèces fongiques peuvent avoir le même aspect macroscopique.

L'identification des actinomycètes se fait principalement par l'intermédiaire de critères macroscopiques, les espèces étant classées principalement en 2 groupes (actinomycètes thermophiles et actinomycètes mésophiles) en fonction du milieu de culture et de la température d'incubation.

2/ critères microscopiques (236)

Les éléments microscopiques des champignons permettent très souvent d'identifier les genres fongiques voire les espèces (figure 27).

Un intérêt particulier doit être porté aux arthrospores (spores nées de la désarticulation d'un filament au niveau des cloisons entre deux cellules), aux phialides (articles mycéliens fertiles en forme de bouteille formant successivement des conidies ou phialospores), aux conidies (spores de reproduction asexuée), aux sporanges (organes de fructification en forme de sac arrondi, caractéristique des Zygomycètes), aux cleistothèces (organes de reproduction sexuée des ascomycètes formés par une paroi dense sans ouverture), aux corémies (regroupement de plusieurs conidiophores (filaments spécialisés portant la spore ou l'organe de reproduction asexuée) en faisceau agglomérés en mèches qui fructifient à leur partie apicale), aux verticilles (regroupement de conidiophores et de phialides formant des bouquets) et aux ascospores (spore de reproduction sexuée formée dans un asque).

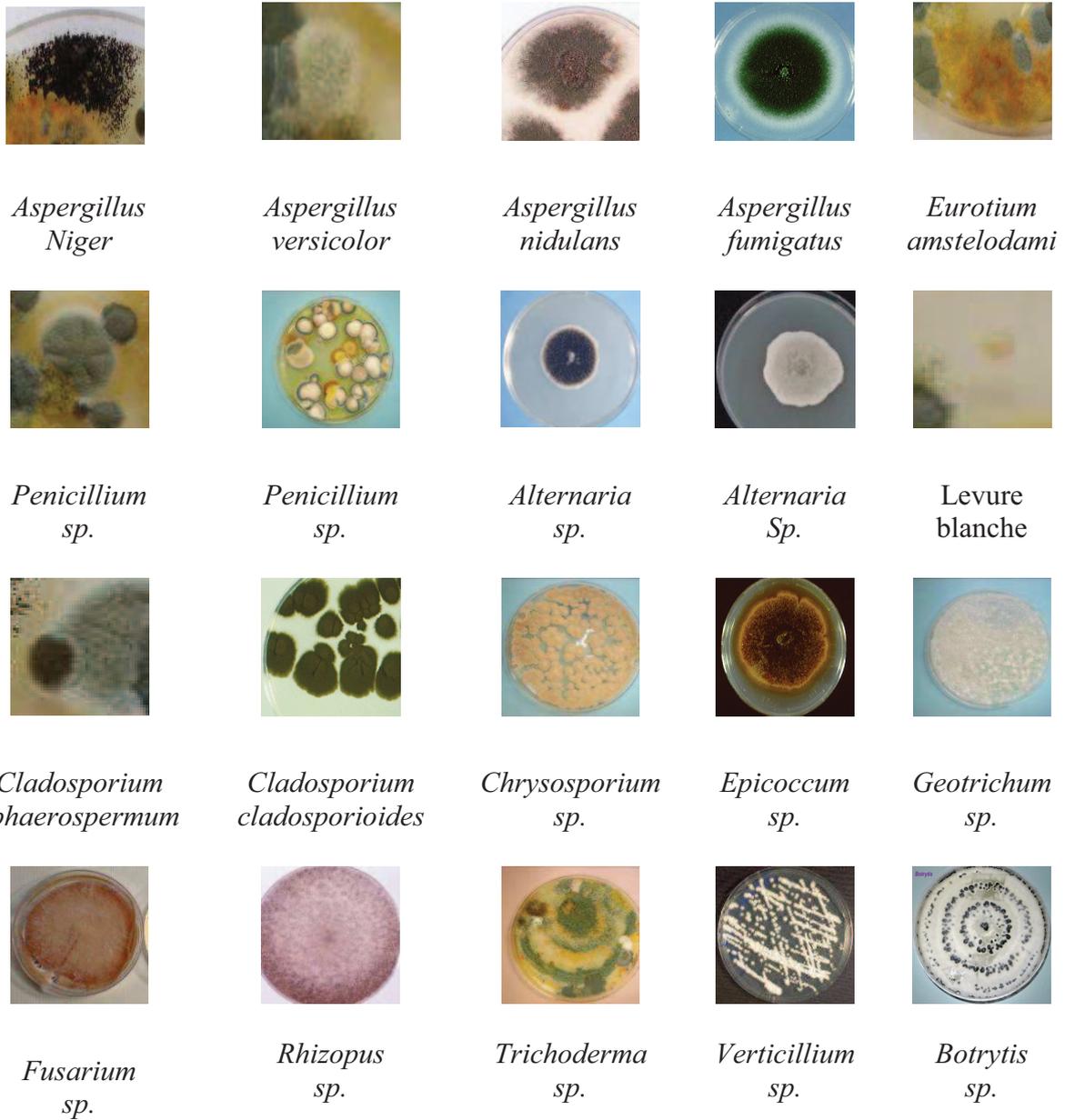


Figure 26 : identification macroscopique des principales espèces fongiques de l'environnement

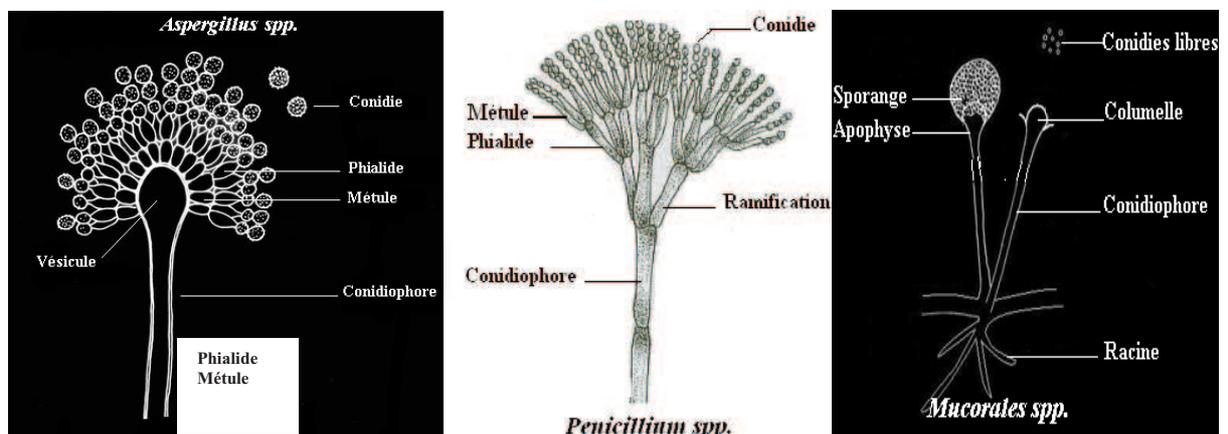


Figure 27 : morphologie microscopique des champignons

Par exemple (figure 28), les arthrospores de *Wallemia sebi* vont former des phialides à collerette, les conidies d'*Aureobasidium* sont lisses et en forme de pépins de courge fixés en petits bouquets, les phialides d'*Acremonium* sont simples ou ramifiées, émergent de corémies et produisent des conidies le plus souvent en agglomérat mais parfois en chaînes, quant aux conidies de *Blastobotrys nivea*, leur aspect lisse ou ovoïde et leur position terminale sur les filaments permettent leur identification.

Les spores d'*Absidia cylindrospora* sont cylindriques contrairement aux spores d'*Absidia corymbifera* qui sont polymorphes. L'enveloppe du sporange de *Mucor* se déchire facilement et s'affaisse tandis que celle de *Rhizopus* reste sous la forme d'un sac froissé. *Syncephalastrum racemosum* ressemble à une marguerite et *Botrytis cinerea* montre des arborescences massives.

Trichoderma sp. possède de nombreuses phialides courtes positionnées à angle droit sur un système de mycélium assez régulièrement ordonné et des conidies lisses ou verruqueuses.

Les espèces appartenant au genre *Eurotium* sont difficilement différenciables les unes des autres microscopiquement. Elles produisent à l'intérieur de cleistothèces, des asques, contenant huit ascospores. L'aspect de ces ascospores varie en fonction des espèces du genre.

Les conidies d'*Epicoccum nigrum* sont verruqueuses, brunes, pluricellulaires avec une cellule blanche à la base, mais sont difficiles à obtenir et à visualiser.

Les chaînes simples ou ramifiées de conidies à apex court naissant à l'extrémité des filaments correspondent à *Alternaria alternata* et celles à apex long à *Alternaria tenuissima*. Les conidies d'*Ulocladium* sont sans apex et se développent à partir des angles d'un conidiophore géciculé, de façon isolée ou rarement en courtes chaînes. *Stachybotrys chartarum* présente, à l'extrémité du filament, un rassemblement de phialides cylindriques en tulipe surmonté de conidies de tailles et de formes similaires aux phialides, légèrement plus claires et rugueuses. *Humicola grisea* produit de nombreuses conidies solitaires sphériques, lisses et à parois épaisses.

Scopulariopsis brevicaulis possède des chaînes d'annellospores sphériques à base tronquée, qui seront oblongues et lisses pour *Scopulariopsis candida*.

Enfin, les champignons des genres *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* et *Penicillium* possèdent des caractéristiques macroscopiques suffisantes pour leur identification au niveau du genre et parfois de l'espèce.

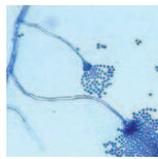
Le plus souvent, l'observation microscopique des moisissures se fait à l'aide d'un colorant, le bleu de lactophénol. Sinon, elle peut se faire simplement avec de l'eau distillée stérile.

Pour pouvoir compléter et/ou affirmer l'identification macroscopique, il faut procéder à un examen microscopique, le plus souvent réalisé par la technique du ruban adhésif ou technique du scotch :

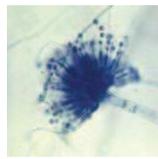
- une goutte de bleu de lactophénol est déposée sur une lame à microscope,
- un morceau de scotch, tenu à l'aide d'une pince métallique, est déposé sur la colonie que l'on veut identifier, en appuyant légèrement pour piéger les appareils sporifères.
- une fois la colonie transférée, le morceau de scotch est déposé sur la goutte de bleu de lactophénol (le scotch faisant office de lamelle)
- la préparation est observée à un grossissement x 200 puis x 400

Une autre technique permet de compléter l'identification, il s'agit de la technique par grattage. Une partie de la colonie est prélevée avec une lamelle, dissociée dans une goutte de bleu de lactophénol, elle-même déposée sur une lame de microscope. La préparation est observée entre lame et lamelle, à l'objectif x20, puis x40.

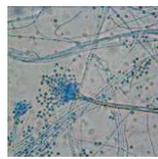
Pour toutes ces techniques d'identification, une fois la mise au point effectuée, il faut chercher s'il y a présence de spores (ou conidies) et leur mode de formation (tableau IV).



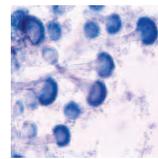
Aspergillus Niger



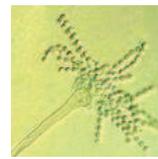
Aspergillus versicolor



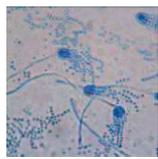
Aspergillus nidulans



Aspergillus fumigatus



Eurotium amstelodami



Penicillium monoverticillé



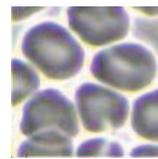
Penicillium triverticillé



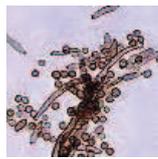
Alternaria Alternata



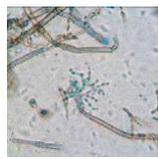
Alternaria tenuissima



Levure blanche



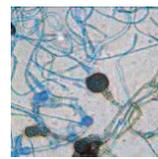
Cladosporium sphaerospermum



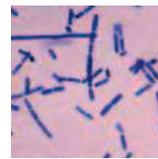
Cladosporium cladosporioides



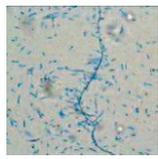
Chrysosporium sp.



Epicoccum sp.



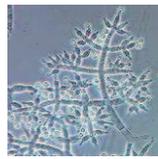
Geotrichum sp.



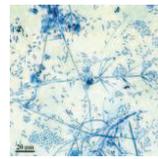
Fusarium sp.



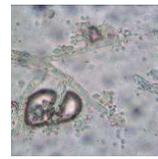
Rhizopus sp.



Trichoderma sp.



Verticillium sp.



Botrytis cinerea

Figure 28 : aspect microscopique des principaux champignons de l'environnement

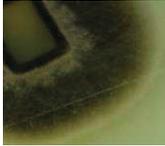
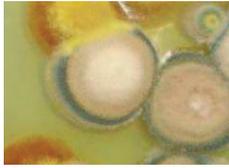
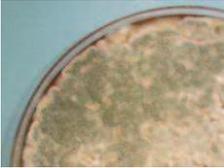
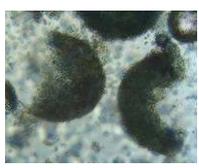
	Description macroscopique	Aspect sur milieu de culture	Description microscopique	Photo au microscope optique
<i>Cladosporium spp.</i>	Poudreux, velouté. Vert olive à brun noir. Revers brun noir.		Conidies de taille variable avec une cicatrice de bourgeonnement nette. Formation de chaînes plus ou moins divergentes.	
<i>Alternaria spp.</i>	De blanc gris à vert foncé noir, feutré. Revers sombre.		Conidies brunes muriformes, cloisonnées, avec un apex plus ou moins long, formant des chaînes.	
<i>Penicillium spp.</i>	Duveteux à velouté, couleur variable. Parfois pigment diffusible.		Phialides en verticilles (pinces) avec conidies rondes ou ovalaires, formant des chaînes désordonnées aux extrémités.	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Couleur variable, de jaune à vert.		Tête aspergillaire bisériée, radiée, présence de têtes primaires ressemblant à des pinces de Penicillium.	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Poudreux, vert sapin.		Tête bisériée en colonne.	
<i>Eurotium amstelodami</i>	Poudreuses, de couleur jaune.		Forme sexuée : cléistothèce jaune et ascospores. Forme asexuée : <i>A. glaucus</i> (tête aspergillaire radiée, unisériée, bleu-vert).	
<i>Absidia spp.</i>	Envahissante, cotonneuse, grise. Revers incolore.		Filaments larges, peu ou pas septés. Evasement au niveau de l'apophyse. Conidies rondes, lisses et jaunâtres.	
<i>Wallemia sebi</i>	Petites colonies marron bien délimitées.		Conidiophore se fragmentant en conidies cubiques, qui s'arrondissent en vieillissant.	

Tableau IV: caractéristiques macro et microscopiques des principaux genres fongiques

D/ Identification bactérienne

Il existe de nombreux milieux permettant d'identifier les bactéries pathogènes mais la diversité des bactéries dans l'environnement est telle qu'il n'existe pas actuellement de clé de détermination visuelle ou de galeries environnementales. Les quatre photos de la figure 29 montrent la difficulté de l'identification due à la diversité des phénotypes sur les différents milieux.

Dans un premier temps, nous avons donc réalisé un catalogue de phénotypes en fonction de la taille, de la forme, de la couleur et de l'aspect de chaque colonie bactérienne sur chaque milieu de culture et ensuite, nous avons réalisé une coloration de Gram qui nous a permis de classer tous ces phénotypes en quatre groupes : les bacilles à Gram positif, les bacilles à Gram négatif, les cocci à Gram positif et les cocci à Gram négatif.

1/ Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.

Pour sa réalisation, une colonie est délicatement prélevée puis déposée dans une goutte d'eau sur une lame en verre. Une fois l'eau évaporée, les bactéries sont fixées sur la lame par de l'alcool que l'on flambe. On procède ensuite à la coloration. Pour ce faire, quatre réactifs sont successivement utilisés et évacués.

Dans un premier temps, la préparation est recouverte pendant une minute de cristal violet (CML, Nemours, France), qui va se fixer sur les composants cytoplasmiques des bactéries, puis elle est rincée à l'eau déminéralisée.

Elle est ensuite recouverte de lugol (CML, Nemours, France), pendant une minute, qui aura pour rôle de fixer la coloration interne au cristal violet.

Après rinçage à l'eau déminéralisée, on procède à une décoloration rapide à l'alcool/acétone (CML, Nemours, France) pendant une dizaine de secondes. Lors de cette étape, le cytoplasme des bactéries qui seront dites Gram négatif sera décoloré : en effet, ces bactéries ayant une paroi pauvre en peptidoglycane (donc plus fine), cette dernière va laisser passer le mélange alcool-acétone qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle

est composée d'une couche de peptidoglycane plus importante (plus épaisse) et les bactéries resteront alors violettes.

Enfin, une contre-coloration à la safranine (CML, Nemours, France) est effectuée pendant une minute avant d'être abondamment rincée à l'eau déminéralisée. Cette nouvelle coloration a pour but de donner aux bactéries Gram négatif précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries Gram positif restées violettes resteront insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme (figure 30).

Cependant, cette technique informative sur les propriétés des parois des bactéries n'est pas suffisante pour permettre de réaliser un inventaire des bactéries retrouvées dans les différents milieux que nous avons testés. Nous avons donc ensuite préparé les échantillons pour d'autres manipulations.

2/ Extraction d'ADN

Une fois les différents phénotypes bactériens caractérisés pour un échantillon, chacun d'entre eux a été ré-isolé sur une nouvelle boîte de Pétri contenant le même milieu de culture que celui sur lequel la bactérie a été caractérisée, afin d'obtenir une culture pure de ce phénotype. Une petite quantité de cet isolat (environ de la taille d'un pépin de raisin) a été prélevée et mise en suspension par vortexage dans 200 microlitres d'eau distillée stérile, contenue dans un tube de 2mL. L'ADN de ces bactéries a été extrait par la méthode de boiling: les tubes ont été plongés pendant dix minutes dans de l'eau bouillante puis centrifugés pendant dix minutes à 12000 rpm afin de culotter les débris cellulaires. Le liquide clair contenant l'ADN en suspension après centrifugation est récupéré pour procéder à des identifications moléculaires.

3/ Conservation

Plusieurs banques de conservation ont été réalisées au long de ces trois études successives et sont représentées sur la figure 31.

La première est une conservation de ce que l'on peut appeler les solutions de lavage des échantillons. Chaque prélèvement a été conservé dans un cryotube étiqueté, à -20°C. C'est notre "banque de solution de lavage".

Une seconde banque est une banque de photos, après une semaine d'incubation à température ambiante, de tous les milieux de culture bactériens utilisés à partir du mois d'avril 2008 pour les cultures de poussières des projets AgriSanté et Gabriel. C'est la "photothèque de culture".

Une autre banque de conservation concerne les bactéries conservées en fonction de leurs phénotypes. Une fois la coloration de Gram effectuée, le ré-isolément réussi, en parallèle de l'extraction, une quantité de bactéries de la taille d'un pépin d'orange a été mise en suspension dans 1,5 mL de milieu liquide cœur-cerveille additionné de glycérol et conservé à -80°C. C'est notre "souchothèque".

Cette "souchothèque" a été associée à une banque de photos de chaque phénotype pur, ce qui permet de réaliser des comparaisons visuelles entre des phénotypes identiques dans la description mais décrits à plusieurs mois d'intervalle. C'est la "photothèque de phénotypes".

Une troisième et dernière "photothèque" a été réalisée et concerne les photos des colorations de Gram observées au microscope pour chaque souche pure. C'est la "photothèque de Gram".

Enfin, une banque contenant tous les ADN de chaque souche bactérienne isolée a été réalisée. C'est la "DNAtèque" dans le cadre des expériences impliquant la culture des bactéries de l'environnement et la "clonothèque" pour les expériences axées sur l'ADN total contenu dans les échantillons.

4/ Amplification de l'ARN 16S

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de biologie moléculaire qui s'est développée dans les années 1990. Elle a été publiée pour la première fois en 1986 par Kary Mullis (193) et n'a cessé depuis de se développer et de s'améliorer. C'est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre, une séquence d'ADN ou d'ARN ciblée, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Chaque cycle contient trois étapes : une étape de dénaturation qui consiste en la séparation des deux brins d'ADN, une étape d'hybridation de l'amorce sur la séquence cible de l'ADN, et une étape d'élongation pendant laquelle la *Taq polymérase* va synthétiser un brin complémentaire à celui qu'on lui a soumis, à partir de l'amorce hybridée (figure 32).



Figure 29 : illustration de la diversité bactérienne macroscopique



Bacille à Gram positif

Bacille à Gram positif (actinomycète)

Bacille à Gram négatif

Cocci à Gram positif

Cocci à Gram négatif

Figure 30 : colorations de Gram

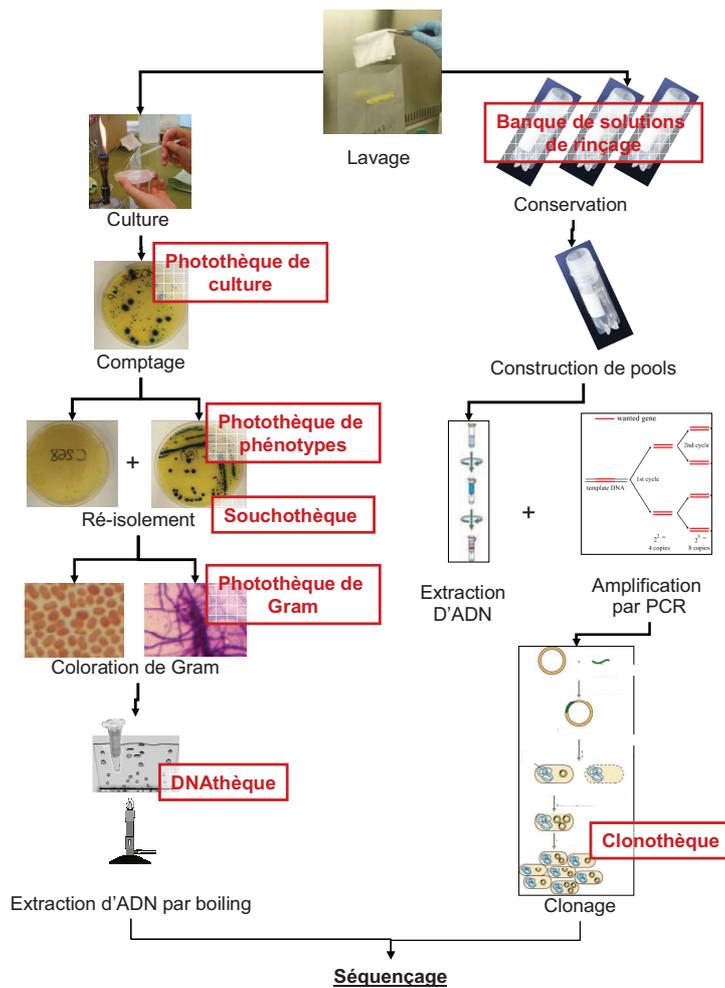


Figure 31 : cheminement des expériences et constitutions des banques de données

Les bactéries possèdent toutes un gène codant pour l'ARN 16S. Dans sa partie variable, la séquence de ce gène est spécifique de chaque espèce bactérienne.

Le protocole utilisé pour amplifier l'ARN 16S des bactéries est un mélange entre les protocoles de Weisburg (303) et de Paster (210), avec des variations au niveau des concentrations des réactifs.

Les amorces décrites par Weisburg ont été choisies pour l'amplification par PCR. Ainsi, grâce aux amorces fD1 (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) et rD1 (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA), encadrant un fragment de 1517 paires de bases, une première étape de la manipulation a été effectuée (303). Le mélange réactionnel, pour un volume de 11,5µL, contenait 0,5µM de chaque amorce, 200µM de dNTPs (A, T, C et G), 1mM de MgCl₂, une concentration de 1X de tampon correspondant à l'enzyme et 0.01 unité de l'enzyme (*Taq DNA polymerase*). 1µL de l'extrait d'ADN obtenu par culture a ensuite été ajouté au mélange réactionnel (volume final de 12,5µL). Ce mélange réactionnel contenant l'ADN a ensuite été soumis au programme de PCR utilisé par Paster (210, 211), soit une différence au niveau de la température d'hybridation (55°C pour Weisburg et 60°C pour Paster), ce qui permet à l'amorce de se fixer plus facilement sur la cible d'ADN.

Le programme utilisé est donc le suivant :

- dénaturation initiale pendant 8 minutes à 94°C
- 30 cycles de :
 - Dénaturation 45 secondes à 94°C
 - Hybridation 45 secondes à 60°C
 - Elongation 90 secondes à 72°C
- élongation finale pendant 10 minutes à 72°C
- pause à 15°C

Les produits de la PCR sont ensuite séparés dans un gel d'agarose par électrophorèse (figure 33). Un gel à 1,5% d'agarose est donc préparé dans un moule prévu à cet effet avec une solution de TAE (Tris-Acetate-EDTA) diluée 100 fois et de l'agarose en poudre. Une fois le gel solidifié, les mélanges réactionnels qui ont été soumis aux cycles de la PCR sont déposés dans les puits du gel avec un tampon de charge qui va permettre à l'ADN de rester dans le puits. Dans les deux puits extrêmes du gel (à gauche et à droite), un marqueur de taille de

fragments est déposé. Il permettra de connaître la taille de l'amplifiat. Le gel est ensuite soumis à un courant de 80V pendant une heure dans une cuve contenant du TAE dilué.

Une fois la migration terminée, le gel est déposé pendant 15 minutes dans un bain contenant de l'eau déminéralisée et du BET (Bromure d'Ethidium : agent intercalant émettant une fluorescence aux UV lorsqu'il est lié à l'ADN) à une concentration finale de 0,2µg/ml.

Le gel est enfin déposé sur une table à UV, faisant apparaître en rose-rouge les bandes d'ADN sur la gélose (en blanc sur la figure 33). La taille de chaque bande peut être évaluée grâce au marqueur de calibration. Dans notre cas, nous recherchons un fragment d'ADN qui mesure environ 1500 paires de bases.

5/ Purification de l'ADN

Les produits de PCR vont ensuite être purifiés enzymatiquement afin de permettre leur séquençage. Le réactif utilisé pour cette étape est de l'ExoSAP-IT™ (Amersham pharmacia biotech Europ, Orasy, France) qui contient deux enzymes : l'exonucléase I et la Shrimp Alkaline phosphatase.

L'exonucléase I a pour rôle de dégrader l'ADN simple brin dans le sens 3'=>5', libérant des désoxyribonucléosides 5'-monophosphate dans le milieu.

La Shrimp Alkaline phosphatase, quant à elle, catalyse la libération des groupements phosphate localisés en 5' et en 3' de l'ADN, de l'ARN et des nucléotides contenus dans un mélange réactionnel.

L'association de ces deux enzymes a donc pour conséquence de dégrader les amorces simples brins en excès ainsi que tout l'ADN simple brin du milieu et de rendre inutilisables les dNTPs non incorporés présents dans le mélange réactionnel. Les deux enzymes sont actives à 37°C. La Shrimp Alkaline phosphatase est inactivée à des températures supérieures à 65°C et l'exonucléase I à des températures supérieures à 80°C.

Pour cette étape, 1µL du mélange d'enzymes est mélangé dans un nouveau micro-tube avec 2,5µL du produit de PCR. Ce mélange est incubé 15 minutes à 37°C puis 15 minutes à 80°C pour inactiver les deux enzymes.

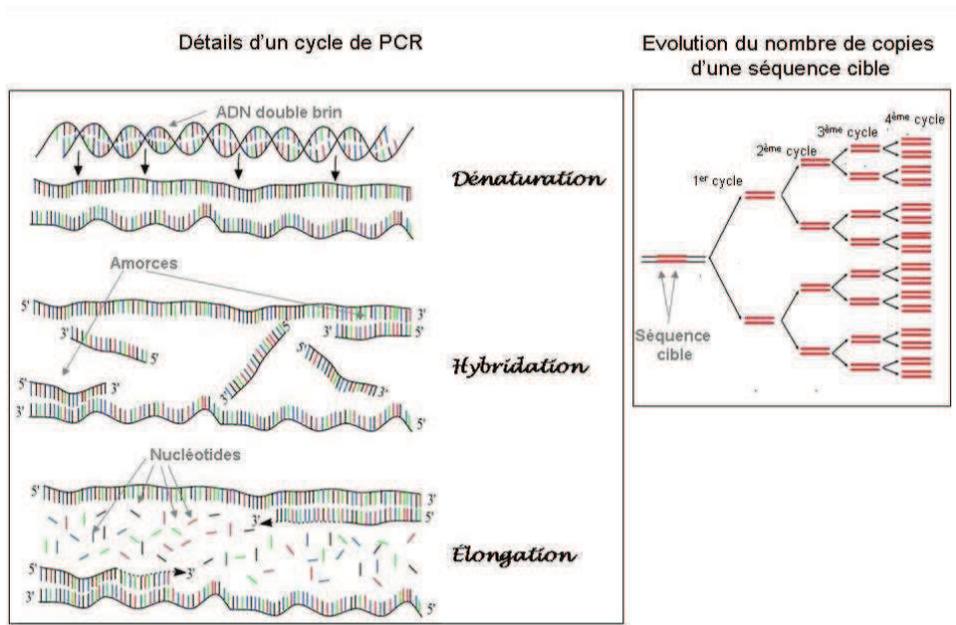


Figure 32 : principe de la PCR

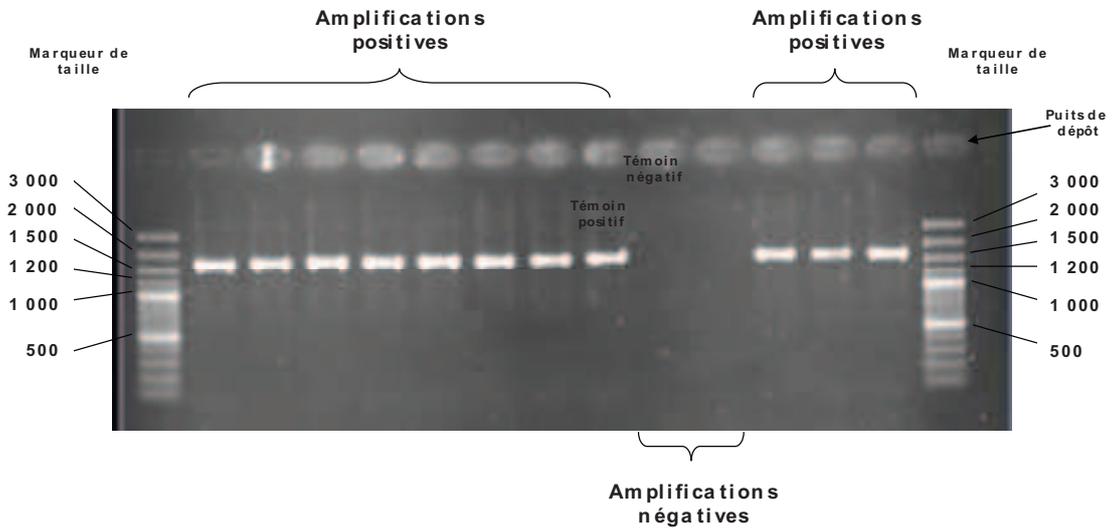


Figure 33 : photographie d'une migration en gel d'agarose

6/ Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN.

Il repose sur la méthode de Sanger (255). Pour cette méthode, à partir d'une amorce située sur le brin à séquencer, une ADN polymérase va synthétiser le brin complémentaire du brin cible.

Le mélange réactionnel contient alors une amorce unique, une ADN polymérase, un mélange de 75% de désoxyribonucléotides et de 25% de didésoxyribonucléotides marqués par un fluorochrome propre à chaque base.

Lors d'une polymérisation normale de l'ADN, le groupement –OH sur le carbone 3' du ribose permet la formation d'une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide (figure 34).

Lors d'une PCR de séquençage, en plus de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), des didésoxyribonucléotides triphosphate (ddNTP) sont incorporés au mélange réactionnel. Ces ddNTP ne possèdent pas de groupement hydroxyle au niveau du carbone en 3' du ribose et les bases portées par ces mêmes riboses sont marquées par un fluorochrome. L'absence du groupement hydroxyle empêche la formation d'une liaison phosphodiester et la synthèse du brin complémentaire s'arrête. Les proportions entre dNTP et ddNTP sont étudiées pour que, les ddNTP se fixant de façon aléatoire au cours de la synthèse, il y ait assez de chacun d'entre eux pour obtenir l'intégralité du fragment d'ADN marqué par fluorescence (figure 35).

Nous avons choisi d'utiliser une amorce complémentaire à une séquence interne du gène pour le séquençage d'un fragment d'environ 500 paires de bases. Cette amorce, appelée P519, est composée comme suit : 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'. Le mélange de séquençage contenant 2 μ L d'un mélange appelé Quick Start Master Mix (Tampon, dNTPs, ddNTPs, ADN polymérase), 2 μ L d'eau pour PCR et 2,5 μ L d'amorce à 2 μ M est soumis à 35 cycles de 20 secondes de dénaturation à 96°C, 20 secondes d'hybridation à 50°C et 2 minutes d'élongation à 60°C.

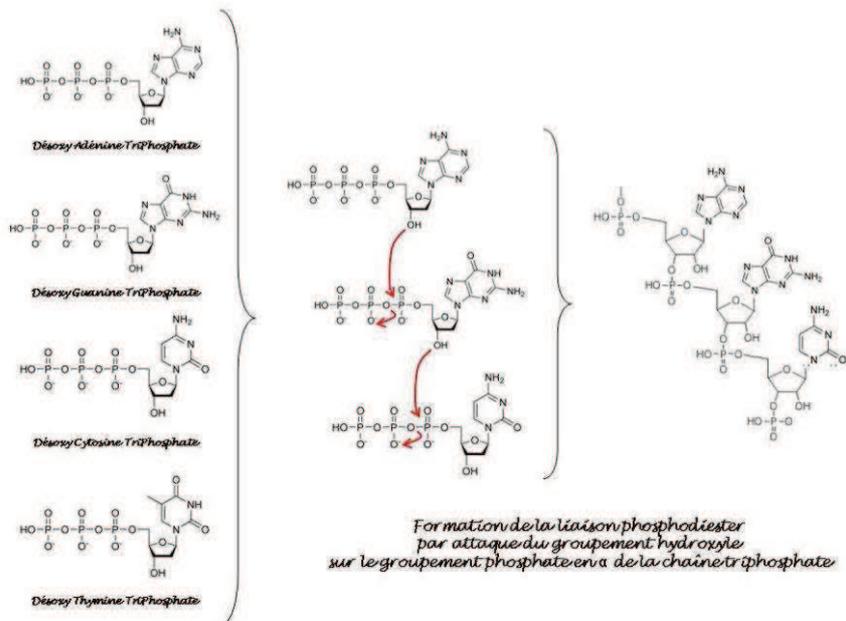


Figure 34 : synthèse d'un brin d'ADN

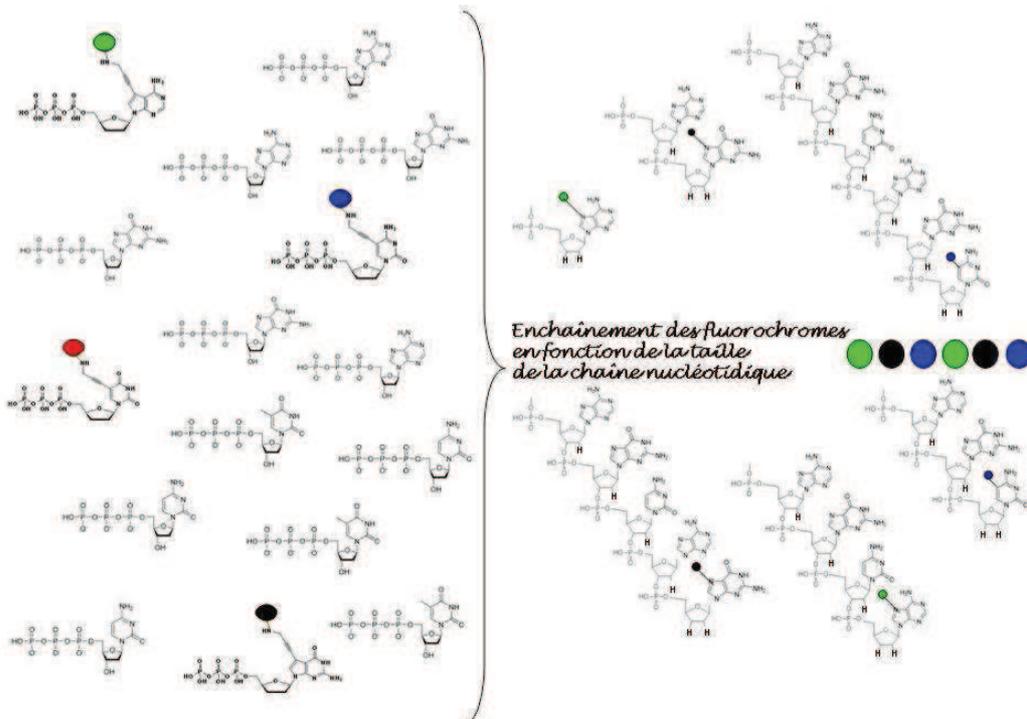


Figure 35 : synthèse des brins d'ADN lorsqu'il y a présence de ddNTPs dans le mélange réactionnel

7/ Précipitation de l'ADN

Une fois la réaction de séquençage effectuée, les produits de séquençage doivent être purifiés (élimination des dNTPS et des ddNTPs), et l'ADN doit être précipité et remis en suspension dans du formamide avant de pouvoir être analysé. Lors de cette étape, 1µL d'EDTA 5µM (dont la fonction est de former des complexes avec les sels présents dans le mélange : chélation des sels) et 1µL d'acétate de sodium 3M (dont le rôle est de limiter la solubilisation de l'ADN en faisant agir les ions sodium sur les charges négatives de l'ADN : protection de l'ADN) sont ajoutés dans chaque mélange réactionnel. Un volume de 40µL d'éthanol froid à 95° est ajouté au mélange réactionnel qui est placé, après vortexage, dans la glace pendant 15 minutes puis centrifugé à 4°C à 12 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration et remplacé par 100 µL d'éthanol à 70° dont le rôle sera de diluer les restes d'éthanol à 90°. Le tube est ensuite immédiatement centrifugé pendant 5 minutes (4°C, 12 000 rpm). Le surnageant est à nouveau aspiré, le culot séché dans une centrifugeuse sous vide puis remis en suspension dans 40µL de formamide désionisé (DTCS). La suspension est enfin transférée dans une plaque de lecture de 96 puits (8 x 12) et prête à être analysée.

8/ Identification

Les échantillons contenus dans la plaque sont soumis à une lecture par l'intermédiaire d'un séquenceur CEQTM 8000 (Beckman Coulter). Sur chaque échantillon, une goutte d'huile minérale est déposée afin de protéger les marqueurs fluorescents et d'éviter les phénomènes d'évaporation lors du chauffage. Durant l'électrophorèse, les fragments d'ADN chargés négativement sont séparés selon leur taille et lorsqu'ils arrivent au niveau de la fenêtre de lecture du capillaire, le fluorochrome qu'ils portent est excité par un laser. La fluorescence alors émise est détectée par caméra (figure 36).

Ainsi, grâce au logiciel d'analyse (CEQ TM 8000), le chromatogramme obtenu peut être retranscrit, base par base, sous la forme d'une séquence (figure 37).

Les séquences obtenues avec le logiciel d'analyse CEQTM 8000 sont transférées sous un logiciel d'alignement BioEdit (123) dans lequel elles peuvent être visualisées et analysées.

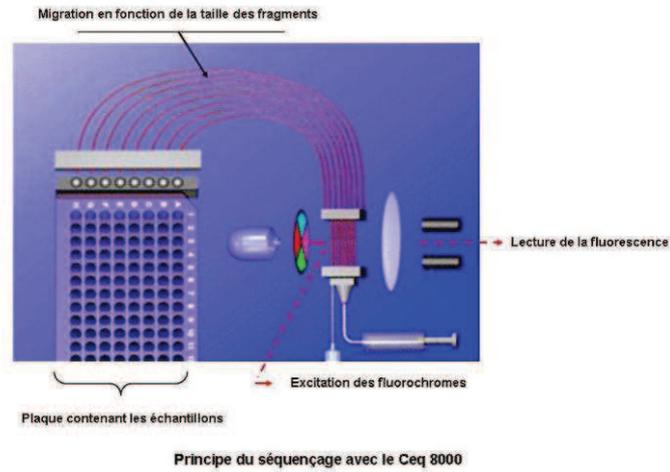


Figure 36 : fonctionnement du séquenceur

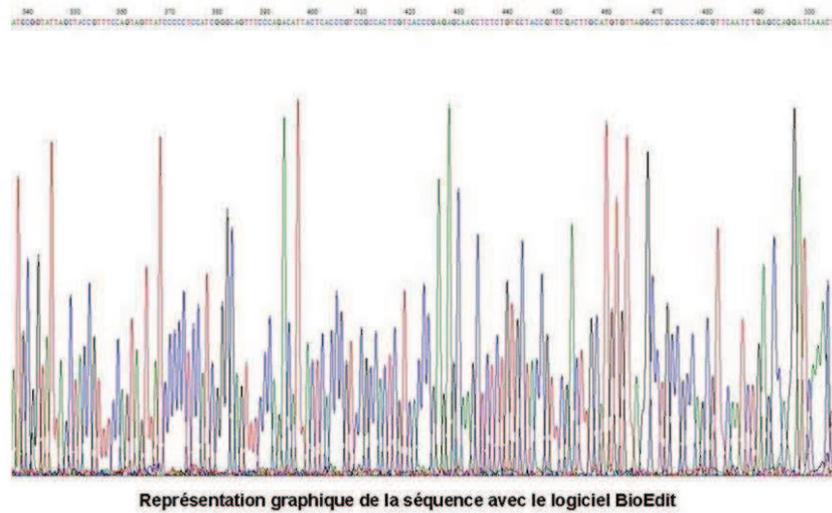


Figure 37 : exemple de chromatogramme

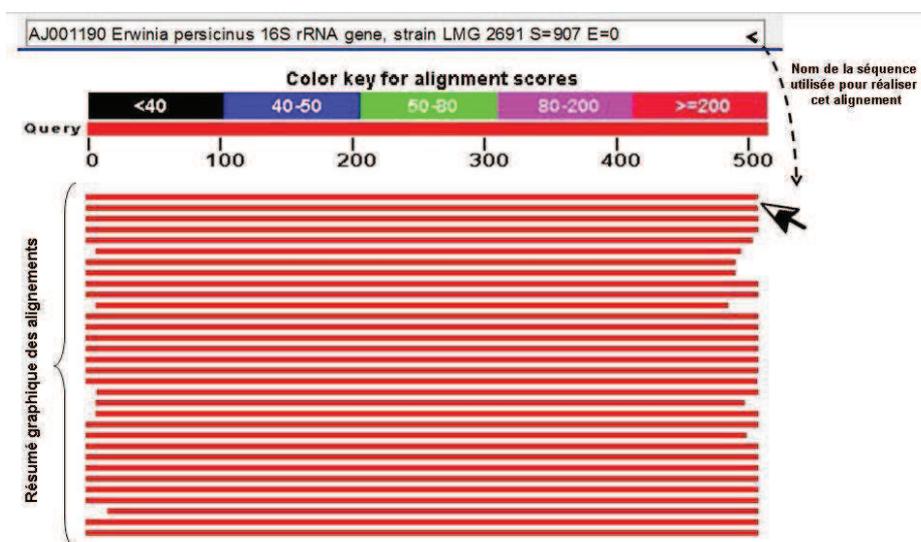


Figure 38 : capture d'écran lors d'une recherche de correspondance d'une séquence sur le site ncbi.gov

Les séquences sont ensuite exportées sur le site pubmed, dans la section BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ce site permet une comparaison de séquences avec des séquences cataloguées dans une base de données internationale.

Une première comparaison graphique est proposée, dans laquelle de nombre de nucléotides alignés avec la séquence de référence est figuré dans une couleur en fonction du degré de correspondance (figure 38). Ainsi, si moins de 40 nucléotides sont alignés, le trait sera figuré en noir et à l'opposé, si plus de 200 nucléotides sont alignés, le trait est figuré en rouge. Plusieurs séquences de référence peuvent être comparées à notre séquence et dans ce cas, autant de traits figureront sur la représentation graphique.

Le site permet également une description de l'alignement (figure 39). Dans cette description apparaissent, entre autres, le nom de la séquence de référence, le pourcentage de recouvrement (nombre de nucléotides de la séquence soumise utilisés pour réaliser l'alignement/nombre de nucléotides de la séquence soumise) et le pourcentage d'homologie (nombre de nucléotides parfaitement alignés avec la séquence de référence/nombre de nucléotides utilisés pour l'alignement). La description de la séquence peut se faire pour plusieurs séquences de référence (une ligne correspond à un alignement avec une séquence de référence).

Enfin, le site nous propose de visualiser l'alignement, base par base (figure 40) en faisant figurer les sauts, les trous et toutes les autres différences entre les deux séquences.

L'identification moléculaire à l'espèce était définie par une homologie de plus de 97% par rapport à la séquence de référence utilisée par le logiciel (144, 213).

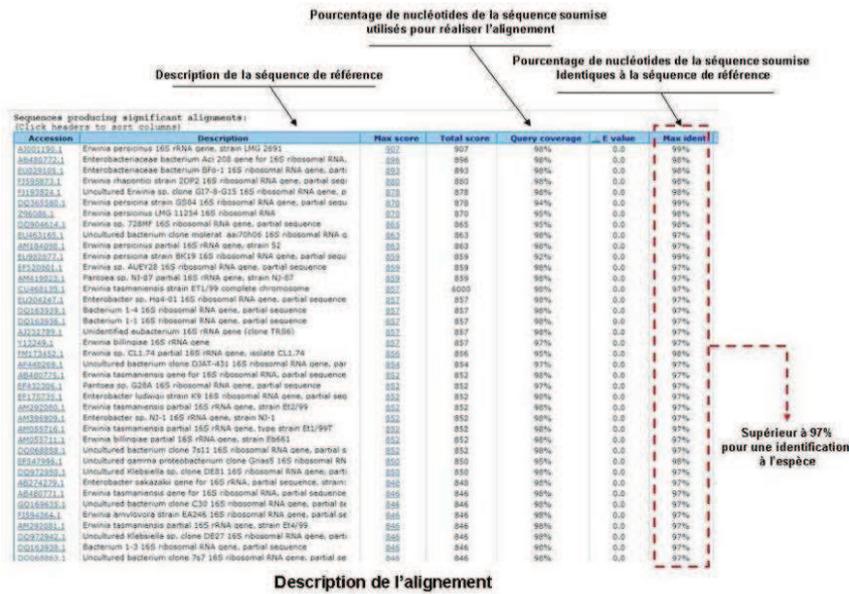


Figure 39 : capture d'écran de la description de l'alignement sur ncbi.gov

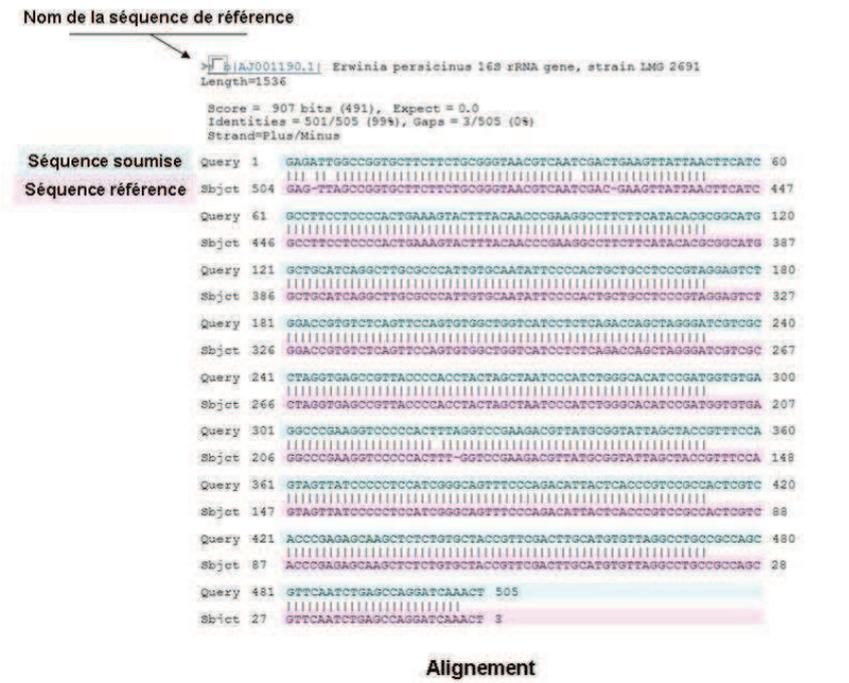


Figure 40 : capture d'écran de l'alignement sur ncbi.gov

E/ Méthode d'identification des bactéries totales

Une méthode de clonage de l'ADN bactérien total à été utilisée au cours de ces recherches dans le but de mieux identifier la diversité bactérienne de certains échantillons. Pour ce faire, l'intégralité de l'ADN contenu dans certains échantillons des banques de solution de lavage, que ces ADN correspondent à des bactéries cultivables ou non, à été analysée.

1/ choix des échantillons

Cette technique a été envisagée dans le laboratoire pour le projet AgriSanté et plus particulièrement pour l'étude de la poussière. Elle a ensuite été utilisée pour le projet GABRIEL-A.

a/ AgriSanté

Dans le cadre du projet AgriSanté, nous avons décidé d'analyser la diversité bactérienne de 3 échantillons de poussières de boîte afin d'évaluer l'apport de cette nouvelle technique sur la culture. Nous avons donc choisi les trois solutions de lavage de poussières pour lesquels les résultats de culture montraient un nombre important de phénotypes différents et une forte contamination en quantité de bactéries.

b/ GABRIEL

Pour le projet GABRIEL, nous avons décidé d'évaluer la diversité totale des échantillons de poussière d'étable que nous possédions en fonction de l'état de santé de l'enfant côtoyant la ferme. Nous avons donc réalisé des pools à partir des solutions de lavage de toutes les lingettes de chaque groupe de santé. Afin d'assurer une représentation équilibrée des prélèvements fortement et faiblement contaminés dans chaque pool de prélèvements, les pools ont été constitués sur la base de leur richesse en micro-organismes cultivables. En pratique, les échantillons ont été préalablement classés en fonction du total de micro-organismes cultivables obtenus après culture, puis les deux pools ont été constitués en incluant les échantillons classés 1, 4, 5, 8, 9, 12, 13 et ainsi de suite (100µL de chaque) dans le premier pool, et 2, 3, 6, 7, 10, 11 etc. (100µL de chaque), dans le deuxième (tableau V). Les pools 1 et 2, correspondant aux étables visitées par des enfants non malades, ont des moyennes qui diffèrent d'environ 0.5% de leurs valeurs. Trois lingettes dont la contamination en bactéries

cultivables semble largement supérieure aux autres lingettes n'ont pas été sélectionnées pour faire partie des pools de contrôles. Pour ces trois lingettes, la sur-contamination vient de la sur-représentation de l'un des quatre groupes bactériens définis sur le résultat de la coloration de Gram. Pour la lingette M1290-2, les bacilles à Gram positif représentent 99.98% du total bactérien de la lingette, pour M0373-2, ce sont les bacilles à Gram négatif qui représentent 96% de la contamination de la lingette et pour M2541-2, les bactéries à Gram non identifiées (par perte de la souche ou par contamination) représentent 67% du total bactérien.

Les pools 3 et 4, correspondant aux étables où évoluent des enfants atopiques, ont des moyennes plus variables mais qui ne diffèrent pas de plus de 6% l'une de l'autre.

Les pools 5 et 6, regroupant les solutions de lavage des lingettes provenant des étables avec lesquelles les enfants asthmatiques ont des contacts, diffèrent de moins d'1% au niveau de leur contamination moyenne.

2/ extraction de l'ADN

L'ADN total des échantillons (Poussière d'AgriSanté et pools de Gabriel) a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.

Les tissus contenus dans 400µL de la solution de lavage de l'échantillon sont culottés par centrifugation pendant 30 minutes à 12000 rpm et le surnageant est évacué. Les cellules sont ensuite lysées par adjonction de deux solutions de lyse. Les protéines, polysaccharides et débris cellulaires sont précipités par ajout de 130µL de solution de précipitation. Pour être efficace, la précipitation se fait dans de la glace pendant cinq minutes suivie d'une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale. Le surnageant est placé dans une colonne de filtration et centrifugé pendant une minute afin d'éliminer totalement tous les débris cellulaires, retenus par la colonne. L'ADN génomique est purifié par une procédure de liaison-lavage-élution par centrifugation sur une colonne de silice. Le liquide, libre de tous débris est ensuite transféré dans une colonne préparée pour retenir l'ADN et centrifugé pendant une minute à vitesse maximale. Le filtre de la colonne est ensuite lavé deux fois par 500µL de solution de lavage contenant de l'éthanol et centrifugé pendant trois minutes. Une fois toutes ces étapes réalisées, l'ADN est détaché du filtre par 100µL d'une solution d'élution préchauffée à 65°C répartie sur l'ensemble du filtre puis par une centrifugation d'une minute à 12000 rpm.

Le produit de l'extraction par cette méthode est un mélange d'ADN divers (bactérien, fongique, viral, végétal et animal), prêt à être utilisé pour des opérations de biologie moléculaire. Il est conservé à -20°C.

3/ PCR ARN 16S

Le protocole utilisé pour amplifier l'ADN bactérien total contenu dans les extraits est le même que celui utilisé pour les extraits d'ADN obtenus à partir de souches pures, mais avec un volume plus important (volume total de 50µL). Les amorces rD1 et rF1 sont utilisées pour l'amplification de l'ADN bactérien du milieu. Les ADN fongiques, viraux et autres sont libres dans le mélange réactionnel et ne seront pas amplifiés par cette méthode. La vérification des produits de PCR se fait par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% et visualisation sous UV après coloration au BET.

4/ purification

Le produit de PCR est purifié par l'utilisation du kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Charbonnière, France). Un volume de solution de liaison égal au volume de la réaction de PCR est ajouté dans le tube et la solution est transférée sur une colonne prévue à cet effet. Le tout est incubé pendant une minute à température ambiante puis centrifugé pendant une minute à 14000 rpm. La membrane est ensuite lavée deux fois avec une solution de lavage contenant de l'éthanol à 95° (le complexe tube-colonne est centrifugé deux fois : une minute puis cinq minutes). Les traces d'éthanol sont éliminées par centrifugation à sec pendant cinq minutes puis par incubation pendant une minute à température ambiante. L'ADN est ensuite élué par ajout de 50µL d'eau pure et centrifugation pendant une minute. Le produit de purification est prêt à être utilisé pour d'autres opérations de biologie moléculaire et est conservé à -20°C.

	Etables de Contrôles		Etables d'Atopiques		Etables d'Asthmatiques	
	Pool 1 (UFC/lingette ; rang)	Pool 2 (UFC/lingette ; rang)	Pool 3 (UFC/lingette ; rang)	Pool 4 (UFC/lingette ; rang)	Pool 5 (UFC/lingette ; rang)	Pool 6 (UFC/lingette ; rang)
Lingettes sélectionnées	M0367-2 (15 200 ; 1)	M1553-2 (66 000 ; 2)	M0441-2 (0 ; 1)	M1630-2 (50 000 ; 2)	M0934-2 (200 ; 1)	M1691-2 (600 ; 2)
	M0481-2 (668 600 ; 4)	M1941-2 (582 000 ; 3)	M0354-2 (370 400 ; 4)	M0300-2 (54 200 ; 3)	M1414-2 (82 000 ; 4)	M1287-2 (8 000 ; 3)
	M0648-2 (699 400 ; 5)	M0489-2 (1 000 800 ; 6)	M1878-2 (406 000 ; 5)	M1113-2 (622 000 ; 6)	M2142-2 (272 000 ; 5)	M1817-2 (355 800 ; 6)
	M0116-2 (1 584 000 ; 8)	M2057-2 (1 430 000 ; 7)	M0130-2 (988 000 ; 8)	M0279-2 (769 600 ; 7)	M2189-2 (1 274 000 ; 8)	M2325-2 (801 200 ; 7)
	M0673-2 (1 671 600 ; 9)	M2420-2 (1 683 000 ; 10)	M1997-2 (995 600 ; 9)	M1230-2 (1 198 000 ; 10)	M1538-2 (1 820 000 ; 9)	M2016-2 (2 226 000 ; 10)
	M2528-2 (2 276 200 ; 12)	M2316-2 (1 760 400 ; 11)	M0898-2 (1 392 600 ; 12)	M2277-2 (1 354 800 ; 11)	M1840-2 (2 720 600 ; 12)	M0352-2 (2 344 000 ; 11)
	M1012-2 (4 307 200 ; 13)	M1360-2 (4 714 000 ; 14)	M1191-2 (1 546 000 ; 13)	M1588-2 (1 604 000 ; 14)	M1500-2 (2 766 000 ; 13)	M0198-2 (3 690 400 ; 14)
	M0385-2 (5 440 600 ; 16)	M1041-2 (5 266 000 ; 15)	M1537-2 (1 722 400 ; 16)	M2058-2 (1 680 000 ; 15)	M1688-2 (4 104 000 ; 16)	M0991-2 (3 861 200 ; 15)
	M1696-2 (5 632 000 ; 17)	M1150-2 (5 732 000 ; 18)	M2102-2 (2 260 000 ; 17)	M0278-2 (3 226 400 ; 18)	M2244-2 (4 224 000 ; 17)	M0699-2 (4 234 000 ; 18)
	M2527-2 (6 420 800 ; 20)	M0540-2 (6 294 000 ; 19)	M0306-2 (3 562 200 ; 20)	M0633-2 (3 378 000 ; 19)	M1912-2 (5 480 000 ; 20)	M0763-2 (4 980 200 ; 19)
	M2555-2 (6 426 200 ; 21)	M0090-2 (7 768 000 ; 22)	M0887-2 (3 592 200 ; 21)	M1338-2 (5 418 800 ; 22)	M1922-2 (7 132 000 ; 21)	M2026-2 (9 110 000 ; 22)
	M0810-2 (9 024 000 ; 24)	M0224-2 (7 808 000 ; 23)	M2452-2 (6 154 000 ; 24)	M1160-2 (5 812 600 ; 23)	M2329-2 (9 445 200 ; 24)	M2090-2 (9 182 000 ; 23)
	M0914-2 (9 119 800 ; 25)	M2271-2 (9 554 000 ; 26)	M1130-2 (6 436 000 ; 25)	M1428-2 (11 706 200 ; 26)	M2245-2 (10 830 000 ; 25)	M0759-2 (11 624 400 ; 26)
	M2324-2 (12 016 000 ; 28)	M0986-2 (11 754 400 ; 27)	M1089-2 (19 268 400 ; 28)	M1498-2 (16 904 000 ; 27)	M0792-2 (19 942 800 ; 28)	M1785-2 (17 610 000 ; 27)
	M0435-2 (12 911 000 ; 29)	M0500-2 (23 061 200 ; 30)	M0231-2 (20 370 000 ; 29)	M2210-2 (20 890 000 ; 30)	M1981-2 (29 180 000 ; 29)	M0205-2 (31 901 800 ; 30)
	M2472-2 (34 971 200 ; 32)	M1915-2 (30 606 000 ; 31)	M2111-2 (28 536 400 ; 32)	M1372-2 (20 934 000 ; 31)	M0580-2 (44 723 200 ; 32)	M1634-2 (39 060 600 ; 31)
	M1087-2 (46 694 800 ; 33)	M2284-2 (47 731 200 ; 34)	M1666-2 (50 948 200 ; 33)	M0140-2 (62 480 000 ; 34)	M0109-2 (76 188 600 ; 33)	M1385-2 (80 118 400 ; 34)
	M0900-2 (55 656 200 ; 36)	M1602-2 (50 704 000 ; 35)	M1567-2 (63 850 000 ; 36)	M1713-2 (62 692 600 ; 35)		
			M2267-2 (91 165 200 ; 37)	M0826-2 (99 862 600 ; 38)		
	Non sélectionnées	M1290-2 (200 062 000 ; 37)				
M0373-2 (208 794 000 ; 38)						
M2541-2 (641 060 200 ; 39)						

Tableau V : constitution des pools de poussière d'étable pour le projet Gabriel

5/ clonage

Le clonage peut être considéré comme la multiplication provoquée d'un fragment d'ADN par l'intermédiaire d'un micro-organisme. C'est une technique de biologie moléculaire qui consiste à isoler un fragment d'ADN et à le multiplier à l'identique en l'insérant dans une molécule d'ADN porteuse appelée vecteur (le plus souvent un plasmide) permettant son amplification. Cette technique de biologie moléculaire peut être utilisée pour un clonage partiel, ne portant que sur un fragment de matériel génétique (ADN), mais aussi pour le clonage d'un gène entier permettant la production de la protéine recombinante correspondante.

Dans notre problématique, le clonage a été utilisé afin de séparer les ADN amplifiés appartenant à des bactéries de genres et d'espèces différents. Ainsi, chaque bactérie issue du clonage a incorporé un fragment unique du gène codant pour l'ARN 16S appartenant à une espèce bactérienne donnée.

Pour réaliser le clonage de nos produits de PCR, nous avons utilisé le kit TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen[™], Cergy-Pontoise, France). Ce kit propose une stratégie de clonage rapide et simple pour des insertions de produits amplifiés par une Taq polymérase dans un vecteur plasmidique (pCR[®]4-TOPO[®]).

Le plasmide contient entre autres, un gène suicide au niveau du site de clonage, impliquant que si aucun fragment d'ADN n'est inséré, la bactérie contenant le plasmide ne sera pas viable. Il contient également un gène de résistance à un antibiotique, la kanamycine. Le milieu de culture des clones est un milieu Mueller-Hinton supplémenté par de la kanamycine, antibiotique auquel la souche de *Escherichia coli* utilisée est sensible. Les bactéries possédant le plasmide pourront se développer, contrairement aux autres.

La Taq polymérase ajoute un résidu adénine unique en 3' en fin de synthèse des produits de PCR. Le vecteur linéarisé contenu dans le kit présente un résidu déoxythymidine en 3', ce qui permet aux produits de PCR de se lier de façon efficace avec le vecteur. Le plasmide présente une topoisomérase (obtenue à partir de Vaccinia virus) liée de façon covalente aux terminaisons CCCTT du vecteur. Le lien phospho-tyrosyl formé entre cette enzyme et le vecteur peut être attaqué par le groupement hydroxyle du brin clivé par la liaison avec

l'enzyme (inversant la réaction et libérant la topoisomérase) ou par le groupement hydroxyle du résidu adénine en 5' du fragment d'ADN bactérien (figure 41).

La réaction de ligature se produit en mettant en contact environ 20ng de produits de PCR frais, 1µL de solution de sels, de l'eau distillée pour obtenir 5µL de solution et 1µL de vecteur et en laissant le mélange agir pendant cinq minutes à température ambiante puis dans de la glace.

Une fois le produit de PCR inséré dans le plasmide, celui-ci est transformé dans des cellules de *Escherichia coli* compétentes sélectionnées ensuite sur un milieu gélosé Mueller-Hinton contenant de la kanamycine pendant 18 heures à 37°C. Les bactéries qui ont poussé sur le milieu contiennent obligatoirement le plasmide et un insert (figure 42).

Le protocole de transformation implique d'ajouter 2µL de la réaction de ligature dans un aliquot de cellules compétentes et de laisser le tout agir pendant 15 minutes dans la glace. Un choc thermique de 30 secondes à 42°C permet de faire pénétrer le plasmide dans les cellules. Les mélanges sont replacés immédiatement dans la glace pendant deux minutes et 250µL de milieu S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolite repression) sont ajoutés. Les suspensions bactériennes sont incubées avec agitation pendant une heure à 37°C avant d'être étalées (100µL par boîte) sur des géloses Mueller-Hinton additionnées de 50µg/mL de kanamycine. Les milieux de culture sont observés après 18 heures d'incubation à 37°C. Toutes les colonies sont prélevées à l'aide d'un cure-dent stérile et mises séparément en suspension dans un micro-tube contenant 400µL d'eau distillée stérile. Ces clones en suspension sont prêts à être analysés et sont stockés à -20°C. C'est notre "clonothèque".

6/ PCR M13

Les clones obtenus ne sont pas prêts à être séquencés. En effet, dans les colonies bactériennes que nous obtenons avec cette méthode, il y a non seulement le fragment d'ARN 16S que nous avons introduit dans le plasmide, mais également le gène codant pour l'ARN 16S de *Escherichia coli* qui est présent dans le génome de la bactérie. Le séquençage direct à partir des clones n'est pas possible puisqu'une amplification avec les amorces fD1 et rD1 du fragment aboutirait à un mélange du gène codant pour l'ARN 16S que nous voulons identifier et de celui de *E. coli*. Il est donc nécessaire de procéder à une amplification spécifique à partir d'autres amorces. Les amorces M13r (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') et M13f (5'-

GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') (figure 43) qui s'hybrident respectivement sur les sites du même nom du vecteur et permettent l'amplification de l'insert sont donc utilisées.

Le mélange réactionnel et les concentrations des réactifs utilisés sont les mêmes que dans le cadre d'une PCR 16S, sauf les amorces qui ciblent une région différente.

Le programme d'amplification utilisé implique :

- dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94°C
- 35 cycles de :
 - Dénaturation 30 secondes à 94°C
 - Hybridation 30 secondes à 55°C
 - Elongation 90 secondes à 72°C
- élongation finale pendant 5 minutes à 72°C
- pause à 15°C

Comme pour les autres PCR, les résultats sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5% et analysés sous U.V. après un bain de B.E.T. pendant 15 minutes (figure 44).

7/ PCR de séquençage

Les clones possédant les bons inserts sont ensuite séquencés suivant le même protocole que les produits de PCR normaux (purification enzymatique, PCR de séquençage avec une amorce interne au fragment d'ADNr 16S).

8/ séquençage

Comme précédemment le séquençage s'effectue à l'aide d'un séquenceur Ceq 8000 (Beckman coulter) et les résultats sont analysés par le logiciel BioEdit avant d'être identifiés par comparaison avec la banque de données NCBI.

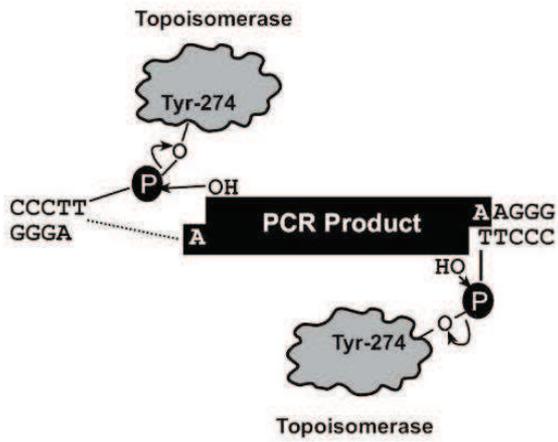


Figure 41 : mode d'action de la topoisomérase

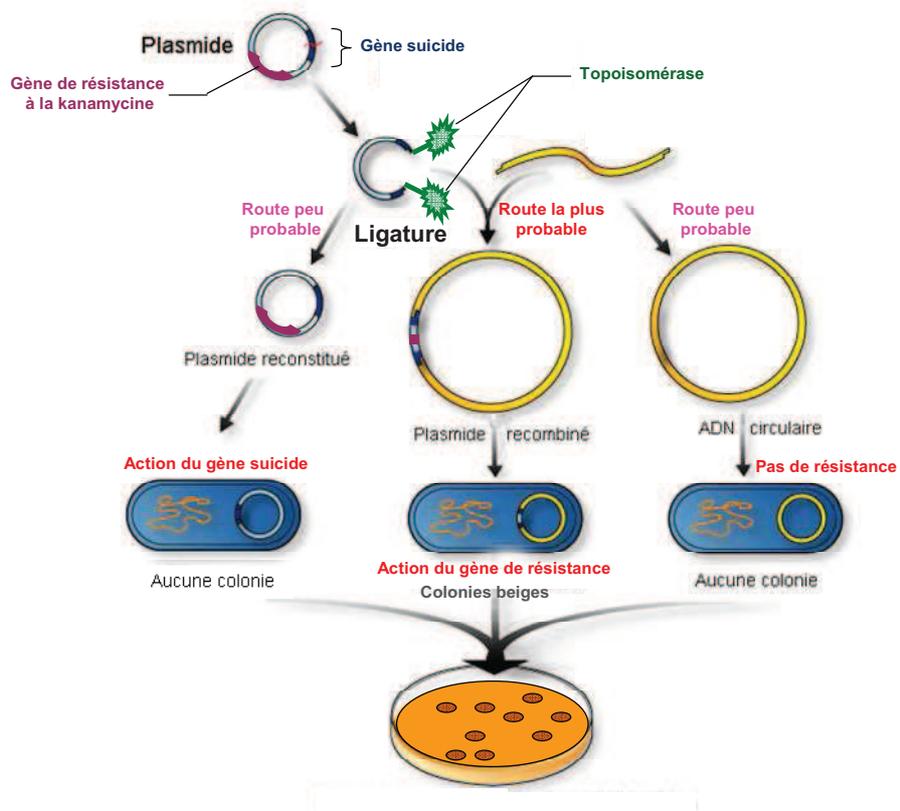


Figure 42 : schéma d'un clonage

9/ détermination phylogénétique

De nombreux clones qui ne sont pas identifiables à l'aide de la banque de données internationale NCBI, nécessiteront une analyse phylogénétique. Pour ce faire, les séquences nucléotidiques éditées à l'aide de BioEdit v7.0.9 (*Tom Hall, Ibis Biosciences*) sont alignées et exportées dans le logiciel Mega4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Masatoshi Nei, Biodesign Institute, USA) pour la construction d'arbres phylogénétiques. Des liens sont alors établis entre les séquences connues et les séquences inconnues, au moins au niveau du phylum bactérien.

F/ Analyses statistiques

Les comparaisons effectuées entre deux types d'échantillons (air avant travail versus air après travail, par exemple) ont été effectuées à l'aide d'un test de Wilcoxon apparié pour chaque groupe microbien considéré.

Des coefficients de corrélation de Spearman ont également été calculés dans certains cas, pour comparer les techniques d'échantillonnage

Des courbes d'accumulation ont été construites à l'aide du logiciel EstimateS (version 8.0, R.K. Colwell) afin d'estimer la diversité des échantillons considérés et les indices de Mao Tau obtenus avec ce logiciel ont servi à la construction de ces courbes.

Dans certains cas, les résultats sont présentés en groupes de micro-organismes. La différence de constitution des groupes vient de la disponibilité des données et du but recherché.

Dans le cadre de l'étude Gabriel, 13 groupes fongiques ont été considérés : *Absidia spp.*, l'ordre des Mucorales, *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium spp.* identifiées, *Eurotium spp.* non-identifiées, autres *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Wallemia sebi*, Total des levures (levures rouges et levures blanches confondues) et autres champignons. De la même manière, six groupes bactériens ont été définis en fonction des caractéristiques macro- et microscopiques des bactéries : les *Actinomycetaceae* mésophiles, les *Actinomycetaceae* thermophiles, les bacilles à Gram négatif, les bacilles à Gram positif, les cocci à Gram négatif et les cocci à Gram positif.

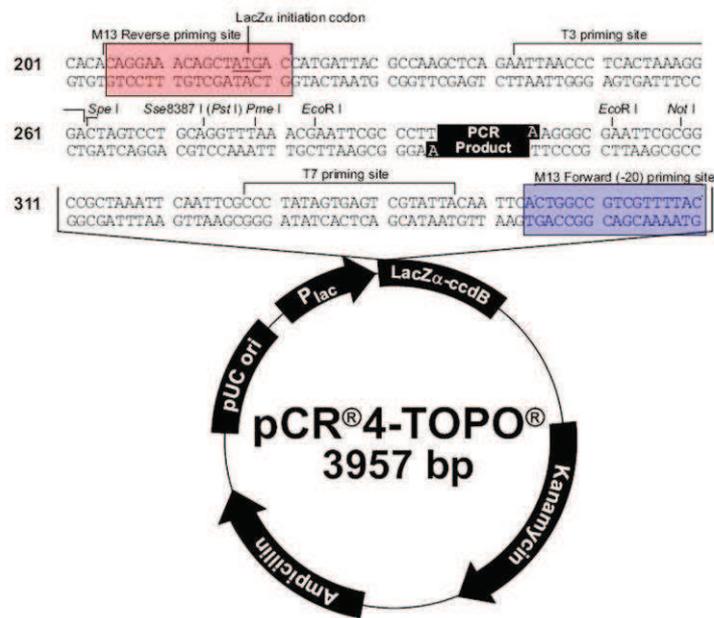


Figure 43 : séquence entourant le site de clonage dans le plasmide

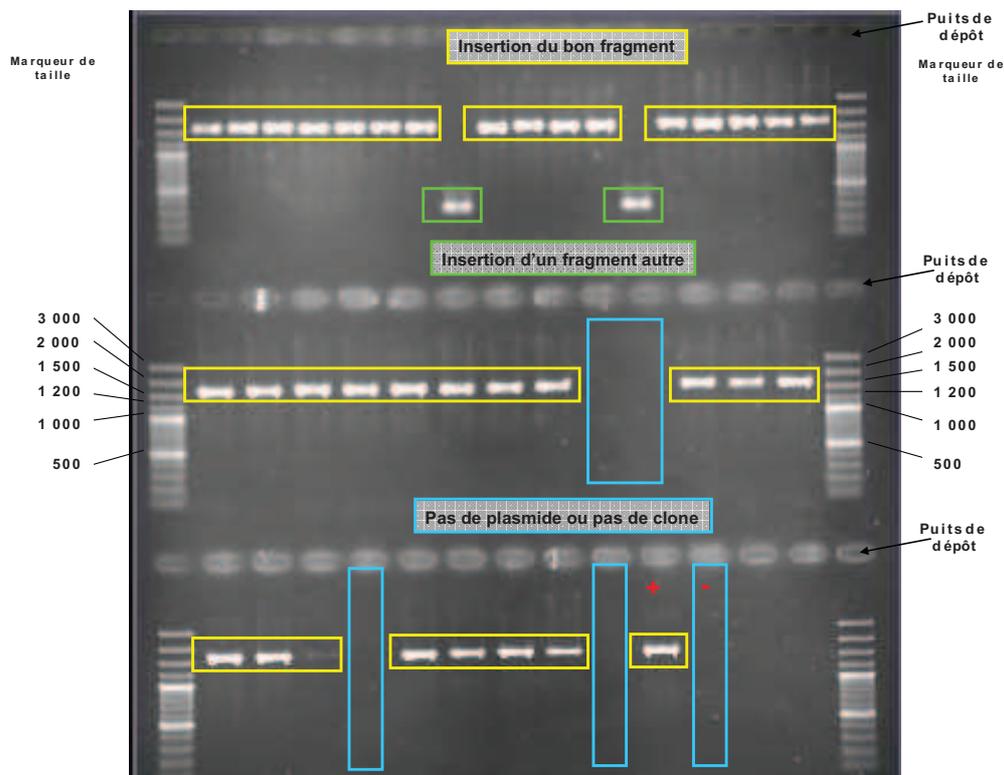


Figure 44 : gel d'agarose des produits clonés puis soumis à une PCR

Légende : les rectangles jaunes entourent les bandes qui correspondent à l'insertion d'un fragment de la taille attendue dans le cas présent ; les rectangles verts entourent les bandes qui correspondent à l'insertion d'un fragment qui ne correspond pas à de l'ARN 16S ; les rectangles bleus montrent ce qui est attendu lorsqu'il n'y a pas de plasmide inséré ou pas de clone dans l'échantillon.

Dans le cadre du projet AgriSanté, les groupes microbiens étaient à peu de choses près les mêmes que pour le projet Gabriel. Pour l'analyse des poussières et la validation de la méthode de prélèvement par lingettes, 12 groupes microbiens ont été utilisés (ordre des Mucorales, *Cladosporium sp.*, *Wallemia sebi*, groupe des *Eurotium* et *Aspergillus*, autres champignons, levures, bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif, cocci à Gram négatif, cocci à Gram positif, *Actinomycetaceae* mésophiles et *Actinomycetaceae* thermophiles). Pour l'analyse des flux jusqu'au lait, 10 groupes fongiques (ordre des Mucorales, *Wallemia sebi*, *Eurotium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, autres champignons, levures rouges et levures blanches) et cinq groupes bactériens (*Actinomycetaceae* mésophiles, *Actinomycetaceae* thermophiles, bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif, et cocci à Gram positif) ont été constitués.

Dans certains cas, les valeurs extrêmes et aberrantes ont été supprimées car un problème de contamination pendant l'exposition ou pendant les manipulations des prélèvements a été supposé (contamination par la paille ou du foin dans le prélèvement, par exemple).

Pour caractériser les différents échantillons, la moyenne arithmétique, la moyenne géométrique, l'écart-type, l'intervalle de confiance à 95% et la fréquence d'identification ont été calculés.

Des comparaisons de moyennes entre deux échantillons ont été effectuées à l'aide de test t de student et les fréquences ont été comparées par des tests de Chi² de Pearson. Dans tous les cas, le seuil de significativité statistique a été fixé à 5%.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Excel, Statview et Stata version 10 (Stata Corp LP, College Station, TX, USA).

RESULTATS

Des techniques de prélèvement d'air sont régulièrement utilisées pour analyser la flore microbienne présente dans les logements et dans différents environnements ruraux. Ces techniques ont montré leur intérêt pour mesurer les pics d'exposition auxquels les travailleurs sont soumis. Dans le cadre d'une étude visant à caractériser l'environnement microbien durant les premières années de vie d'un enfant, une méthode d'échantillonnage s'échelonnant sur une période prolongée s'avère nécessaire. Ainsi, le projet AgriSanté, dont le but principal était de caractériser la flore microbienne présente dans les différents compartiments de la ferme, nous a permis d'évaluer un système de récolte de la poussière sédimentée pendant 15 jours à un mois et de la comparer aux méthodes de prélèvements de poussière aéroportée.

A/ Validation des méthodes (étude de 16 fermes franc-comtoises durant les hivers 2006 et 2007)

1/ validation de la méthode de prélèvement par poussière

Pour cette partie, nous ne considérerons que six types de prélèvements : les poussières aéroportées dans l'étable (avant et après distribution de fourrage), les poussières sédimentées récoltées durant l'hiver 2006 (poussière sédimentée dans une boîte en plastique et poussière récoltée à la spatule) et les poussières sédimentées récoltées durant l'hiver 2007 (poussières sédimentées dans une boîte en plastique et poussières sédimentées sur une lingette électrostatique stérile).

a/ identification des genres et des espèces

Vingt-deux *taxa* fongiques ont été identifiés dans les différents échantillons à partir de la culture. Les genres les plus fréquents dans les échantillons de poussières (aéroportées et sédimentées) étaient *Eurotium* (principalement *E. amstelodami* et *E. umbrosum*) qui représentaient 46.6% du total fongique dans l'air et 34.8% dans la poussière, *Wallemia* (25.1%; 19.8%), *Aspergillus* (10.5%; 10.4%), et *Penicillium* (7.0%; 10.4%). Les autres champignons identifiés appartenaient aux genres *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Humicola*, et *Tricosporon*. Certains champignons n'ont pas pu être identifiés au niveau du genre. Ils ont alors été classés en moniliacées non identifiées, en dématiées non identifiées, en levures rouges (principalement *Rhodotorula*), et en levures blanches (appartenant aux *taxa* *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., et *Debariomyces* spp.). Les colonies bactériennes cultivées

sur milieu Mueller-Hinton ont été classées en fonction de leur coloration de Gram, ce qui nous a permis d'identifier 57.4% de cocci à Gram positif dans l'air et 68.2% dans la poussière, 32.2% de bacilles à Gram positif dans l'air et 31.6% dans la poussière et 10.3% de bacilles à Gram négatif dans l'air et 29.4% dans la poussière. Aucun cocci à Gram négatif n'a été mis en évidence dans cette étude. Les actinobactéries cultivées sur le milieu Difco actinomycètes ont été identifiées au niveau de l'espèce pour trois d'entre elles (*Saccharomonospora viridis*, *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*), tandis que les autres actinobactéries ont été regroupées en fonction de la température de culture (actinomycètes mésophiles et actinomycètes thermophiles). D'une manière générale, le séquençage d'une partie de l'ADN ribosomal 16S de 586 colonies bactériennes isolées sur le milieu Mueller-Hinton lors de l'hiver 2006 a permis l'identification de 93 espèces correspondant à 41 genres bactériens. Les principaux genres bactériens identifiés par les méthodes de biologie moléculaire sont *Staphylococcus*, principalement *S. equorum* et *S. xylosus*, qui représentaient 24.2% du total des bactéries cultivables de l'air et 39.2% de la poussière, *Curtobacterium* (2.3% et 3.8%), *Bacillus* (3.4% et 2.9%) et *Brachybacterium* (0.5% et 11.4%).

Pour simplifier la comparaison entre les différentes méthodes d'échantillonnage, les micro-organismes ont été regroupés en douze *taxa* : 1) les champignons appartenant à l'ordre des Mucorales (total Mucorales), 2) les espèces appartenant au genre *Cladosporium*, 3) *Wallemia sebi*, 4) les champignons des genres *Eurotium* et *Aspergillus*, 5) les autres espèces fongiques, 6) les levures (blanches et roses), 7) les bacilles à Gram négatif, 8) les bacilles à Gram positif, 9) les cocci à Gram négatif, 10) les cocci à Gram positif, 11) les actinobactéries mésophiles et 12) les actinobactéries thermophiles.

b/ microflore aéroportée et sédimentée

Les compositions microbiologiques de la poussière aéroportée (avant et après affouragement) et de la poussière sédimentée récoltée pendant l'hiver 2006 sont exposées dans la figure 45. Avant affouragement, la flore de la poussière aéroportée était dominée par des champignons du taxon *Aspergillus/Eurotium* ainsi que par des cocci à Gram positif. Après le nourrissage du bétail, une quantité importante de spores d'actinobactéries mésophiles est mise en suspension par la manipulation de foin dans l'étable. D'une manière générale, la biomasse microbienne augmente dans l'air de l'étable après le nourrissage du bétail. Cette augmentation est significative pour *Eurotium* sp. ($p=0.004$) et pour *Cladosporium* sp. ($p=0.004$) (comparaisons réalisées avec un test de Wilcoxon). La répartition des micro-organismes présentée dans la

figure 45 montre que la poussière sédimentée récoltée grâce à la boîte en plastique présente une diversité microbienne équivalente à celle retrouvée dans l'air avant affouragement, donc à l'ambiance de l'étable au repos. Dans les deux cas cette flore est caractérisée par une prédominance des *Aspergillus/Eurotium* et des bactéries Gram positif. La poussière récoltée à l'aide d'une spatule semble être moins représentative de la microflore aéroportée, probablement du fait de la surreprésentation des cocci à Gram positif. Des tests de corrélation appariés (tableau VI) effectués sur les effectifs des douze *taxa* microbiens montrent une relation faible ($r = 0.09$ à 0.18) mais significative ($p < 0.05$) entre la poussière aéroportée et la poussière sédimentée. Cependant, les corrélations entre la flore aéroportée et celle de la poussière sédimentée sont meilleures ($r = 0.35$ à 0.82) quand, pour chaque taxon microbien, les valeurs moyennes pour les seize fermes sont prises en compte au lieu des valeurs individuelles de chaque ferme.

Ainsi, les meilleurs résultats sont observés pour la comparaison entre l'air avant affouragement et la poussière sédimentée dans une boîte en plastique avec une corrélation de 0.82.

La construction des courbes d'accumulation pour les deux échantillons de poussière aéroportée et pour les deux échantillons de poussière sédimentée (figure 46) montre qu'un échantillonnage de seize fermes est suffisant pour estimer correctement la diversité fongique dans les fermes. Ces résultats montrent également qu'un plateau est atteint plus rapidement lorsque l'on analyse la poussière sédimentée par rapport à la poussière aéroportée. A l'opposé, la pente de la courbe n'atteint pas de plateau pour les résultats bactériens. Ainsi, un échantillonnage de seize fermes n'est pas suffisant pour estimer la diversité bactérienne des étables.

Compte tenu de la faible reproductibilité des prélèvements environnementaux de poussière aéroportée liée aux variations journalières de la composition de l'air, l'utilisation d'un système d'échantillonnage permettant de limiter l'impact de ces variations s'avère intéressant dans le cadre de l'analyse de l'environnement microbien des personnes participant aux études que nous menons. Ainsi, nous nous proposons ici de tester si cette méthode permet, sur deux périodes différentes, d'obtenir des résultats similaires.

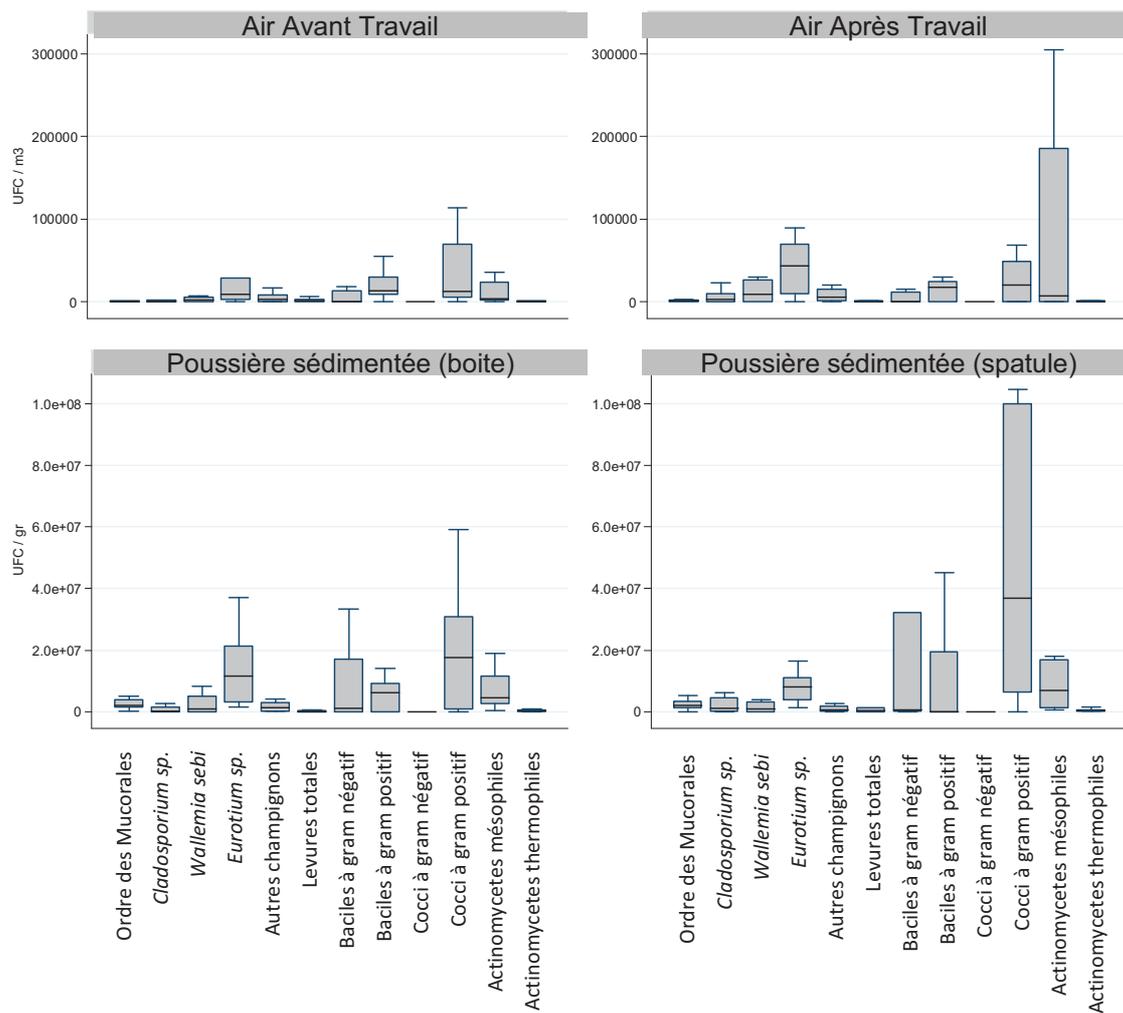


Figure 45 : profils microbiens en box-plots des quatre types d'échantillons pour le premier hiver : Air (avant et après travail) et poussière sédimentée (boîte et spatule).

Légende: le terme Travail correspond à la distribution de nourriture au bétail. Les rectangles gris correspondent aux valeurs comprises entre le 25^{ème} et le 75^{ème} percentile. Les "moustaches" correspondent aux valeurs immédiatement adjacentes à ces mêmes percentiles. Les barres situées à l'intérieur des boîtes correspondent aux médianes. Pour une question de représentativité graphique, les valeurs extrêmes n'ont pas été représentées.

Tableau VI : coefficients de corrélation appariés pour les différents types d'échantillons de poussières du premier hiver pour les 16 fermes.

		AIR		POUSSIÈRE	
		Avant travail ind/ moy	Après travail ind/ moy	W ₁ Boite ₁ ind/ moy	W ₁ SPA ₁ ind/ moy
AIR	Avant travail ind / moy	1			
	Après travail ind / moy	0.33* / 0.76*	1		
POUSSIÈRE	W ₁ Boite ₁ ind / moy	0.09* / 0.82*	0.16* / 0.35*	1	
	W ₁ SPA ₁ ind / moy	0.18* / 0.69*	0.18* / 0.47*	0.03* / 0.59*	1

Légende: les coefficients de corrélation ont été calculés à partir de deux ensembles de données. D'un côté, chaque valeur de chaque taxon microbien a été prise en compte (ind) (* : $p < 0.01$), et de l'autre, les valeurs moyennes des 16 fermes pour chaque taxon microbien ont été calculées (moy) (* : $p < 0.05$).

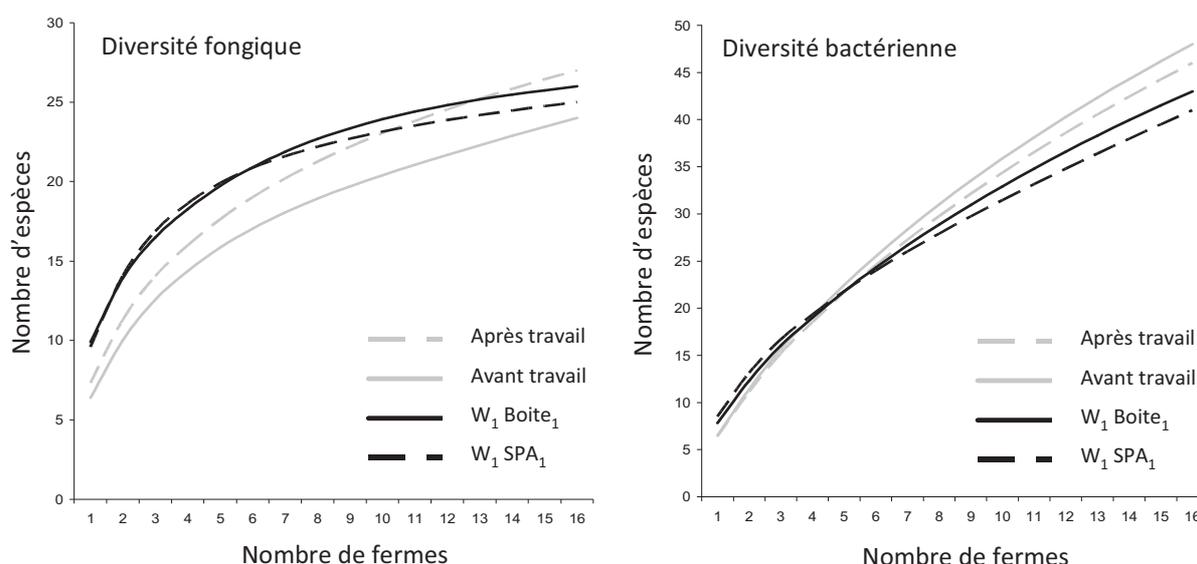


Figure 46 : courbes d'accumulation pour les quatre types d'échantillons du premier hiver. Représentation de l'accumulation des espèces fongiques et bactériennes.

Légende: les lignes grises représentent les échantillons d'air (continue : avant travail ; pointillée : après travail) et les lignes noires représentent les échantillons de poussière sédimentée (continue : dans une boîte ; pointillée : récoltée à la spatule).

2/ reproductibilité des prélèvements de poussière collectés au moyen de boîtes et de lingettes

Les tests de corrélation effectués sur les échantillons de poussière de la seconde année prélevés dans treize fermes montrent que les deux types de prélèvements de poussière sédimentée (dans une boîte en plastique et sur une lingette) sont des méthodes reproductibles (tableau VII).

Il existe également une forte corrélation entre la flore des poussières sédimentées sur des lingettes et celle des poussières sédimentées dans une boîte en plastique. Plus particulièrement, une très forte corrélation est observée entre les résultats obtenus avec la première boîte en plastique déposée un mois dans les étables et le cumul des deux lingettes déposées sur deux périodes de quinze jours correspondant à la même période temporelle. Le coefficient de corrélation de 0.82, retrouvé dans ce cas, nous indique que 67% ($= 0.82^2 * 100$) de la variabilité microbienne d'un des deux prélèvements est due à la variabilité microbienne de l'autre prélèvement.

Grâce à la méthode de prélèvement de poussière sédimentée, dans une boîte ou sur une lingette, les variations journalières sont éteintes et des résultats reproductibles entre deux périodes de quinze jours consécutives sont obtenus. Elle est peu coûteuse et permet aux personnes dont l'environnement est analysé de procéder eux-mêmes au dépôt et au renvoi des prélèvements au centre de traitement. Cependant, la question du délai d'analyse et du mode de conservation des prélèvements est primordiale avant toute mise en place d'un protocole portant sur de plus grands échantillons. Nous avons donc soumis certains prélèvements à diverses conditions de conservation sur différentes durées pour tenter d'estimer si les résultats d'analyse de flore microbienne pouvaient être fortement biaisés par la conservation.

Tableau VII : coefficients de corrélation appariés pour la comparaison des prélèvements de poussières sédimentées du second hiver.

		Lingettes			Boîtes	
		W_2Ling_1	W_2Ling_2	W_2Ling	W_2Boite_1	W_2Boite_2
Lingettes	W_2Ling_1	1				
	W_2Ling_2	0.73*	1			
Boîtes	W_2Boite_1	0.78*	0.77*	0.82*	1	
	W_2Boite_2	0.63*	0.57*	0.64*	0.72*	1

Légende: chaque valeur individuelle pour chaque taxon microbien a été prise en compte pour le calcul des coefficients de corrélation entre les différents échantillons de poussière du second hiver. W_2Ling_1 et W_2Ling_2 ont été déposées successivement au même endroit de l'étable, tout comme W_2Boite_1 et W_2Boite_2 . La colonne W_2Ling correspond à la compilation des échantillons W_2Ling_1 et W_2Ling_2 , ce qui correspond également à la période de dépôt de W_2Boite_1 (* : $p < 0.001$).

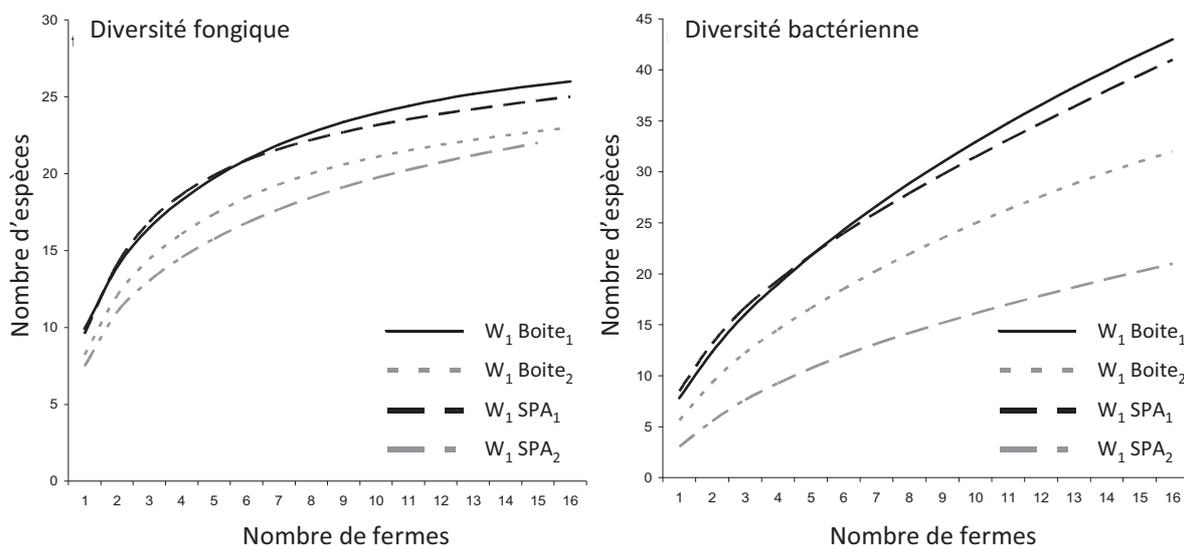


Figure 47 : Courbes d'accumulation des échantillons de poussières sédimentées pour le premier hiver. Effet d'une conservation de la poussière pendant trois mois à température ambiante.

Légende: les échantillons analysés immédiatement après le prélèvement sont figurés en noir, ceux analysés après trois mois de conservation à température ambiante sont représentés en gris.

3/ Conditions de conservation de la poussière

a/ poussière sédimentée dans une boîte ou ramassée à la spatule

Une conservation des échantillons de poussière sédimentée pendant trois mois à température ambiante entraîne une diminution significative de la diversité microbienne (figure 47).

En particulier, le tableau VIII nous montre une diminution significative des *Cladosporium sp.* ($p=0.035$), des levures ($p=0.015$) et des cocci à Gram positif ($p=0.005$) dans la boîte en plastique conservée pendant trois mois, ainsi qu'une diminution significative des *Cladosporium sp.* ($p=0.001$), des levures ($p=0.005$) et des bacilles à Gram négatif ($p=0.019$) dans les poussières récoltées à la spatule et conservées pendant trois mois.

b/ poussière sédimentée sur une lingette

Les prélèvements A, B et C d'un côté et D, E et F de l'autre, correspondent à trois prélèvements effectués en parallèle dans deux étables. Ces trois prélèvements diffèrent un peu au niveau de la contamination et de la diversité microbienne comme montré sur la figure 48. Cependant, le calcul d'un coefficient de corrélation entre les six types de prélèvements, tous types de conservation confondus, montre qu'il y a peu de différences entre les deux étables (tableau IX). Ainsi, on remarque que les échantillons ont une diversité partagée entre 74% et 97% à l'intérieur d'une même ferme et une diversité partagée entre 77% et 98% entre deux étables.

De plus, comme montré par les figures 49 et 50, le fait de conserver les prélèvements sous différentes conditions peut entraîner une variation dans leur composition microbienne. Afin de comparer les compositions microbiennes en fonction de la méthode de conservation, des coefficients de corrélation (tableau X) ont été calculés, l'analyse immédiate tenant lieu de référence pour étudier les trois méthodes de conservation (5 jours à température ambiante, 5 jours à -20°C , et 5 jours à température ambiante suivis par 35 jours à -20°C).

Une analyse de la diversité microbienne des différents prélèvements de poussière réalisés et comparés a donc été réalisée pour valider les différentes méthodes de prélèvement et pour démontrer la reproductibilité de la méthode par poussière sédimentée. Les identifications microbiennes réalisées dans le but de valider les méthodes de récolte vont à présent permettre de caractériser la diversité microbienne de l'environnement fermier. Dans cette partie, l'étude de la diversité microbienne a été réalisée par des méthodes de culture mais également par des méthodes de clonage pour les bactéries.

Tableau VIII : comparaison par un test de student des quantités moyennes de micro-organismes de chacun des 12 taxa microbiens pour les échantillons de poussière analysés immédiatement après prélèvement et de ceux analysés après trois mois de conservation à température ambiante et comparaison de la contamination de l'air avant et après affouragement.

	Poussière aéroportée		Poussière sédimentée dans une boîte en plastique		Poussière sédimentée récoltée à la spatule	
	z-value (Après travail comparé à Avant travail)	p-value	z-value (Poussière de trois mois comparée à Poussière fraîche)	p-value	z-value (Poussière de trois mois comparée à Poussière fraîche)	p-value
Groupe des <i>Mucorales</i>	0.34	0.733	-0.59	0.552	-1.47	0.139
Groupe des <i>Cladosporiums</i>	2.87	0.004	-2.10	0.035	-3.25	0.001
<i>Wallemia sebi</i>	1.23	0.215	-1.61	0.106	-1.65	0.097
Groupe des <i>Eurotiums/Aspergillus</i>	2.89	0.004	-0.51	0.605	0.39	0.690
Groupe des autres champignons	1.01	0.312	-0.72	0.469	-1.44	0.147
Groupe des levures	-1.28	0.199	-2.43	0.015	-2.77	0.005
Groupe des Bacilles à Gram négatif	0.15	0.876	-1.89	0.058	-2.34	0.019
Groupe des Bacilles à Gram positif	-0.25	0.796	0.18	0.856	-0.02	0.977
Groupe des Cocci à Gram négatif	/	/	/	/	/	/
Groupe des Cocci à Gram positif	0.38	0.698	-2.76	0.005	-1.02	0.306
Groupe des Actinobactéries mésophiles	1.68	0.093	-1.55	0.120	-1.41	0.155
Groupe des Actinobactéries thermophiles	0.54	0.585	-1.55	0.120	-0.68	0.495

Légende: les valeurs moyennes des 16 fermes pour chacun des 12 taxa microbiens obtenues par analyse immédiate ou par analyse après trois mois de conservation à température ambiante ont été comparées par un test de student. Les valeurs de z obtenues ont été reportées dans le tableau ainsi que la valeur de p. Les échantillons d'air avant et après travail ont également été comparés par le même test.

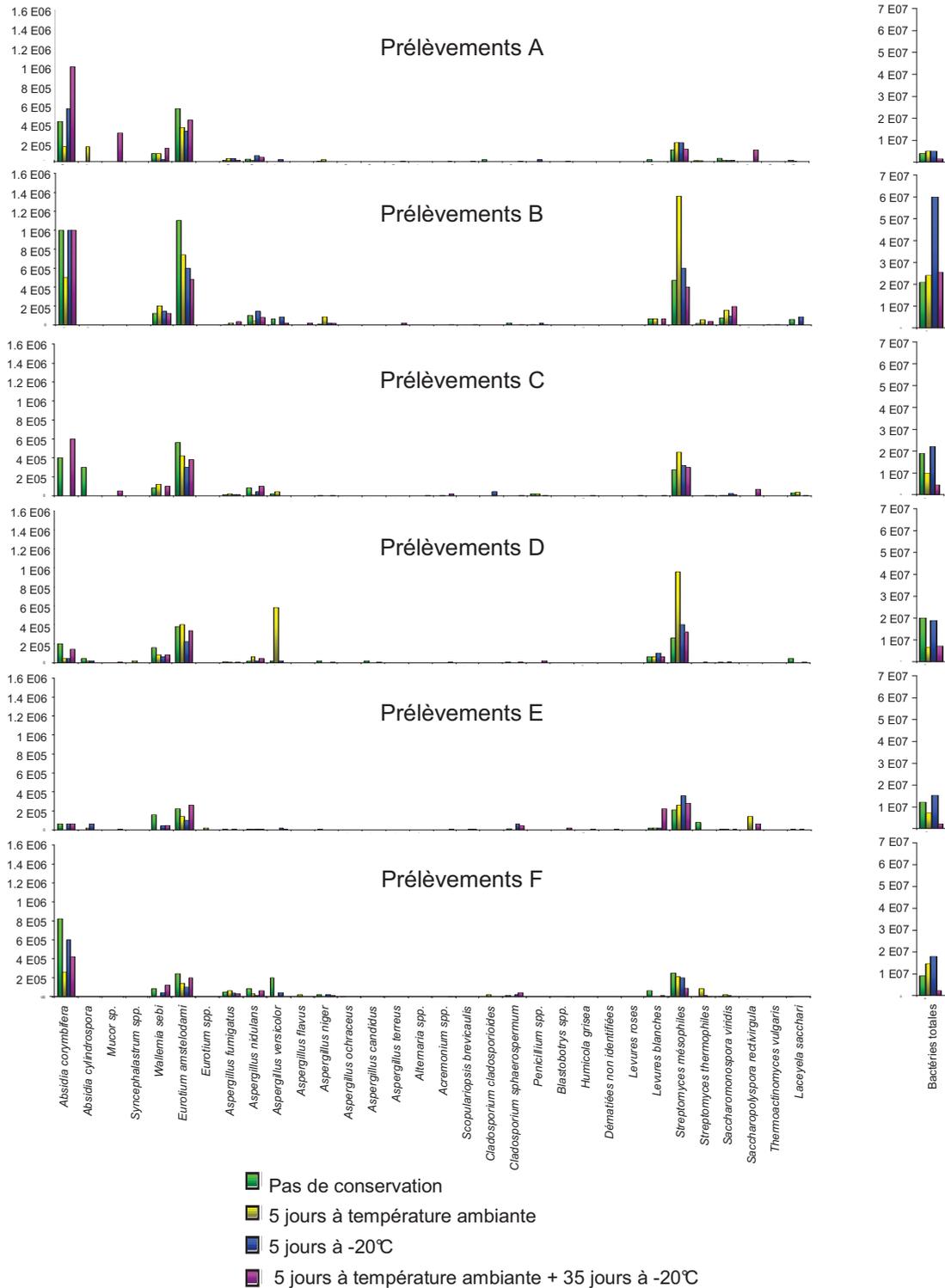


Figure 48 : profils microbiens des 6 prélèvements effectués en parallèle dans deux étables en fonction du mode de conservation.

Légende: sur la partie gauche du graphique ont été représentés les taxa microbiens pour lesquels la quantité microbienne observée en UFC/lingette est sensiblement identique. Les bactéries cultivées sur Mueller-Hinton étant plus nombreuses, elles ont été représentées à part. Les quatre méthodes de conservation des lingettes ont été représentées de quatre couleurs différentes.

Tableau IX : coefficients de corrélation appariés en fonction du mode de conservation des lingettes de poussière.

		Prélèvement				
		A	B	C	D	E
Prélèvement	A	1				
	B	0.89*	1			
	C	0.93*	0.91*	1		
	D	0.88*	0.89*	0.98*	1	
	E	0.93*	0.91*	0.99*	0.97*	1
	F	0.97*	0.92*	0.93*	0.86*	0.94*

Légende: A, B, C, D, E et F correspondent à six prélèvements de poussière déposée sur une lingette électrostatique dans 2 étables de Franche-Comté (A, B et C pour la première étable et D, E et F pour la seconde) (* : $p < 0.05$).

Tableau X : coefficients de corrélation des prélèvements en fonction du mode de conservation des lingettes.

		Conservation			
		aucune	5 jours à température ambiante	5 jours à -20°C	5 jours à température ambiante + 35 jours à -20°C
Conservation	aucune	1			
	5 jours à température ambiante	0.87*	1		
	5 jours à -20°C	0.89*	0.96*	1	
	5 jours à température ambiante + 35 jours à -20°C	0.79*	0.88*	0.96*	1

Légende: les coefficients de corrélation appariés ont été calculés à partir de chacune des six valeurs pour chaque taxon microbien (* : $p < 0.05$).

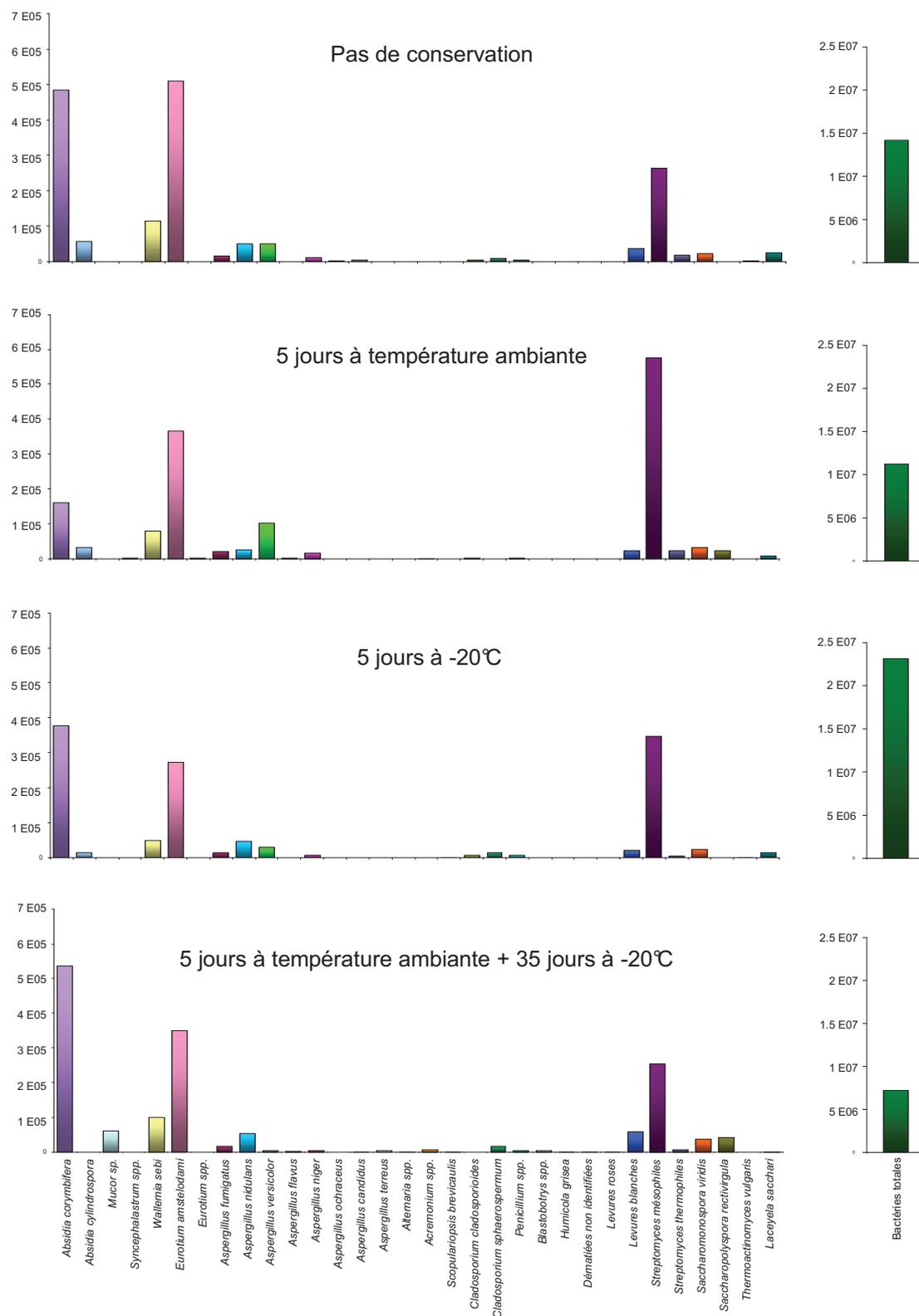


Figure 49 : profils microbiens en fonction du mode de conservation des lingettes de poussière.

Légende: sur la partie gauche du graphique ont été représentés les taxa microbiens pour lesquels la quantité microbienne observée en UFC/lingette est sensiblement identique. Les bactéries cultivées sur Mueller-Hinton étant plus nombreuses, elles ont été représentées à part. Les valeurs moyennes obtenues pour les 6 prélèvements ont été représentées pour chaque méthode de conservation.

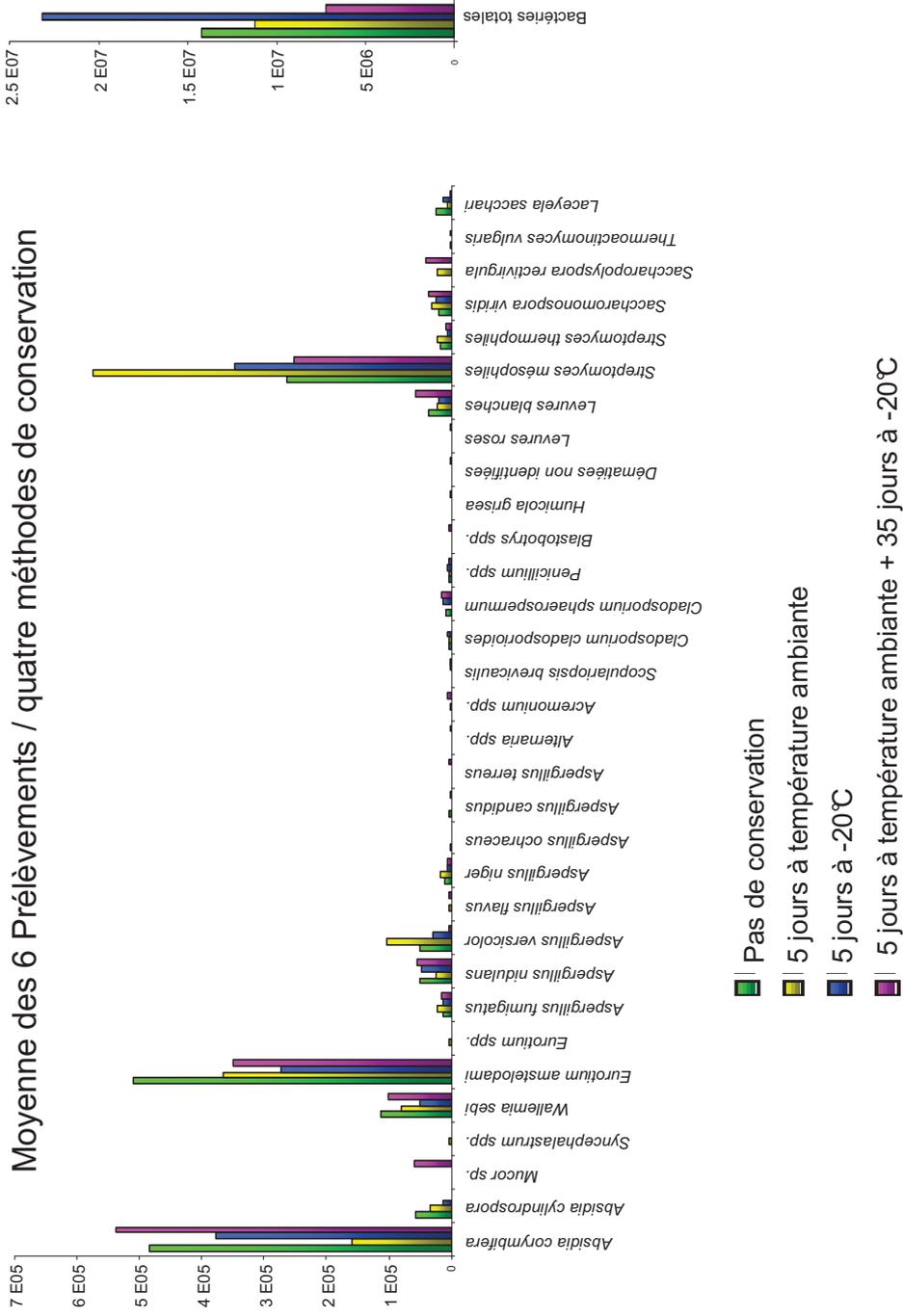


Figure 50 : représentation graphique moyenne de la contamination microbienne des six prélèvements en fonction du mode de conservation.

Légende: sur la partie gauche du graphique ont été représentés les taxa microbiens pour lesquels la quantité microbienne observée en UFC/lingette est sensiblement identique. Les bactéries cultivées sur Mueller-Hinton étant plus nombreuses, elles ont été représentées à part. Les valeurs moyennes obtenues pour les six prélèvements sont figurées en fonction du mode de conservation.

4/ comparaison de deux approches (avec ou sans étape de culture) dans l'inventaire microbien de la poussière des fermes franc-comtoises

a/ identification micro et macroscopique par culture

Un total de 204 colonies bactériennes a été réisolé sur Mueller Hinton à partir des cultures des ensemencements d'air (n=32) et de poussière sédimentée (n=16), réalisées sur les milieux Drigalski et Mueller Hinton.

Les extraits d'ADN correspondants ont été analysés par PCR d'ARN 16S et par séquençage. Ainsi, nous avons pu identifier 80 espèces bactériennes appartenant à 37 genres différents. Il est à noter que, dans le cas présent, toutes les bactéries identifiées à partir de la culture sur milieu Drigalski l'ont également été à partir de la culture sur Mueller-Hinton.

Sur milieux Difco et R8, 7 *taxa* d'actinomycètes ont pu être distingués parmi les différentes colonies.

Les colonies obtenues à partir des cultures sur DG18 et sur Malt agar ont mené à l'identification de 32 *taxa* fongiques (29 moisissures et 3 levures).

La figure 51 présente une liste alphabétique de ces 87 *taxa* bactériens et 32 *taxa* fongiques obtenus par culture ainsi que le nombre d'échantillons d'air et de poussière positifs pour chacun d'entre eux. Le tableau XI regroupe les *taxa* microbiens identifiés dans plus de 10% du total des prélèvements, ainsi que la moyenne des colonies microbiennes correspondant à chaque type d'échantillons.

b/ identification bactérienne par approche métagénomique

Une séquence d'une partie de l'ARN 16S a été analysée pour un total de 266 clones obtenus à partir de l'extraction d'ADN total de trois échantillons de poussière sédimentée (n=44 pour l'échantillon de la ferme 1 ; n=52 pour l'échantillon de la ferme 2 ; n=170 pour l'échantillon de la ferme 3).

Le séquençage de ces 266 clones a abouti à l'identification, au niveau du genre ou de l'espèce, de 220 d'entre eux (figure 52). Un arbre phylogénétique indiquant les relations entre les clones identifiés est montré en figure 53. Les séquences des 46 clones restants correspondent à de l'ADN bactérien non identifiable sur la base des séquences déjà

disponibles dans la banque NCBI. Cependant, grâce à ces mêmes séquences, la plupart d'entre eux ont pu être identifiés au niveau de la Classe (ce qui est le cas pour les Classes Actinobacteria et Firmicutes) ou de la Famille (Clostridiales, Lactobacillales) (Tableau XIII).

L'absence de plateau dans les courbes d'accumulation d'espèces montre que le nombre maximum de *taxa* bactériens par échantillon est loin d'être atteint, même après l'identification de 170 clones (Figure 54.).

De plus, comme cela est indiqué par le tableau XII, seule une faible proportion des genres bactériens révélés par clonage direct a également été isolée par culture dans les mêmes échantillons (*Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Saccharopolyspora* et *Staphylococcus*) ou dans les échantillons d'air correspondants (*Clavibacter*, *Microbacterium* et *Rathayibacter*).

Afin de caractériser au mieux l'environnement dans lequel les agriculteurs et leurs enfants évoluent, nous avons également étudié la flore microbienne présente dans divers types de substrats. Ces résultats donnent non seulement une information sur l'environnement de contact des agriculteurs mais également sur les sources potentielles de ces différents micro-organismes. Dans un premier temps, étant donné la charge de travail découlant du clonage direct des produits de PCR, nous avons travaillé sur les bactéries et champignons cultivables sur un large panel de milieux.

BACTERIES	BACTERIES	CHAMPIGNONS
<i>Acinetobacter</i> sp. (3 ; 1 ; 0)	<i>Pantoea</i> sp. (1 ; 1 ; 4)	<i>Absidia corymbifera</i> (5 ; 8 ; 16)
<i>Actinobacterium</i> sp. (0 ; 0 ; 2)	<i>Pedobacter koreensis</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Absidia cylindrospora</i> (1 ; 1 ; 11)
Actinomycètes mésophiles (3 ; 5 ; 8)	<i>Pedobacter</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Acremonium</i> spp. (1 ; 1 ; 0)
Actinomycètes thermophiles (1 ; 1 ; 0)	<i>Planomicrobium</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Alternaria</i> spp. (3 ; 2 ; 3)
<i>Aerococcus</i> sp. (1 ; 1 ; 1)	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> (0 ; 2 ; 0)	<i>Aspergillus candidus</i> (0 ; 2 ; 2)
<i>Aerococcus viridans</i> (4 ; 2 ; 1)	<i>Pseudoclavibacter</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Aspergillus flavus</i> (0 ; 0 ; 1)
<i>Alcaligenes</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (4 ; 5 ; 13)
<i>Arthrobacter agilis</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Pseudomonas graminis</i> (0 ; 0 ; 2)	<i>Aspergillus glaucus</i> (6 ; 6 ; 3)
<i>Bacillus cereus</i> (0 ; 2 ; 0)	<i>Pseudomonas putida</i> (1 ; 0 ; 1)	<i>Aspergillus nidulans</i> (3 ; 4 ; 13)
<i>Bacillus licheniformis</i> (1 ; 1 ; 1)	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (0 ; 0 ; 3)	<i>Aspergillus niger</i> (2 ; 3 ; 10)
<i>Bacillus macroides</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Pseudomonas</i> sp. (0 ; 0 ; 3)	<i>Aspergillus ochraceus</i> (1 ; 3 ; 4)
<i>Bacillus megaterium</i> (1 ; 1 ; 0)	<i>Psychrobacter cryohalodentis</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Aspergillus terreus</i> (1 ; 1 ; 2)
<i>Bacillus mycooides</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Psychrobacter faecalis</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Aspergillus versicolor</i> (4 ; 5 ; 3)
<i>Bacillus pumilus</i> (0 ; 2 ; 2)	<i>Psychrobacter psychrophilus</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Aureobasidium pullulans</i> (0 ; 1 ; 2)
<i>Bacillus simplex</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Psychrobacter</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (7 ; 10 ; 8)
<i>Bacillus</i> sp. (5 ; 1 ; 1)	<i>Rathayibacter</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (5 ; 1 ; 1)
<i>Bacillus subtilis</i> (0 ; 1 ; 1)	<i>Rathayibacter tritici</i> (1 ; 0 ; 0)	Dématiées non-identifiées (1 ; 0 ; 0)
<i>Brachybacterium</i> sp. (1 ; 1 ; 0)	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (0 ; 1 ; 1)	<i>Eurotium amstelodami</i> (15 ; 15 ; 16)
<i>Brevibacterium linens</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Rothia</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Eurotium umbrosum</i> (4 ; 9 ; 4)
<i>Chryseobacterium</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	<i>Saccharomonospora viroidis</i> (0 ; 2 ; 15)	<i>Fusarium</i> spp. (0 ; 0 ; 1)
<i>Clavibacter michiganensis</i> (2 ; 0 ; 1)	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> (2 ; 0 ; 8)	<i>Humicola grisea</i> (0 ; 2 ; 6)
<i>Clavibacter</i> sp. (1 ; 1 ; 0)	<i>Sphingomonas</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	Levures blanches (9 ; 5 ; 4)
<i>Corynebacterium casei</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (2 ; 1 ; 0)	Levures rouges (6 ; 4 ; 3)
<i>Corynebacterium</i> sp. (2 ; 1 ; 1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2 ; 0 ; 0)	Moniliales non-identifiées (0 ; 2 ; 3)
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (4 ; 3 ; 2)	<i>Staphylococcus equorum</i> (5 ; 5 ; 6)	<i>Mucor</i> sp. (1 ; 1 ; 1)
<i>Curtobacterium</i> sp. (2 ; 0 ; 0)	<i>Staphylococcus fleurettii</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Penicillium</i> spp. (12 ; 12 ; 13)
<i>Enterobacter amnigenus</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (1 ; 0 ; 0)	<i>Rhizopus</i> sp. (1 ; 1 ; 6)
<i>Enterobacter</i> sp. (1 ; 0 ; 0)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1 ; 2 ; 0)	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (0 ; 1 ; 0)
<i>Erwinia persicina</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Staphylococcus pulvereri</i> (0 ; 3 ; 2)	<i>Scopulariopsis candida</i> (1 ; 0 ; 0)
<i>Kocuria carniphila</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (0 ; 5 ; 0)	<i>Syncephalastrum</i> spp. (0 ; 1 ; 0)
<i>Kocuria palustris</i> (0 ; 2 ; 0)	<i>Staphylococcus sciuri</i> (0 ; 1 ; 0)	<i>Tricosporon</i> spp. (1 ; 0 ; 0)
<i>Kocuria</i> sp. (0 ; 1 ; 0)	<i>Staphylococcus</i> sp. (9 ; 9 ; 2)	<i>Wallemia sebi</i> (8 ; 11 ; 9)
<i>Massilia</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	<i>Staphylococcus succinus</i> (2 ; 0 ; 2)	
<i>Microbacterium</i> sp. (2 ; 0 ; 1)	<i>Staphylococcus warneri</i> (0 ; 1 ; 0)	
<i>Microbacterium testaceum</i> (1 ; 2 ; 0)	<i>Staphylococcus xylosum</i> (7 ; 7 ; 5)	
<i>Micrococcus luteus</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (0 ; 1 ; 0)	
<i>Micrococcus</i> sp. (1 ; 1 ; 0)	<i>Streptomyces flavofungini</i> (0 ; 0 ; 1)	
<i>Nocardioopsis</i> sp. (0 ; 1 ; 0)	<i>Streptomyces</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> (1 ; 0 ; 0)	Streptomycètes mésophiles (14 ; 14 ; 16)	
<i>Ochrobactrum</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	Streptomycètes thermophiles (3 ; 3 ; 12)	
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (0 ; 0 ; 1)	<i>Terrabacter</i> sp. (0 ; 0 ; 1)	
<i>Paenibacillus</i> sp. (2 ; 1 ; 0)	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (1 ; 1 ; 1)	
<i>Pantoea agglomerans</i> (1 ; 4 ; 5)	<i>Xanthomonas</i> sp. (0 ; 1 ; 0)	
<i>Pantoea ananatis</i> (0 ; 0 ; 2)		

Figure 51 : liste alphabétique et fréquence des différents *taxa* microbiens identifiés par culture dans les 3 types d'échantillons (air avant et après travail, et poussière sédimentée).

Légende: Le groupe des bactéries correspond aux micro-organismes identifiés sur milieu Mueller-Hinton, Drigalski, Difco et R8. Le groupe Champignons comprend les micro-organismes qui se sont développés sur Malt Agar et sur DG18. Entre parenthèses figurent les nombres d'échantillons positifs parmi les échantillons d'air avant travail, d'air après travail et de poussière sédimentée).

Tableau XI : Quantités moyennes dans les trois types de prélèvements des espèces microbiennes les plus fréquentes (>10% du total des prélèvements).

	Poussière sédimentée			Air-Avant travail			Air-après travail		
	moyenne arithmétique (10 ³ UFC/g)	moyenne géométrique (10 ³ UFC/g)	observations positives	moyenne arithmétique (10 ³ UFC/m ³)	moyenne géométrique (10 ³ UFC/m ³)	observations positives	moyenne arithmétique (10 ³ UFC/m ³)	moyenne géométrique (10 ³ UFC/m ³)	observations positives
<i>Eurotium amstelodami</i>	9 938	5 695	16	17	8	15	44	23	15
Streptomyces mésophiles	7 145	3 944	16	24	7	14	79	19	14
<i>Penicillium</i> spp.	2 055	1 009	13	4	3	12	7	4	12
<i>Absidia corymbifera</i>	2 026	1 207	16	1	1	5	1	1	8
<i>Wallemia sebi</i>	5 230	3 396	9	9	11	8	29	13	11
Cladosporium clado-sporioïdés	634	825	8	1	2	7	6	6	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	640	511	13	1	1	4	1	2	5
<i>Aspergillus nidulans</i>	447	329	13	0	1	3	1	3	4
<i>Aspergillus</i> sp.	768	3 250	2	11	7	9	28	8	9
<i>Staphylococcus xylosum</i>	15 600	23 500	5	7	6	7	8	10	7
Streptomyces thermophiles	71	49	12	0	1	3	7	9	3
Levures blanches	187	469	4	2	2	9	1	1	5
<i>Saccharomonospora viridis</i>	101	48	15	0	.	0	7	38	2
<i>Eurotium umbrosum</i>	267	437	4	1	3	4	7	6	9
Actinomycètes mésophiles	361	457	8	0	2	3	2	3	5
<i>Staphylococcus equorum</i>	9 623	13 000	6	11	20	5	6	14	5
<i>Aspergillus niger</i>	447	263	10	0	1	2	1	2	3
<i>Aspergillus glaucus</i>	122	466	3	2	3	6	2	2	6
<i>Absidia cylindrospora</i>	517	597	11	0	7	1	0	1	1
Levures rouges	46	165	3	0	1	6	0	1	4
<i>Aspergillus versicolor</i>	125	513	3	3	3	4	2	4	5
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	577	145	8	0	1	2	0	.	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	690	949	5	0	4	1	2	9	4
<i>Curvobacterium flaccumfaciens</i>	23 200	37 200	2	2	6	4	4	19	3
<i>Humicola grisea</i>	34	30	6	0	.	0	1	4	2
<i>Rhizopus</i> sp.	74	105	6	0	1	1	0	7	1
<i>Aspergillus ochraceus</i>	126	278	4	1	17	1	2	4	3
<i>Alternaria</i> spp.	111	270	3	0	2	3	0	1	2
<i>Bacillus</i> sp.	962	15 400	1	3	7	5	0	1	1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	34	541	1	0	1	5	0	3	1
<i>Aerococcus viridans</i>	9 643	164 000	1	2	8	4	0	2	2
<i>Pantoea</i> sp.	100	88	4	0	7	1	0	4	1
Montiacées non-identifiées	81	372	3	0	.	0	0	2	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	.	0	0	.	0	2	3	5
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	11 600	32 500	2	0	.	0	1	5	3

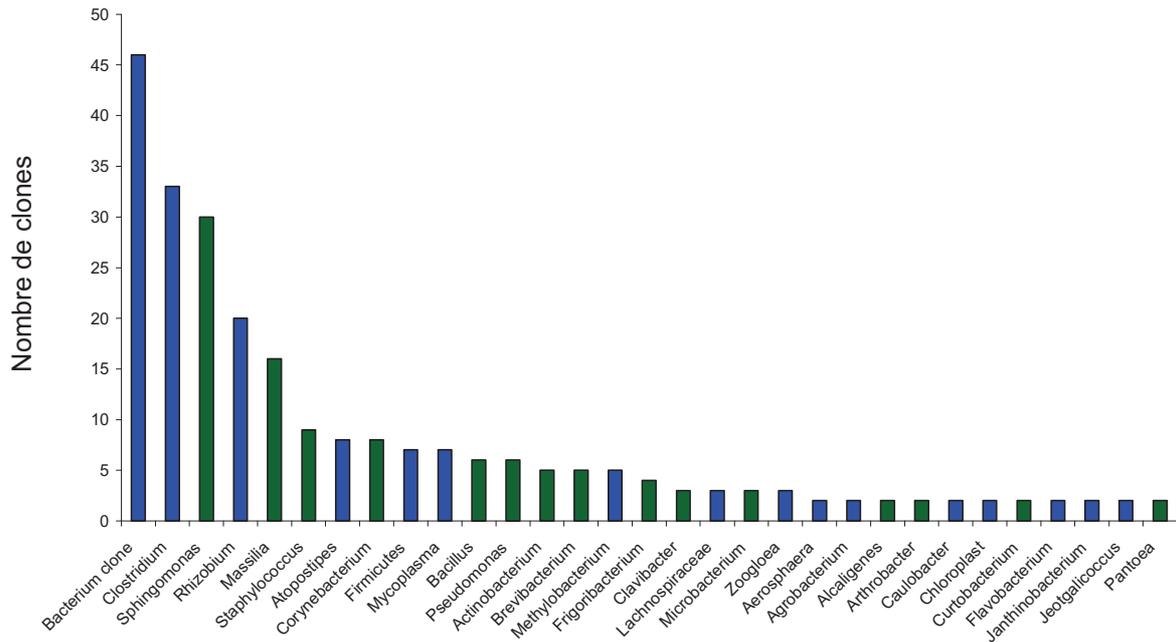
Légende: la quantité moyenne de micro-organismes est exprimée en UFC/m³ d'air et en UFC/g de poussière pour les moyennes arithmétiques et pour les moyennes géométriques. Le nombre d'échantillons positifs est indiqué pour les trois types de prélèvements.

Tableau XII : taxa bactériens identifiés par la méthode de clonage et par la méthode de culture sur les différents milieux bactériens pour les trois échantillons de poussière sélectionnés.

	Poussière sédimentée						Air					
	clones poussière			culture poussière			culture air après travail			culture air avant travail		
	f1	f4	f16	f1	f4	f16	f1	f4	f16	f1	f4	f16
<i>Actinobacterium</i>		x	x									
<i>Aerococcus</i>	x											
<i>Aeromicrobium</i>	x											
<i>Aerosphaera</i>			x									
<i>Agrobacterium</i>	x	x										
<i>Alcaligenes</i>	x		x									
<i>Arthrobacter</i>			x									
<i>Atopostipes</i>			x									
<i>Bacillus</i>			x		x		x	x			x	x
<i>Bosea</i>			x									
<i>Brevibacterium</i>			x									
<i>Brevundimonas</i>		x										
<i>Caulobacter</i>	x		x									
<i>Clavibacter</i>		x								x	x	
<i>Clostridium</i>	x	x	x									
<i>Coprococcus</i>			x									
<i>Corynebacterium</i>	x		x									
<i>Curto bacterium</i>		x		x							x	
<i>Frigoribacterium</i>	x	x	x									
<i>Janthinobacterium</i>			x									
<i>Jeotgalicoccus</i>			x									
<i>Leifsonia</i>		x										
<i>Leucobacter</i>			x									
<i>Leucostoc</i>	x											
<i>Lysobacter</i>			x									
<i>Massilia</i>	x	x	x									
<i>Mesorhizobium</i>			x									
<i>Methylobacterium</i>		x	x									
<i>Microbacterium</i>	x		x					x		x	x	
<i>Mycoplasma</i>			x									
<i>Novosphingobium</i>		x										
<i>Paenibacillus</i>						x		x				
<i>Pantoea</i>			x		x	x	x	x			x	
<i>Paracoccus</i>			x									
<i>Plantibacter</i>		x										
<i>Propionibacterium</i>		x										
<i>Pseudoclavibacter</i>										x		
<i>Pseudomonas</i>	x	x	x	x							x	
<i>Rathayibacter</i>			x								x	
<i>Rhizobium</i>	x	x	x									
<i>Rhodobacter</i>		x										
<i>Rhodococcus</i>		x										
<i>Rubrivivax</i>			x									
<i>Ruminococcus</i>			x									
<i>Saccharomonospora</i>				x	x	x		x	x			
<i>Saccharopolyspora</i>			x		x							x
<i>Sphingomonas</i>	x	x	x									
<i>Staphylococcus</i>			x	x	x	x		x	x	x	x	x
<i>Streptococcus</i>			x									
<i>Tessaracoccus</i>			x									
<i>Thermoactinomyces</i>			x									
unidentified Clostridiales			x									
unidentified Lachnospiraceae			x									
unidentified Lactobacillales			x									
<i>Variovorax</i>			x									
<i>Xylophilus</i>	x											
<i>Zoogloea</i>		x	x									

Légende: f = ferme. Les lignes grisées correspondent aux taxa bactériens identifiés par les deux méthodes.

Genres bactériens identifiés par clonage (n=282) 1/2



Genres bactériens identifiés par clonage (n=282) 2/2

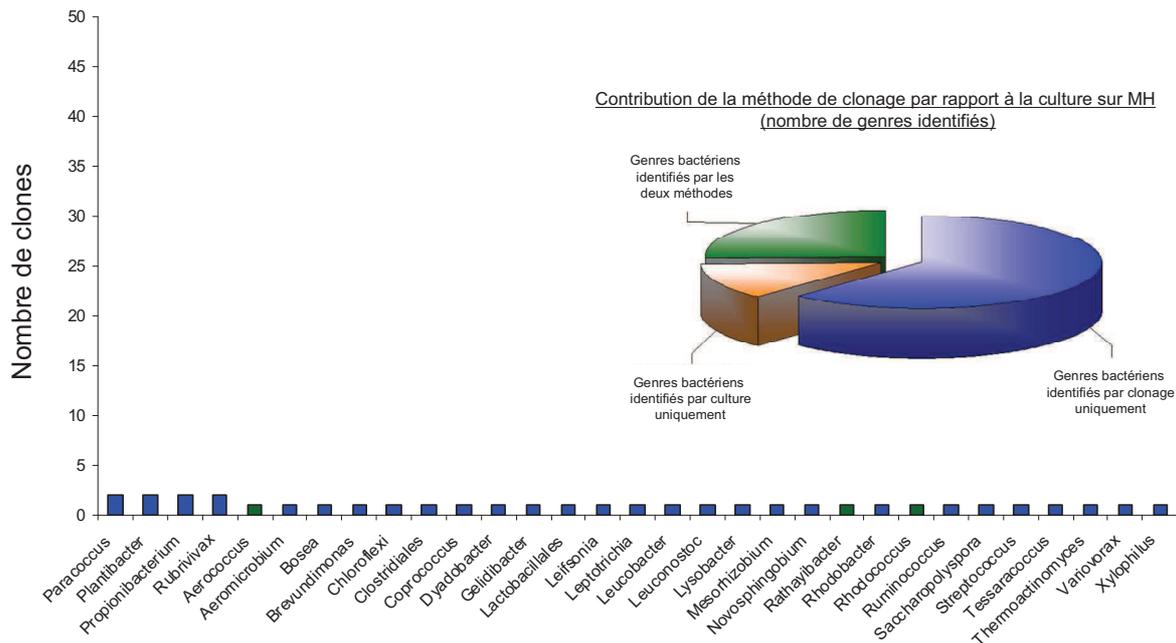


Figure 52 : fréquence d'identification des différents genres bactériens obtenus par clonage et contribution de la méthode de clonage par rapport à la culture sur MH.

Légende: les genres bactériens identifiés uniquement par les méthodes de clonage sont représentés en bleu (dans les histogrammes et dans le graphique en secteurs), les genres identifiés par les deux méthodes sont représentés en vert dans les deux types de graphiques et les genres identifiés uniquement par la culture sont représentés en orange sur le camembert. La hauteur des barres de l'histogramme correspond au nombre de clones identifiés pour chaque genre.

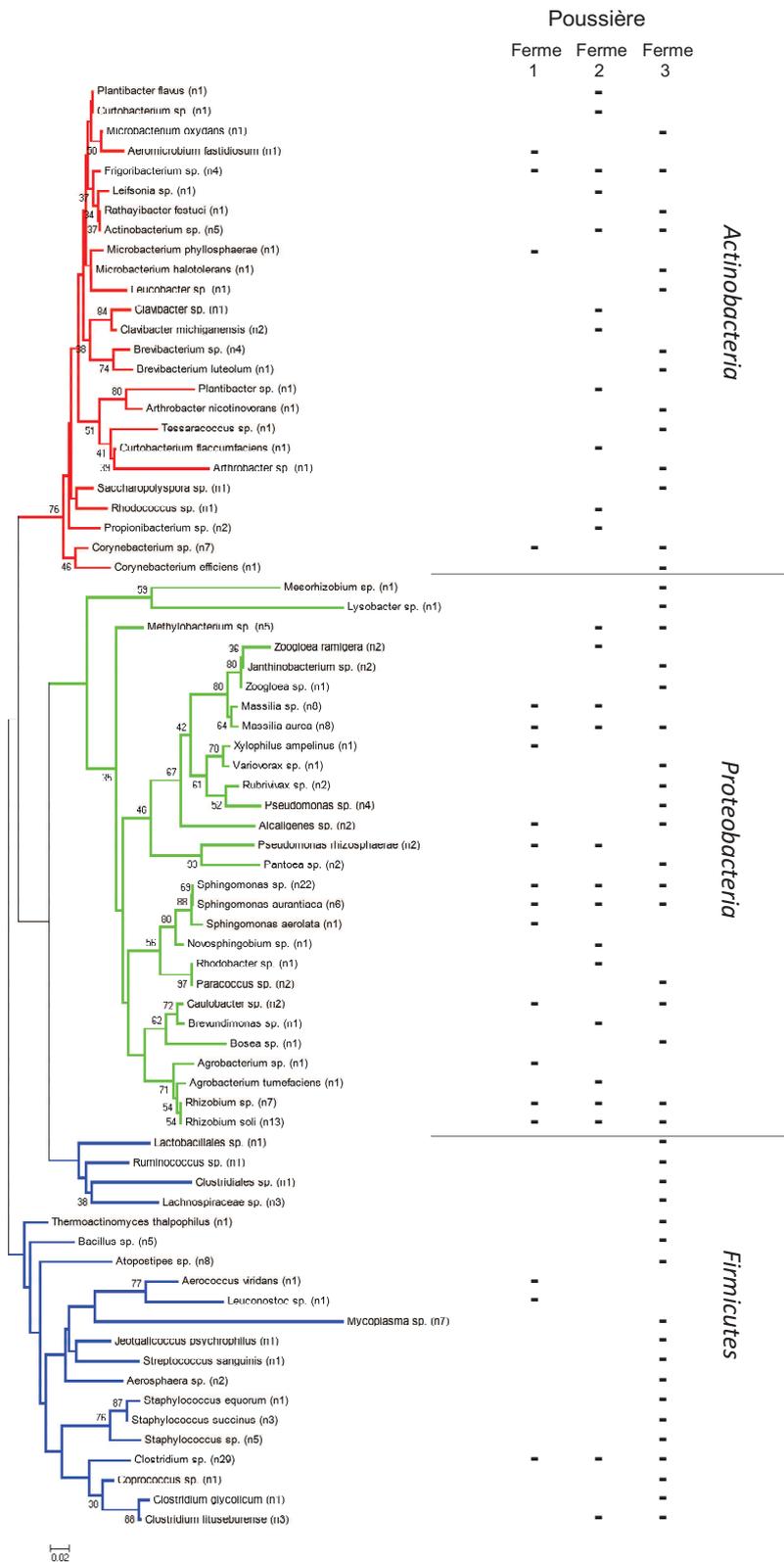


Figure 53 : Arbre phylogénétique indiquant les liens entre les différents clones identifiés.

Légende: les trois phyla correspondant aux différents clones identifiés sont représentés dans trois couleurs différentes : en rouge, les actinobactéries, en vert, les protéobactéries et en bleu, les firmicutes. Un trait horizontal en face d'une branche de l'arbre indique la présence de la bactérie en question dans le prélèvement de poussière correspondant. Les valeurs de bootstrap inférieures à 50 n'apparaissent pas sur cette figure.

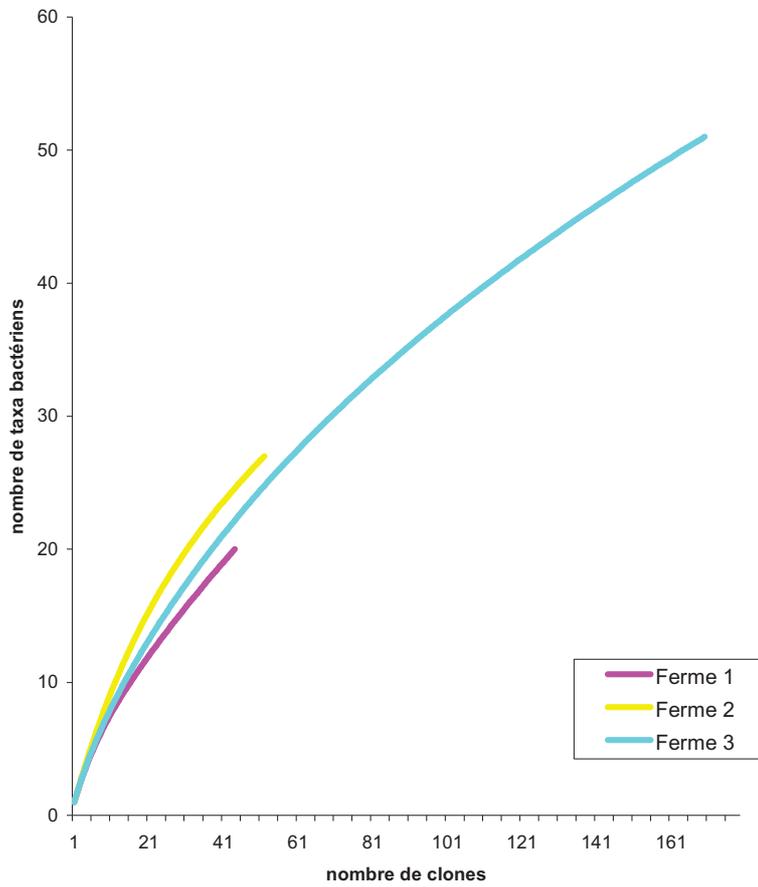


Figure 54 : courbes d'accumulation d'espèces identifiées à partir des clones pour les trois poussières analysées.

Légende: le nombre de clones identifiés est représenté en abscisse et le nombre de taxa microbiens cumulés en ordonnée. Les trois poussières apparaissent avec des figurés différents.

Tableau XIII : origine, fréquence et position taxonomique des séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage des trois poussières de ferme.

Phylum	Classe	Taxonomie		nombre de taxa	nombre de clones					
		Ordre	Famille		Ferme 1	Ferme 2	Ferme 3			
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	2	-	-	5			
			Corynebacteriaceae	2	1	-	7			
			Microbacteriaceae	13	3	9	5			
			Micrococcaceae	2	-	-	2			
			Nocardiaceae	1	-	1	-			
			Noctuidiaceae	1	1	-	-			
			Propionibacteriaceae	2	-	2	1			
			Pseudocardineae	1	-	-	1			
non-identifié	non-identifié	non-identifié	1	-	2	3				
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	1	-	-	5			
			Bacillales Incertae sedis	1	-	-	2			
			Staphylococcaceae	4	-	-	10			
			Thermoactinomyetaceae	1	-	-	1			
			Aerococcaceae	1	1	-	-			
			Carnobacteriaceae	1	-	-	8			
			Lactobacillales	1	1	-	-			
			Streptococcaceae	1	-	-	1			
			non-identifié	1	-	-	1			
			Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	3	1	3	30	
					Lachnospiraceae	3	-	-	5	
Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	1	-	-	7				
Proteobacteria	a-Proteobacteria	Rhizobiales	Caulobacteriales	Caulobacteriaceae	2	1	1	1		
				Bradyrhizobiaceae	1	-	-	1		
				Methylobacteriaceae	1	-	4	1		
				Phyllobacteriaceae	1	-	-	1		
				Rhizobiaceae	4	11	6	5		
				Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	2	-	1	1	
				Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	4	11	7	12	
					Alcaligenaceae	1	1	-	1	
			b-Proteobacteria	Burkholderiales		Comamonadaceae	1	-	-	1
						Oxalobacteriaceae	3	4	10	4
						Rubrivivax	1	-	-	2
					Enterobacterales	Enterobacteriaceae	1	-	-	2
					Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	2	-	2	2
			g-Proteobacteria	Xanthomonadales	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	3	2	1	4
	Xanthomonadaceae	1			-	-	1			

Légende: dans la colonne nombre de taxa figure le nombre de taxa pouvant être assimilés à une famille taxonomique donnée. Les tirets indiquent qu'aucun clone ne correspondait au taxon en particulier pour un échantillon de poussière en particulier.

B/ Composition de la flore microbienne dans les différents environnements étudiés

Pour les agriculteurs et leur famille, il existe trois voies possibles de contact entre les micro-organismes provenant du bioaérosol des étables et des granges. L'une implique l'inhalation lors de séjours dans la grange ou dans l'étable des particules aéroportées qui peuvent provenir du bétail ou de la manipulation de divers substrats (foin, paille), la deuxième passe par l'inhalation de particules transportées dans le domicile lors des allées et venues entre la ferme et le domicile et la dernière passe par l'ingestion de la flore microbienne par l'intermédiaire du lait recueilli dans les exploitations. La caractérisation microbienne de tous les types de substrats utilisés ainsi que des milieux probables de contact (air et lait) est donc une première étape dans la mesure de l'exposition à ces différents micro-organismes.

1/ AgriSanté, composition des différents compartiments de l'étable

a/ caractéristiques des exploitations

Les seize questionnaires correspondant aux fermes participant au projet AgriSanté (fermes franc-comtoises incluses dans l'appellation AOC Comté) ont été analysés et les fermes ont été caractérisées en fonction des habitudes des agriculteurs, de la taille du troupeau et des caractéristiques de l'étable. Les éléments principaux des fermes en général sont exposés dans le tableau XIV.

Un test de Mann et Whitney a été effectué sur les surfaces, le nombre de vaches laitières et le nombre de vaches totales (UGB = Unité de Gros Bétail) des exploitations à stabulation libre et des entravées. La surface des étables à stabulation libre est significativement supérieure à celle des étables entravées ($p = 0.02$). Le test de Mann et Whitney ne montre pas de différences significatives au niveau du nombre de vaches laitières et des UGB bien qu'il y ait une tendance à posséder un nombre supérieur de vaches dans les exploitations à stabulation libre.

Deux méthodes de stockage du foin ont été observées : onze fermes utilisaient des balles rondes tandis que cinq stockaient le foin en vrac. Les mamelles des vaches, avant la traite, étaient lavées de trois manières différentes. Dix agriculteurs utilisaient du savon, trois de l'eau et pour trois fermes, l'agriculteur ne lavait pas les mamelles avant la traite ou simplement, les

essuyait avec de la paille plus ou moins propre provenant de la litière. Les températures de conservation du lait étaient variables d'une ferme à une autre. Ainsi, sur les seize fermes, neuf conservaient le lait à 4°C pendant 24 heures (relevé du lait une seule fois par jour), trois le conservaient à 10°C et trois à 12°C. Pour une exploitation, le lait était apporté directement à la fruitière dès la fin de la traite et n'était donc pas réfrigéré. Peu de variations ont été observées au niveau des techniques de lavage de la machine à traire. Pour quatorze fermes, de l'acide nitrique était utilisé un jour sur deux, en alternance avec une solution basique d'hydroxyde de sodium. Pour les deux autres exploitations les agriculteurs ne lavaient les tuyauteries qu'avec de l'acide. Seuls deux agriculteurs avaient recours à la distribution de nourriture dans la salle de traite et dans la plupart des cas, la traite avait lieu avant la distribution de fourrage dans l'étable.

b/ composition microbienne des différents compartiments

Huit types d'échantillons ont été prélevés dans les seize fermes. Il s'agit d'échantillons d'air avant et après distribution du fourrage, d'air dans la salle de traite pendant la traite (pour les neuf fermes à stabulation libre), d'échantillons de foin distribué le jour des prélèvements d'air ainsi que de foin distribué pendant le mois précédent et de poussière sédimentée pendant un mois, de surface de trayon et de lait. Au total, 121 prélèvements environnementaux ont été récoltés et analysés. Dans un premier temps, chaque prélèvement a été mis en culture sur milieux Malt salé et DG18 (pour les champignons et levures), Difco et R8 (pour les actinomycètes) et MH, Drigalski et Slanetz (pour les bactéries). Les micro-organismes ont été classés en fonction de leurs caractéristiques macro et microscopiques. Les bactéries environnementales ont ensuite été identifiées au niveau de l'espèce par séquençage d'un fragment de l'ARN 16S.

Les fréquences d'isolement des différents *taxa* microbiens sont reportées dans le tableau XV pour chaque type de prélèvement et pour l'ensemble des fermes. Dans ce tableau, les trois *taxa* bactériens identifiés sur les milieux Mueller-Hinton et Drigalski (bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif et cocci à Gram positif) ont été détaillés jusqu'au genre grâce aux identifications par PCR d'ARN 16S. Le tableau XVI regroupe quant à lui les moyennes géométriques et les intervalles de confiance pour les échantillons positifs à chacun des 15 *taxa* microbiens.

Pour tous les échantillons confondus, cinq *taxa* microbiens ont été fréquemment identifiés: 1) les *Eurotium spp.*, qui ont été identifiés dans 93% des échantillons, 2) les actinomycètes mésophiles, présents dans 91% des échantillons, 3) les *Penicillium spp.*, identifié dans 76% des échantillons, 4) les cocci à Gram positif, observés dans 76% des prélèvements et 5) les *Aspergillus spp.*, identifiés dans 74% des échantillons. Pour l'identification des espèces bactériennes, un total de 659 extraits d'ADN obtenus à partir de cultures sur milieu Mueller-Hinton et Drigalski a été analysé par PCR et séquençage.

Ainsi, par cette méthode, les bactéries ont été classées en 136 espèces appartenant à 54 genres.

Le détail de la composition microbienne des différents compartiments obtenue par culture et identification macroscopique et microscopique pour les champignons et actinomycètes et par culture et biologie moléculaire pour les bactéries, va par la suite nous permettre de dresser une carte de l'étable sur laquelle la provenance probable des différents micro-organismes pourra être indiquée.

Tableau XIV : caractéristiques des fermes décrites par les agriculteurs dans les questionnaires.

		caractéristiques des fermes		
		étables entravées (n=7)	stabulations libres (n=9)	total étables (n=16)
surface de l'étable	min	120	370	120
	max	640	836	836
	moyenne	361	598	495
lavage des trayons	savon	3	7	10
	eau	1	2	3
	paille / rien	3	0	3
nombre de vaches	min	25	28	25
	max	45	65	65
	moyenne	33	42	38
période de traite	avant distribution de foin	5	7	12
	après distribution de foin	2	2	4
distribution de nourriture dans la salle de traite		/	2	/
température de conservation du lait	4°C	4	5	9
	10°C	1	2	3
	12°C	1	2	3
	pas de conservation	1	0	1
conservation du foin	balles rondes	5	6	11
	vrac	2	3	5

Légende: les étables entravées ont, dans un premier temps, été séparées des stabulations libres puis les caractéristiques de toutes les étables confondues sont exposées.

Tableau XV : fréquence d'identification des micro-organismes sur les différents milieux de culture

	Lait	Air avant travail	Air après travail	Air de la salle de traite	Foin du jour	Foin du mois	Poussière sédimentée	Surface de trayons
Milieu Mueller-Hinton et Drigalski								
Acinetobacter	6	3	1	1	1	1	2	6
Actinobacterium					1	3	2	
Aerococcus	2	5	2	1			2	4
Agrobacterium						1		
Alcaligenes		1						
Arthrobacter		1		1	2	1		1
Bacillus	2	6	7	3	7	8	4	5
Bordetella					1			
Brachybacterium	1	1	1	1				
Brevibacterium			1			2		1
Chryseobacterium							1	
Clavibacter		3	1		1	3	1	1
Corynebacterium	4	2	1	1			1	7
Curtobacterium		5	3	4	6	5	2	1
Deinococcus	1							
Demacoccus	1							
Enterobacter	1	1				1	1	
Enterococcus	2							
Erwinia					4		1	
Escherichia	1							
Flavobacterium						1		
Klebsiella						1		
Kocuria	2		3		1	1		3
Lactobacillus	1							
Lactococcus	2							
Leucobacter	1							
Massilia					1	1	1	
Microbacterium	3	3	2	1	1	2	1	
Micrococcus		1	1		1		1	
Nocardopsis			1					
Oceanobacillus		1						
Ochrobactrum	1						1	
Paenibacillus		2	1		3	5	1	
Pantoea	1	2	5		13	10	8	1
Paracoccus	1							
Pedobacter		1	1		1	1		
Planomicrobium		1						
Plantibacter					1			
Proteus								2
Pseudoclavibacter	3	1	2			1		
Pseudomonas	1	2		2	12	12	6	2
Psychrobacter	1	1	1		1		1	
Rathayibacter		2						
Rhodococcus			1				1	
Rothia		1						
Sphingomonas	1					1	1	
Staphylococcus	9	15	14	7	5	3	11	15
Stenotrophomonas			1		1	3		
Streptococcus	4				1			
Streptomyces							2	
Subtercola						1		
Terrabacter							1	
Variovorax					1			
Xanthomonas			1			1		
Milieu Difco actinomycetes								
Actinomycètes mésophiles	9	15	14	9	16	16	16	15
Milieu R8								
Actinomycètes thermophiles	2	4	4	3	15	15	16	12
Milieux MRS et FH								
Bacillus coagulans					2			
Bacillus sp.					1			
Lactobacillus amylovorus	1							
Lactobacillus animalis								3
Lactobacillus coryniformis ssp. torquens					1	3		7
Lactobacillus curvatus	2				1	1		1
Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis	8							
Lactobacillus johnsonii					4			1
Lactobacillus murinus								3
Lactobacillus paracasei	14					2		3
Lactobacillus paraplantarum	1							3
Lactobacillus plantarum	7				3	3		9
Lactobacillus rhamnosus	2							
Milieu Slac								
Propionibacterium acidipropionici								1
Propionibacterium freudenreichii ssp.	9				2			3
Propionibacterium jensenii	2		1					2
Milieux Malt-agar et DG18								
Alternaria spp.		3	2	3	2	4	3	1
Aspergillus spp.	4	11	12	7	13	14	16	13
Autres champignons	2	3	6	3	12	10	10	6
Cladosporium spp.	1	11	11	5	7	11	8	12
Eurotium spp.	10	15	15	9	16	16	16	16
Levures blanches	14	9	5	3	10	8	4	14
Levures roses	1	6	4	1	8	8	3	7
Mucorales spp.	2	7	9	5	12	15	16	14
Penicillium spp.	10	12	12	5	14	13	13	13
Wallemia sebi	2	8	11	7	10	12	9	9

Tableau XVI : moyennes géométriques et intervalles de confiance pour les 15 taxa microbiens dans les huit types d'échantillons.

	Lait		Air Avant travail		Air Après travail		Air Salle de traite		Foin du jour		Fion du mois		Poussière sédimentée		Surface de trayons				
	N	MG	IC-S95	IC-195/1000 -	IC-S95/1000 -	IC-195/1000 -	IC-S95/1000 -	IC-195/1000 -	IC-S95/1000 -	IC-195/1000 -	IC-S95/1000 -	IC-195/1000 -	IC-S95/1000 -	IC-195/1000 -	N	MG/1000	IC-S95/1000	IC-195/1000	
Mueller-Hinton and Drigalski media																			
Bacilles à Gram négatif	12	210	(65-834)	(3,3-21,3)	8	6,3	(1,6-24,4)	3	4,2	(0,3-52,9)	14	975,4	(234,3-4060)	10	3172,6	(359,3-28000)	9	1,6	(0,2-17,5)
Bacilles à Gram positif	11	372	(116-1173)	(11,3-31,8)	11	15,5	(5,6-43,4)	7	18,9	(6,1-56,4)	15	1012,8	(297,9-3443,4)	9	13000,0	(4079,4-1100)	9	7,8	(0,8-75,2)
Cocco à Gram positif	13	733	(257-2089)	(6,8-37,1)	14	22,5	(6,2-61,3)	8	20,2	(9,4-5,3)	8	427,0	(68,7-2654,6)	13	16900,0	(6384,6-44900)	15	10,5	(2,2-49,4)
Total bactéries sur MH et Drigalski	16	1 855	(1089-3178)	(30,4-75,1)	16	44,8	(23,1-86,8)	9	36,7	(17-79,1)	16	4398,7	(1721,2-11200)	14	32400,0	(10800-97300)	16	13,6	(2,5-76)
Milieu Difco actinomycètes																			
Actinomycètes mésophiles	9	8	(5-15)	(2,3-16,2)	14	19,2	(4,9-75)	9	8,0	(2,5-25)	16	2,9	(1,1-7,4)	16	4372,8	(2338,6-8176,4)	15	1,6	(0,7-3,6)
Milieu R8																			
Actinomycètes thermophiles	2	10	(1-129)	(0,3-5,6)	4	8,3	(0,1-565,3)	3	2,0	(0,1-53,1)	15	1,7	(0,9-3,1)	16	182,3	(73,6-451,5)	12	0,1	(0,1-0,3)
Milieux Malt-agar et DG18																			
Alternaria spp.	0	-	(-)	(0,1-18,5)	3	1,6	(0,7-6,8)	3	0,7	(0,7-0,7)	2	1,0	(0,1-20000)	4	0,8	(0,1-16,6)	1	0,0	(-)
Aspergillus spp.	4	5	(3-9)	(1,6-10,2)	12	4,8	(1,9-12,2)	7	3,0	(0,8-11,5)	13	1,9	(0,9-4)	14	3,4	(1,6-8,1)	13	0,2	(0,1-0,6)
Autres champignons	2	11	(0-925)	(0,9-3,1)	6	2,2	(0,7-7,3)	3	1,9	(0,8-4,5)	12	3,8	(1,1-15,3)	10	4,6	(0,7-28,9)	6	0,2	(0,1-0,8)
Cladosporium spp.	1	4	(-)	(0,9-3,1)	11	5,6	(2,9-11,4)	5	2,4	(0,3-16,1)	7	5,1	(0,9-29,6)	11	3,5	(1,5-38,5)	12	0,1	(0,1-0,3)
Eurotium spp.	10	7	(3-13)	(3,9-17,4)	15	27,2	(12,3-60,1)	9	7,6	(3-19,7)	16	22,1	(6,2-78,5)	16	32,9	(313,6-2566,3)	16	0,8	(0,4-1,5)
Levures blanches	14	56	(28-107)	(1-4,4)	5	1,3	(0,4-4)	3	0,7	(0,7-0,7)	10	3,3	(0,9-17,2)	8	2,8	(0,5-16,9)	14	0,6	(0,2-1,5)
Levures roses	1	4	(-)	(0,6-1,2)	4	1,2	(0,4-3,9)	1	2,7	(-)	8	2,9	(0,3-18,1)	4	488,9	(67,5-3256,1)	7	0,0	(0,0-1)
Mucorales spp.	2	4	(4-4)	(0,7-5,3)	9	1,8	(1-3,4)	5	1,4	(0,5-3,5)	12	1,2	(0,4-3,7)	15	1,3	(0,7-2,7)	14	0,2	(0,1-0,4)
Penicillium spp.	10	10	(3-28)	(1,4-5,7)	12	4,3	(1,8-10,3)	5	4,6	(0,6-34,7)	14	4,1	(1,1-10,4)	13	1009,3	(442,1-2304,4)	13	0,4	(0,1-1,6)
Walleria sebi	2	12	(0-13900000)	(4,4-25)	11	13,0	(4,2-39,8)	7	3,2	(1,5-6,7)	10	64,6	(7,7-539,2)	12	58,1	(1168,3-9861,5)	9	0,2	(0,0-7)
Total champignons	15	82	(42-161)	(12,5-50,2)	16	59,1	(28,9-120,9)	9	25,3	(11,7-54,7)	16	192,1	(75,2-490,9)	16	265,2	(151,4-464,6)	16	4,2	(2,3-7,6)

Légende: Les moyennes géométriques sont exprimées en UFC/m³ d'air, en UFC/ g de foin ou de poussière, en UFC/mL de lait ou encore en UFC/lingette pour les trayons. Les quantités microbiennes des bactéries utiles à la fabrication des fromages ne sont pas connues puisque l'identification résulte d'une méthode d'enrichissement.

2/ AgriSanté, flux microbiens de l'étable vers le lait

a/ composition des laits

Soixante-deux extraits d'ADN bactériens obtenus à partir de culture de lait sur Mueller-Hinton et Drigalski et 293 extraits d'ADN récupérés à partir des milieux FH, MRS et Slac ont été analysés.

Quarante-sept espèces bactériennes correspondant à 25 genres ont pu être identifiées par les méthodes de biologie moléculaire (PCR/séquençage ou PCR spécifiques d'une espèce) (Tableau XV). Les méthodes de culture ont abouti à l'identification de neuf espèces bactériennes utiles à la fabrication des fromages (sur les milieux sélectifs), de neuf *taxa* fongiques (milieux DG18 et Malt+sel) et de deux *taxa* bactériens (milieux difco et R8), soit un total de cinquante-huit *taxa* microbiens identifiés dans les prélèvements de lait (tableau XV).

La plupart des bactéries appartiennent au groupe des bacilles à Gram positif, qui inclut les bactéries lactiques acides (*Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*), les Propionibactéries, les bactéries corynéformes (*Brachybacterium*, *Corynebacterium*, *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Leucobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoclavibacter*) et les Staphylocoques à coagulase négative (*S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*). Les autres bactéries à Gram positif (*Bacillus*, *Deinococcus*, *S. aureus*, *Streptococcus*) n'étaient présentes que dans une ou deux fermes. Des bacilles à Gram négatif (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Sphingomonas*) ont été assez rarement identifiés (dans un seul lait, sauf pour *Acinetobacter* qui a été retrouvé dans quatre laits). La variabilité dans la composition microbienne du lait est importante et la plupart des genres bactériens cultivés sur Mueller-Hinton et identifiés dans ce type de prélèvement sont, au mieux, identifiés dans 56% des échantillons (*Staphylococcus spp.*).

Peu de bactéries environnementales ont été identifiées dans plus d'un prélèvement sur quatre (*Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*). Cependant, certaines bactéries lactiques acides sont présentes en grande quantité dans un ou deux échantillons de

lait. Par exemple, la moyenne géométrique de *Lactococcus lactis*, identifié dans seulement deux prélèvements de lait, est de 2 191 UFC par mL de lait et *Enterococcus faecalis*, présent dans un seul prélèvement de lait (chez un agriculteur qui utilisait un produit pour le lavage des trayons), avait alors une concentration de près de 3 000 UFC par mL. Les bactéries d'intérêt technologique comme *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei* et *Propionibacterium freudenreidrii* ont été identifiées dans 50 à 88% des échantillons de lait.

Les champignons, et plus particulièrement les levures ont été fréquemment identifiés dans le lait. Quatre des neuf *taxa* fongiques ont été identifiés dans au moins quatre échantillons de lait (des levures blanches ont été retrouvées dans quatorze échantillons de lait sur seize, des *Penicillium spp.* et des *Eurotium spp.* dans dix et les *Aspergillus spp.* dans quatre). La concentration des neuf *taxa* fongiques identifiés dans le lait n'est cependant pas aussi importante que celle des bactéries environnementales. Elle est par exemple de 56 UFC par mL pour les levures blanches qui constituent le taxon fongique le plus fréquemment isolé.

Il n'y a pas de différence significative entre le nombre d'espèces microbiennes présentes dans les laits issus de stabulation libre et ceux issus d'étables entravées.

La contamination microbienne globale de ces mêmes laits, en UFC par mL, a été testée et le test de rangs de Mann-Whitney a montré que les différences entre les deux types d'exploitations étaient significatives ($p = 0.04$). En effet, il y a plus de micro-organismes dans le lait provenant des étables entravées que dans celui provenant des stabulations libres.

b/ identification des flux microbiens à l'origine de la première flore du lait

Les micro-organismes identifiés dans les échantillons de lait et sur la surface des trayons sont exposés dans la figure 55. Les bactéries environnementales, trop nombreuses pour être représentées dans un graphique en barre, ont été regroupées en fonction de leur coloration de Gram. La plupart des espèces fongiques et les bactéries environnementales sont fréquemment retrouvées dans les huit types d'échantillons tandis que les bactéries utiles à la fabrication des fromages ne sont fréquemment identifiées que dans le lait et sur la surface des trayons et rarement dans les autres types d'échantillons environnementaux.

Si l'on considère la contamination du lait comme étant la conséquence de flux microbiens dans l'étable, un schéma peut être construit, pour lequel le détail des bactéries

environnementales et des bactéries d'intérêt laitier (qui ont été retrouvées dans les seize échantillons de lait) est représenté pour chaque type de prélèvement. Comme les neuf *taxa* fongiques identifiés semblent être ubiquitaires de l'environnement fermier, ils n'ont pas été représentés dans la figure 56.

Parmi les 38 espèces bactériennes identifiées dans le lait, dix-sept ont été identifiées dans au moins un autre type de prélèvement. Certaines, comme *Staphylococcus equorum*, sont retrouvées dans tous les compartiments environnementaux de l'étable. En revanche, les bactéries considérées comme utiles à la fabrication des fromages sont rarement retrouvées dans les autres compartiments de l'étable. Seul *Lactobacillus curvatus* est retrouvé dans trois compartiments autres que le lait. Un total de 21 espèces bactériennes retrouvées dans le lait n'a pas pu être identifié dans les différents environnements testés et leur origine reste inconnue à ce stade. La surface des trayons semble constituer la principale source de contamination du lait avec vingt espèces présentes à la fois sur le trayon et dans le lait. L'air de l'étable (avant et après travail), le foin et la poussière sédimentée ont une contribution non-négligeable à la contamination du lait puisque treize à seize espèces bactériennes de chacun de ces compartiments sont retrouvées dans le lait.

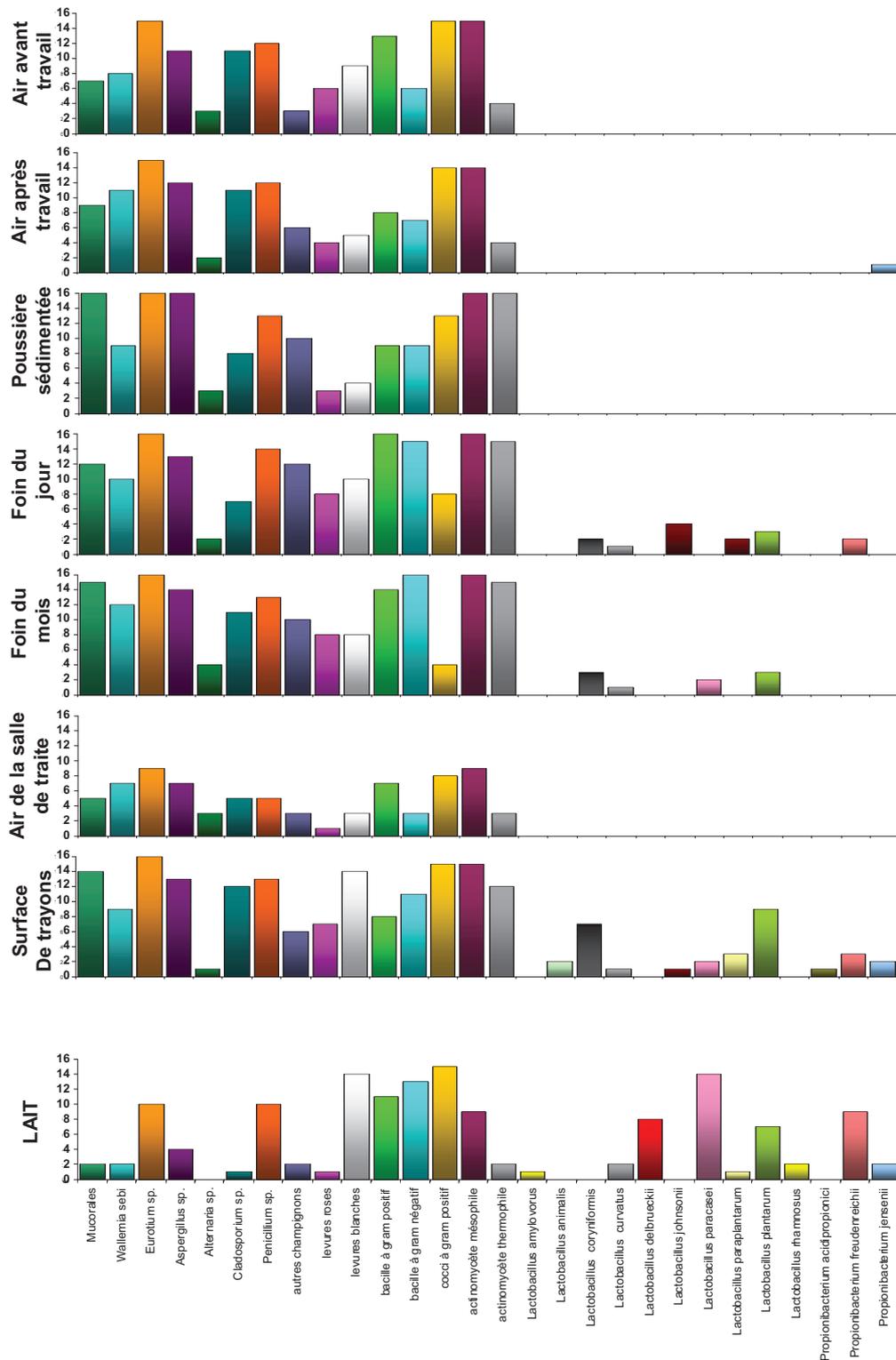


Figure 55 : Profils microbiens des huit compartiments fermiers étudiés.

Légende: les micro-organismes indiqués dans ces graphiques sont ceux qui ont été identifiés dans le lait et sur les trayons. La hauteur des histogrammes correspond au nombre de fermes dans lesquelles ces micro-organismes ont été identifiés pour chacun des compartiments.

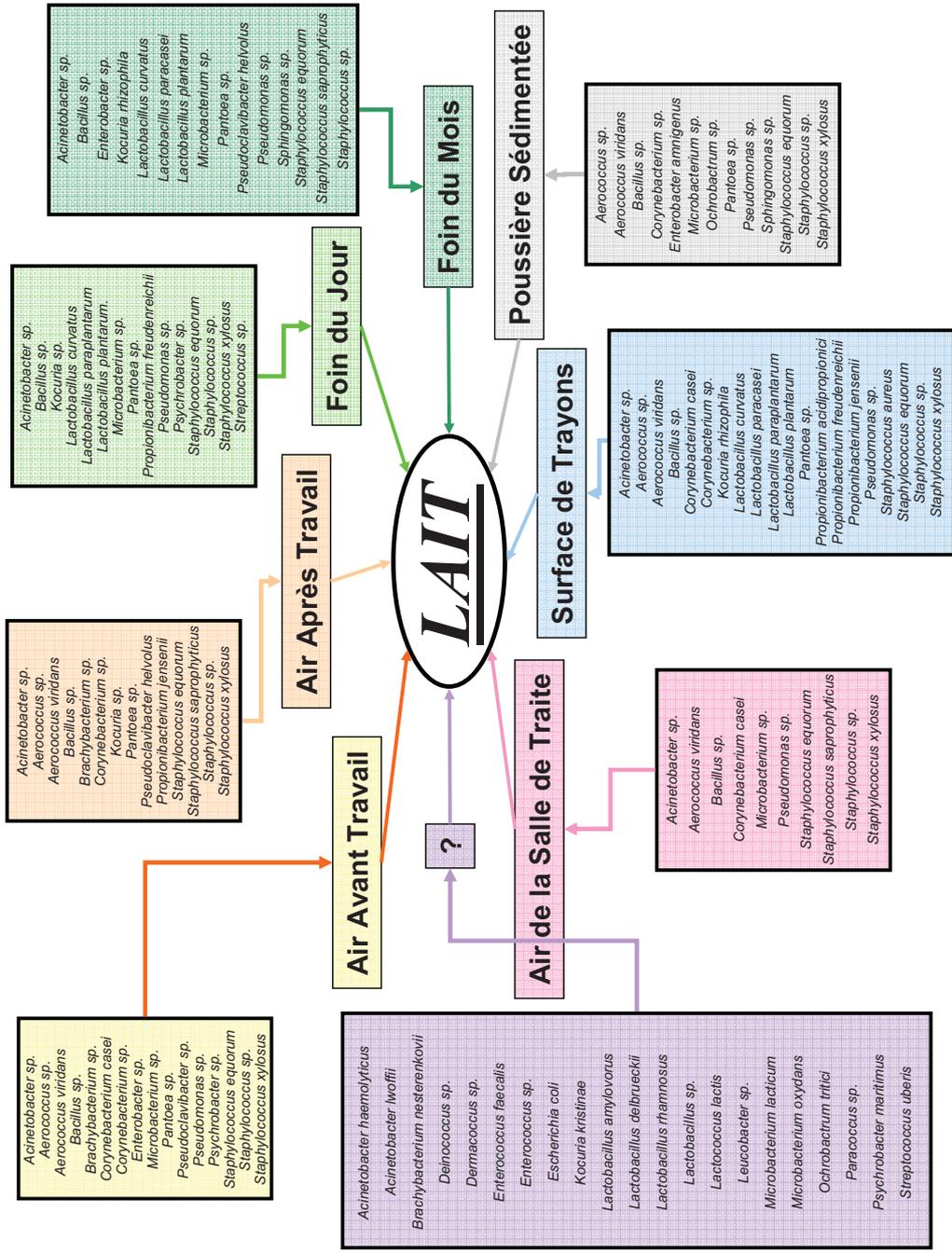


Figure 56 : Représentation graphique des flux bactériens potentiels de l'étable vers le lait.

Légende: les 3 taxa bactériens utilisés précédemment (bacille à Gram positif, bacille à Gram négatif et cocci à Gram positif) ont été détaillés ici, après identification par biologie moléculaire.

c/ transferts bactériens de l'étable à la salle de traite

Comme indiqué précédemment pour les bactéries du lait, la plupart des espèces bactériennes identifiées dans l'étable sont aussi retrouvées dans l'air de la salle de traite, suggérant que l'air de la salle de traite est dépendant de celui de l'étable.

Des coefficients de corrélation de Spearman ont été calculés entre les trois types de prélèvements d'air afin d'évaluer le lien entre eux. Les résultats sont exposés dans le tableau XVII. Les corrélations entre les *taxa* microbiens dans l'air de l'étable et dans l'air de la salle de traite sont faibles et non significatives sauf pour trois *taxa* (actinomycètes mésophiles, *Wallemia sebi* et levures roses). Cependant, la corrélation entre l'air de l'étable et l'air de la salle de traite est bonne et significative si le total microbien est pris en compte ($\rho = 0.53$, $p < 0.0001$ entre l'air avant travail et l'air de la salle de traite et $\rho = 0.54$, $p < 0.0001$ entre l'air après travail et l'air de la salle de traite).

Comme montré dans le chapitre précédent, l'air de l'étable ainsi que tous les compartiments analysés peut représenter une source potentielle de la contamination du lait par les micro-organismes. Cependant, la principale source de contamination du lait passe, soit par le matériel de traite utilisé jusqu'au tank à lait, soit par le pis de la vache. La même démarche a donc été adoptée pour comparer la microflore du lait et celle des différents compartiments du matériel de traite.

Tableau XVII : coefficients de corrélation de Spearman entre l'air de l'étable et l'air de la salle de traite.

	Air Avant travail vs Air de la salle de traite		Air après travail vs Air de la salle de traite	
	Coefficient de Spearman	p	Coefficient de Spearman	p
Milieux Mueller-Hinton et Drigalski				
Bacilles à Gram négatif	0.30	0.43	0.16	0.68
Bacilles à Gram positif	0.18	0.64	-0.15	0.69
Cocci à Gram positif	-0.43	0.25	0.33	0.39
Milieu Difco actinomycètes				
Actinomyocètes mésophiles	0.55	0.12	0.66	0.05*
Milieu R8				
Actinomycètes thermophiles	0.23	0.55	-0.13	0.74
Milieux Malt-agar et DG18				
Alternaria spp.	-	-	-	-
Aspergillus spp.	0.11	0.78	0.09	0.81
Autres champignons	0.49	0.18	0.51	0.16
Cladosporium spp.	0.27	0.49	0.58	0.10
Eurotium spp.	0.38	0.32	0.20	0.61
Levures blanches	-0.43	0.24	0.49	0.18
Levures roses	0.31	0.42	0.75	0.02*
Mucorales spp.	0.04	0.91	0.12	0.75
Penicillium spp.	0.47	0.20	0.58	0.10
Wallemia sebi	0.78	0.01*	0.81	0.01*
Tous micro-organismes confondus	0.53	<0.0001*	0.54	<0.0001*

Légende: * = $p < 0.05$

3/ AgriSanté, flux microbiens du matériel de traite vers le lait (résultats partiels)

Cette étude, réalisée sur quatre fermes tirées au sort parmi les fermes du groupe AgriSanté est toujours en cours. Seule la moitié des bactéries isolées (141/267) ont été identifiées à ce jour. Les autres bactéries ont pour l'instant été classées en fonction de leur aspect microscopique (bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif, cocci à Gram négatif, cocci à Gram positif).

Si l'on considère l'ensemble des échantillons en contact avec le matériel de traite (soit 4 échantillons de lait, de surface de trayons, de manchons trayeurs, du gobelet, de la sortie de lait, de l'arrivée d'air, de l'entrée du lait dans le tank, du tank et de l'eau résiduelle) on obtient, un total de 30 *taxa* fongiques et 74 *taxa* bactériens. Parmi les 27 *taxa* microbiens identifiés dans le lait, quatorze ont été identifiés dans au moins sept des neuf types de prélèvements (figure 57 et 58). Il s'agit des micro-organismes suivants *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium amstelodami*, levures blanches, *Streptomyces* mésophiles, *Streptomyces* thermophiles, bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif et cocci à Gram positif (tous présents dans l'ensemble des prélèvements) ainsi que d'*Absidia corymbifera*, *Aspergillus nidulans*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Saccharomonospora viridis* et *Wallemia sebi*). Ces espèces microbiennes peuvent donc être considérées comme ubiquitaires dans l'environnement fermier. A l'opposé, quelques espèces ne sont présentes que dans un ou deux compartiments autres que le lait. Ces espèces, au nombre de six, sont principalement retrouvées sur les lingettes, sur les manchons, dans l'arrivée d'air et dans la sortie de lait, c'est-à-dire dans les compartiments les plus proches de la vache. Il s'agit de : *Stenotrophomonas maltophila* (sortie de lait et arrivée de lait), *Staphylococcus pulvereri* (lingettes et manchon), *Pseudomonas sp.* (arrivée d'air), *Corynebacterium sp.* (lingettes), *Geotrichum sp.* (manchon) et *Cladosporium sphaerospermum* (sortie de lait et arrivée d'air). Par ailleurs les échantillons partageant le plus grand nombre d'espèces microbiennes et de *taxa* avec le lait sont les lingettes et les manchons qui possèdent près de 2/3 des espèces microbiennes du lait. Le tank, l'eau résiduelle et le tuyau d'arrivée de lait dans le tank, quant à eux, ne partagent qu'entre 13 et 15 *taxa* microbiens avec le lait. Une espèce fongique (*Scopulariopsis candida*) n'a été identifiée que dans un prélèvement de lait et son origine sur le matériel de traite reste inconnue. Les figures 57 et 58 font la synthèse de l'apport possible de chaque compartiment du matériel de traite dans la constitution de la première flore du lait.

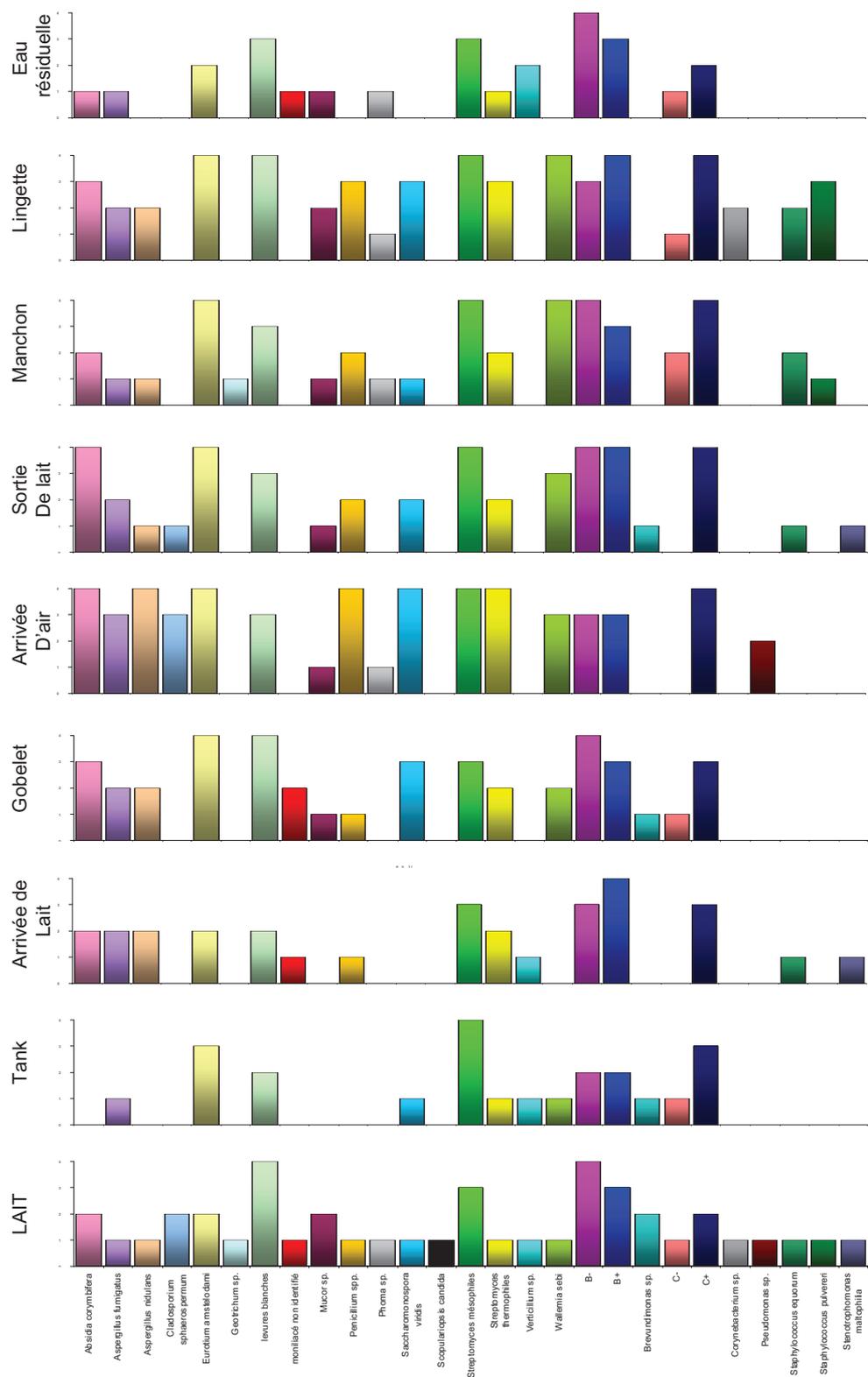


Figure 57 : profils microbiens des 9 compartiments en contact avec le matériel de traite.

Légende: les micro-organismes indiqués dans ces graphiques sont ceux qui ont été identifiés dans le lait lors de cette campagne d'échantillonnage. La hauteur des histogrammes correspond au nombre de fermes dans lesquelles ces micro-organismes ont été identifiés pour chacun des compartiments.

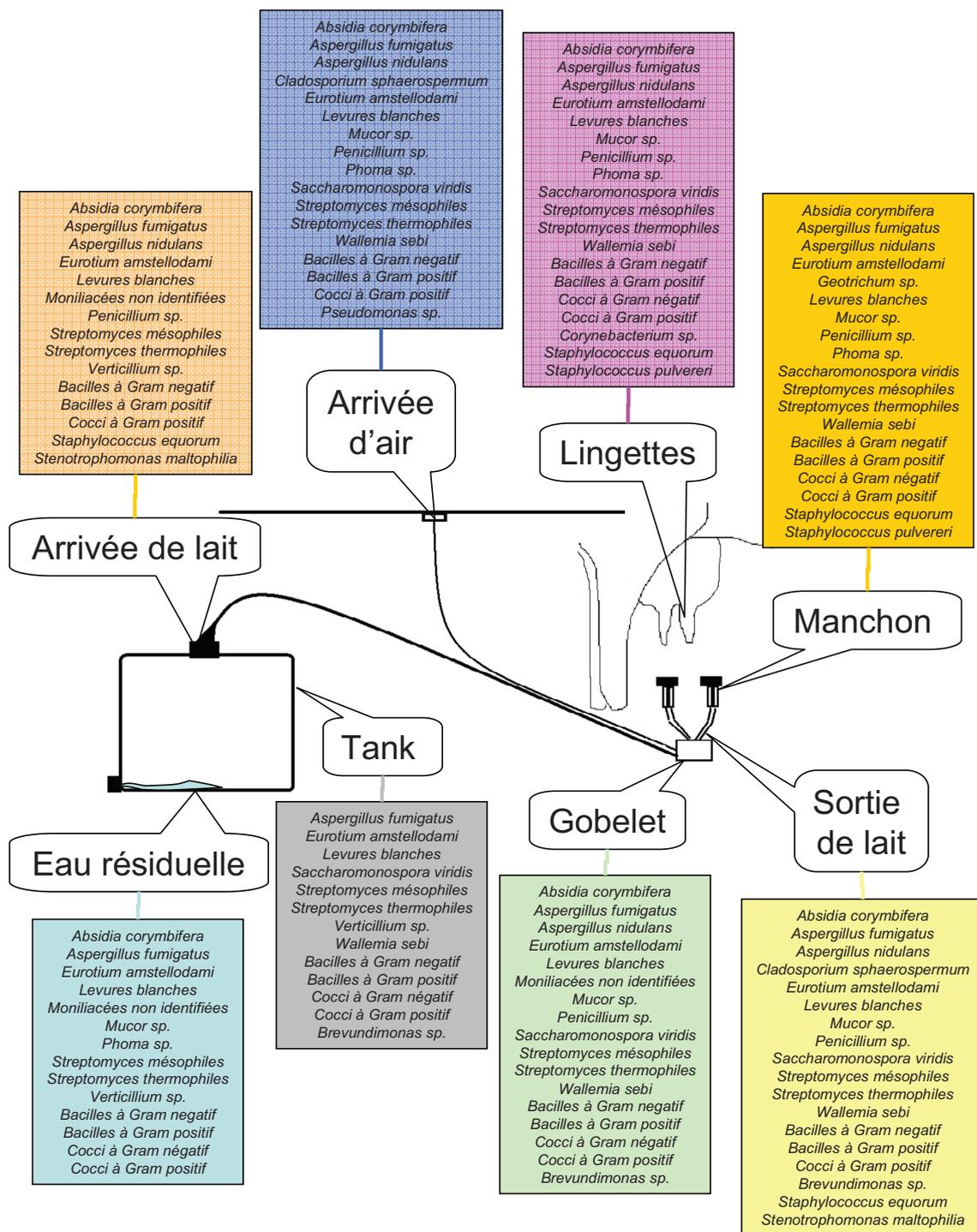


Figure 58 : représentation graphique de la contamination du matériel de traite en micro-organismes identifiés dans le lait.

Légende: les huit compartiments potentiellement responsables de la contamination du lait sont représentés et la flore du lait est indiquée pour chacun d'entre eux lorsque cela a été possible.

Le projet AgriSanté nous a donc permis de tester une technique de prélèvement de l'environnement respirable qui s'affranchit en partie des variations de la composition microbienne de l'air d'un instant à l'autre et qui représente donc une exposition durable plutôt que ponctuelle. Ce projet a également permis d'illustrer une possibilité de cheminement des micro-organismes au sein de l'étable, en considérant le lait comme produit final de la ferme.

La méthode de prélèvement par lingettes ayant été validée aussi bien au niveau des micro-organismes par notre équipe que pour les produits microbiens grâce à d'autres équipes (endotoxines, β -D-Glucans...), son utilisation pour des études plus importantes est maintenant envisageable. Elle présente l'intérêt d'améliorer la reproductibilité des prélèvements et de diminuer les coûts relatifs à la collecte d'échantillons sur des études portant sur des centaines de fermes ou de logements. Ainsi, les lingettes ont été utilisées pour la mise en place du projet GABRIEL portant sur la flore microbienne et les composés microbiens de l'environnement de plusieurs centaines d'enfants en Allemagne.

4/ GABRIEL, transferts microbiens de l'étable à la chambre

Le projet GABRIEL a été conduit dans cinq régions en Allemagne (Bavière et Bade-Wurtemberg), en Suisse (dans neuf cantons germanophones), en Autriche (Tyrol) et en Pologne (Silésie) durant la période été 2006 - automne 2008. Sur 132 518 questionnaires distribués, 34 491 ont été retournés accompagnés d'un consentement des parents à la poursuite de l'étude, et au fil des sélections, 895 enfants ont été sélectionnés pour participer à l'étude de leur environnement en rapport avec leur état de santé. 444 enfants ont eu des prélèvements environnementaux analysés du point de vue de la flore microbienne (logements, étables et granges).

a/ sélection des *taxa* microbiens

L'ensemble des résultats obtenus après analyses microbiologiques des 680 lingettes a permis de regrouper les micro-organismes en dix-huit *taxa* microbiens, en fonction de leur impact connu sur les maladies respiratoires. Les bactéries ont été classées en six *taxa*. Les actinomycètes, souvent identifiés dans les études menées sur la maladie du poumon de fermier et connus pour être présents dans les étables en quantité importante du fait de la manipulation du foin, ont été séparés en deux *taxa* : les actinomycètes mésophiles et les actinomycètes thermophiles. Les autres bactéries ont été classées en fonction de leurs caractéristiques microscopiques (bacilles et cocci) et de leur coloration de Gram (bacille à

Gram positif, bacille à Gram négatif, cocci à Gram positif et cocci à Gram négatif). Les espèces fongiques peuvent être séparées en cinq groupes en fonction de leur classification, de leur implication dans l'environnement fermier ou dans le développement de maladies respiratoires: les Zygomycètes (ordre des mucorales, composé à plus de 60% du genre *Absidia* (impliqué dans les pneumopathies d'hypersensibilité chez les agriculteurs)), les Ascomycètes [*Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.* : genre fongique important quantitativement dans l'environnement), *Alternaria spp.* (impliqué dans l'hypersensibilité bronchique chez les agriculteurs), *Cladosporium spp.* (responsable de sinusites et d'infections pulmonaires), *Penicillium spp.* (impliqué dans les pneumopathies d'hypersensibilité chez les agriculteurs et genre dominant dans la contamination de l'environnement intérieur), *Scopulariopsis spp.* (impliqué dans les infections pulmonaires)], les Basidiomycètes (*Wallemia sebi*, impliqué dans les pneumopathies d'hypersensibilité chez les agriculteurs), les levures (blanches et roses) et les champignons n'ayant pas de rôle connu à ce jour dans l'environnement fermier ou dans le développement de maladies respiratoires (autres espèces fongiques). Notons, par ailleurs, que certaines espèces fongiques ont déjà été incriminées dans le développement d'allergies. C'est le cas par exemple d'*Aspergillus fumigatus*. Treize *taxa* fongiques ont donc été ainsi constitués (*Absidia spp.*, autres espèces appartenant à l'ordre des mucorales, *Asp.glaucus/Eurotium spp.* identifiés, *Eurotium spp.* non identifiés, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, total levures, total moniliacées non-identifiées et autres espèces fongiques).

b/ répartition des micro-organismes dans les différentes strates environnementales.

De nombreux *taxa* microbiens (fongiques et bactériens) ont été détectés à partir des 680 lingettes analysées. Cependant, seul un taxon fongique et trois *taxa* bactériens (*Penicillium spp.*, bacilles à Gram négatif, bacilles à Gram positif et cocci à Gram positif) ont été retrouvés dans la majorité des échantillons collectés dans chaque type d'environnement (chambres, étables et granges). Lorsque l'on considère le nombre d'échantillons avec un nombre détectable de micro-organismes par taxon et par strate environnementale, on observe une plus forte proportion de résultats détectables (quantité microbienne supérieure au seuil de détection) à partir des lingettes provenant des logements fermiers qu'à partir des lingettes provenant des logements exposés et non-exposés (tableau XVIII). Ainsi, la proportion d'échantillons positifs pour chaque taxon bactérien et fongique était significativement plus importante dans les logements fermiers que dans les logements exposés. L'exposition plus

importante aux moisissures et aux bactéries dans les logements fermiers n'est pas seulement confirmée par la proportion de prélèvements positifs mais également par une plus grande concentration microbienne. Comme montré par le tableau XIX, les moyennes géométriques des échantillons détectables pour chacun des paramètres microbiens à l'exception de *Scopulariopsis spp.* étaient supérieures dans les logements fermiers par rapport aux témoins exposés ou non.

c/ flore microbienne des différents types de logements

Les profils fongiques des logements contrôles et exposés sont très similaires et sont caractérisés par la présence dominante de *Penicillium spp.*, tandis que la microflore des logements fermiers apparaît plus proche de la microflore des étables avec une dominance des *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et des cocci à Gram positif (figure 59). Les profils bactériens montrent également des similarités entre les logements fermiers, les étables et les granges. En revanche, la contamination bactérienne des logements contrôles et exposés est très faible par rapport à celle des logements fermiers (figure 59).

d/ transfert microbien au sein de l'environnement fermier

Pour la plupart des *taxa* (tableau XX), la concentration microbienne dans les logements fermiers était significativement et positivement corrélée à la concentration observée dans les échantillons provenant des étables et des granges correspondantes. La correspondance entre les résultats des logements et ceux des étables ou des granges est également corroborée par le fait que pour la majorité des exploitations agricoles (de 58 à 100% en fonction des micro-organismes considérés), un échantillon positif pour un micro-organisme donné dans la chambre correspond à un échantillon positif pour le même micro-organisme dans l'étable ou dans la grange (tableau XXI). Le tableau XXII montre que les concentrations de différents micro-organismes étaient plus faibles dans les logements fermiers que celles observées dans les étables ou dans les granges, avec un ratio variant de 1/6 (*Penicillium spp.*) à 1/64 (*Eurotium spp.* non identifiés) pour les champignons et de 1/11 (actinomycètes mésophiles) à 1/171 (bacilles à Gram négatif) pour les bactéries.

Cette illustration de "transferts" entre l'étable et le logement fermier nous incite donc à analyser de manière plus complète la composition microbienne de la poussière récoltée dans les étables. Ainsi, une approche métagénomique, faisant appel au clonage direct de produits de PCR, a été utilisée pour compléter les résultats obtenus par culture.

Tableau XVIII : quantité et fréquence des micro-organismes détectés, stratifiés en fonction de la strate d'exposition et de la localisation dans la ferme. Tests statistiques du Chi² pour les différences entre les fréquences observées pour les strates d'exposition.

	Logements non-exposés N = 150		Logements exposés N = 149		Logements fermiers N = 144		Etables N = 111		Granges N = 126		Fermiers vs. Non-exposés		Fermiers vs. Exposés	
	N	frq (%)	N	frq (%)	N	frq (%)	N	frq (%)	N	frq (%)	CHI ² (sig)	CHI ² (sig)	CHI ² (sig)	CHI ² (sig)
<i>Absidia</i> spp.	5	3.3	7	4.7	35	24.3	61	55.0	67	53.2	27.5 (***)	22.9 (***)		
Autres <i>Mucorales</i> spp.	12	8.0	11	7.4	31	21.5	48	43.2	45	35.7	10.8 (**)	11.9 (**)		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	21.3	40	26.9	55	38.2	74	66.7	88	69.8	10.0 (**)	4.3 (*)		
<i>Eurotium</i> spp. identifiées ^a	27	18.0	40	26.9	95	66.0	72	64.9	75	59.5	69.6 (***)	45.1 (***)		
<i>Eurotium</i> spp. non identifiées	21	14.0	22	14.8	51	35.4	51	46.0	53	42.1	18.2 (***)	16.7 (***)		
Autres <i>Aspergillus</i> spp.	57	38.0	66	44.3	95	66.0	75	67.6	87	69.1	23.0 (***)	13.9 (***)		
<i>Alternaria</i> spp.	8	5.3	11	7.4	19	13.2	35	31.5	44	34.9	5.4 (*)	2.7 (NS)		
<i>Cladosporium</i> spp.	77	51.3	73	49.0	116	80.6	82	73.9	104	82.5	27.8 (***)	31.9 (***)		
<i>Penicillium</i> spp.	113	75.3	113	75.8	127	88.2	80	72.1	73	57.9	8.1 (**)	7.5 (**)		
<i>Scoluopariopsis</i> spp.	5	3.3	10	6.7	41	28.5	66	59.5	69	54.8	35.2 (***)	24.1 (***)		
<i>Wailemia sebi</i>	18	12.0	27	18.1	69	47.9	50	45.1	78	61.9	45.5 (***)	29.5 (***)		
Levures	12	8.0	19	12.8	44	30.6	72	64.9	48	38.1	24.2 (***)	13.8 (***)		
Autres espèces fongiques	44	29.3	46	30.9	66	45.8	72	64.9	78	61.9	8.5 (**)	6.9 (**)		
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	38	25.3	45	30.2	111	77.1	109	98.2	117	92.9	78.7 (***)	64.7 (***)		
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	8	5.3	27	18.1	45	31.3	79	71.2	71	56.4	33.4 (***)	6.8 (**)		
Bacilles à Gram négatif	79	52.7	87	58.4	121	84.0	95	85.6	112	88.9	33.2 (***)	23.4 (***)		
Bacilles à Gram positif	89	59.3	91	61.1	132	91.7	90	81.1	111	88.1	41.2 (***)	37.7 (***)		
Cocci à Gram négatif	41	27.3	44	29.5	67	46.5	38	34.2	30	23.8	11.6 (**)	9.0 (**)		
Cocci à Gram positif	106	70.7	95	63.8	133	92.4	94	84.7	109	86.5	22.7 (***)	34.7 (***)		

Légende: N = nombre d'échantillons positifs ; frq = pourcentage d'échantillons positifs ; ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*. ; les tests du Chi² représentent les différences d'exposition entre les strates d'exposition (fermiers vs exposés et fermiers vs contrôles). La significativité du test de Chi² est indiquée entre parenthèses : * = p-value <= 0.05; ** = p-value <= 0.001; *** = p-value <= 0.0001; NS = p-value > 0.05.

Tableau XIX : moyennes géométriques et déviation standard pour les *taxa* microbiens (en UFC/m²) par strate d'exposition et par localisation dans la ferme

	Logements non-exposés			Logements exposés			Logements fermiers			Etables			Granges		
	N	GM / 1000	GSD	N	GM / 1000	GSD	N	GM / 1000	GSD	N	GM / 1000	GSD	N	GM / 1000	GSD
	<i>Absidia</i> spp.	5	15	2.9	7	15	2.4	35	56	4.0	61	312	7.4	67	235
Autres <i>Mucorales</i> spp.	12	11	1.8	11	24	3.1	31	31	3.6	48	123	4.7	45	122	5.4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	16	3.3	40	31	3.7	55	37	4.8	74	188	8.2	88	80	6.5
<i>Eurotium</i> spp. identifiées ^a	27	23	3.5	40	23	3.1	95	53	3.9	72	1384	7.0	75	959	6.2
<i>Eurotium</i> spp. non identifiées	21	17	2.7	22	23	2.9	51	37	4.0	51	1476	5.2	53	696	5.0
Autres <i>Aspergillus</i> spp.	57	25	3.3	66	27	3.5	95	42	3.6	75	641	6.2	87	273	6.0
<i>Alternaria</i> spp.	8	13	2.3	11	11	1.3	19	17	2.6	35	73	5.4	44	70	3.6
<i>Cladosporium</i> spp.	77	21	2.7	73	17	2.4	116	33	3.0	82	693	4.3	104	766	4.6
<i>Penicillium</i> spp.	113	36	3.2	113	48	3.4	127	65	3.3	80	428	3.6	73	342	4.2
<i>Scolopariopsis</i> spp.	5	10	1.0	10	40	4.9	41	21	3.1	66	441	5.3	69	189	4.5
<i>Wailleria sebi</i>	18	17	2.4	27	29	4.0	69	43	3.6	50	918	5.0	78	731	5.0
Levures	12	13	2.1	19	20	2.9	44	52	3.6	72	740	5.0	48	854	4.4
Autres espèces fongiques	44	22	2.8	46	22	3.1	66	32	3.3	72	343	4.9	78	341	4.9
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	38	15	2.2	45	21	3.0	111	77	5.1	109	1874	6.5	117	680	7.3
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	8	12	1.5	27	18	3.1	45	39	4.8	79	213	7.1	71	123	7.4
Bacilles à Gram négatif	79	40	3.5	87	42	5.1	121	227	7.0	95	23977	7.2	112	4875	8.0
Bacilles à Gram positif	89	26	3.0	91	39	5.6	132	352	7.8	90	29140	8.9	111	6603	8.0
Cocci à Gram négatif	41	41	4.3	44	46	4.9	67	118	9.3	38	11275	4.8	30	521	4.6
Cocci à Gram positif	106	54	6.6	95	83	8.3	133	662	8.7	94	119633	7.0	109	4659	9.7

Légende: N=nombre d'échantillons positifs ; GM=moyenne géométrique ; GSD=déviation standard à la moyenne ; ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*. Les moyennes sont exprimées en unité formant colonies par mètre carré (UFC/m²).

Tableau XX : coefficient de corrélation de Spearman entre les niveaux microbiens de la chambre de l'enfant et les niveaux dans les étables ou dans les granges.

	logement fermier / étable		logement fermier / grange	
	Spearman rho	p	Spearman rho	p
<i>Absidia spp.</i>	0.62	***	0.54	***
Autres <i>Mucorales spp.</i>	0.09	NS	0.21	*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.5	***	0.44	***
<i>Eurotium spp. identifiées</i> ^a	0.54	***	0.42	***
<i>Eurotium spp. non identifiées</i>	0.33	***	0.17	NS
Autres <i>Aspergillus spp.</i>	0.42	***	0.36	***
<i>Alternaria spp.</i>	0.22	*	0.16	NS
<i>Cladosporium spp.</i>	0.19	*	0.13	NS
<i>Penicillium spp.</i>	0.2	*	0.19	*
<i>Scolopariopsis spp.</i>	0.26	**	0.28	**
<i>Wallemia sebi</i>	0.29	**	0.27	**
Levures	0.22	*	0.19	*
Autres espèces fongiques	0.23	*	0.15	NS
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	0.48	***	0.35	***
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	0.37	***	0.22	*
Bacilles à Gram négatif	0.27	**	0.39	***
Bacilles à Gram positif	0.29	**	0.31	***
Cocci à Gram négatif	0.11	NS	0.17	NS
Cocci à Gram positif	0.47	***	0.32	***

Légende: le coefficient rho de Spearman est calculé pour les enfants pour lesquels des lingettes ont été analysées dans les logements et dans les étables (n=110) et dans les logements et dans les granges (n=125).

^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*.

* = p-value <= 0.05; ** = p-value <= 0.001; *** = p-value <= 0.0001; NS = p-value > 0.05.

Tableau XXI : nombre d'échantillons avec ou sans la présence des micro-organismes dans la chambre de l'enfant et/ou dans les autres localisations de la ferme

	Présent dans la chambre / Etable ou Grange				Proportion de + / + pour les chambres positives	Proportion de - / - pour les chambres négatives
	- / -	+ / -	- / +	+ / +		
<i>Absidia spp.</i>	30	0	39	29	100%	43%
Autres <i>Mucorales spp.</i>	36	8	39	15	65%	48%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16	3	46	33	92%	26%
<i>Eurotium spp. identifiées</i> ^a	8	9	26	55	86%	24%
<i>Eurotium spp. non identifiées</i>	25	8	40	25	76%	38%
Autres <i>Aspergillus spp.</i>	8	7	26	57	89%	24%
<i>Alternaria spp.</i>	42	3	45	8	73%	48%
<i>Cladosporium spp.</i>	0	4	19	75	95%	0%
<i>Penicillium spp.</i>	1	12	10	75	86%	9%
<i>Scolopariopsis spp.</i>	19	5	49	25	83%	28%
<i>Wallemia sebi</i>	16	8	37	37	82%	30%
Levures	24	0	42	32	100%	36%
Autres espèces fongiques	11	5	40	42	89%	22%
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	0	0	17	81	100%	0%
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	11	2	52	33	94%	17%
Bacilles à Gram négatif	0	1	17	80	99%	0%
Bacilles à Gram positif	2	3	8	85	97%	20%
Cocci à Gram négatif	29	19	24	26	58%	55%
Cocci à Gram positif	2	3	6	87	97%	25%

Légende: N=98 enfants fermiers pour lesquels les informations sont disponibles pour le logement, l'étable et la grange. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*.

Tableau XXII : moyennes arithmétiques (en 10³ UFC/m²) et ratio de moyennes pour les micro-organismes retrouvés dans les étables et dans les logements fermiers

	Moyennes arithmétiques (10 ³ UFC/m ²)		Ratio de moyennes (étable / logement fermier)
	Etables (N=111)	Logement fermier (N=144)	
<i>Absidia spp.</i>	835	32	26
<i>Autres Mucorales spp.</i>	145	14	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 055	59	18
<i>Eurotium spp. identifiées^a</i>	4 012	177	23
<i>Eurotium spp. non identifiées</i>	3 005	47	64
<i>Autres Aspergillus spp.</i>	1 724	75	23
<i>Alternaria spp.</i>	75	4	19
<i>Cladosporium spp.</i>	2 183	51	43
<i>Penicillium spp.</i>	639	109	6
<i>Scolopariopsis spp.</i>	817	13	63
<i>Wallemia sebi</i>	1 411	54	26
Levures	1 964	31	63
Autres espèces fongiques	715	31	23
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	6 994	624	11
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	1 073	66	16
Bacilles à Gram négatif	173 551	1 013	171
Bacilles à Gram positif	279 564	3 270	85
Cocci à Gram négatif	15 733	431 ^b	37
Cocci à Gram positif	388 932	6 334	61

Légende: Ratio de moyennes arithmétiques=moyenne de l'étable / moyenne du logement fermier. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbarorium*. ^b = une valeur manquante.

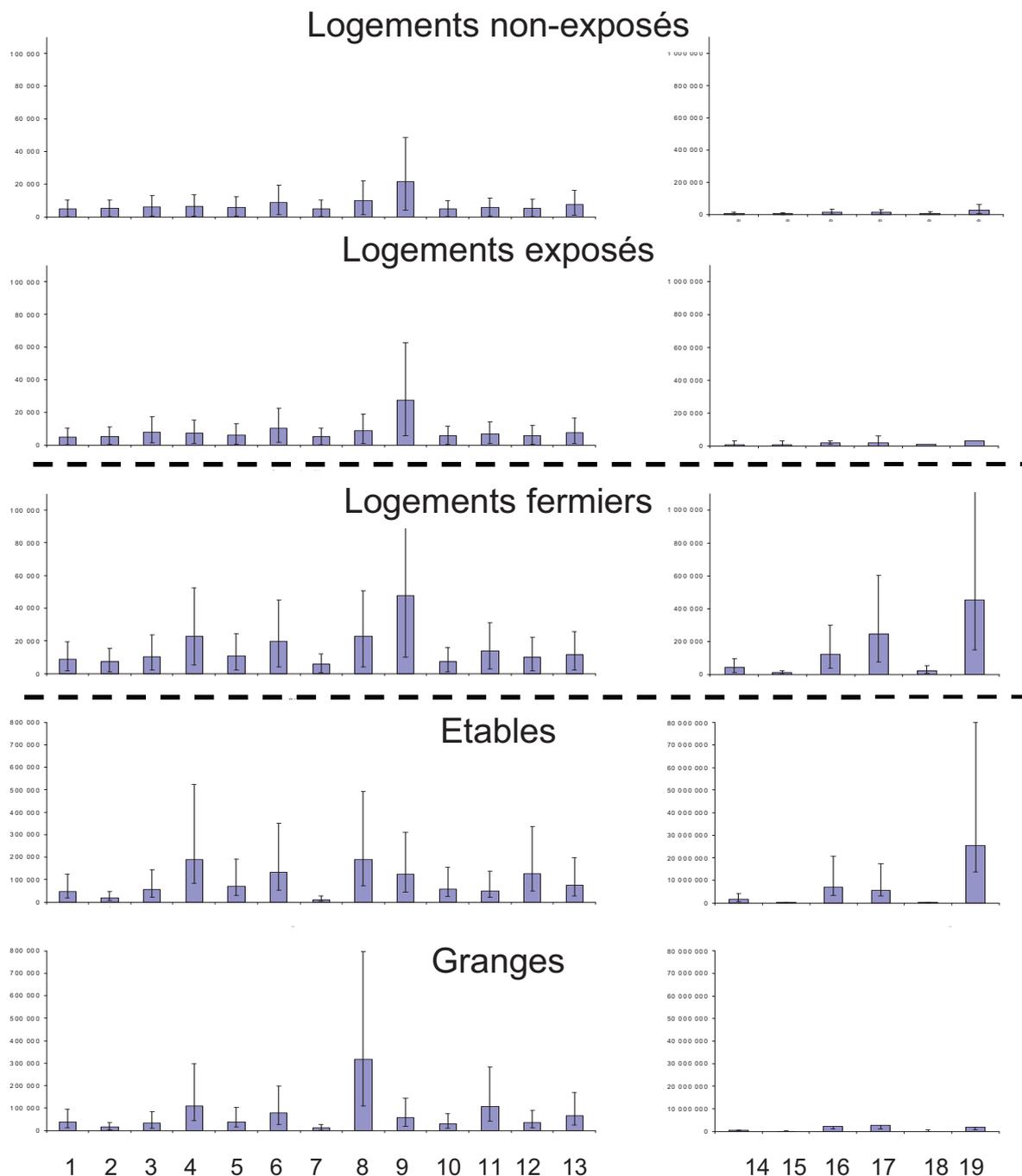


Figure 59 : Profils microbiens des cinq différentes strates environnementales pour chacun des *taxa* microbiens.

*Légende: les moyennes géométriques et l'intervalle de confiance à 95% sont représentés. Les valeurs nulles ont été remplacées par ½ de la limite de détection (= ½ 200/0.0209 m²). Les *taxa* fongiques sont représentés sur la partie gauche de la figure et les *taxa* bactériens sur la partie droite. Les chiffres figurant sur l'axe des abscisses correspondent à : 1: *Absidia* spp.; 2: autres *Mucorales* spp.; 3: *Aspergillus fumigatus* ; 4: *Eurotium* spp. identifiées ; 5: *Eurotium* spp. non identifiées ; 6: autres *Aspergillus* spp.; 7: *Alternaria* spp.; 8: *Cladosporium* spp.; 9: *Penicillium* spp.; 10: *Scopulariopsis* spp.; 11: *Wallemia sebi* ; 12: Levures ; 13: autres espèces fongiques ; 14: actinomycètes mésophiles ; 15: actinomycètes thermophiles ; 16: bacilles à Gram négatif ; 17: bacilles à Gram positif ; 18: cocci à Gram négatif ; 19: cocci à Gram positif. L'axe des ordonnées correspond à la concentration moyenne en micro-organismes en UFC/m²*

5/ GABRIEL, analyse de la flore des étables par clonage de produit de PCR

a/ identification des clones

α/ résultats globaux

Un total de 1054 clones, sur les 1439 obtenus, a pu être séquencé, les autres correspondant, pour la plupart, à l'insertion d'un mauvais insert ou à l'absence de bactéries dans la suspension contenant un clone. Cela représente donc une moyenne de 175 clones séquencés pour chacun des six pools étudiés (deux pools de lingettes d'étables correspondant à des enfants non malades, deux pools à des enfants atopiques et deux pools à des enfants asthmatiques). Après séquençage et comparaison avec les bases de données internet, 844 clones ont pu être identifiés. Pour 491 de ces bactéries, la comparaison des séquences avec celles disponibles dans la base NCBI a permis d'identifier l'espèce en cause (plus de 97% d'homologie avec une séquence connue). Dans 183 autres cas, l'identification n'a pu se faire jusqu'à l'espèce et les bactéries ont alors été classées en fonction de leur appartenance à un Phylum (*Firmicutes Bacterium*), à un Ordre (*Pseudomonadales Bacterium*), à une Famille (*Lachnospiraceae, Ruminococcaceae*), à un Genre (*Eubacterium sp., Bacteroides sp.*). Les 210 clones n'ayant pas pu être identifiés à ces différents niveaux ont été regroupés sous le terme de "*Uncultured Bacterium clone*".

β/ répartition des taxa bactériens

Un total de 52 genres bactériens, correspondant à 138 espèces, a été identifié par la méthode de clonage. La figure 60 et le tableau XXIII montrent la distribution de chacun des genres bactériens dans les 6 pools étudiés. On peut ainsi noter que le genre *Atopostipes* est retrouvé plus fréquemment dans les pools correspondant à des enfants atopiques, que les genres *Staphylococcus* et *Sphingomonas* sont retrouvés plus souvent chez les asthmatiques, et qu'aucun *Pseudomonas* n'a été retrouvé chez les enfants non atopiques et non asthmatiques. Il semble, par ailleurs, que les clones non identifiables aient été beaucoup plus nombreux chez les enfants non malades que dans les étables où évoluent des enfants atopiques ou asthmatiques.

Les différents pools ont été comparés par des tests de corrélation appariés (tableau XXIV). Ces tests montrent qu'il y a une bonne reproductibilité de la méthode dans l'environnement de l'étable, quel que soit l'état de santé de l'enfant. Ainsi, entre les pools 1 et 2, correspondant

aux enfants non atopiques et non asthmatiques, un coefficient de corrélation de 0.96 ($p < 0.0001$) pour les genres et de 0.94 ($p < 0.0001$) pour les espèces, a été calculé, ce qui signifie que 88 à 92% de la diversité du pool 1 est retrouvée dans le pool 2. Des résultats légèrement plus faibles mais significatifs ont été retrouvés pour les deux pools d'enfants atopiques ($r = 0.84^*$ pour les genres et $r = 0.78^*$ pour les espèces) montrant que 60 à 70% de la diversité de l'un est partagée avec l'autre pool du même état de santé. Pour les étables d'enfants asthmatiques, un coefficient de 0.94* a été obtenu pour les genres et pour les espèces. Quatre-vingt-huit pour cent de la diversité est donc partagée entre les deux pools. Des coefficients relativement élevés ont également été obtenus en comparant les pools correspondant à des états de santé différents. Ainsi, une diversité partagée de 55% peut être observée entre les pools 4 et 5 et une diversité partagée maximum de 86% peut être observée entre les pools 3 et 6. Il n'y a donc pas de différences majeures entre les différents groupes de santé au niveau de la diversité bactérienne.

b/ diversité bactérienne

La construction des courbes d'accumulation pour les six pools de lingettes de poussière d'étable (figure 61) montre que l'extinction de diversité n'est atteinte dans aucun des pools. En effet, après 150 à 220 clones identifiés, aucun plateau n'est visible pour aucun des pools. Le tableau XXV regroupe les différentes caractéristiques des six pools. La diversité relative de chacun d'entre eux a été calculée. Que ce soit en diversité de genre ou d'espèce, les pools possédant la plus grande diversité bactérienne sont les pools atopiques (0.24 genre / clone identifié et 0.42 espèce / clone identifié) et asthmatiques (0.20 genre / clone identifié et 0.28 espèce / clone identifié). Les résultats du pool 4 semblent être influencés par la présence d'un genre dominant (*Atopostipes*) qui change légèrement la tendance observée avec les autres pools. La fréquence des clones non identifiés est plus importante dans les pools 1 et 2 que dans les quatre autres pools, ce qui rejoint ce qui avait été montré par la figure 60.

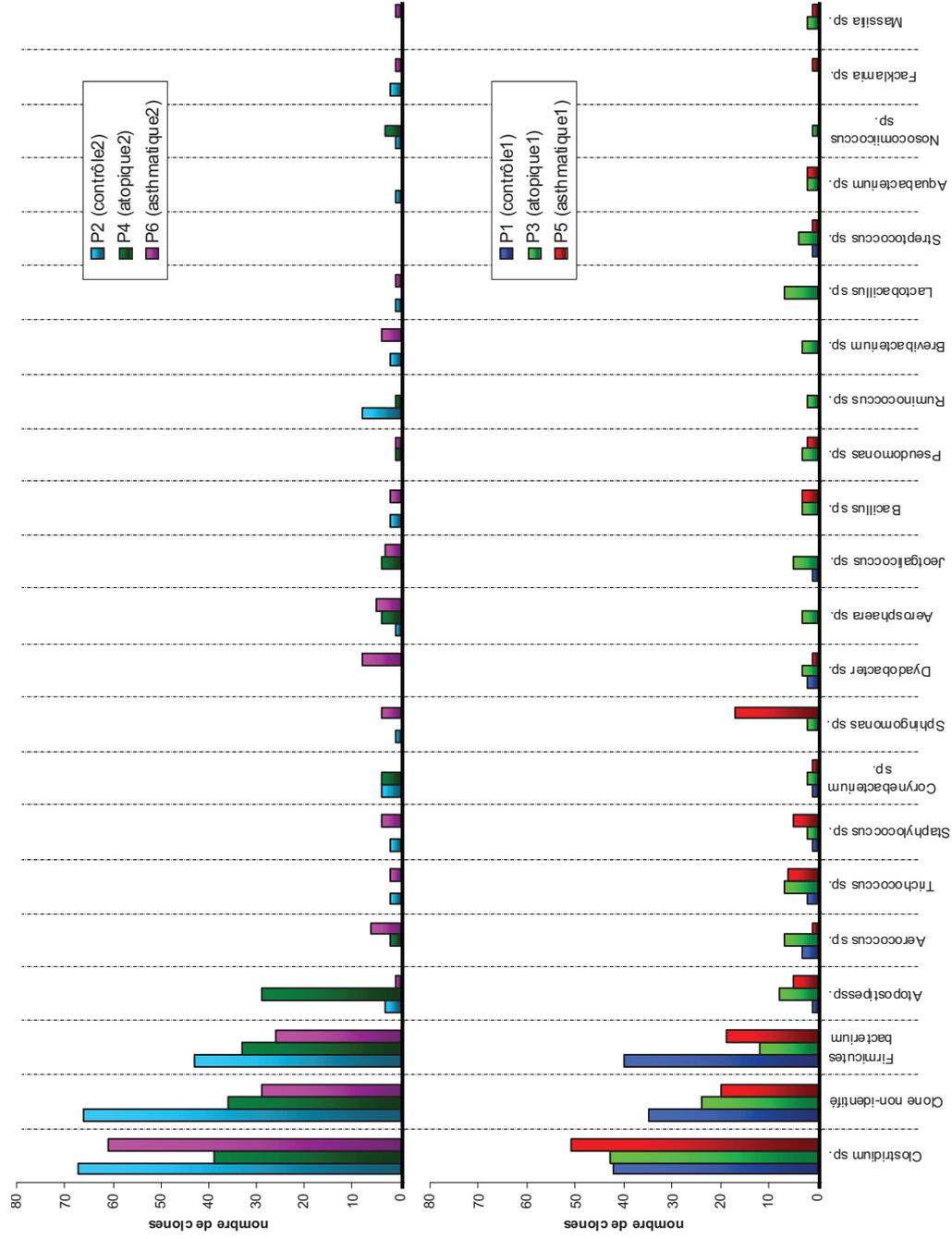


Figure 60 : représentation graphique des genres bactériens les plus fréquemment identifiés par clonage des pools de lingettes.

Légende: les six pools bactériens (P1 : pool contrôle 1 ; P2 : pool atopique 2 ; P3 : pool atopique 1 ; P4 : pool atopique 2 ; P5 : pool asthmatique 1 ; P6 : pool asthmatique 2) sont représentés pour les 22 genres bactériens les plus fréquemment identifiés. La hauteur des histogrammes dépend du nombre de clones correspondant à un genre bactérien spécifique.

Tableau XXIII : liste et fréquence d'identification des genres bactériens les moins fréquemment identifiés par clonage.

	première série de pools			seconde série de pools			première série de pools		seconde série de pools	
	P1	P3	P5	P2	P4	P6	nb de pools positifs	nb de clones total	nb de pools positifs	nb de clones total
Psychrobacter	10		2				2	12		
Dialister		4		2			1	4	1	2
Flavobacterium	1	4					2	5		
Planococcus		3	2				2	5		
Brachybacterium	1					3	1	1	1	3
Helcococcus		2	2				2	4		
Unc Lachnospiraceae				1		3			2	4
Mesorhizobium		1			2		1	1	1	2
Microbacterium	2			1			1	2	1	1
Peptostreptococcus		2		1			1	2	1	1
Stenotrophomonas	2	1					2	3		
Eubacterium		1	1				2	2		
Kocuria		1	1				2	2		
Rhizobium	1					1	1	1	1	1
Xanthomonas	1		1				2	2		
Enterococcus		4					1	4		
Arthrobacter		3					1	3		
Paracoccus			3				1	3		
Sanguibacter						3			1	3
Unc Eubacterium			3				1	3		
Brevundimonas	2						1	2		
Desemzia				2					1	2
Dyella				2					1	2
Fusobacterium		2					1	2		
Pantoea		2					1	2		
Tessaracoccus			2				1	2		
Vagococcus		2					1	2		
Zoogloea			2				1	2		
Acetivibrio		1					1	1		
Acidovorax					1				1	1
Acinetobacter		1					1	1		
Alkalliphilus		1					1	1		
Burkholderia			1				1	1		
Carnobacterium		1					1	1		
Cryobacterium			1				1	1		
Curtobacterium			1				1	1		
Cytophaga		1					1	1		
Faecalibacterium		1					1	1		
Granulicatella			1				1	1		
Hymenobacter		1					1	1		
Jeotgalibacillus			1				1	1		
Leucobacter				1					1	1
Moraxella	1						1	1		
Nocardioides		1					1	1		
Petrimonas		1					1	1		
Rhodococcus	1						1	1		
Roseburia		1					1	1		
Roseovarius						1			1	1
Rothia			1				1	1		
Rubrivivax				1					1	1
Spirosoma						1			1	1
Taxeobacter			1				1	1		
Thermomonas		1					1	1		
Tissierella				1					1	1
Unc Bacteroides			1				1	1		
Unc Pseudomonadales						1			1	1
Unc Ruminococcaceae						1			1	1
Variovorax		1					1	1		
Veillonella				1					1	1

Légende: ce tableau regroupe les genres bactériens identifiés dans moins d'un pool sur deux. Le nombre de pools ainsi que le nombre de clones correspondant à chaque genre bactérien est reporté dans le tableau.

Tableau XXIV : coefficients de corrélation entre les genres et les espèces bactériens identifiés dans les différents pools d'étables.

	P1 genre / espèces	P2 genre / espèces	P3 genre / espèces	P4 genre / espèces	P5 genre / espèces	P6 genre / espèces
P1 genre / espèces	1					
P2 genre / espèces	0.96* / 0.94*	1				
P3 genre / espèces	0.84* / 0.97*	0.89* / 0.84*	1			
P4 genre / espèces	0.89* / 0.87*	0.90* / 0.88*	0.84* / 0.78*	1		
P5 genre / espèces	0.85* / 0.81*	0.87* / 0.81*	0.90* / 0.91*	0.80* / 0.74*	1	
P6 genre / espèces	0.91* / 0.86*	0.93* / 0.87*	0.94* / 0.93*	0.84* / 0.78*	0.94* / 0.94*	1

Légende: les coefficients de corrélation ont été calculés entre les différents pools afin d'évaluer la diversité partagée en genres et espèces bactériens. (: $p < 0.0001$)*

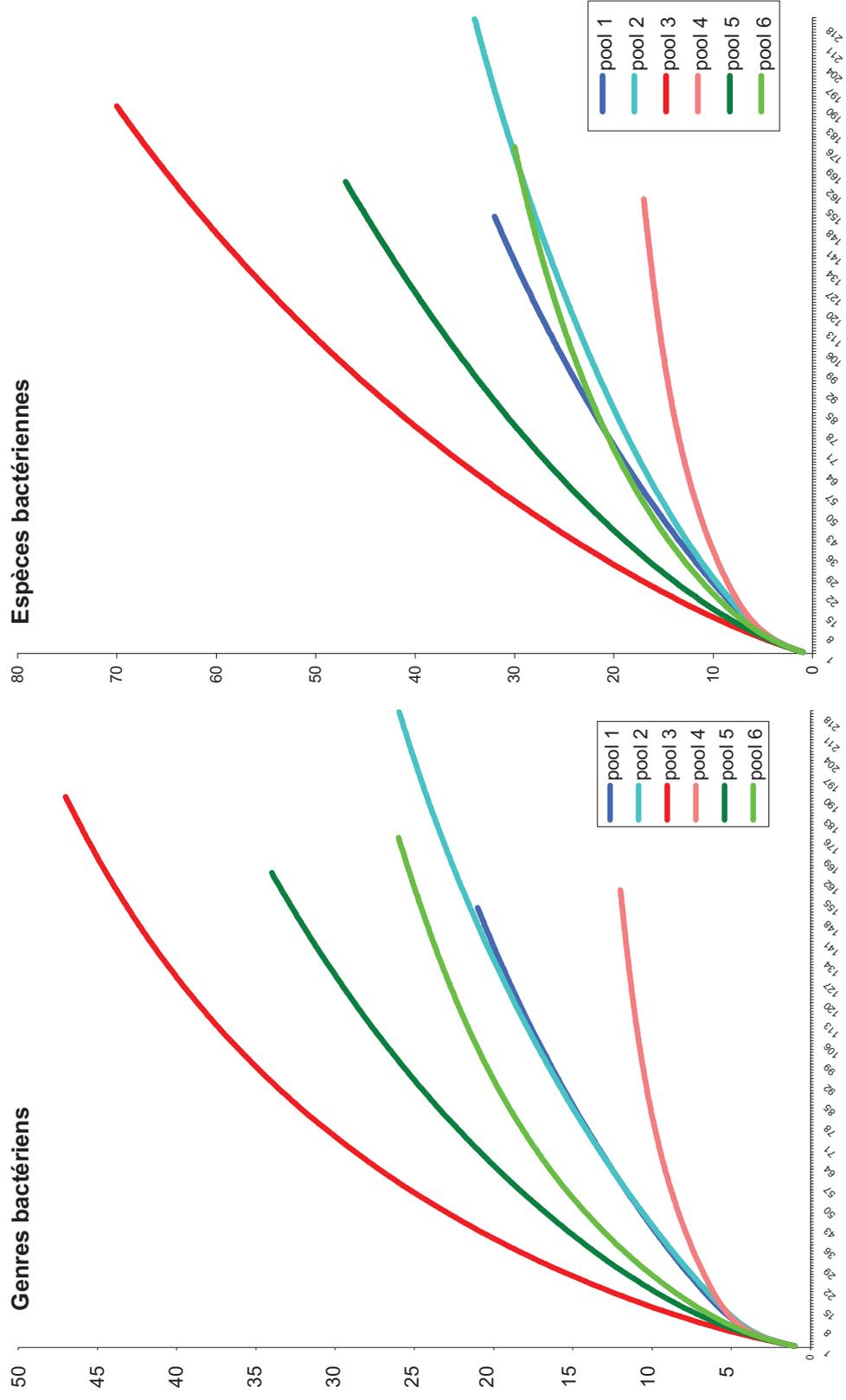


Figure 61 : courbes d'accumulation des genres et espèces bactériennes pour les six pools.

Légende: les courbes d'accumulation des six pools sont représentées par des couleurs différentes, en bleu (clair et foncé) pour les pools de contrôles, en rouge (clair et foncé) pour les atopiques et en vert (clair et foncé) pour les asthmatiques. A gauche sont retrouvées les courbes d'accumulation de genres et à droite, les courbes d'accumulation d'espèces.

Tableau XXV : diversité observée des six pools de poussière d'étable

	<i>Poussière sédimentée des étables</i>					
	<u>Pool 1</u>	<u>Pool 2</u>	<u>Pool 3</u>	<u>Pool 4</u>	<u>Pool 5</u>	<u>Pool 6</u>
Groupe de santé	control	control	atopic	atopic	asthmatic	Asthmatic
Nombre de lingettes	18	18	19	19	17	17
Nombre de clones sur boîte de culture	175	364	270	198	195	209
Nombre de clones identifiés*	151	219	189	157	163	175
Nombre de clones identifiés**	111	153	165	121	143	146
Nombre de genres bactériens**	19	25	46	11	33	25
Nombre d'espèces bactériennes**	31	33	69	16	46	29
Nombre de Uncultured bacterium clones	40	66	24	36	20	29

*Légende: les caractéristiques des différents pools de lingettes sont résumés ici. * : total en comptant les clones appartenant à la catégorie des uncultured bacterium clones ; ** : total sans les clones appartenant à la catégorie des uncultured bacterium clones.*

Les résultats microbiens obtenus par culture ont été intégrés dans les résultats globaux de l'étude GABRIEL et ont été testés, pour leur impact sur la santé des enfants, au même titre que les données épidémiologiques obtenues par l'intermédiaire des questionnaires.

6/ GABRIEL, impact de l'environnement sur la santé des enfants.

a/ rappels numériques

Le projet GABRIEL a pour but de mettre en évidence d'éventuels liens entre l'asthme, l'atopie, le génome humain et divers facteurs environnementaux. En particulier, une partie de l'étude, appelée étude GABRIEL-A (pour avancée/approfondie), s'est attachée à mieux définir les facteurs à l'origine de la protection conférée par certains environnements ruraux contre l'asthme et l'atopie.

Durant la première phase de cette étude approfondie, les familles de 132 518 enfants vivant dans des zones rurales d'Allemagne, de Suisse, d'Autriche et de Pologne ont reçu un questionnaire concernant leur mode de vie (entre autres, des questions sur la proximité d'une ferme et sa fréquentation par les enfants, ce qui est produit par la ferme et utilisé comme nourriture du bétail le cas échéant, la consommation par les membres de la famille de lait cru ou encore les éventuelles manifestations allergiques ou asthmatiques des enfants). Ce questionnaire était systématiquement accompagné par une demande de consentement à la poursuite de l'étude prévoyant la réalisation de prélèvements de sang chez l'enfant et de poussière dans sa chambre. Au total, 79 888 questionnaires ont été retournés. Pour 34 491 familles ces questionnaires étaient accompagnés d'un consentement pour la poursuite de l'étude. Ces familles étaient donc sélectionnables pour la seconde phase (tableau I). Parmi elles, 9 668 ont été sélectionnées de façon aléatoire en fonction de leur strate d'exposition. Quatre-vingt-trois pour cent (soit 8 023 enfants participant à la phase II) ont fourni des échantillons de sang pour la mesure des IgE spécifiques.

Sur un total de 1 903 enfants remplissant toutes les conditions nécessaires à l'intégration dans la phase II de l'étude, 895 ont été sélectionnés pour participer à la troisième phase. Cette sélection a été réalisée en fonction des catégories d'exposition et de santé. Du fait de restrictions humaines et budgétaires, les analyses microbiennes n'ont été réalisées que pour la moitié des échantillons.

A chacune des phases successives, un nouveau questionnaire a été distribué aux familles, permettant l'investigation de paramètres génétiques et environnementaux de plus en plus détaillés (cf annexes 2, 3 et 4).

b/ asthme et maladies allergiques au sein de la population étudiée.

Une prévalence plus faible d'asthme infantile, de rhume des foins, de dermatite atopique et de sensibilisation atopique a été observée chez les enfants de fermiers comparés aux enfants non fermiers (tableau XXVI). Après ajustement et intégration des différentes variables (statut fermier, sexe, taille de la famille, antécédents atopiques et tabagisme maternel pendant la grossesse, les odds ratios concernant l'asthme infantile et l'atopie étaient respectivement de 0.69 ($p < 0.0001$) et de 0.53 ($p < 0.0001$). Un effet protecteur de la ferme a été observé pour tous les phénotypes asthmatiques : asthme infantile, asthme avec sifflements dans les 12 derniers mois, asthme atopique, asthme non atopique et sifflements sévères. Les définitions de l'asthme basées sur les réponses aux questionnaires ont été validées par la mesure des fonctions respiratoires dans la phase III. Ainsi la moyenne des ratios entre la force de l'expiration pendant la première seconde et la capacité volumétrique forcée ainsi que le flux maximum à la moitié de l'expiration étaient significativement plus faibles chez les enfants présentant un asthme infantile, un asthme actuel, un asthme atopique actuel et des sifflements sévères comparé aux enfants contrôles non asthmatiques (tableau XXVII).

c/ asthme et maladies allergiques ; exposition et environnement

Lors de l'analyse des questionnaires, il a été noté que les agriculteurs n'hésitaient pas à exposer leurs enfants à la ferme très tôt. Ainsi, l'exposition la plus forte a été trouvée pour la phase pendant la grossesse et pour la deuxième ou troisième année de la vie de l'enfant (figure 62). Ainsi, pour toutes les analyses, la phase d'exposition à la ferme correspond à la période recouvrant la grossesse jusqu'à la troisième année de l'enfant. Certaines de ces expositions (contact avec des animaux et leurs litières, séjour dans l'étable ou dans la grange, et consommation de lait cru) ont été, par les questionnaires, inversement corrélées à l'asthme infantile et à l'atopie indépendamment du statut fermier (tableau XXVIII). Pour de nombreux enfants, l'exposition aux fourrages, foin et paille, a montré des corrélations supérieures aux autres expositions, avec un coefficient r supérieur à 0.7.

Comme certaines études sur des enfants vivant dans des fermes laitières ont montré des résultats conflictuels concernant la protection contre l'asthme infantile, le contact avec les vaches a peu de chances d'être la cause principale de l'effet protecteur de la ferme. Ainsi, les interactions potentielles entre le contact avec les vaches et les autres expositions liées à la ferme ont été analysées pour identifier celles qui pourraient influencer sur cet effet protecteur. De toutes les variables d'exposition testées, seuls la paille, le foin et le contact avec les chats, lorsqu'ils sont associés avec le contact avec les vaches (analyses bivariées) ont montré une réduction de la prévalence de l'asthme infantile (tableau XXIX).

L'utilisation de modèles multivariés a montré que peu de variables d'expositions fermières restaient inversement liées à l'asthme infantile et à l'atopie (tableau XXX). Le contact avec les vaches et avec la paille ainsi que la consommation de lait cru dans la petite enfance sont des facteurs protecteurs indépendants pour l'asthme infantile.

En ce qui concerne la sensibilisation atopique, le contact avec la paille et la consommation de lait cru dans la petite enfance sont des déterminants significativement protecteurs (tableau XXX). Ainsi, les odds ratios augmentent de 0.53 à seulement 0.77 après l'inclusion des variables d'exposition à la ferme, indiquant la présence de facteurs d'exposition protecteurs additionnels et non détectés dans l'environnement fermier. L'exposition aux volailles et aux chiens tôt dans la vie de l'enfant contribue également au modèle lorsqu'on définit l'atopie à un taux plus élevé (> 3.5 kU/L). Une relation dose-dépendante a également été montrée, indiquant que plus l'exposition est importante, plus la protection est importante et ce pour toutes les variables.

Les associations entre les *taxa* microbiens et les variables de la ferme sont faibles (tableau XXXI). L'exposition à l'ensemble des *taxa* fongiques et bactériens est plus importante dans les logements fermiers que dans les logements non fermiers (figure 63) avec une corrélation faible entre eux ($r < 0.49$). Après ajustement à la strate fermière, l'exposition à *Eurotium spp.* à *Penicillium spp.* et aux bacilles à Gram négatif est inversement liée à l'asthme et à l'atopie (tableau XXXII). Comme les *Penicillium spp.* ont été détectés dans la majorité des échantillons de poussière, une approche quantitative a été utilisée. Des effets combinés des expositions fongiques et bactériennes ont été mis en évidence pour l'asthme mais pas pour l'atopie (*Eurotium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium*

sphaerospermum et des bacilles à Gram négatif). La taille limitée de l'échantillon n'a pas permis la stratification en asthme atopique et asthme non-atopique.

Dans les analyses multivariées faites sur les variables épidémiologiques investiguées à partir des questionnaires et sur les mesures d'expositions microbiennes, le modèle final de régression pour l'asthme retient, comme facteurs protecteurs, l'exposition aux bacilles à Gram positif et aux *Eurotium spp.* associée à la consommation de lait cru (tableau XXXIII). La taille limitée de l'échantillon ne permettait cependant pas de tester tous les effets combinés possibles. Pour l'atopie, l'exposition aux bacilles à Gram négatif et le contact avec la paille étaient les déterminants protecteurs les plus forts.

Tableau XXVI : prévalence de l'asthme et de l'atopie chez les enfants fermiers comparés aux enfants exposés et aux contrôlés

	Phase I				Phase II				Phase III			
	Total N = 34 491				Total N = 9 668 (ajusté sur 34 491)				Total N = 895 (ajusté sur 11 183)			
	Fermiers	Exposés	Contrôlés		Fermiers	Exposés	Contrôlés		Fermiers	Exposés	Contrôlés	
Diagnostic de dermatite atopique	12.7%	17.1%	17.6%		12.8%	17.1%	18.1%		11.2%	18.6%	17.7%	
Diagnostic de rhume des foins	3.6%	7.7%	11.7%		3.9%	7.3%	12.0%		5.0%	6.9%	8.3%	
Atopie	-	-	-		24.7%	35.2%	43.1%		24.2%	36.9%	41.7%	
Asthme infantile	13.3%	18.2%	21.6%		14.0%	19.5%	21.7%		12.9%	18.5%	18.3%	
Asthme actuel	8.5%	12.3%	15.5%		9.1%	13.4%	15.7%		8.5%	12.3%	12.8%	
Asthme atopique actuel	-	-	-		4.4%	7.3%	8.3%		5.1%	8.7%	8.4%	
Asthme non atopique actuel	-	-	-		3.4%	5.0%	5.9%		3.8%	4.3%	5.2%	
Sifflements sévères	-	-	-		1.7%	2.9%	3.6%		1.5%	3.1%	5.0%	

Tableau XXVII : paramètres des fonctions respiratoires chez les enfants asthmatiques et chez les non-asthmatiques

	FEV ₁ /FVC						FEF ₂₅₋₇₅						
	% pred			z-scores			% pred			z-scores			
	Moyenne	SEM	p	Moyenne	SEM	p	Moyenne	SEM	p	Moyenne	SEM	p	
Asthme infantile	Non	95.25	± 0.40	0.004	-0.56	± 0.05	0.002	88.16	± 1.34	0.006	-0.64	± 0.07	0.010
	Oui	93.12	± 0.61		-0.82	± 0.07		82.02	± 1.80		-0.94	± 0.09	
Asthme diagnostiqué	Non	95.26	± 0.38	< 0.001	-0.56	± 0.04	< 0.001	88.23	± 1.26	< 0.001	-0.63	± 0.06	< 0.001
	Oui	91.55	± 0.84		-1.00	± 0.09		76.94	± 2.29		-1.20	± 0.12	
Asthme actuel	Non	95.25	± 0.40	0.001	-0.56	± 0.05	< 0.001	88.16	± 1.34	0.002	-0.64	± 0.07	0.002
	Oui	92.25	± 0.79		-0.91	± 0.09		79.83	± 2.25		-1.05	± 0.12	
Asthme atopique actuel	Non	95.25	± 0.40	0.001	-0.56	± 0.05	< 0.001	88.16	± 1.34	< 0.001	-0.64	± 0.07	0.001
	Oui	91.47	± 1.05		-1.00	± 0.11		76.97	± 2.80		-1.22	± 0.15	
Asthme non-atopique actuel	Non	95.25	± 0.40	0.130	-0.56	± 0.05	0.174	88.16	± 1.34	0.641	-0.64	± 0.07	0.496
	Oui	93.84	± 0.96		-0.76	± 0.12		85.71	± 3.33		-0.72	± 0.16	
Sifflements sévères	Non	95.30	± 0.45	0.002	-0.56	± 0.05	< 0.001	88.57	± 1.53	< 0.001	-0.62	± 0.08	< 0.001
	Oui	88.83	± 2.00		-1.30	± 0.20		68.16	± 4.34		-1.67	± 0.25	

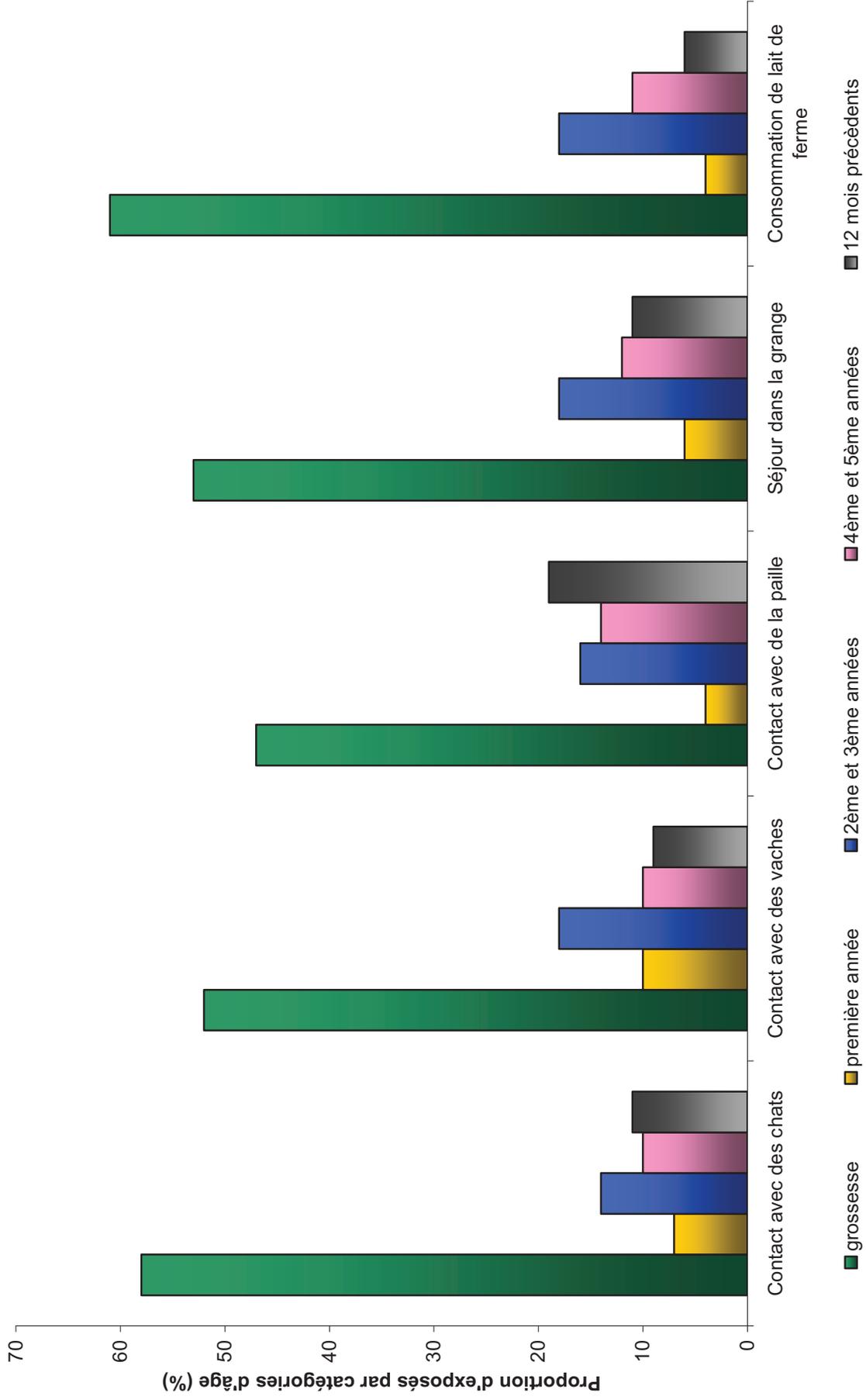


Figure 62 : premières expositions aux caractéristiques de la ferme calculées en tant que proportion de sujets exposés par catégorie d'âge.

Tableau XXVIII : Expositions à la ferme (de la grossesse à la troisième année) associée avec une décroissance du risque d'asthme infantile et d'atopie dans une analyse bivariée pesée, ajustée par centre et selon la variable ferme.

	Asthme infantile			Atopie		
	aOR	95%-IC	p	aOR	95%-IC	p
Contact avec des chats	0.86	0.75 - 0.99	0.04	0.75	0.66 - 0.85	< 0.001
Contact avec des chiens	0.96	0.83 - 1.11	0.59	0.81	0.71 - 0.93	0.002
Contact avec des vaches	0.73	0.61 - 0.87	< 0.001	0.69	0.60 - 0.80	< 0.001
Contact avec des volailles	0.86	0.71 - 1.05	0.13	0.71	0.60 - 0.83	< 0.001
Contact avec des moutons	0.80	0.63 - 1.01	0.06	0.78	0.63 - 0.96	0.02
Contact avec des chevaux	1.07	0.85 - 1.35	0.54	0.73	0.59 - 0.89	0.002
Contact avec le foin *	0.85	0.72 - 1.01	0.06	0.69	0.60 - 0.80	< 0.001
Contact avec la paille	0.74	0.62 - 0.88	< 0.001	0.57	0.49 - 0.66	< 0.001
Contact avec du blé *	0.76	0.61 - 0.94	0.01	0.73	0.61 - 0.88	< 0.001
Contact avec l'herbe *	0.96	0.80 - 1.14	0.6	0.77	0.66 - 0.89	< 0.001
Contact avec les céréales *	0.90	0.74 - 1.09	0.27	0.68	0.58 - 0.80	< 0.001
Contact avec les aliments achetés	0.80	0.65 - 0.98	0.03	0.71	0.59 - 0.86	< 0.001
Contact avec les betteraves	1.05	0.75 - 1.47	0.76	0.72	0.51 - 0.99	0.05
Séjour dans la grange	0.83	0.69 - 0.99	0.03	0.65	0.56 - 0.76	< 0.001
Séjour dans la salle de stockage du fourrage	0.90	0.71 - 1.16	0.42	0.73	0.60 - 0.90	0.003
Présence lorsque les parents s'occupent du fumier	0.67	0.50 - 0.92	0.01	0.86	0.67 - 1.09	0.22
Consommation de lait de ferme	0.65	0.55 - 0.76	< 0.001	0.65	0.57 - 0.75	< 0.001

Légende: * = combinaison de plusieurs questions. Foin : contact avec le foin servant de fourrage ou présence lorsque les parents récoltent ou manipulent le foin. Blé : Contact avec le blé servant à l'alimentation du bétail ou présence lorsque les parents récoltent, pilent ou préparent l'ensilage de blé. Herbe : contact avec l'herbe en tant que fourrage ou présents lorsque les parents préparent l'ensilage d'herbe. Céréales : contact avec les céréales servant au nourrissage du bétail ou présence lorsque les parents récoltent, battent ou pilent les céréales.

Tableau XXIX : effets combinés de différentes caractéristiques de fermes sur l'asthme infantile.
Analyses de régression logistiques ajustées en fonction des centres et de la ferme.

Asthme infantile		aOR	95%-IC	p
Contact avec les vaches (-), contact avec les chats (-)		1.00	-	-
Contact avec les vaches (-), contact avec les chats (+)		0.91	0.78 - 1.08	0.29
Contact avec les vaches (+), contact avec les chats (-)		0.91	0.65 - 1.27	0.58
Contact avec les vaches (+), contact avec les chats (+)		0.66	0.54 - 0.80	<0.001
Effet ferme		0.73	0.62 - 0.86	0.001
Contact avec les vaches (-), contact avec le foin (-)		1.00	-	-
Contact avec les vaches (-), contact avec le foin (+)		1.05	0.85 - 1.30	0.66
Contact avec les vaches (+), contact avec le foin (-)		0.93	0.68 - 1.26	0.63
Contact avec les vaches (+), contact avec le foin (+)		0.64	0.53 - 0.78	<0.001
Effet ferme		0.77	0.65 - 0.90	0.002
Contact avec les vaches (-), contact avec la paille (-)		1.00	-	-
Contact avec les vaches (-), contact avec la paille (+)		0.94	0.72 - 1.23	0.65
Contact avec les vaches (+), contact avec la paille (-)		0.87	0.69 - 1.09	0.23
Contact avec les vaches (+), contact avec la paille (+)		0.58	0.47 - 0.70	<0.001
Effet ferme		0.79	0.68 - 0.93	0.004

Tableau XXX : modèles de régression logistique ajustée avec une sélection de variables pour l'asthme et pour l'atopie. Toutes les variables d'exposition significatives à partir de l'analyse bivariée ont été incluses dans le processus de sélection.

	Modèle final			Modèle final ajusté pour la variable ferme et les autres variables		
	aOR	95%-IC	p	aOR	95%-IC	p
Asthme infantile						
Contact avec les vaches (-); contact avec la paille (-)	1.00	-	-	1.00	-	-
Contact avec les vaches (-); contact avec la paille (+)	0.92	0.71 - 1.20	0.56	0.96	0.73 - 1.27	0.79
Contact avec les vaches (+); contact avec la paille (-)	0.93	0.74 - 1.17	0.54	0.95	0.74 - 1.23	0.72
Contact avec les vaches (+); contact avec la paille (+)	0.62	0.51 - 0.74	< 0.001	0.67	0.53 - 0.84	< 0.001
Consommation de lait de ferme	0.67	0.56 - 0.79	< 0.001	0.68	0.57 - 0.83	< 0.001
Effet ferme	-	-	-	0.94	0.79 - 1.11	0.45
Atopie						
Contact avec la paille	0.65	0.54 - 0.78	< 0.001	0.71	0.57 - 0.87	0.001
Consommation de lait de ferme	0.69	0.60 - 0.79	< 0.001	0.78	0.67 - 0.91	0.001
Contact avec les chats	0.83	0.73 - 0.95	0.006	0.89	0.78 - 1.03	0.12
Séjour dans la grange	0.80	0.67 - 0.96	0.01	0.87	0.71 - 1.07	0.19
Effet ferme	-	-	-	0.78	0.66 - 0.91	0.002

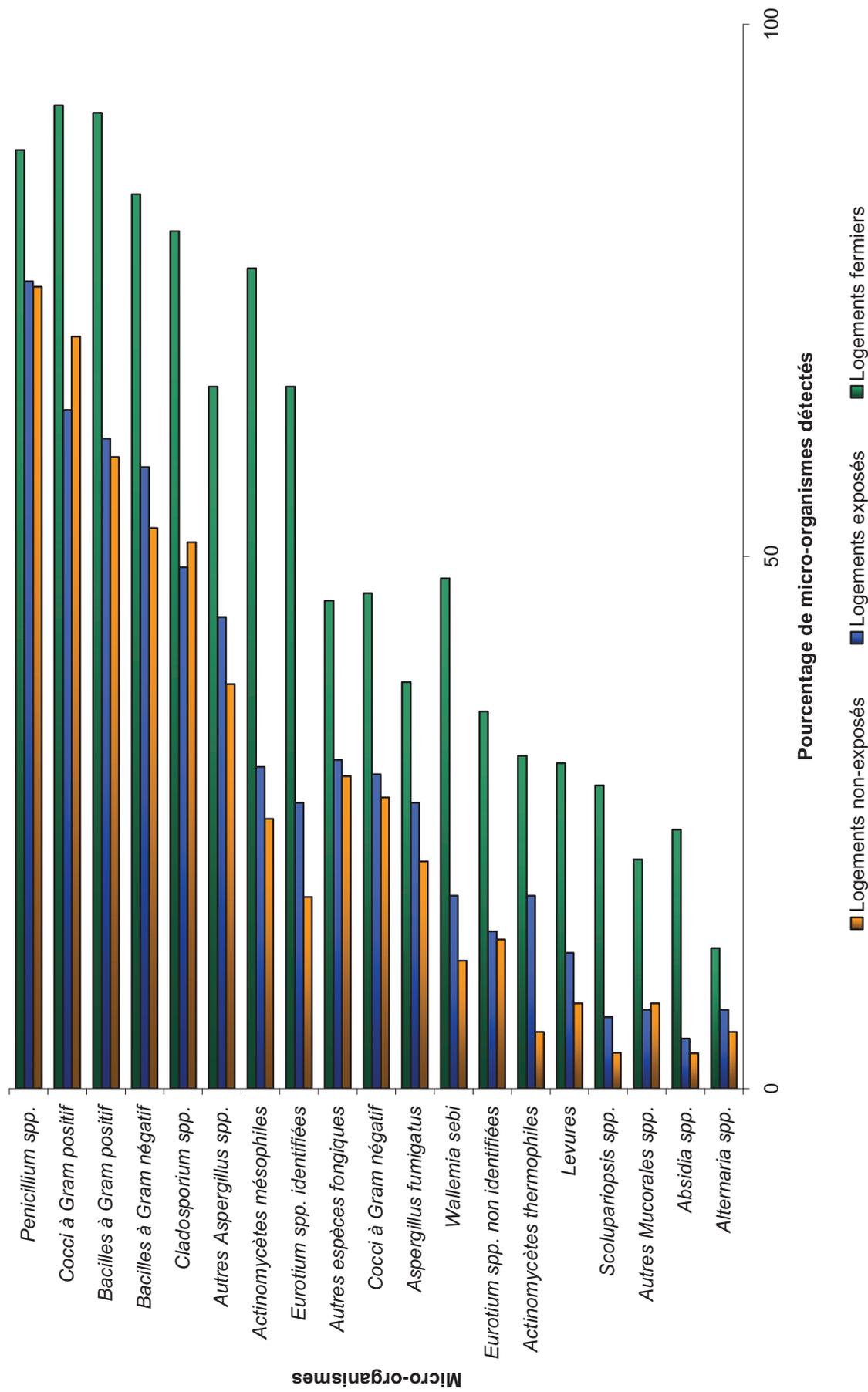


Figure 63 : *taxa* fongiques et bactériens détectés dans les échantillons de poussière sédimentée des chambres d'enfants en fonction de leur statut fermier

Tableau XXXI : Champignons et bactéries cultivables et effets combinés associés avec un risque décroissant d'asthme infantile et d'atopie dans une analyse bivariée ajustée sur l'effet ferme.

Effet simple	Asthme			Atopie		
	aOR	95%-IC	p	aOR	95%-IC	p
<i>Eurotium spp.</i>	0.44	0.23 - 0.85	0.01	-	-	-
log <i>Eurotium spp.</i>	0.80	0.67 - 0.95	0.01	-	-	-
Bacille à Gram négatif	-	-	-	0.45	0.27 - 0.76	0.003
Effet combiné	aOR	95%-CI	p	aOR	95%-CI	p
<i>Eurotium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>	0.20	0.09 - 0.45	< 0.001	-	-	-
<i>Eurotium spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	0.25	0.09 - 0.67	0.006	-	-	-
<i>Eurotium spp.</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0.34	0.16 - 0.72	0.005	-	-	-
<i>Eurotium spp.</i> , Bacille à Gram positif	0.33	0.15 - 0.71	0.005	-	-	-
<i>Eurotium spp.</i> , <i>Streptomyces</i> mésophiles	0.36	0.16 - 0.77	0.008	-	-	-

Légende: effet combiné = combinaisons pour lesquelles un risque diminué d'asthme infantile ou d'atopie atteint le seuil de significativité.

Tableau XXXII : Associations entre les expositions actuelles et antécédentes et les bactéries et champignons les plus influents en fonction de l'exposition.

Expositions actuelles (12 mois précédents)	<i>Eurotium spp.</i>			<i>Penicillium spp.</i>			Bacille à Gram négatif		
	OR	95%-IC	p	OR	95%-IC	p	OR	95%-IC	p
Fermiers : Contact avec les vaches	1.67	0.63 - 4.41	0.31	1.03	0.39 - 2.68	0.96	1.55	0.45 - 5.32	0.49
Contact avec la paille	2.50	0.98 - 6.37	0.06	1.42	0.57 - 3.57	0.45	1.68	0.48 - 5.89	0.42
Consommation de lait de ferme	0.75	0.29 - 1.94	0.56	0.66	0.26 - 1.69	0.39	1.39	0.37 - 5.22	0.63
Contact avec les chats	0.71	0.21 - 2.40	0.58	1.76	0.52 - 5.99	0.37	0.81	0.25 - 2.67	0.73
Séjour dans la grange	2.41	0.84 - 6.91	0.1	1.14	0.42 - 3.08	0.8	1.32	0.37 - 4.77	0.67
Non-fermiers : Contact avec les vaches	0.65	0.16 - 2.59	0.54	2.70	1.08 - 6.76	0.03	1.80	0.69 - 4.71	0.23
Contact avec la paille	0.90	0.33 - 2.43	0.83	1.04	0.52 - 2.11	0.91	1.15	0.57 - 2.33	0.7
Consommation de lait de ferme	0.37	0.07 - 1.92	0.23	1.86	0.71 - 4.85	0.21	1.38	0.54 - 3.52	0.5
Contact avec les chats	1.20	0.56 - 2.59	0.64	1.20	0.66 - 2.17	0.56	1.52	0.84 - 2.74	1.16
Séjour dans la grange	0.95	0.39 - 2.35	0.91	1.22	0.63 - 2.37	0.56	0.95	0.50 - 1.84	0.89
Antécédents d'exposition (de la naissance à 3 ans)	OR	95%-IC	p	OR	95%-IC	p	OR	95%-IC	p
Fermiers : Contact avec les vaches	0.77	0.28 - 2.11	0.61	0.70	0.24 - 2.01	0.5	0.70	0.18 - 2.71	0.61
Contact avec la paille	1.74	0.66 - 4.56	0.26	1.80	0.70 - 4.62	0.22	0.69	0.20 - 2.44	0.57
Consommation de lait de ferme	2.38	0.95 - 5.97	0.06	2.87	1.15 - 7.14	0.02	4.55	1.05 - 19.69	0.04
Contact avec les chats	0.69	0.24 - 2.03	0.51	1.80	0.62 - 5.25	0.28	1.40	0.39 - 5.06	0.6
Séjour dans la grange	2.97	1.02 - 8.63	0.05	2.51	0.90 - 6.98	0.08	1.31	0.35 - 4.91	0.69
Non-fermiers : Contact avec les vaches	0.95	0.37 - 2.42	0.92	1.75	0.86 - 3.60	0.13	1.46	0.71 - 3.04	0.31
Contact avec la paille	1.70	0.67 - 4.27	0.26	2.03	0.95 - 4.32	0.07	1.76	0.82 - 3.78	0.15
Consommation de lait de ferme	0.56	0.17 - 1.86	0.35	2.31	1.01 - 5.31	0.05	1.41	0.62 - 3.22	0.41
Contact avec les chats	1.14	0.51 - 2.53	0.75	1.03	0.57 - 1.88	0.92	0.98	0.54 - 1.77	0.95
Séjour dans la grange	1.35	0.57 - 3.20	0.5	1.61	0.81 - 3.21	0.18	1.27	0.64 - 2.52	0.5

Tableau XXXIII : modèles de régression logistique finaux selon les variables importantes en fonction des questionnaires et des bactéries et champignons importants montrés dans le tableau XXVIII

Asthme	Modèle final			Modèle final ajusté pour la variable		
	aOR	95%-IC	p	aOR	95%-IC	p
Consommation de lait de ferme	0.63	0.37 - 1.05	0.08	0.66	0.37 - 1.19	0.17
<i>Penicillium spp.</i> (quantitatif)	0.83	0.70 - 0.99	0.04	0.80	0.66 - 0.96	0.02
<i>Eurotium spp.</i> (-), Bacille à Gram négatif (-)	1.00	-	-	1.00	-	-
<i>Eurotium spp.</i> (-), Bacille à Gram négatif (-)	0.56	0.14 - 2.18	0.4	0.51	0.11 - 2.44	0.4
<i>Eurotium spp.</i> (-), Bacille à Gram négatif (-)	0.82	0.46 - 1.46	0.5	0.74	0.39 - 1.37	0.33
<i>Eurotium spp.</i> (-), Bacille à Gram négatif (-)	0.37	0.17 - 0.77	0.008	0.35	0.15 - 0.80	0.01
Effet ferme	-	-	-	1.25	0.87 - 1.79	0.23
Atopie	aOR	95%-IC	p	aOR	95%-IC	p
Bacille à Gram négatif	0.47	0.28 - 0.78	0.004	0.41	0.24 - 0.72	0.002
Contact avec la paille	0.63	0.37 - 1.04	0.07	0.59	0.31 - 1.11	0.1
Contact avec les chats	0.58	0.34 - 0.99	0.05	0.72	0.40 - 1.29	0.27
Effet ferme	-	-	-	0.97	0.65 - 1.46	0.89

DISCUSSION

L'environnement fermier, de par la multiplicité des sources microbiennes et la configuration des étables, est un environnement complexe, sujet à des variations journalières et saisonnières (209), difficile à échantillonner et qui, de ce fait, a rarement été étudié dans sa globalité. Des études ont été menées par le passé pour valider des méthodes diverses d'échantillonnage de l'environnement fermier, mais rares sont celles qui se sont intéressées à la diversité microbienne (188, 276). Les études regroupées dans ce travail de thèse sont parmi les premières à prendre en compte la diversité des micro-organismes que contient ce type de prélèvements. En effet, certaines études ont porté sur l'identification des espèces fongiques retrouvées dans l'air et les fourrages des étables, dans le but de trouver les agents responsables de maladies telle la maladie du poumon de fermier (235, 243, 244). D'autres études se sont focalisées sur les bactéries utiles dans la fabrication des fromages et qui sont retrouvées dans le lait ou sur les trayons des vaches (39, 53, 69), et d'autres encore ont cherché à caractériser l'environnement fermier en fonction des composés microbiens (endotoxines et autres) (111, 141, 200, 304), dont la présence est en relation avec un risque plus faible de maladies allergiques (45, 87, 296).

Dans le cadre de cette thèse, plusieurs points ont été abordés. Dans un premier temps, une méthode simple, efficace, reproductible et peu coûteuse de prélèvements de l'environnement a été recherchée. Puis, l'efficacité des différentes méthodes a été étudiée par comparaison avec les prélèvements d'air habituellement réalisés dans de telles études. Ensuite, différentes méthodes d'analyses ont été évaluées permettant d'obtenir une diversité microbienne la plus complète possible, aussi bien pour les espèces fongiques que pour les espèces bactériennes. Ces méthodes d'analyses font appel à des domaines divers allant de la caractérisation macroscopique à l'identification par biologie moléculaire. Enfin, les différents compartiments environnementaux de la ferme ont été caractérisés du point de vue de leur composition microbienne. Cette caractérisation a été appliquée à l'étude de l'exposition des enfants à la microflore des bioaérosols des étables et des logements avec le projet GABRIEL et à leur exposition à la flore microbienne du lait avec le projet AgriSanté, toutes deux en rapport plus ou moins direct avec la problématique de l'allergie et de l'asthme. Le cheminement de cette étude a donc permis de valider les méthodes de prélèvements des micro-organismes du point de vue des espèces viables et cultivables sur nos milieux de culture.

Par la suite, nous avons testé l'avantage de la méthode de clonage sur la méthode de culture et avons trouvé que de nombreuses nouvelles espèces bactériennes pouvaient être identifiées par

cette méthode. Cependant, une partie des clones obtenus n'a pas été référencée et leur identification reste incomplète, au niveau du Genre, parfois de la Famille ou même de l'Ordre ou du Phylum.

Les méthodes de culture et de PCR, appliquées à l'ensemble des compartiments de la ferme (dans l'étable ainsi que sur le matériel de traite), ont abouti à l'identification de possibles transports microbiens au sein de l'étable et de l'étable vers la salle de traite. Ainsi, l'origine des champignons retrouvés dans le lait peut être multiple mais nos résultats suggèrent que les sources principales d'espèces fongiques dans l'environnement de l'étable sont la poussière sédimentée et le foin distribué aux animaux. Les quantités bactériennes sont également plus importantes dans ces deux types de prélèvements que dans les autres. Cependant la flore bactérienne identifiée dans le lait est surtout le reflet de celle de la surface du trayon et de la partie de la machine à traire située entre le gobelet (ou récipient à lait) et les manchons. L'étude des étables et des chambres associées dans le cadre du projet Gabriel a montré que les espèces fongiques et les actinomycètes circulent plus facilement d'un bâtiment à un autre que les espèces bactériennes non sporulantes.

Ainsi, ces différentes expériences montrent que l'espace occupé par les vaches est assez homogène aussi bien du point de vue de la flore fongique que de la flore bactérienne. Quelques interrogations subsistent quant à la provenance de certaines espèces bactériennes identifiées dans le lait. Les enfants qui fréquentent les étables sont donc en contact avec cette microflore aussi bien lorsqu'ils participent à l'activité de la ferme que lorsqu'ils sont dans leur chambre ou consomment le lait produit dans la ferme.

A/ Evaluation des méthodes de prélèvements de la microflore des étables.

Afin d'évaluer les performances des différentes méthodes de prélèvements, des échantillonnages ont été effectués en parallèle. Il a été supposé que les micro-organismes fongiques et bactériens de l'environnement fermier finissaient par sédimenter et se retrouver dans la poussière, sous la forme d'organismes vivants, de spores ou de cellules mortes ou même de débris cellulaires contenant de l'ADN. Différentes méthodes de prélèvements de la poussière ont donc été testées et comparées avec les différents échantillons d'air collectés en parallèle.

- La méthode de récolte de la poussière sédimentée permet-elle d'identifier la microflore des étables?

D'une manière générale, la comparaison des différents prélèvements, du point de vue de la diversité microbienne, a montré que les résultats obtenus avec les prélèvements d'air et de poussière offrent des profils relativement semblables, même si quelques nuances sont à apporter pour certains échantillons. Par exemple, les résultats obtenus pour les bactéries et champignons cultivables indiquent que les échantillons collectés avec des boîtes en plastique déposées pendant un mois dans des étables reflètent correctement (coefficient de corrélation de 0.82) la composition des échantillons de l'air avant distribution du fourrage au bétail.

Comme indiqué précédemment, ces résultats concernant les micro-organismes cultivables et ne représentent donc qu'une fraction des micro-organismes présents dans l'étable (97) puisque des champignons et bactéries ne sont pas cultivables sur les milieux que nous avons utilisés. Pour pouvoir comparer un maximum d'échantillons sans avoir à nous soucier d'un effet de saison, nous avons choisi de n'étudier les différents prélèvements que pendant la période hivernale. Durant cette période, les niveaux microbiens et la diversité microbienne sont élevés du fait de la présence permanente des animaux dans l'étable et du nourrissage qui se déroule dans un espace clos (234, 243).

Les différences constatées en fonction des méthodes de récolte de la poussière indiquent que certains points sont à prendre en compte pour obtenir des échantillons représentatifs de la contamination de l'air. En effet, il avait été exposé lors d'une étude réalisée par Chew et al. (56) sur un panel de 397 habitations américaines, que la divergence entre les échantillons de

poussière sédimentée et ceux d'air peut être due à la faible représentativité d'échantillons d'air prélevés sur une période de temps courte et unique. Nos résultats montrent que les coefficients de corrélation obtenus pour chaque micro-organisme sur des moyennes de fermes étaient bien meilleurs que lorsque les fermes sont considérées une par une dans les calculs. La faible valeur du coefficient de corrélation entre les prélèvements d'air et de poussière pris isolément pourrait être due à la forte variabilité dans le temps de la composition microbienne de l'air. En particulier, certains auteurs ont déjà décrit d'importantes variations journalières dans les niveaux de contamination de l'air des étables (209, 273). De plus, il a été prouvé que de la manipulation de fourrages résultait une augmentation des spores de *Eurotium* et de *Cladosporium*, espèces fongiques utilisant le foin comme substrat de croissance. Le même constat a été effectué pour les actinomycètes mésophiles (235, 243).

Afin d'améliorer la corrélation entre les échantillons d'air et de poussière, un échantillonnage sur une durée plus longue de l'air aurait pu être envisagé mais cela aurait comporté certains inconvénients, notamment une surreprésentation des espèces moins sensibles à la dessiccation et une perte de diversité par saturation du filtre.

Par contraste avec les échantillons d'air, les prélèvements de poussière sédimentée, quels qu'ils soient, permettent de faire la synthèse sur plusieurs jours voire semaines entre des périodes d'intense contamination de l'atmosphère et des phases de faible contamination. Cette pondération au fil du temps s'avère être un avantage lorsqu'il s'agit d'évaluer une exposition cumulée des sujets aux micro-organismes de l'environnement.

Cependant, dans le cadre d'études environnementales, les analyses microbiennes doivent parfois être différées, notamment pour des raisons logistiques. Si la conservation des échantillons à -20°C n'est pas possible, l'évolution de la microflore dans la poussière aboutit à la disparition de certaines espèces et donc à une perte de diversité, et à la prédominance de certaines autres espèces comme, par exemple, les bactéries à Gram positif que nous avons observées dans la poussière collectée avec une spatule. En effet, la poussière récoltée à la spatule est une poussière sans âge, qui s'est accumulée depuis le précédent lavage de l'étable, avant le retour des vaches au début de l'hiver. Le fait de conserver les différents types de poussière pendant trois mois dans des récipients fermés a accentué cette perte de diversité et cette surreprésentation de certaines espèces. L'évolution de la microflore dans la poussière sédimentée avec le temps peut, au moins en partie, expliquer les faibles relations obtenues

dans les études précédentes entre l'air et les poussières sédimentées récoltées à la spatule (175, 177, 202, 308).

Ainsi, la standardisation des prélèvements de poussière sédimentée dans une boîte ou sur une lingette améliore l'évaluation de la contamination environnementale dans les fermes. L'aspect pratique de la manipulation des lingettes, le fait qu'elles peuvent facilement être envoyées par la poste à la fin de la période d'exposition et leur faible coût en font une méthode de prélèvement applicable aux larges études environnementales de terrain. Mais, bien que les échantillons standardisés de poussière sédimentée offrent des résultats de flore microbienne représentatifs de ceux obtenus avec les prélèvements d'air, leur conservation avant analyse doit être régulée et la conservation des échantillons à une température de -20°C doit être envisagée pour éviter la perte de diversité microbienne et la perte de matériel viable.

- Les méthodes de récolte de la poussière donnent-elles des résultats reproductibles ?

D'une manière générale, l'étude menée dans le cadre d'une comparaison des différentes méthodes de prélèvements a montré que les techniques de prélèvements de poussière par dépôt dans une boîte en plastique ou sur une lingette stérile donnent des résultats reproductibles, comme l'indiquent les coefficients de corrélations de 0,73 obtenu entre les deux lingettes successives et de 0,72 obtenu entre les deux boîtes en plastique. Les deux méthodes ont également donné des résultats très similaires en ce qui concerne la composition microbienne de la poussière sédimentée. Ainsi, la mise en parallèle des lingettes (deux fois quinze jours) et des boîtes (une fois un mois) a mis en évidence une diversité partagée de plus de 60%.

Ces résultats viennent ici en complément de ceux obtenus récemment par Noss et al. qui ont exposé que l'utilisation de lingettes électrostatiques était une méthode efficace de mesure de l'exposition aux endotoxines contenues dans la poussière aéroportée des environnements intérieurs (203). Contrairement aux méthodes de récolte par impaction de l'air, et du fait de la durée de prélèvement, les méthodes de récolte de la poussière sédimentée permettent de s'affranchir des variations journalières dues à la distribution de fourrages. Cependant, il faut garder en mémoire que la composition des bioaérosols varie aussi d'une saison à une autre et que ces méthodes sont valables sur une période limitée de quelques mois.

En conclusion, les méthodes de prélèvement de poussière standardisée et les méthodes d'analyse de la diversité cultivable, utilisées dans le cadre de cette étude, se sont avérées reproductibles donnant des résultats comparables. Leur utilisation pour de larges études environnementales est donc envisageable.

- Quelle est la méthode de conservation la moins délétère de la diversité et de la quantité microbienne pour les lingettes en attente d'analyse?

Afin de compléter les observations effectuées sur les échantillons de poussière conservés pendant 3 mois à température ambiante, une étude a été réalisée sur des prélèvements de poussière déposée sur des lingettes. Ces lingettes ont été placées pendant un mois dans deux étables. Quatre analyses faisant varier les durées et les températures de conservation ont été réalisées. Cette expérience a montré qu'il existe une évolution de la poussière dans le temps.

La congélation à -20°C est un moyen efficace de ralentir cette évolution mais peut également biaiser les résultats. En effet, il existe des micro-organismes qui sont plus tolérants aux variations de la température que d'autres et donc plus résistants à une congélation à -20°C (281). Les quantités relatives de chaque micro-organisme sont certainement influencées par la méthode de conservation.

Une analyse immédiate après l'échantillonnage permet de visualiser la diversité réelle des prélèvements. Lorsqu'elle n'est pas possible, la congélation à -20°C permet de limiter les modifications de la flore microbienne dans l'échantillon.

B/ Comparaison des méthodes d'analyses bactériennes (viable et non viable)

Comme indiqué par les résultats discutés dans la section précédente, les méthodes utilisées pour l'identification de la diversité fongique des prélèvements sont assez reproductibles et fiables. Ces identifications basées sur l'aspect macro- et microscopique des colonies ont été élaborées au cours d'études antérieures et ont fréquemment montré leur intérêt, tant au niveau de la reproductibilité des manipulations qu'au niveau de la rapidité et du faible coût des analyses. De l'autre côté, les analyses bactériennes, lourdes et sélectives, peuvent être largement optimisées. La méthode de clonage permet d'identifier une plus grande partie de la diversité bactérienne en s'affranchissant de l'aspect viable et non-viable des bactéries ainsi que des conditions de culture.

- La méthode d'identification par clonage permet-elle de mieux définir un environnement microbien que la méthode de culture?

Des méthodes ont été décrites permettant la caractérisation des micro-organismes dans l'environnement sans procéder à l'étape de culture [clonage (42, 103, 157, 210) et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (77, 173, 174)]. Leurs principales limites sont la durée de mise en oeuvre, leur coût et le fait qu'elles ne permettent pas de connaître la viabilité des micro-organismes étudiés.

Dans certains cas, la connaissance de la diversité totale de l'environnement fermier, incluant les micro-organismes non viables, peut être utile (asthme, maladie du poumon de fermier, allergies, agroalimentaire).

Nous avons donc, dans le cadre de cette étude, procédé à la détermination de la diversité microbienne selon plusieurs approches. D'un côté, une approche axée sur les micro-organismes cultivables (fongiques et bactériens) et, de l'autre, une approche de la diversité bactérienne totale que nous avons appliquée à un nombre limité de prélèvements de poussière.

La grande variabilité bactérienne observée dans les différents types d'échantillons analysés ici (98 espèces bactériennes dont une seule a été identifiée dans plus de la moitié des échantillons) implique que la composition bactérienne des fermes repose sur quelques espèces dominantes.

La contribution de la méthode de clonage, avec l'identification de 30 genres bactériens nouveaux, nous indique que l'identification par la culture n'est pas suffisamment efficace pour apprécier la diversité bactérienne réelle d'un environnement. Un minimum de 20 nouveaux milieux de culture serait nécessaire pour optimiser l'approche par la culture.

Cependant, dans de nombreux cas, la méthode de clonage aboutit à une identification incomplète avec l'obtention de séquences correspondant à des bactéries non-identifiées. Ces ADN peuvent toutefois avoir une importance non-négligeable dans la composition de l'environnement des fermes et dans la protection contre l'asthme et les allergies.

C/ La flore microbienne de l'environnement de l'enfant

L'impact sur la santé de composés microbiens comme les endotoxines est connu et avéré en allergologie. Cependant, ces composés sont avant tout des éléments produits par des bactéries. Leurs caractéristiques et leurs propriétés sont différentes en fonction des espèces bactériennes qui les produisent. Il est donc légitime de penser que la protection observée dans un modèle murin puisse être amplifiée si, une fois les différences dans la flore bactérienne des enfants protégés mises en évidence, les endotoxines protectrices étaient séparées des autres.

D'un autre côté, alors que quelques sources anciennes indiquent que le lait de vache est stérile dans le pis (127) (méthodes de culture peut-être insuffisantes), il a également été montré qu'il existait une flore inhérente au lait dans le tank (138, 143). L'origine de cette flore est pour une grande partie, encore inconnue. Ainsi, les deux projets sur lesquels est basé ce travail de thèse auront permis de répondre à ces deux questions sur l'environnement de l'enfant (respiration et consommation).

- Quels sont les flux dans les étables qui permettent l'ensemencement naturel du lait en micro-organismes viables?

La composition microbienne de l'air et du lait a souvent été étudiée dans des thématiques de santé (311, 313). La microbiologie du lait, quant à elle, a été étudiée dans les problématiques de fabrication des fromages (38, 52, 180). En effet, la consommation de lait cru a régulièrement été associée à une diminution des risques allergiques et asthmatiques chez les enfants fermiers (240, 302, 304). D'un autre côté, la composition du lait en bactéries utiles à la fabrication des fromages a souvent été étudiée, notamment pour les fromages d'appellation d'origine contrôlée (37, 39, 53, 60, 73, 119, 129, 178). De nombreuses études ont aussi porté sur la détection des bactéries pathogènes ou susceptibles d'altérer la qualité des laits (132, 133, 192, 239, 252, 254, 271).

Dans le cadre de cette étude, nous avons donc cherché à évaluer la contamination microbienne (fongique et bactérienne) de l'étable afin d'identifier les sources potentielles de contamination du lait.

Cette démarche originale nous a donné un aperçu assez général de la flore microbienne dans différents compartiments de l'étable (lieu de vie des animaux, nourriture, peau des vaches, ou encore matériel de traite) et un nombre important de micro-organismes a pu être identifié dans les différents prélèvements.

D'une manière générale, les bactéries utiles à la fabrication des fromages n'ont été retrouvées qu'en faible nombre dans les échantillons environnementaux par opposition au lait et à la surface des trayons des vaches. Plus généralement, la surface des trayons apparaît comme étant une des sources majeures de la contamination bactérienne du lait. La détection des bactéries lactiques et propioniques a posé un problème car dans l'air, la poussière et les échantillons de foin, la proportion de micro-organismes environnementaux, bactériens et fongiques, est telle qu'il devient difficile, sur des milieux de culture généraux, de visualiser les espèces minoritaires. Ainsi les cultures sur milieu Mueller-Hinton ne permettent de détecter qu'une quantité très faible de ces micro-organismes. Seule l'espèce *Lactococcus lactis* a pu être identifiée sur ce milieu et ce, uniquement à partir d'échantillons de lait. Même en ayant recours à des milieux de culture spécifiques, nous n'avons pu détecter les bactéries lactiques dans les différents compartiments de l'étable en amont du lait. Ceci est probablement dû au fait qu'elles ne représentent qu'une part minime de la flore des étables par ailleurs très riches en micro-organismes divers. Ainsi, l'utilisation de méthodes d'enrichissement ciblant ces bactéries ou de PCR en temps réel spécifiques devra être considérée si l'on veut identifier l'origine de ces bactéries constituant la première flore du lait.

Les bactéries environnementales sont nombreuses, mais assez rares sont les espèces que nous avons retrouvées dans plus d'un échantillon. Sur les 136 espèces bactériennes identifiées par culture sur milieu Mueller-Hinton puis par séquençage dans les seize fermes du projet AgriSanté, seules 38 ont été retrouvées dans le lait et à des concentrations relativement faibles. Il existe donc une barrière non négligeable entre l'étable et le lait qui limite la contamination du lait. Pour illustrer cette séparation probablement physique (différente localisation dans l'étable) dans le cas d'une étable à stabulation libre, nous avons testé le flux microbien aéroporté entre l'air de l'étable et l'air de la salle de traite. Les tests de corrélation entre les trois types de prélèvements (air avant travail, air après travail et air de la salle de traite) ont montré qu'il existe un flux entre l'étable et la salle de traite, probablement induit par les mouvements des vaches dans l'étable.

Des différences dans la composition microbienne des laits ont été observées entre les étables entravées et les stabulations libres, indiquant une plus forte contamination du lait dans les étables entravées. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que la traite est physiquement séparée de l'espace de vie des vaches dans les stabulations libres, et que les salles de traite sont nettoyées à grandes eaux chaudes après chaque traite. Dans les étables entravées, cette séparation physique n'existe pas puisque les vaches sont traites à même leur litière et que le nettoyage consiste simplement en un raclage et remplacement de la paille souillée.

D'autres sources de contamination, comme le matériel de traite ont également été étudiées et ont montré des résultats similaires avec une forte contamination des éléments les plus proches physiquement des animaux : la surface des trayons, les manchons et la sortie de lait des manchons. Les analyses sont toujours en cours mais le faible nombre de fermes prélevées (quatre bâtiments) ne nous permettra pas de tirer des conclusions définitives.

- Quelle est la population bactérienne (viable et non-viable) de la poussière des étables du projet Gabriel ?

Pour l'essentiel, nous nous sommes focalisés sur les bactéries et champignons cultivables de l'environnement et qui pouvaient être obtenus par des méthodes de culture sur des milieux standards. Ces micro-organismes, cependant, ne représentent qu'une fraction des micro-organismes de tout environnement naturel. Afin de caractériser de façon la plus complète possible l'environnement avec lequel l'enfant entre en contact lorsqu'il est dans l'étable, nous avons décidé d'utiliser aussi la méthode de clonage que nous avons validée précédemment dans le cadre du projet AgriSanté. En effet, même si les approches basées sur la culture sont plus faciles à utiliser, elles génèrent des résultats moins complets que ceux des techniques génétiques (97).

Du fait de la lourdeur des techniques de clonage, nous avons regroupé les prélèvements en six pools, constitués à partir des lingettes de poussière provenant des étables. D'une manière générale, la méthode s'est avérée efficace puisqu'elle a permis l'obtention d'environ 200 clones par pool.

Quel que soit l'état de santé de l'enfant (asthmatique, atopique ou ni asthmatique, ni atopique), la flore bactérienne dominante de l'étable est représentée par *Clostridium sp.*

(bactéries anaérobies strictes) et par *Atopostipes sp.* (bactéries aéro-anaérobies). Ces bactéries sont fréquemment identifiées en milieu agricole (62, 147, 160).

Si l'on considère le nombre de clones obtenus pour une espèce donnée et pour un pool donné comme étant représentatif de la quantité d'ADN de cette même espèce présente dans le pool initial, certaines espèces et genres bactériens ne sont pas identifiés avec la même fréquence dans tous les pools. Ainsi, le genre *Atopostipes*, bien que présent dans tous les pools, est identifié plus fréquemment dans les pools 3 et 4 correspondant aux enfants atopiques que dans les autres pools et le genre *Sphingomonas* est plus retrouvé dans les pools 5 et 6 correspondant à des enfants asthmatiques. Cependant, dans l'attente de la mise en place de protocoles de PCR en temps réel ou de puces à ADN ciblés sur quelques-unes des espèces bactériennes mises en évidence par cette étude, les fréquences respectives d'identification des genres bactériens ne concernent finalement que deux pools par catégorie de sujets, rendant impossible toute conclusion sur les liens entre le statut clinique des enfants et la composition du bioaérosol auquel ils sont exposés.

- D'où proviennent les micro-organismes retrouvés dans les chambres des enfants du projet Gabriel et quels sont les flux potentiels qui permettent leur transfert d'un bâtiment à un autre ?

A notre connaissance, aucune étude environnementale axée sur la microflore n'avait permis à ce jour de mettre en évidence des flux microbiens entre les étables et les chambres des enfants dans la thématique de l'asthme et de l'allergie.

D'une manière générale, notre travail suggère fortement que la flore microbienne caractéristique de l'étable et de la grange est transportée jusqu'aux habitations en quantité non négligeable. Ce transport peut se faire soit par un flux aérien, soit plus probablement par les allées et venues des personnes entre les bâtiments agricoles et le domicile. En conséquence, nous avons noté une tendance marquée vers une augmentation de la quantité microbienne dans les habitations de fermiers, comparée aux habitations de contrôles ou d'enfants exposés. De plus, ce flux/transport a tendance à modifier de façon importante la composition de la flore microbienne de la chambre de l'enfant. Tandis que l'environnement des enfants contrôles est caractérisé par une prédominance de *Penicillium spp.*, chez les agriculteurs, ce champignon est largement surpassé par des espèces du groupe *Eurotium spp.*

Aspergillus glaucus et son téléomorphe *Eurotium herbariorum* sont caractéristiques d'un environnement fermier et trouvent leur origine dans la distribution de fourrage au bétail. Ces champignons, mais aussi certaines Mucorales et certains actinomycètes sont également fréquents dans l'environnement fermier. De plus, notre étude a montré que pour sept *taxa* (l'ordre des *Mucorales*, les groupes *Aspergillus spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, levures et actinomycètes thermophiles), la quantité microbienne dans l'étable et dans les logements de fermiers était corrélée positivement et significativement. Cette observation corrobore l'hypothèse d'un flux ou d'un transport de l'étable à la chambre de l'enfant. Il pourrait jouer un rôle important dans l'exposition des enfants puisque, pour la plupart des groupes fongiques, le ratio entre les deux compartiments est situé entre 1/10 et 1/30. Pour ces micro-organismes, il peut être transposé que lorsque l'enfant passe de 10 à 30 heures dans sa chambre, il est entré en contact avec une quantité microbienne égale à celle qu'il aurait respirée s'il avait passé une heure dans l'étable.

Contrairement à ce qui a été mis en évidence pour les actinomycètes, la contamination de la chambre par les autres *taxa* bactériens semble être moins influencée par la proximité d'une étable. Ceci peut être dû à la capacité qu'ont les spores d'actinomycètes d'être facilement disséminées dans l'atmosphère. La plupart des autres bactéries n'ont pas la possibilité de sporuler et ont besoin d'un système de transfert indirect tel que les mains ou les vêtements des agriculteurs pour passer d'un environnement à un autre.

Le cas de *Penicillium spp.* est quelque peu différent. D'un côté, le faible ratio entre l'air de la chambre des enfants agriculteurs et l'air de l'étable, ainsi que la corrélation positive entre le nombre de UFC trouvé dans ces deux environnements, suggère que l'air des chambres est contaminé par les spores de *Penicillium* provenant de l'étable. D'un autre côté, les espèces de *Penicillium* sont également prédominantes dans la flore fongique des chambres des enfants non fermiers, ce qui permet d'évoquer l'hypothèse d'autres sources de *Penicillium* que l'étable. Ces résultats confirment ceux mis en évidence précédemment dans d'autres études portant sur la contamination de l'air intérieur (117, 232, 238).

D/ Quels sont les facteurs environnementaux qui entrent en jeu dans la mise en place de la protection contre l'asthme et l'atopie observée chez les enfants ?

L'étude GABRIEL, comme d'autres études avant elle, a montré que les enfants grandissant dans les fermes en Allemagne, en Autriche et en Suisse souffrent moins d'asthme, de rhume des foins, d'atopie et à une moindre échelle, de dermatite atopique. Divers modes d'exposition à la ferme peuvent être assimilés à ce que l'on appellera un effet ferme sur l'asthme et partiellement sur l'atopie. Le principal résultat de cette partie du travail est que l'exposition environnementale à certains champignons et bactéries s'avère être un facteur protecteur significatif contre l'asthme infantile et l'atopie y compris lorsque cette exposition est incluse dans des modèles associant des données de type épidémiologique (fréquentation de la ferme, consommation de lait cru) et des données de mesures d'exposition à la flore aéroportée intra-domiciliaire.

- Quels sont les facteurs environnementaux impliqués dans la protection contre l'asthme et l'atopie ?

Il existe une relation inverse entre la consommation de lait cru de vache et le développement de l'asthme infantile ou de l'atopie qui vient en appui de résultats d'autres études (30, 217, 240). En effet, lors de ces différentes études, il a été exposé que la consommation de lait cru pouvait offrir une protection relative contre l'asthme et les maladies allergiques.

Ici, tous les types de nourriture destinés aux animaux ont fait l'objet d'une investigation épidémiologique dans les questionnaires. Les analyses statistiques ont montré que l'effet protecteur le plus fort était associé à la fréquence des contacts avec la paille. Dans la zone concernée par l'étude, la paille est principalement utilisée comme litière pour les animaux et les enfants y sont exposés, soit dans la grange ou la zone de stockage, soit lorsque la litière est mise en place ou nettoyée. Cependant, les enfants exposés à la paille sont également exposés de manière concomitante à l'ensilage et au foin, ce qui fait que l'effet individuel de l'exposition à la paille, à l'ensilage ou au foin ne peut pas être mis en évidence de façon certaine. Des expériences récentes ont montré que l'oligosaccharide arabinogalactane extrait d'échantillons d'ensilage et de foin protège les souris contre le développement d'asthme allergique (194, 219). Sachant que la paille contient également de l'arabinogalactane (194), l'exposition des enfants à la paille pourrait ainsi leur conférer une certaine protection contre l'asthme et l'atopie. Cependant, la paille et le foin sont loin d'être stériles, surtout lorsqu'ils

sont collectés dans des étables, et « l'effet paille/foin » mis en évidence par les études épidémiologiques pourrait tout aussi bien être dû à la mise en suspension dans l'air des micro-organismes qui se sont développés sur ce type de substrat. Les résultats obtenus en intégrant l'exposition microbienne aux analyses statistiques, apporte des arguments solides en faveur de cette hypothèse. Ainsi, avoir combiné dans la même démarche la recherche d'indicateur épidémiologique par questionnaire et la mesure d'une exposition individuelle aux micro-organismes constitue l'originalité et le point fort de la présente étude.

- Exposition microbienne et protection contre l'asthme et les maladies allergiques.

De façon alternative, l'exposition à des micro-organismes qui n'avaient jusqu'alors pas été identifiés peut avoir un impact sur le phénomène de protection observé puisque certains micro-organismes sont très souvent associés à l'environnement fermier. Par exemple, les espèces constituant le genre *Eurotium* sont très souvent retrouvées dans le foin. La combinaison d'expositions à certains micro-organismes fongiques et bactériens (*Eurotium spp.* associé aux bacilles à Gram négatif) est également un facteur protecteur fort contre l'asthme infantile, tandis que la présence bacilles à Gram négatif est inversement liée à l'atopie. Ces résultats rejoignent les données sur les endotoxines (45, 306). Nous avons vu précédemment que ces micro-organismes sont transportés de l'étable ou de la grange vers les logements fermiers. Cependant, les méthodes d'analyse utilisées pour cette partie de l'étude ne permettaient pas de distinguer les différentes espèces d'*Eurotium*, de *Penicillium* et les *taxa* bactériens. Ainsi, des signaux provenant d'espèces individuelles peuvent avoir été manqués, sans oublier que les expositions microbiennes et les tests de santé ont été effectués alors que l'enfant était en âge d'aller à l'école, bien qu'il soit reconnu que l'exposition plus tôt dans la vie a une plus grande influence sur la santé des enfants (297). Ces résultats et les conclusions qui en découlent supposent donc que l'exposition a été relativement constante et que les résultats ne reflètent pas uniquement l'exposition actuelle mais aussi l'exposition à long terme. En effet, les études épidémiologiques ont montré que les effets protecteurs contre l'asthme et l'atopie étaient surtout constatés après une exposition survenant pendant la grossesse de la mère et les premières années de vie de l'enfant (81, 298). Ici, les mesures d'exposition effectuées lorsque l'enfant est âgé de plus de huit ans ne sont qu'une manière indirecte d'estimer l'environnement auquel chaque enfant était exposé auparavant.

Par ailleurs, il n'existe pas de méthode de culture de micro-organismes qui permette, à l'heure actuelle, d'identifier l'intégralité de la microflore présente dans un échantillon. Idéalement

une approche métagénomique devrait donc être appliquée pour identifier une plus grande proportion de micro-organismes et mieux caractériser la nature de l'exposition à laquelle chaque enfant est soumis.

Des études antérieures ont montré la complexité des relations qui existent entre l'exposition aux moisissures et le risque de développer des symptômes d'asthme. Certaines études associent un risque plus élevé de faire des crises d'asthme lorsque les enfants sont soumis à un environnement humide riche en moisissures (122, 156, 280), d'autres comme celle que nous venons de réaliser montrent au contraire, un effet protecteur de l'exposition à certaines moisissures.

Une étude sur l'exposition fongique des agriculteurs adultes pendant une période de cinq ans en Norvège a révélé un effet protecteur de l'exposition aux spores fongiques envers l'asthme atopique, mais pas vis-à-vis de l'asthme non-atopique (89). L'exposition aux *Aspergillus spp.* et aux *Penicillium spp.* a également été testée en mesurant les polysaccharides extracellulaires et les carbohydrates spécifiques sécrétés pendant la croissance de ces espèces. L'exposition aux polysaccharides extracellulaires était inversement liée à l'asthme infantile dans les environnements ruraux et urbains (99). Les raisons pour lesquelles l'inhalation de ces polysaccharides extracellulaires, spores ou métabolites secondaires (158) produits par ces champignons confère un effet protecteur restent encore à élucider.

- Mécanismes mis en jeu lors de l'exposition microbienne.

Les mécanismes sous-jacents à l'effet protecteur conféré par certains éléments de la flore microbienne des fermes sont méconnus. L'activation de plusieurs récepteurs de type Toll Like qui ont pour fonction de lier des molécules associées à des microbes a été reconnue dans plusieurs environnements fermiers (99). Différents polymorphismes dans les gènes codant pour les récepteurs de l'immunité innée ont également été identifiés comme pouvant modifier les réactions immunitaires à diverses expositions à la ferme (30, 95, 96). Par ailleurs, on peut concevoir que la combinaison de plusieurs expositions microbiennes active plusieurs réactions en aval de ces récepteurs. Alternativement, l'exposition environnementale à des micro-organismes bénéfiques pourrait prévenir une colonisation bactérienne nocive des voies respiratoires inférieures qui a récemment été associée avec un risque accru d'asthme chez les enfants et chez les adultes (31, 134). Les résultats GABRIEL-A nous montrent donc que la balance microbienne influençant la protection contre certaines maladies peut s'appliquer non seulement à la gorge (152) ou à la peau (61), mais également aux muqueuses respiratoires.

CONCLUSION

Le travail fourni dans le cadre de cette thèse a donc permis de répondre à plusieurs questions sur l'environnement fermier et les manières de l'échantillonner.

Le prélèvement de poussière aéroportée par l'intermédiaire de pompes à impaction a été souvent utilisé pour évaluer la fraction respirable de la poussière au moment de la manipulation de fourrages dans les étables. Cette méthode s'est cependant avérée sujette à de très fortes variations journalières obligeant à multiplier les prélèvements pour obtenir une estimation acceptable de l'exposition. La technique de prélèvement de poussière sédimentée, dont l'intérêt avait été démontré par le passé pour des composants d'origine microbienne comme les endotoxines, a été ici testée avec les micro-organismes viables et avec l'ADN bactérien. Les résultats obtenus montrent que cette méthode est représentative de ce qui se passe dans l'air des étables et qu'elle est beaucoup plus reproductible que les prélèvements d'air. Elle offre l'avantage d'être peu coûteuse car les lingettes électrostatiques peuvent être facilement envoyées par courrier et les prélèvements peuvent être réalisés par des particuliers s'ils sont bien guidés par une notice.

Le lait consommé par les enfants fréquentant les fermes a également, par le passé, été associé à une baisse de la prévalence des maladies allergiques. Lors de notre étude, des flux microbiens ont pu être identifiés pour expliquer une partie de la contamination du lait. Du point de vue de la contamination fongique, l'air ambiant, résultant de l'aérosolisation de la poussière et des matières végétales, semble participer à la mise en place de la flore du lait. Ce transfert peut être expliqué par la sporulation des espèces fongiques. En revanche, pour ce qui est de la contamination bactérienne, les éléments qui entrent en contact direct avec le lait (trayons et matériel de traite) semblent en être les principales sources de contamination.

Enfin, notre travail a permis de mettre en évidence une voie de transfert entre l'étable et la chambre de l'enfant qui pourrait jouer un rôle majeur dans l'exposition des enfants à la flore des bâtiments agricoles. En effet, lorsqu'il y a proximité et/ou fréquentation d'une étable par l'enfant, les niveaux de *Penicillium*, espèce fongique prédominante dans les logements contrôlés, sont largement surpassés dans les logements fermiers par ceux d'*Eurotium*, un genre fongique caractéristique des étables et de l'environnement fermier en général. Plus globalement, les champignons et les actinomycètes de l'étable se retrouvent en grande quantité dans les chambres des fermes.

PERSPECTIVES

Du point de vue agroalimentaire, il est important de connaître l'origine des micro-organismes qui sont retrouvés dans le lait. La flore microbienne du lait cru a non-seulement un intérêt dans la fabrication des fromages, mais également dans les mécanismes de protection contre l'asthme et les maladies allergiques puisque la consommation de lait cru a été associée à un risque plus faible de développer ces maladies. Cette étude a montré que de nombreuses bactéries identifiées dans le lait ne sont pas identifiées dans les autres compartiments échantillonnés de l'étable. Leur origine reste donc inconnue pour le moment. La recherche plus poussée de ces bactéries peut donc passer, soit par l'échantillonnage d'autres compartiments, soit par la mise en place d'une nouvelle méthode d'identification dont la limite de détection serait moins élevée.

Pour ce qui est du projet GABRIEL, les études statistiques menées sur les questionnaires et les données microbiennes suggèrent le rôle de plusieurs micro-organismes dans la protection contre l'asthme et les maladies allergiques. Dans l'état actuel de cette étude, ces micro-organismes ne sont encore identifiés qu'au niveau du genre pour les champignons et de la coloration de Gram pour les bactéries. La poursuite de cette étude visant à identifier plus en détail ces bactéries par des méthodes moins onéreuses que la PCR et le séquençage (spectrométrie de masse par exemple) pourrait aboutir à une identification plus précise de bactéries. Du point de vue des champignons d'intérêt (*Penicillium* et *Eurotium*), une identification au niveau de l'espèce pourrait être réalisable en employant des méthodes de PCR d'ARN ribosomal 18S, dont le principe est similaire à celui de la PCR 16S chez les bactéries. Par la suite, une recherche systématique des bactéries et champignons ayant montré des associations avec l'asthme et l'allergie par les questionnaires pourrait être mise en place par PCR en temps réel dans les logements et autres bâtiments afin de connaître leur présence/absence et leur concentration. La connaissance du détail de la composition microbienne de l'environnement des enfants pourra alors nous permettre d'identifier les micro-organismes mis en jeu dans le mécanisme de protection.

BIBLIOGRAPHIE

1. 1997. Adverse effects of crystalline silica exposure. American Thoracic Society Committee of the Scientific Assembly on Environmental and Occupational Health. *Am J Respir Crit Care Med* **155**:761-8.
2. 2001. Fermented foods and healthy digestive functions, vol. ISBN 2-7420-0365-7.
3. 1989. Guidelines for the assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment., American Conference of Governmental Industrial Hygienists., Cincinnati, OH.
4. http://sante-medecine.commentcamarche.net/contents/asthme/01_1-asthme-statistiques-et-definitions.php3.
5. <http://www.allergienet.com/allergies-croisees.html>.
6. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/chip/chip.html>.
7. http://www.citt.gc.ca/dumping/inquiere/advice/re95003_f.asp.
8. http://www.euro.who.int/Document/EHI/ENHIS_Factsheet_3_1.pdf.
9. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/IMG/pdf_CR_150730005-prelevement_flores_trayons.pdf.
10. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>.
11. http://www.worldallergy.org/professional/who_paa2003.pdf.
12. 1998. Respiratory health hazards in agriculture. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:S1-S76.
13. 1998. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* **12**:315-35.
14. **Alm, J. S., J. Swartz, G. Lilja, A. Scheynius, and G. Pershagen.** 1999. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* **353**:1485-8.
15. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143-69.
16. **Amner, W., C. Edwards, and A. J. McCarthy.** 1989. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *Appl Environ Microbiol* **55**:2669-74.
17. **Andersen, A. A.** 1958. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol* **76**:471-84.
18. **Ara, Y., T. Saito, T. Takagi, E. Hagiwara, Y. Miyagi, M. Sugiyama, S. Kawamoto, N. Ishii, T. Yoshida, D. Hanashi, T. Koshino, H. Okada, and K. Okuda.** 2001. Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology* **103**:98-105.
19. **Asher, M. I., S. Montefort, B. Bjorksten, C. K. Lai, D. P. Strachan, S. K. Weiland, and H. Williams.** 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* **368**:733-43.
20. **Avenberg, K. M., D. S. Harper, and B. L. Larsson.** 1986. Foot-notes on Allergy, Pharmacia, Uppsala.
21. **Baczynska, A., H. F. Svenstrup, J. Fedder, S. Birkelund, and G. Christiansen.** 2004. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol* **4**:35.
22. **Bakirci, N., S. Kalaca, H. Francis, A. M. Fletcher, C. A. Pickering, N. Tumerdem, S. Cali, L. Oldham, and R. Niven.** 2007. Natural history and risk factors of early respiratory responses to exposure to cotton dust in newly exposed workers. *J Occup Environ Med* **49**:853-61.

23. **Barnes, M., P. Cullinan, P. Athanasaki, S. MacNeill, A. M. Hole, J. Harris, S. Kalogeraki, M. Chatzinikolaou, N. Drakonakis, V. Bibaki-Liakou, A. J. Newman Taylor, and I. Bibakis.** 2001. Crete: does farming explain urban and rural differences in atopy? *Clin Exp Allergy* **31**:1822-8.
24. **Bellanger, A. P., G. Reboux, S. Roussel, F. Grenouillet, E. Didier-Scherer, J. C. Dalphin, and L. Millon.** 2009. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* **49**:260-6.
25. **Bellou, A., J. Manel, H. Samman-Kaakaji, J. D. de Korwin, D. A. Moneret-Vautrin, P. E. Bollaert, and H. Lambert.** 2003. Spectrum of acute allergic diseases in an emergency department: an evaluation of one years' experience. *Emerg Med (Fremantle)* **15**:341-7.
26. **Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen, and G. Grappin.** 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese as revealed by PCR with repetitive and species specific primers. *Int. Dairy. J.* **11**:293-305.
27. **Bertrand, X., M. Thouverez, P. Bailly, C. Cornette, and D. Talon.** 2000. Clinical and molecular epidemiology of hospital Enterococcus faecium isolates in eastern France. Members of Réseau Franc-Comtois de Lutte contr les Infections Nosocomiales. *J Hosp Infect* **45**:125-34.
28. **Bertrand, X., M. Thouverez, D. Talon, A. Boillot, G. Capellier, C. Floriot, and J. P. Helias.** 2001. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of Pseudomonas aeruginosa in intensive care units. *Intensive Care Med* **27**:1263-8.
29. **Bhagwat, A. A.** 2003. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella strains by real-time PCR. *Int J Food Microbiol* **84**:217-24.
30. **Bieli, C., W. Eder, R. Frei, C. Braun-Fahrlander, W. Klimecki, M. Waser, and e. al.** 2007. A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J Allergy Clin Immunol* **120**:1308-15.
31. **Bisgaard, H., M. N. Hermansen, F. Buchvald, L. Loland, L. B. Halkjaer, K. Bonnelykke, and e. al.** 2007. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med* **357**:1487-95.
32. **Blackley, C. H.** 1873. Experimental research on the cause and nature of Catarhus Aestivus, London: Balliere.
33. **Boleij, J., E. Buringh, D. Heederik, and H. Kromhout.** 1995. Occupational Hygiene of Chemical and Biological Agents. *In* Elsevier (ed.), Amsterdam.
34. **Borchers, A. T., J. S. Stern, R. M. Hackman, C. L. Keen, and M. E. Gershwin.** 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**:281-93.
35. **Bourke, S. J., J. C. Dalphin, G. Boyd, C. McSharry, C. I. Baldwin, and J. E. Calvert.** 2001. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J Suppl* **32**:81s-92s.
36. **Bouton, Y.** 2001. Raw milk cheese characteristics and their positive effects on health. *Caseus Int* **1**:54-63.
37. **Bouton, Y., P. Guyot, F. Berthier, and E. Beuvier.** 2000. Investigation of bacterial community development from raw milk and whey starter to curd and mature Comté cheese., p. 85, Abstracts of IDF Symposium "cheese ripening and technology", Banff, Canada.
38. **Bouton, Y., P. Guyot, E. Beuvier, P. Tailliez, and R. Grappin.** 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *Int J Food Microbiol* **76**:27-38.
39. **Bouton, Y., P. Guyot, and R. Grappin.** 1998. Preliminary characterization of microflora of Comte cheese. *J Appl Microbiol* **85**:123-31.

40. **Bouton, Y., L. Tessier, P. Guyot, and E. Beuvier.** 2005. Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté. *Rencontres Recherches et Ruminants*.
41. **Bovallius, A., B. Bucht, R. Roffey, and P. Anas.** 1978. Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Appl Environ Microbiol* **35**:847-52.
42. **Bramucci, M., H. Kane, M. Chen, and V. Nagarajan.** 2003. Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:594-600.
43. **Braun-Fahrlander, C.** 2002. Do only European cattle protect from allergies? *Allergy* **57**:1094-6.
44. **Braun-Fahrlander, C.** 2003. Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April 2002. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **3**:325-9.
45. **Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, and E. von Mutius.** 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* **347**:869-77.
46. **Brouillaud-Delattre, A., M. Maire, C. Collette, C. Mattei, and C. Lahellec.** 1997. Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int* **80**:913-9.
47. **Brown, A. F., D. McKinnon, and K. Chu.** 2001. Emergency department anaphylaxis: A review of 142 patients in a single year. *J Allergy Clin Immunol* **108**:861-6.
48. **Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon.** 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**:407-12.
49. **Brusselle, G. G., J. C. Kips, J. H. Tavernier, J. G. van der Heyden, C. A. Cuvelier, R. A. Pauwels, and H. Bluethmann.** 1994. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* **24**:73-80.
50. **Burge, H., M. Chatigny, J. Feeley, K. Kreiss, P. Morey, J. Otten, and K. Peterson.** 1987. Bioaerosols: guidelines for assessment and sampling of saprophytic bioaerosols in the indoor environment. *Applied Industrial Hygiene* **2**:R10-R16.
51. **Burr, M. L., B. K. Butland, S. King, and E. Vaughan-Williams.** 1989. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Arch Dis Child* **64**:1452-6.
52. **Callon, C., F. Duthoit, C. Delbes, M. Ferrand, Y. Le Frileux, R. De Cremoux, and M. C. Montel.** 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* **30**:547-60.
53. **Callon, C., L. Millet, and M. C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J Dairy Res* **71**:231-44.
54. **Celedon, J. C., D. K. Milton, C. D. Ramsey, A. A. Litonjua, L. Ryan, T. A. Platts-Mills, and D. R. Gold.** 2007. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* **120**:144-9.
55. **Chesterman, H., R. Heywood, T. R. Allen, A. E. Street, N. A. Edmondson, and D. E. Prentice.** 1981. The intravenous toxicity of lentinan to the beagle dog. *Toxicol Lett* **9**:87-90.
56. **Chew, G. L., C. Rogers, H. A. Burge, M. L. Muilenberg, and D. R. Gold.** 2003. Dustborne and airborne fungal propagules represent a different spectrum of fungi with differing relations to home characteristics. *Allergy* **58**:13-20.
57. **Chinn, S., D. Jarvis, P. Burney, C. Luczynska, U. Ackermann-Liebrich, J. M. Anto, I. Cerveri, R. De Marco, T. Gislason, J. Heinrich, C. Janson, N. Kunzli, B.**

- Leynaert, F. Neukirch, J. Schouten, J. Sunyer, C. Svanes, P. Vermeire, and M. Wjst.** 2004. Increase in diagnosed asthma but not in symptoms in the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax* **59**:646-51.
58. **Cleven, B. E., M. Palka-Santini, J. Gielen, S. Meembor, M. Kronke, and O. Krut.** 2006. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol* **44**:2389-97.
59. **Com-Ruelle, L., B. Crestin, and S. Dumesnil.** 2003. L'asthme en France selon les stades de sévérité. 1290. CREDES.
60. **Coppola, R., G. Blaiotta, D. Ercolini, and G. Moschetti.** 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**:414-420.
61. **Costello, E. K., C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, and R. Knight.** 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **326**:1694-7.
62. **Cotta, M. A., T. R. Whitehead, M. D. Collins, and P. A. Lawson.** 2004. *Atopostipes suicloacale* gen. nov., isolated from an underground swine manure storage pit. *Anaerobe* **10**:191-5.
63. **Crook, B.** 1996. Review: methods of monitoring for process micro-organisms in biotechnology. *Ann Occup Hyg* **40**:245-60.
64. **Dasen, G., J. Smutny, M. Teuber, and L. Meile.** 1998. Classification and identification of propionibacteria based on ribosomal RNA genes and PCR. *Syst Appl Microbiol* **21**:251-9.
65. **David, B., and M. Guénounou.** 1999. Immuno-Allergie. Cahier de formation Biologie Médicale **16**:49-55.
66. **de Melo, G. B., F. B. Aggio, A. L. Hofling-Lima, P. A. d'Azevedo, and A. C. Pignatari.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis in the identification of the origin of bacterial keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**:1053-4.
67. **de Souza, F. A., G. A. Kowalchuk, P. Leeflang, J. A. van Veen, and E. Smit.** 2004. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl Environ Microbiol* **70**:1413-24.
68. **De Weck, A. L.** 1997. A short history of allergological diseases and concepts, p. 3–22. *In* E. A.B. Kay (ed.), *Allergy and allergic diseases*. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom.
69. **Delbes, C., L. Ali-Mandjee, and M. C. Montel.** 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl Environ Microbiol* **73**:1882-91.
70. **Depouilly, A., F. Dufrene, E. Beuvier, and F. Berthier.** 2004. Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait* **84**:155-167.
71. **Desmaures, N., F. Bazin, and M. Gueguen.** 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *J Appl Microbiol* **83**:53-8.
72. **Desmaures, N., and M. Gueguen.** 1997. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *J Dairy Res* **64**:271-80.
73. **Desmaures, N., I. Mangin, D. Corroler, and M. Gueguen.** 1998. Characterization of lactococci isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *J Appl Microbiol* **85**:999-1005.

74. **Di Luzio, N. R.** 1985. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin Immunopathol* **8**:387-400.
75. **Di Luzio, N. R., D. L. Williams, R. B. McNamee, B. F. Edwards, and A. Kitahama.** 1979. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int J Cancer* **24**:773-9.
76. **di Luzio, N. R., D. L. Williams, R. B. McNamee, and V. G. Malshet.** 1980. Comparative evaluation of the tumor inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan. *Recent Results Cancer Res* **75**:165-72.
77. **Diez, B., C. Pedros-Alio, T. L. Marsh, and R. Massana.** 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* **67**:2942-51.
78. **Dillon, H. K., D. K. Boling, and J. D. Miller.** 2007. Comparison of detection methods for *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples in an occupational environment. *J Occup Environ Hyg* **4**:509-13.
79. **Dillon, H. K., J. D. Miller, W. G. Sorenson, J. Douwes, and R. R. Jacobs.** 1999. Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 3**:473-80.
80. **Donnelly, C. W.** 2001. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutr Rev* **59**:183-94.
81. **Douwes, J., S. Cheng, N. Travier, C. Cohet, A. Niesink, J. McKenzie, C. Cunningham, G. Le Gros, E. von Mutius, and N. Pearce.** 2008. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* **32**:603-11.
82. **Douwes, J., P. Gibson, J. Pekkanen, and N. Pearce.** 2002. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* **57**:643-8.
83. **Douwes, J., and D. Heederik.** 1997. Epidemiologic investigations of endotoxins. *Int j Occup Environ Health* **3**:S26-S31.
84. **Douwes, J., G. Le Gros, P. Gibson, and N. Pearce.** 2004. Can bacterial endotoxin exposure reverse atopy and atopic disease? *J Allergy Clin Immunol* **114**:1051-4.
85. **Douwes, J., and N. Pearce.** 2002. Asthma and the westernization 'package'. *Int J Epidemiol* **31**:1098-102.
86. **Douwes, J., and N. Pearce.** 2008. Commentary: The end of the hygiene hypothesis? *Int J Epidemiol* **37**:570-2.
87. **Douwes, J., N. Pearce, and D. Heederik.** 2002. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax* **57**:86-90.
88. **Douwes, J., N. Travier, K. Huang, S. Cheng, J. McKenzie, G. Le Gros, E. von Mutius, and N. Pearce.** 2007. Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* **62**:1158-65.
89. **Douwes, J., R. Van Strien, G. Doekes, J. Smit, M. Kerkhof, J. Gerritsen, and e. al.** 2006. Does early indoor microbial exposure reduce the risk of asthma? The prevention and incidence of asthma and mite allergy birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* **117**:1067-73.
90. **Drinan, F. D., and T. M. Cogan.** 1992. Detection of propionic acid bacteria in cheese. *J Dairy Res* **59**:65-9.
91. **Drinka, P. J., M. E. Stemper, C. D. Gauerke, J. M. Miller, and K. D. Reed.** 2004. The identification of genetically related bacterial isolates using pulsed field gel electrophoresis on nursing home units: a clinical experience. *J Am Geriatr Soc* **52**:1373-7.
92. **Dubernet, S., N. Desmaures, and M. Gueguen.** 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* **214**:271-5.

93. **Duthoit, F., J. J. Godon, and M. C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol* **69**:3840-8.
94. **Dutkiewicz, J.** 1994. Bacteria, fungi, and endotoxin as potential agents of occupational hazard in a potato processing plant. *Am J Ind Med* **25**:43-6.
95. **Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. Von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, and e. al.** 2006. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy* **61**.
96. **Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. Von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, and e. al.** 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* **113**:482-8.
97. **Eduard, W., and D. Heederik.** 1998. Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. *Am Ind Hyg Assoc J* **59**:113-27.
98. **Eduard, W., E. Omenaas, P. S. Bakke, J. Douwes, and D. Heederik.** 2004. Atopic and non-atopic asthma in a farming and a general population. *Am J Ind Med* **46**:396-9.
99. **Ege, M. J., R. Frei, C. Bieli, D. Schram-Bijkerk, M. Waser, M. R. Benz, and e. al.** 2007. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* **119**:1140-7.
100. **Embong, Z., W. H. Wan Hitam, C. Y. Yean, N. H. Rashid, B. Kamarudin, S. K. Abidin, S. Osman, Z. F. Zainuddin, and M. Ravichandran.** 2008. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmol* **8**:7.
101. **Eppert, I., N. Valdes-Stauber, H. Gotz, M. Busse, and S. Scherer.** 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium* lines as evaluated in situ on soft cheese. *Appl Environ Microbiol* **63**:4812-7.
102. **Etopia.** Le lait : cet élixir assassiné, <http://www.etopia.be/IMG/ppt/Wuidart.ppt>.
103. **Faveri, M., M. P. Mayer, M. Feres, L. C. de Figueiredo, F. E. Dewhirst, and B. J. Paster.** 2008. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol* **23**:112-8.
104. **Fernandez Rivas, M.** 2009. Food allergy in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* **19 Suppl 2**:37-44.
105. **FIL.** 1991. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. *Fédération Internationale de Laiterie*:A10/A11.
106. **Filion, M., M. St-Arnaud, and S. H. Jabaji-Hare.** 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J Microbiol Methods* **53**:67-76.
107. **Fogelmark, B., H. Goto, K. Yuasa, B. Marchat, and R. Rylander.** 1992. Acute pulmonary toxicity of inhaled beta-1,3-glucan and endotoxin. *Agents Actions* **35**:50-6.
108. **Fogelmark, B., M. Sjostrand, and R. Rylander.** 1994. Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of beta(1,3)-D-glucan and endotoxin. *Int J Exp Pathol* **75**:85-90.
109. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, and D. M. Underhill.** 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* **24**:1277-86.
110. **Gavett, S. H., D. J. O'Hearn, C. L. Karp, E. A. Patel, B. H. Schofield, F. D. Finkelman, and M. Wills-Karp.** 1997. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol* **272**:L253-61.

111. **Gehring, U., J. Spithoven, S. Schmid, S. Bitter, C. Braun-Fahrlander, J. C. Dalphin, A. Hyvarinen, J. Pekkanen, J. Riedler, S. K. Weiland, G. Buchele, E. von Mutius, D. A. Vuitton, and B. Brunekreef.** 2008. Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families - the PASTURE study. *Environ Int* **34**:1132-6.
112. **Gerhold, K., K. Bluemchen, A. Franke, P. Stock, and E. Hamelmann.** 2003. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* **112**:389-96.
113. **Gerhold, K., K. Blumchen, A. Bock, A. Franke, A. Avagjan, and E. Hamelmann.** 2002. Endotoxins and allergy: lessons from the murine model. *Pathobiology* **70**:255-9.
114. **Gerhold, K., K. Blumchen, A. Bock, C. Seib, P. Stock, T. Kallinich, M. Lohning, U. Wahn, and E. Hamelmann.** 2002. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* **110**:110-6.
115. **Gerrard, J. W., C. A. Geddes, P. L. Reggin, C. D. Gerrard, and S. Horne.** 1976. Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. *Ann Allergy* **37**:91-100.
116. **Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta.** 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**:2802-13.
117. **Gorny, R. L., and J. Dutkiewicz.** 2002. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med* **9**:17-23.
118. **Goto, H., K. Yuasa, and R. Rylander.** 1994. (1-->3)-beta-D-glucan in indoor air, its measurement and in vitro activity. *Am J Ind Med* **25**:81-3.
119. **Grappin, G., and E. Beuquier.** 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy. J.* **7**:751-761.
120. **Green, R. J.** 2003. Inflammatory airway disease. *Current Allergy and Clinical Immunology* **16**:181.
121. **Gregory, P. H., and M. E. Lacey.** 1963. Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J Gen Microbiol* **30**:75-88.
122. **Hagerhed-Engman, L., T. Sigsgaard, I. Samuelson, J. Sundell, S. Janson, and C. G. Bornehag.** 2009. Low home ventilation rate in combination with moldy odor from the building structure increase the risk for allergic symptoms in children. *Indoor Air* **19**:184-92.
123. **Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyse programme for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.
124. **Hamelmann, E., G. Cieslewicz, J. Schwarze, T. Ishizuka, A. Joetham, C. Heusser, and E. W. Gelfand.** 1999. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **160**:934-41.
125. **Hamelmann, E., and E. W. Gelfand.** 1999. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* **120**:8-16.
126. **Hamelmann, E., U. Wahn, and E. W. Gelfand.** 1999. Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* **118**:90-4.
127. **Heinemann, P. G.** 1921. Micro-organisms in milk, p. 258-278. *In* W. B. S. Company (ed.), *Milk*, Philadelphia.

128. **Helbling, A., T. Hurni, U. R. Mueller, and W. J. Pichler.** 2004. Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern. *Clin Exp Allergy* **34**:285-90.
129. **Henri-Dubernet, S., N. Desmaures, and M. Gueguen.** 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Can J Microbiol* **54**:218-28.
130. **Hesselmar, B., N. Aberg, B. Aberg, B. Eriksson, and B. Bjorksten.** 1999. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy* **29**:611-7.
131. **Hetland, G., N. Ohno, I. S. Aaberge, and M. Lovik.** 2000. Protective effect of beta-glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**:111-6.
132. **Heuchel, V., J. Marly, and N. Meffe.** 2001. Origines, diagnostic et moyens de maîtrise de la contamination du lait de vache par les salmonelles. Actes des 8ièmes rencontres recherches ruminants (3R):87-90.
133. **Heuchel, V., and N. Meffe.** 2000. Origines et moyens de maîtrise à la production de la contamination du lait de vache par les salmonelles. Institut de l'élevage, C.R. N°2003108:67p.
134. **Hilty, M., C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, and e. al.** 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* doi:10.1371/journal.pone.0008578.
135. **Hobson, R. P., C. A. Munro, S. Bates, D. M. MacCallum, J. E. Cutler, S. E. Heinsbroek, G. D. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow.** 2004. Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem* **279**:39628-35.
136. **Hocking, A. D., and J. I. Pitt.** 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**:488-92.
137. **Hoeekstra, E. S., R. A. Samson, and A. P. Verhoeff.** 1994. Fungal propagules in house dust: A qualitative analysis., p. 169-177. *In* R. A. Samson, Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G., and Hoeekstra, E.S. (ed.), *Health implications of fungi in indoor environments*. Elsevier, New York.
138. **Holm, C., L. Jepsen, M. Larsen, and L. Jespersen.** 2004. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. *J Dairy Sci* **87**:1151-7.
139. **Holt, P. G., C. Macaubas, P. A. Stumbles, and P. D. Sly.** 1999. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**:B12-7.
140. **Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, and N. R. Pace.** 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**:366-76.
141. **Hyvarinen, A., M. Roponen, P. Tiittanen, S. Laitinen, A. Nevalainen, and J. Pekkanen.** 2006. Dust sampling methods for endotoxin - an essential, but underestimated issue. *Indoor Air* **16**:20-7.
142. **Isolini, D., M. Grand, and H. Glättli.** 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* **19**:57-59.
143. **Jackson, H., and L. F. Clegg.** 1966. The microflora of raw bulk tank milk. *Can J Microbiol* **12**:429-32.
144. **Janda, J. M., and S. L. Abbott.** 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**:2761-4.

145. **Jensen, P. A., W. F. Todd, G. N. Davis, and P. V. Scarpino.** 1992. Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria. *Am Ind Hyg Assoc J* **53**:660-7.
146. **Johansson, S. G., T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey, C. Motala, J. A. Ortega Martell, T. A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, and H. C. Williams.** 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* **113**:832-6.
147. **Julien, M. C., P. Dion, C. Lafrenière, H. Antoun, and P. Drouin.** 2008. Sources of Clostridia in raw milk on farms. *Appl Environ Microbiol* **74**:6348-57.
148. **Jung, T., G. Lack, U. Schauer, W. Uberuck, H. Renz, E. W. Gelfand, and C. H. Rieger.** 1995. Decreased frequency of interferon-gamma- and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *J Allergy Clin Immunol* **96**:515-27.
149. **Kakumu, S., T. Ishikawa, T. Wakita, K. Yoshioka, Y. Ito, and T. Shinagawa.** 1991. Effect of sizofiran, a polysaccharide, on interferon gamma, antibody production and lymphocyte proliferation specific for hepatitis B virus antigen in patients with chronic hepatitis B. *Int J Immunopharmacol* **13**:969-75.
150. **Kalliomaki, M., and E. Isolauri.** 2003. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **3**:15-20.
151. **Kalliomaki, M., P. Kirjavainen, E. Eerola, P. Kero, S. Salminen, and E. Isolauri.** 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* **107**:129-34.
152. **Kalliomaki, M., S. Salminen, and E. Isolauri.** 2008. Positive interactions with the microbiota: probiotics. *Adv Exp Med Biol* **635**:57-66.
153. **Kalliomaki, M., S. Salminen, T. Poussa, H. Arvilommi, and E. Isolauri.** 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **361**:1869-71.
154. **Kalliomaki, M. A., and E. Isolauri.** 2004. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**:739-52, viii.
155. **Kanny, G., D. A. Moneret-Vautrin, J. Flabbee, E. Beaudouin, M. Morisset, and F. Thevenin.** 2001. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* **108**:133-40.
156. **Karvonen, A. M., A. Hyvarinen, M. Roponen, M. Hoffmann, M. Korppi, S. Remes, E. von Mutius, A. Nevalainen, and J. Pekkanen.** 2009. Confirmed moisture damage at home, respiratory symptoms and atopy in early life: a birth-cohort study. *Pediatrics* **124**:e329-38.
157. **Kazor, C. E., P. M. Mitchell, A. M. Lee, L. N. Stokes, W. J. Loesche, F. E. Dewhirst, and B. J. Paster.** 2003. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* **41**:558-63.
158. **Keller, N. P., G. Turner, and J. W. Bennett.** 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**:937-47.
159. **Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:1-8.
160. **Ko, G., O. D. r. Simmons, C. A. KLikirdopulos, L. Worley-Davis, M. Williams, and M. D. Sobsey.** 2008. Investigation of bioaerosols released from swine farms using conventional and alternative waste treatment and management technologies. *Environ Sci Technol* **42**:8849-57.
161. **Kournikakis, B., R. Mandeville, P. Brousseau, and G. Ostroff.** 2003. Anthrax-protective effects of yeast beta 1,3 glucans. *MedGenMed* **5**:1.

162. **Laakkonen, A., P. K. Verkasalo, A. Nevalainen, T. Kauppinen, P. Kyyronen, and E. I. Pukkala.** 2008. Moulds, bacteria and cancer among Finns: an occupational cohort study. *Occup Environ Med* **65**:489-93.
163. **Lacey, J., and B. Crook.** 1988. Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann Occup Hyg* **32**:515-33.
164. **Lacey, J., and J. Dutkiewicz.** 1994. Bioaerosols and occupational lung disease. *Journal of Aerosol Science* **25**:1371-1404.
165. **Lange, J. H.** 2000. Reduced cancer rates in agricultural workers: a benefit of environmental and occupational endotoxin exposure. *Med Hypotheses* **55**:383-5.
166. **Lange, J. H., G. Mastrangelo, and A. Buja.** 2005. Occupational exposure to endotoxin reduces lung cancer rates. *Occup Med (Lond)* **55**:154-5; author reply 155.
167. **Larsson, L., B. Szponar, and C. Pehrson.** 2004. Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. *Indoor Air* **14**:421-4.
168. **Le Moual, N., V. Siroux, I. Pin, F. Kauffmann, and S. M. Kennedy.** 2005. Asthma severity and exposure to occupational asthmogens. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:440-5.
169. **Liebers, V., T. Bruning, and M. Raulf-Heimsoth.** 2006. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *Am J Ind Med* **49**:474-91.
170. **Liu, A. H.** 2002. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* **109**:379-92.
171. **Lo, H. C., F. A. Tsai, S. P. Wasser, J. G. Yang, and B. M. Huang.** 2006. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sci* **78**:1957-66.
172. **Lu, S., M. Park, H. S. Ro, D. S. Lee, W. Park, and C. O. Jeon.** 2006. Analysis of microbial communities using culture-dependent and culture-independent approaches in an anaerobic/aerobic SBR reactor. *J Microbiol* **44**:155-61.
173. **Maarit Niemi, R., I. Heiskanen, K. Wallenius, and K. Lindstrom.** 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J Microbiol Methods* **45**:155-65.
174. **Machado de Oliveira, J. C., T. G. Gama, J. F. Siqueira, Jr., I. N. Rocas, R. S. Peixoto, and A. S. Rosado.** 2007. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis approach for bacterial identification in endodontic infections. *Clin Oral Investig* **11**:127-32.
175. **Macher, J. M.** 2001. Evaluation of a procedure to isolate culturable microorganisms from carpet dust. *Indoor Air* **11**:134-40.
176. **Macher, J. M.** 1989. Positive-hole correction of multiple-jet impactors for collecting viable microorganisms. *Am Ind Hyg Assoc J* **50**:561-8.
177. **Macher, J. M.** 2001. Review of methods to collect settled dust and isolate culturable microorganisms. *Indoor Air* **11**:99-110.
178. **Manolopoulou, E., P. Sarantinopoulos, E. Zoidou, A. Aktypis, E. Moschopoulou, I. G. Kandarakis, and E. M. Anifantakis.** 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* **82**:153-61.
179. **Mao, Z., H. Zheng, X. Wang, S. Lin, Y. Sun, and B. Jiang.** 2008. DNA microarray for direct identification of bacterial pathogens in human stool samples. *Digestion* **78**:131-8.
180. **Maoz, A., R. Mayr, and S. Scherer.** 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **69**:4012-8.

181. **Markova, N., V. Kussovski, I. Drandarska, S. Nikolaeva, N. Georgieva, and T. Radoucheva.** 2003. Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *Int Immunopharmacol* **3**:1557-62.
182. **Martinez, F. D., and P. G. Holt.** 1999. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* **354 Suppl 2**:SII12-5.
183. **Mastrangelo, G., J. M. Grange, E. Fadda, U. Fedeli, A. Buja, and J. H. Lange.** 2005. Lung cancer risk: effect of dairy farming and the consequence of removing that occupational exposure. *Am J Epidemiol* **161**:1037-46.
184. **May, J. J., and M. B. Schenker.** 1995. Agriculture, p. 617-626. *In* M. S. P. Harber, and J. Balmes (ed.), *Occupational and environmental respiratory disease*, Mosby, St. Louis.
185. **Mayell, M.** 2001. Maitake extracts and their therapeutic potential. *Altern Med Rev* **6**:48-60.
186. **Michel, V., A. Hauwuy, and J. F. Chamba.** 2006. [Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs.]. *Renc. Rech. Ruminants* **13**:309-312.
187. **Michel, V., A. Hauwuy, and J. F. Chamba.** 2001. La flore microbienne de laits de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait* **81**:575-592.
188. **Miller, J. D., A. M. Laflamme, Y. Sobol, P. Lafontaine, and R. Greenhalgh.** 1988. Fungi and fungal products in some Canadian houses. *International Biodeterioration* **24**:103-120.
189. **Moneret-Vautrin, D. A., M. Morisset, J. Flabbee, E. Beaudouin, and G. Kanny.** 2005. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* **60**:443-51.
190. **Morea, M., F. Baruzzi, and P. S. Cocconcelli.** 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional mozzarella cheese processing. *J Appl Microbiol* **87**:574-82.
191. **Moreau, D., S. Ledoux, M. Choquet, and I. Annesi-Maesano.** 2000. Prevalence and severity of asthma in adolescents in France. Cross-sectional and retrospective analyses of a large population-based sample. *Int J Tuberc Lung Dis* **4**:639-48.
192. **Morisse, J. P., J. P. Cotte, G. Argente, and I. Daniel.** 1992. Approche épidémiologique de l'excretion de salmonelles dans un réseau de 50 exploitations bovines laitières avec ou sans antécédents cliniques. *ann. Méd. Vét.* **136**:403-409.
193. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-73.
194. **Muralikrishna, G., and M. Rao.** 2007. Cereal non-cellulosic polysaccharides: structure and function relationship - an overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47**:599-610.
195. **Nakano, H., K. Namatame, H. Nemoto, H. Motohashi, K. Nishiyama, and K. Kumada.** 1999. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. Kanagawa Lentinan Research Group. *Hepatogastroenterology* **46**:2662-8.
196. **Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E. T. Buurman, K. Gijzen, D. L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D. M. MacCallum, F. C. Odds, J. W. Van der Meer, A. J. Brown, and B. J. Kullberg.** 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**:1642-50.

197. **Neukirch, C., C. Henry, B. Leynaert, R. Liard, J. Bousquet, and F. Neukirch.** 1999. Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma? A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* **103**:709-11.
198. **Nevalainen, A., J. Pastuszka, F. Liebhaber, and K. Willeke.** 1992. Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. *Atmospheric Environment* **26A**:531-540.
199. **Nicolosi, R., S. J. Bell, B. R. Bistrain, I. Greenberg, R. A. Forse, and G. L. Blackburn.** 1999. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *Am J Clin Nutr* **70**:208-12.
200. **Nieuwenhuijsen, M. J., K. S. Noderer, M. B. Schenker, V. Vallyathan, and S. Olenchock.** 1999. Personal exposure to dust, endotoxin and crystalline silica in California agriculture. *Ann Occup Hyg* **43**:35-42.
201. **Ninan, T. K., and G. Russell.** 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *Bmj* **304**:873-5.
202. **Normand, A. C., M. Vacheyrou, B. Sudre, D. J. Heederik, and R. Piarroux.** 2009. Assessment of Dust Sampling Methods for the Study of Cultivable Microorganism Exposure in Stables. *Appl Environ Microbiol*.
203. **Noss, I., I. M. Wouters, M. Visser, D. J. Heederik, P. S. Thorne, B. Brunekreef, and G. Doekes.** 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl Environ Microbiol* **74**:5621-7.
204. **Ohno, N., N. N. Miura, N. Chiba, Y. Adachi, and T. Yadomae.** 1995. Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice. *Biol Pharm Bull* **18**:1242-7.
205. **Oros-Sichler, M., N. C. Gomes, G. Neuber, and K. Smalla.** 2006. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J Microbiol Methods* **65**:63-75.
206. **Oryszczyn, M. P., R. Van Ree, J. Maccario, R. Nadif, and F. Kauffmann.** 2009. Cat sensitization according to cat window of exposure in adult asthmatics. *Clin Exp Allergy*.
207. **Osterballe, M., C. G. Mortz, T. K. Hansen, K. E. Andersen, and C. Bindsvlev-Jensen.** 2009. The Prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatr Allergy Immunol*.
208. **Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:1-55.
209. **Pangloli, P., Y. Dje, O. Ahmed, C. A. Doane, S. P. Oliver, and F. A. Draughon.** 2008. Seasonal incidence and molecular characterization of *Salmonella* from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathog Dis* **5**:87-96.
210. **Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst.** 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**:3770-83.
211. **Paster, B. J., M. K. Russell, T. Alpagot, A. M. Lee, S. K. Boches, J. L. Galvin, and F. E. Dewhirst.** 2002. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. *Ann Periodontol* **7**:8-16.
212. **Pastorello, E. A., F. Rivolta, M. Bianchi, M. Mauro, and V. Pravettoni.** 2001. Incidence of anaphylaxis in the emergency department of a general hospital in Milan. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **756**:11-7.
213. **Patel, J. B.** 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* **6**:313-21.
214. **Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, and C. Robertson.** 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III

- of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* **62**:758-66.
215. **Pearce, N., and J. Douwes.** 2006. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr (Rio J)* **82**:319-21.
 216. **Pearce, N., J. Pekkanen, and R. Beasley.** 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* **54**:268-72.
 217. **Perkin, M. R., and D. P. Strachan.** 2006. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* **117**:1374-81.
 218. **Pessi, T., Y. Sutas, M. Hurme, and E. Isolauri.** 2000. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* **30**:1804-8.
 219. **Peters, M., M. Kauth, J. Schwarze, C. Korner-Rettberg, J. Riedler, D. Nowak, C. Braun-Fahrlander, E. von Mutius, A. Bufe, and O. Holst.** 2006. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* **61**:134-9.
 220. **Pizarro, J., E. Jedlicki, O. Orellana, J. Romero, and R. T. Espejo.** 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environ Microbiol* **62**:1323-8.
 221. **Pohjavuori, E., M. Viljanen, R. Korpela, M. Kuitunen, M. Tiittanen, O. Vaarala, and E. Savilahti.** 2004. *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* **114**:131-6.
 222. **Ponsonby, A. L., N. Glasgow, A. Pezic, T. Dwyer, K. Ciszek, and M. Kljakovic.** 2008. A temporal decline in asthma but not eczema prevalence from 2000 to 2005 at school entry in the Australian Capital Territory with further consideration of country of birth. *Int J Epidemiol* **37**:559-69.
 223. **Portera, C. A., E. J. Love, L. Memore, L. Zhang, A. Muller, W. Browder, and D. L. Williams.** 1997. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg* **63**:125-31.
 224. **Postec, A., L. Urios, F. Lesongeur, B. Ollivier, J. Querellou, and A. Godfroy.** 2005. Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal ecosystems. *Curr Microbiol* **50**:138-44.
 225. **Preza, D., I. Olsen, T. Willumsen, S. K. Boches, S. L. Cotton, B. Grinde, and B. J. Paster.** 2009. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:509-17.
 226. **Pyrhonen, K., S. Nayha, M. Kaila, L. Hiltunen, and E. Laara.** 2009. Occurrence of parent-reported food hypersensitivities and food allergies among children aged 1-4 yr. *Pediatr Allergy Immunol* **20**:328-38.
 227. **Radon, K.** 2006. The two sides of the "endotoxin coin". *Occup Environ Med* **63**:73-8, 10.
 228. **Radon, K., D. Windstetter, J. Eckart, H. Dressel, L. Leitritz, J. Reichert, M. Schmid, G. Praml, M. Schosser, E. von Mutius, and D. Nowak.** 2004. Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. *Clin Exp Allergy* **34**:1178-83.
 229. **Rage, E., V. Siroux, N. Kunzli, I. Pin, and F. Kauffmann.** 2009. Air pollution and asthma severity in adults. *Occup Environ Med* **66**:182-8.
 230. **Raherison, C., J. M. Tunon de Lara, A. Taytard, C. Kopferschmitt, E. Quoix, and G. Pauli.** 1997. [Prévalence de l'asthme chez l'enfant.]. *Rev Mal Respir* **14**:4s33-4s39.

231. **Reboux, G.** 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* **46**:208-212.
232. **Reboux, G., A. P. Bellanger, S. Roussel, F. Grenouillet, S. Sornin, R. Piarroux, J. C. Dalphin, and L. Millon.** 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* **19**:446-53.
233. **Reboux, G., J. C. Dalphin, J. C. Polio, L. Millon, J. Baverel, J. Martinez, L. Girard, and R. Piarroux.** 2002. Influence of buffered propionic acid on the development of micro-organisms in hay. *Mycoses* **45**:184-7.
234. **Reboux, G., R. Piarroux, F. Mauny, A. Madroszyk, L. Millon, K. Bardonnnet, and J. C. Dalphin.** 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* **163**:1534-9.
235. **Reboux, G., M. Reiman, S. Roussel, K. Taattola, L. Millon, J. C. Dalphin, and R. Piarroux.** 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med* **13**:267-73.
236. **Reboux, G., S. Roussel, and F. Grenouillet.** 2006. Moisissures de l'environnement agricole. *Journal de Mycologie Médicale*.
237. **Remes, S. T., K. Iivanainen, H. Koskela, and J. Pekkanen.** 2003. Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clin Exp Allergy* **33**:427-34.
238. **Ren, P., T. M. Jankun, and B. P. Leaderer.** 1999. Comparisons of seasonal fungal prevalence in indoor and outdoor air and in house dusts of dwellings in one Northeast American county. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **9**:560-8.
239. **Richard, J.** 1983. Nature de la flore dominante et sous dominante des laits crus très pollués. *Le lait* **63**:148-170.
240. **Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius.** 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* **358**:1129-33.
241. **Robertson, C. F., E. Heycock, J. Bishop, T. Nolan, A. Olinsky, and P. D. Phelan.** 1991. Prevalence of asthma in Melbourne schoolchildren: changes over 26 years. *Bmj* **302**:1116-8.
242. **Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tscopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay.** 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* **326**:298-304.
243. **Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, K. Bardonnnet, L. Millon, and R. Piarroux.** 2004. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup Environ Med* **61**:e3.
244. **Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, D. Pernet, J. J. Laplante, L. Millon, and R. Piarroux.** 2005. Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study. *Mycopathologia* **160**:273-9.
245. **Rudeeaneksin, J., S. Srisungngam, P. Sawanpanyalert, T. Sittiwakin, S. Likansakul, S. Pasadorn, P. Palittapongarnpim, P. J. Brennan, and B. Phetsuksiri.** 2008. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**:263-70.
246. **Rylander, R.** 2006. Endotoxin and occupational airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**:62-6.
247. **Rylander, R.** 1994. Organic dusts--from knowledge to prevention. *Scand J Work Environ Health* **20 Spec No**:116-22.

248. **Rylander, R., and B. Fogelmark.** 1994. Inflammatory responses by inhalation of endotoxin and (1-->3)-beta-D-glucan. *Am J Ind Med* **25**:101-2.
249. **Rylander, R., H. Goto, K. Yuasa, B. Fogelmark, and B. Polla.** 1994. Bird droppings contain endotoxin and (1-->3)-beta-D-glucan. *Int Arch Allergy Immunol* **103**:102-4.
250. **Rylander, R., and O. Michel.** 2005. Organic dust induced inflammation--role of atopy and TLR-4 and CD14 gene polymorphisms. *Am J Ind Med* **48**:302-7.
251. **Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S. H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, T. Kinjo, K. Nakamura, K. Kawakami, and Y. Iwakura.** 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**:39-46.
252. **Sanaa, M.** 1993. Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI:207p.
253. **Sanaa, M., A. Audurier, B. Poutrel, J. L. Menard, and F. Serieys.** 1996. Origine of bovine milk contamination by *Listeria monocytogenes*. *Int Dairy Fed* **25**:163-179.
254. **Sanaa, M., B. Poutrel, J. L. Menard, and F. Serieys.** 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J Dairy Sci* **76**:2891-8.
255. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
256. **Sato, M., H. Sano, D. Iwaki, K. Kudo, M. Konishi, H. Takahashi, T. Takahashi, H. Imaizumi, Y. Asai, and Y. Kuroki.** 2003. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* **171**:417-25.
257. **Schmid, F., B. A. Stone, R. T. Brownlee, B. M. McDougall, and R. J. Seviour.** 2006. Structure and assembly of epiglucan, the extracellular (1-->3;1-->6)-beta-glucan produced by the fungus *Epicoccum nigrum* strain F19. *Carbohydr Res* **341**:365-73.
258. **Schmid, F., B. A. Stone, B. M. McDougall, A. Bacic, K. L. Martin, R. T. Brownlee, E. Chai, and R. J. Seviour.** 2001. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1 --> 3;1 --> 6)-beta-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. *Carbohydr Res* **331**:163-71.
259. **Schwarze, J., E. Hamelmann, G. Cieslewicz, A. Tomkinson, A. Joetham, K. Bradley, and E. W. Gelfand.** 1998. Local treatment with IL-12 is an effective inhibitor of airway hyperresponsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol* **102**:86-93.
260. **Sears, M. R.** 1997. Descriptive epidemiology of asthma. *Lancet* **350 Suppl 2**:SIII-4.
261. **Sebastian, A., C. Pehrson, and L. Larsson.** 2006. Elevated concentrations of endotoxin in indoor air due to cigarette smoking. *J Environ Monit* **8**:519-22.
262. **Shaker, M., and D. Woodmansee.** 2009. An update on food allergy. *Curr Opin Pediatr*.
263. **Sheikh, A., and B. Alves.** 2001. Age, sex, geographical and socio-economic variations in admissions for anaphylaxis: analysis of four years of English hospital data. *Clin Exp Allergy* **31**:1571-6.
264. **Sheikh, A., and B. Alves.** 2000. Hospital admissions for acute anaphylaxis: time trend study. *Bmj* **320**:1441.
265. **Simons, F. E. R.** 1994. *Ancestors of Allergy*, New York.
266. **Siroux, V., M. P. Oryszczyn, E. Paty, F. Kauffmann, C. Pison, D. Vervloet, and I. Pin.** 2003. Relationships of allergic sensitization, total immunoglobulin E and blood eosinophils to asthma severity in children of the EGEA Study. *Clin Exp Allergy* **33**:746-51.

267. **Siroux, V., I. Pin, M. P. Oryszczyn, N. Le Moual, and F. Kauffmann.** 2000. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. *Eur Respir J* **15**:470-7.
268. **Smit, E., P. Leeflang, B. Glandorf, J. D. van Elsas, and K. Wernars.** 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **65**:2614-21.
269. **Smit, L. A., I. M. Wouters, M. M. Hobo, W. Eduard, G. Doekes, and D. Heederik.** 2006. Agricultural seed dust as a potential cause of organic dust toxic syndrome. *Occup Environ Med* **63**:59-67.
270. **Smyth, R. L.** 2002. Asthma: a major pediatric health issue. *Respir Res* **3 Suppl 1**:S3-7.
271. **Sommellier, L., and V. Heuchel.** 1999. Caractérisation microbiologique et aptitudes technologiques des laits ultrapropres. Institut de l'élevage, C.R. N°9983118:32p.
272. **Steele, C., L. Marrero, S. Swain, A. G. Harmsen, M. Zheng, G. D. Brown, S. Gordon, J. E. Shellito, and J. K. Kolls.** 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med* **198**:1677-88.
273. **Sudre, B., M. Vacheyrou, C. Braun-Fahrlander, A. C. Normand, M. Waser, G. Reboux, P. Ruffaldi, E. von Mutius, and R. Piarroux.** 2009. High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy* **64**:1068-73.
274. **Sugihara, T., M. Koda, Y. Maeda, T. Matono, T. Nagahara, M. Mandai, M. Ueki, and Y. Murawaki.** 2009. Rapid identification of bacterial species with bacterial DNA microarray in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Intern Med* **48**:3-10.
275. **Takahashi, H., N. Ohno, Y. Adachi, and T. Yadomae.** 2001. Association of immunological disorders in lethal side effect of NSAIDs on beta-glucan-administered mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **31**:1-14.
276. **Takatori, K., H. J. Lee, T. Ohta, and T. Shida.** 1994. Composition of the house dust microflora in Japanese houses. , p. 93-101. *In* R. A. Samson, Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G., and Hoekstra, E.S. (ed.), *Health implications of fungi in indoor environments*. Elsevier, New York.
277. **Talon, D., P. Menget, M. Thouverez, G. Thiriez, H. Gbaguidi Haore, C. Fromentin, A. Muller, and X. Bertrand.** 2004. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect* **57**:119-25.
278. **Tam, S. C., K. P. Yip, K. P. Fung, and S. T. Chang.** 1986. Hypotensive and renal effects of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Sci* **38**:1155-61.
279. **Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G. D. Brown.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**:31-8.
280. **Tham, K. W., M. S. Zuraimi, D. Koh, F. T. Chew, and P. L. Ooi.** 2007. Associations between home dampness and presence of molds with asthma and allergic symptoms among young children in the tropics. *Pediatr Allergy Immunol* **18**:418-24.
281. **Thammavongs, B., J. M. Poncet, N. Desmases, M. Gueguen, and J. M. Panoff.** 2004. Resin straw as an alternative system to securely store frozen microorganisms. *J Microbiol Methods* **57**:181-6.

282. **Thomsen, S. F., C. S. Ulrik, K. Larsen, and V. Backer.** 2004. Change in prevalence of asthma in Danish children and adolescents. *Ann Allergy Asthma Immunol* **92**:506-11.
283. **Thorne, P. S., M. S. Kiekhaefer, P. Whitten, and K. J. Donham.** 1992. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Appl Environ Microbiol* **58**:2543-51.
284. **Thorne, P. S., J. L. Lange, P. Bloebaum, and G. J. Kullman.** 1994. Bioaerosol sampling in field studies: can samples be express mailed? *Am Ind Hyg Assoc J* **55**:1072-9.
285. **Tilsala-Timisjarvi, A., and T. Alatossava.** 2001. Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. *Int J Food Microbiol* **68**:45-52.
286. **Valacta.** Désinfection et qualité du lait, <http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/documents/Desinfectionqualitelait%20MTGA.pdf>.
287. **Van Kessel, J. S., J. S. Karns, and M. L. Perdue.** 2003. Using a portable real-time PCR assay to detect Salmonella in raw milk. *J Food Prot* **66**:1762-7.
288. **Vandenbulcke, L., C. Bachert, P. Van Cauwenberge, and S. Claeys.** 2006. The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* **139**:159-65.
289. **Vandentorren, S., I. Baldi, I. Annesi Maesano, D. Charpin, F. Neukirch, L. Filleul, A. Cantagrel, and J. F. Tessier.** 2003. Long-term mortality among adults with or without asthma in the PAARC study. *Eur Respir J* **21**:462-7.
290. **Varraso, R., V. Siroux, J. Maccario, I. Pin, and F. Kauffmann.** 2005. Asthma severity is associated with body mass index and early menarche in women. *Am J Respir Crit Care Med* **171**:334-9.
291. **Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbes, and M. C. Montel.** 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol* **26**:305-10.
292. **Verhoeff, A. P., and H. A. Burge.** 1997. Health risk assessment of fungi in home environments. *Ann Allergy Asthma Immunol* **78**:544-54; quiz 555-6.
293. **Verhoeff, A. P., E. S. van Reenen-Hoekstra, R. A. Samson, B. Brunekreef, and J. H. van Wijnen.** 1994. Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure. *Allergy* **49**:533-9.
294. **Vetvicka, V., and J. C. Yvin.** 2004. Effects of marine beta-1,3 glucan on immune reactions. *Int Immunopharmacol* **4**:721-30.
295. **von Mutius, E.** 2002. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* **109**:S525-32.
296. **von Mutius, E., C. Braun-Fahrlander, R. Schierl, J. Riedler, S. Ehlermann, S. Maisch, M. Waser, and D. Nowak.** 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* **30**:1230-4.
297. **von Mutius, E., and K. Radon.** 2008. Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am* **28**:631-47, ix-x.
298. **von Mutius, E., and S. Schmid.** 2006. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* **61**:407-13.
299. **Von Pirquet, C.** 1906. Allergie. *Münch Med Wochenschr* **30**:1457.
300. **Wallace, R. L.** 2009. Bacteria Counts in Raw Milk, http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/management/articles/bacteria-counts-raw-milk_1285.htm. IlliniDairyNet Quality Milk Issues Papers.

301. **Warner, J. A., E. A. Miles, A. C. Jones, D. J. Quint, B. M. Colwell, and J. O. Warner.** 1994. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* **24**:423-30.
302. **Waser, M., K. B. Michels, C. Bieli, H. Floistrup, G. Pershagen, E. von Mutius, M. Ege, J. Riedler, D. Schram-Bijkerk, B. Brunekreef, M. van Hage, R. Lauener, and C. Braun-Fahrlander.** 2007. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* **37**:661-70.
303. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**:697-703.
304. **Wickens, K., J. M. Lane, P. Fitzharris, R. Siebers, G. Riley, J. Douwes, T. Smith, and J. Crane.** 2002. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* **57**:1171-9.
305. **Williams, D. L.** 1997. Overview of (1->3)-beta-D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm* **6**:247-50.
306. **Williams, L. K., D. R. Ownby, M. J. Maliarik, and C. C. Johnson.** 2005. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* **94**:323-32.
307. **Wu, Z. H., D. M. Jiang, P. Li, and Y. Z. Li.** 2005. Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ Microbiol* **7**:1602-10.
308. **Wurtz, H., T. Sigsgaard, O. Valbjorn, G. Doekes, and H. W. Meyer.** 2005. The dustfall collector--a simple passive tool for long-term collection of airborne dust: a project under the Danish Mould in Buildings program (DAMIB). *Indoor Air* **15 Suppl** **9**:33-40.
309. **Yoo, S. M., S. Y. Lee, K. H. Chang, S. Y. Yoo, N. C. Yoo, K. C. Keum, W. M. Yoo, J. M. Kim, and J. Y. Choi.** 2009. High-throughput identification of clinically important bacterial pathogens using DNA microarray. *Mol Cell Probes* **23**:171-7.
310. **Yoshioka, S., N. Ohno, T. Miura, Y. Adachi, and T. Yadomae.** 1998. Immunotoxicity of soluble beta-glucans induced by indomethacin treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:171-9.
311. **Zejda, J. E., and J. A. Dosman.** 1993. Respiratory disorders in agriculture. *Tuber Lung Dis* **74**:74-86.
312. **Zekovic, D. B., S. Kwiatkowski, M. M. Vrvic, D. Jakovljevic, and C. A. Moran.** 2005. Natural and modified (1->3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol* **25**:205-30.
313. **Zucker, B. A., S. Trojan, and W. Muller.** 2000. Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**:37-46.
314. **Zureik, M., C. Neukirch, B. Leynaert, R. Liard, J. Bousquet, and F. Neukirch.** 2002. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *Bmj* **325**:411-4.

ANNEXES

ANNEXE 1 : questionnaire AgriSanté



PROGRAMME : AGRICULTURE ET SANTE

NOM Prénom : _____ N° _____
 Adresse : _____

 Tél. : _____

Visites :

Dates	Enquêteurs	Observations

Type de Bâtiment : _____ Quota : _____
 Système de production : _____ Nombre de VL : _____
 Personnel : _____ Nombre d'UGB : _____

NOM Prénom	Age	Fonction

Quarantaine

Le foin : Conditions de préparation de l'échantillon moyen : (sur 20 jours)

(Seulement celui distribué pendant la période de séchage)

Types de foin

Nature

Nature / NF

Conditions de récolte

Qualité de conservation*

Date des prélèvements

Les autres aliments stockés :

/ Si susceptibles de créer de la poussière ou des moisissures

Nature

Conditions de préparation de l'échantillon sur les 6 jours précédant les prélèvements d'ambiance

La paille : paille en balles ronds produit + sochat

Qualité de conservation

L'étable (lire un schéma p. 4)

Alimentation

Moment de distribution

Nature de la ration

Moment de créations de poussières

Fréquences entraînées des auges :

Progress des auges** :

Cause :

Foin humide dans les résus :

Moment1

Moment2

Moment3

1 ambrétable :

2 ambrétable :

3 ambrétable :

Paillage :

Fréquence :

Mode (balleuse, manuel...)

GréVL

Lieu de prélèvement de la poussière accumulée

Propriété des animaux***

général

memelles :

Présence d'une brosse à vache (grille dos)

Présence de foin dans la litière

Rabats des déjections

Hauteur / Sol :

(minimum 1 m)

Distribution de foin à la traite :

heure traite matin

soir

Préparation à la traite

produits

propreté apparente :

Température

Grasse

Lingettes trayons n°10

Matériau de litière: 2-4

Age :

Etat général :

Etat des aboucheours** :

Néologisme IAT :

Méthode***

Produits :

propreté*

Taille :

entrées d'air

Etat des meins** :

(principales anomalies)

Auto Trailla :

Boîte à lait

Température

Nombre de litières prélevées :

Fréquences collectée :

*meins ←→ 5 excellent

** 1 Incomant ←→ 5 faible

*** note grille INRA sur n° 10

**** -Alerte quotidien /Alerte hebdo / Eau chaude soignée

Lait :

Schéma de l'étable :

Indiquer Lieu de logement des animaux (/type d'animaux)
Lieu d'alimentation
Schéma de déplacement des animaux et des personnes
Aération
Points de prélèvements de poussières et d'ambiance

RENSEIGNEMENTS OU OBSERVATIONS DIVERS

déroulement travaux:

matin:

soir:

n° ferme :

Complément du questionnaire :

Type de foin – condition de récolte : (1à5 : très mauvais à très bonne)

Origine des céréales : achetées, produites à la ferme,...

Alimentation :

Matin : (foin ou regain ou foin + regain) :

Soir :

Propreté des animaux : (1à5 très mauvais à très bon)

Déroulement de la session de travail, traite : (raclage, paille, foin, farine, avant/après traite,...)

Nettoyage des trayons :

Traite à l'extérieure :

Météo (traite dehors)

Nature du sol

courant d'air, vent,

nb de jour de pluie,

Propreté de l'aire d'attente (boue, terre, poussière)

ANNEXE 2 : Questionnaire Gabriel Phase I

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Annex A7 - Phase I

ID: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []

Screening Questionnaire

Dear parents!

Thank you very much for completing this questionnaire. When having finished, please ask your child to bring it back to school in the closed envelope. The class teacher will collect the envelope and return it to the Gabriel Study Centre in Basel.

Please answer the questions by making a cross in the appropriate tick box. Please use only a black ball-pen (no felt-tip pen).

If you wish to correct an answer, please click on the wrongly marked tick box completely to show it.

If numbers or texts are required, please write the numbers or texts in capital letters clearly in the appropriate boxes.

Examples: 16 W R I write: -> GRINTEX

Please answer the questions in their order. When having finished please check the questionnaires for its completeness. Please do not forget to fill in the consent form and the address sheet!

Thank you very much for your assistance!

1. In which class is your child? r01 Class: [] [] -> r01c

2. Is your child a boy or a girl? r02 Boy: 1 Girl: 2

3. When was your child born? r03 Day: [] [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r03c

4. How many siblings does your child have? (0 for no siblings) r04 number: [] []

5. Please fill in the dates of birth of your child's siblings who live in the same household and visit the primary school.

1. r05_01 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_01c
 r05_02 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_02c
 r05_03 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_03c

2. r05_04 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_04c
 r05_05 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_05c
 r05_06 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_06c

3. r05_07 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_07c
 r05_08 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_08c
 r05_09 Day: [] [] Month: [] [] Year: [] [] -> r05_09c

6. Does your child have the Swiss Nationality? (Austria, Germany) r06_01 Yes: 1 No: 2

Were the parents of the child born in Switzerland? (Austria, Germany) r06_02 Yes, both parents: 1 Yes, but only one parent: 2 No, both parents elsewhere: 3

A7-1

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Annex A7 - Phase I

5897439571

7. Does your child live on a farm? r07 Yes: 1 No: 2 -> If no, please go on with question 8

7a. If yes, is the farm being managed currently? r07a_01 Yes: 1 No: 2 -> since when? [] [] [] [] -> r07a_02 Year

7b. If yes, who is managing the farm? r07b

Close family (Father, Mother) 1 -> r07b_1x

Next family (Brother, Sister, Uncle, Aunt, Brother-in-law, Grandparents) 2 -> r07b_2x

Other persons (i.e. Landlord, Leaseholder) 3 -> r07b_3x

7c. In case the parents are managing the farm, is this on a regular or a sideline basis? r07c

Regular basis: 1 Sideline basis: 2

7d. If yes, what is being managed or cultivated on the farm (more than one answer is possible)?

Dairy farming: r07d_01 1 Cultivation of feed grain: r07d_02 2 Feeding with fresh grass: r07d_03 3

Cow farming: r07d_04 4 Cultivation of feeding corn: r07d_05 5 Feeding with grass silage: r07d_06 6

Pig farming: r07d_07 7 Cultivation of fodder beet: r07d_08 8 Feeding with corn silage: r07d_09 9

Sheep farming: r07d_10 10 Cultivation of grain for sale: r07d_11 11 Feeding with grain shred: r07d_12 12

Poultry farming: r07d_13 13 Market gardening: r07d_14 14 Feeding with hay pellets: r07d_15 15

Horse farming: r07d_16 16 Fruit-planting: r07d_17 17 Feeding with loose hay: r07d_18 18

Goat farming: r07d_19 19 Winegrowing: r07d_20 20 -> r07d_1x bis
 r07d_21 21
 r07d_22 22

8. Has your child ever spent time with animals in an animal shed regularly (at least once a week for a period of 6 months minimum)? r08 Yes: 1 No: 2

9. Has your child ever spent time in a barn regularly (at least once a week for a period of 6 months minimum)? r09 Yes: 1 No: 2

10. Has your child ever drunk milk directly from a farm regularly (at least once a week for a period of 6 months minimum)? r10 Yes: 1 No: 2

A7-2

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Annex A7 - Phase I

ID: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []

11. Has your child had wheezing or whistling in the chest in the past 12 months? r11 Yes: 1 No: 2

12. Has a doctor ever diagnosed your child with any of the following diseases (more than one answer is possible)?

	No	Once	Several times
Asthma	r12_01 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3 -> r12_01x
Wheezing/bronchitis (asthmatic, spasmodic, obstructive bronchitis)	r12_02 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3 -> r12_02x
Bronchitis	r12_03 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3 -> r12_03x
Acute spasmodic Laryngitis (Pseudo-croup)	r12_04 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3 -> r12_04x

13. Has your child ever used an inhaler? r13 Yes: 1 No: 2

14. In the last 12 months, has your child had problems with sneezing or with a running or a blocked or an itchy nose although not having a flu?

r14_01 Yes: 1 No: 2

If yes, in the last 12 months, has your child had problems with itchy or running eyes together with these nose problems? r14_02 Yes: 1 No: 2 -> r14_02x

15. Has a doctor ever diagnosed your child with hay fever? r15 Yes: 1 No: 2

16. Has a doctor ever diagnosed your child with neurodermatitis (atopic eczema, endogenous eczema, atopic dermatitis)? r16 Yes: 1 No: 2

17. Do the parents of the child smoke? r17_01 Mother: 1 r17_02 Father: 1

Yes: 1 1

No longer: 2 2

Never: 3 3

18. Have either the parents or siblings of the child ever suffered from any of the following diseases?

	Yes	No
Asthma	r18_01 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 -> r18_01x
Hay fever	r18_02 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 -> r18_02x
Neurodermatitis, atopic eczema, endogenous eczema	r18_03 <input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 -> r18_03x

A7-3

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Annex A7 - Phase I

7101439577

19. What is the highest graduation of the parents?

	r19_01 Mother	r19_02 Father
School finished without school leaving certificate	<input type="checkbox"/> 1 r19_01_1x	<input type="checkbox"/> 1 r19_02_1x
Primary school and Secondary school with certificate (Austria: without Secondary school)	<input type="checkbox"/> 2 r19_01_2x	<input type="checkbox"/> 2 r19_02_2x
High school graduation	<input type="checkbox"/> 3 r19_01_3x	<input type="checkbox"/> 3 r19_02_3x
Diploma	<input type="checkbox"/> 4 r19_01_4x	<input type="checkbox"/> 4 r19_02_4x -> r19x
General qualification for university entrance	<input type="checkbox"/> 5 r19_01_5x	<input type="checkbox"/> 5 r19_02_5x
Other graduation	<input type="checkbox"/> 6 r19_01_6x	<input type="checkbox"/> 6 r19_02_6x

r19_01x r19_02x

Declaration of consent

r20 1 I agree with the participation in the first study phase (i.e. the use of the data from this questionnaire). (Please do not forget your signature.)

I declare my non-binding readiness for the participation of my child in the second phase of the GABRIEL-Study. (Please tick the appropriate boxes.) -> r20_01x

r20_01 1 Withdrawal of blood

If yes, I would like to be informed about the results of the allergy test.

r20_02 Yes: 1 No: 2 -> r20_01x

r21 1 Analysis of the genetic information in the taken blood in relation to asthma and allergies. I know that an information about these results is not possible because of the anonymisation.

r22_01 1 Sampling of dust

If yes, I would like to be informed about the results of the dust sample test.

r22_02 Yes: 1 No: 2 -> r22_01x -> r21_b2x

I have read the Parents' Information and the information sheet "Information concerning data protection within the GABRIEL-Study" and I agree with the participation of my / our child in the study as well as the handling of personal data in the described manner.

I have had enough time for a voluntary decision and was / were notably informed. The adjoining statements concerning "Agreement and Data Protection" are correct.

Signature of the parent / parents: _____

Date: _____

Please do not forget your address inside. _____ signature

Thank you very much!

A7-4

ANNEXE 3 : Questionnaire Gabriel Phase II

9961364891

study_id

WELL BEING

The following questions address your child's health well-being. Please read every question closely, think about how your child felt during the last week and mark the box that best applies

m97 97) Physical well being

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m97_1, m97_1x ... my child felt sick	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m97_2, m97_1x ... my child had head or stomach ache	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m97_3, m97_1x ... my child felt tired and without energy	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m97_4, m97_1x ... my child had a lot of strength and endurance	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

m98 98) Mental well being

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m98_1, m98_1x ... my child laughed a lot and had a lot of fun	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m98_2, m98_1x ... my child didn't feel like doing anything	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m98_3, m98_1x ... my child felt lonesome	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m98_4, m98_1x ... my child felt anxious and insecure	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

m99 99) Self-worth

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m99_1, m99_1x ... my child was proud of him/herself	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m99_2, m99_1x ... my child felt well with his/herself	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m99_3, m99_1x ... my child could stand him/herself	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m99_4, m99_1x ... my child had lots of good ideas	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

L

B1-41

J

9961364891

study_id

m100 100) Family

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m100_1, m100_1x ... my child had a good relationship with us as parents	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m100_2, m100_1x ... my child felt comfortable at home	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m100_3, m100_1x ... we had bad fights at home	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m100_4, m100_1x ... my child felt patronised by me	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

m101 101) Friends

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m101_1, m101_1x ... my child did something with friends	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m101_2, m101_1x ... my child was well accepted by others	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m101_3, m101_1x ... my child felt comfortable with his/her friends	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m101_4, m101_1x ... my child had the feeling his/she was different than the others	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

m102 102) School

During the last week ...

	Never	Seldomly	Sometimes	Often	Always
m102_1, m102_1x ... my child managed the homework well	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m102_2, m102_1x ... my child had fun during school lessons	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m102_3, m102_1x ... my child worried about his/her future	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
m102_4, m102_1x ... my child was afraid of bad school grades	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4

L

B1-42

J

9961364891

study_id

m103 103) How many hours does your child sleep on average?

m103_1 Altogether hours during the day and the night

	Yes	No
m103_2, m103_2x Does your child suffer from sleeping difficulties	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m103_3, m103_3x My child has problems to fall asleep	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m103_4, m103_4x My child has problems sleeping through the night	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0



MOVEMENT AND SPORT

104) How much time does your child spend normally each day with physical activities outdoors (for example playing, running around, bicycling, hiking, helping with the work on the farm)?

In the summer

m104_1, m104_1x During schooldays	m104_2, m104_2x During the week-ends
More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5	More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5
Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4	Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4
Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3	Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3
Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2	Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2
Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1	Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1
None <input type="checkbox"/> 0	None <input type="checkbox"/> 0

In the winter

m104_1, m104_1x During schooldays	m104_2, m104_2x During the week-ends
More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5	More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5
Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4	Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4
Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3	Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3
Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2	Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2
Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1	Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1
None <input type="checkbox"/> 0	None <input type="checkbox"/> 0

L

B1-43

J

9961364891

study_id

105) Does your child do sport in a club or a sports group?

m105_1 Yes No

m105_2, m105_2x If yes, how often:

3 times a week or more often	<input type="checkbox"/> 3
1 - 2 times a week	<input type="checkbox"/> 2
Less than once a week	<input type="checkbox"/> 1

106) How much time does your child spend normally each day with electronic games (game console, gameboy), computers or television?

Please add up the time your child spends with these devices.

m106_1, m106_1x During schooldays	m106_2, m106_2x During the week-ends
More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5	More than 4 hours <input type="checkbox"/> 5
Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4	Up to 4 hours <input type="checkbox"/> 4
Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3	Up to 2 hours <input type="checkbox"/> 3
Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2	Up to 1 hour <input type="checkbox"/> 2
Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1	Up to 1/2 hour <input type="checkbox"/> 1
None <input type="checkbox"/> 0	None <input type="checkbox"/> 0

107) How does your child normally get to school?

m107_1, m107_1_1x -_5x By foot	<input type="checkbox"/> 1	→ how long does it take approximately? <input type="text"/> minutes
m107_2, m107_2x With the bike or a scouler	<input type="checkbox"/> 2	→ how long does it take approximately? <input type="text"/> minutes
m107_3, m107_3x With the car	<input type="checkbox"/> 3	→ how long does it take approximately? <input type="text"/> minutes
m107_4, m107_4x With the bus or schoolbus	<input type="checkbox"/> 4	→ how long does it take approximately? <input type="text"/> minutes
m107_5, m107_5x Others	<input type="checkbox"/> 5	

L

B1-44

J

S961364891

study_id

Milk

The following questions concern the milk that your child drinks. We distinguish between milk that comes directly from the farm and milk that was bought in a store.



Milk directly from the farm

We mean the milk that was produced or acquired directly on a farm (for example from barnyard sales, milk stations). We are interested to know if you boil or skim the milk before you drink it.

m75 75) Did your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) drink milk directly from a farm?

Yes No If no, please continue with the question 81

76) How often did your child drink milk directly from the farm that was neither boiled nor skimmed?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m75_1, m76_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m75_2, m76_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m75_3, m76_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m75_4, m76_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m75_5, m76_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B1-33

S961364891

study_id

77) How often did your child drink milk directly from the farm that was boiled but not skimmed?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m77_1, m77_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m77_2, m77_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m77_3, m77_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m77_4, m77_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m77_5, m77_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

78) How often did your child drink milk directly from the farm that was skimmed but not boiled?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m78_1, m78_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m78_2, m78_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m78_3, m78_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m78_4, m78_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m78_5, m78_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

79) How often did your child drink milk directly from the farm that was boiled and skimmed?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m79_1, m79_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m79_2, m79_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m79_3, m79_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m79_4, m79_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m79_5, m79_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B1-34

S961364891

study_id

80) How long did you store the milk directly from the farm before your child drank it?

	About a day	About 2-3 days	About 4-5 days	About a week
m80_1, m80_1x During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m80_2, m80_2x In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m80_3, m80_3x In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m80_4, m80_4x In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m80_5, m80_5x In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Milk from the store

We mean milk that you bought in a store or the supermarket.

81) How often did your child drink unskimmed milk (more than 3% fat) from a store?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m81_1, m81_1x During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m81_2, m81_2x In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m81_3, m81_3x In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m81_4, m81_4x In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m81_5, m81_5x In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B1-35

S961364891

study_id

82) How often did your child drink reduced fat milk (1.5% fat or less) from a store?

	At least once a day	1 – 6 times a week	Less than once a week	Never
m82_1, m82_1x During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m82_2, m82_2x In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m82_3, m82_3x In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m82_4, m82_4x In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m82_5, m82_5x In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

83) How long did you store the milk from the store before your child drank it?

	About a day	About 2-3 days	About 4-5 days	About a week
m83_1 During pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m83_2 In the first year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m83_3 In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m83_4 In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m83_5 In the last 12 months	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B1-36

S961364891

study_id

64) How often was your child present while the adults were grinding coarsely or mixing forage corn?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m64_1, m64_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m64_2, m64_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m64_3, m64_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m64_4, m64_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m64_5, m64_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

65) How often was your child present while the adults were ensiling forage corn?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m65_1, m65_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m65_2, m65_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m65_3, m65_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m65_4, m65_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m65_5, m65_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

66) How often was your child present while the adults were harvesting hay?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m66_1, m66_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m66_2, m66_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m66_3, m66_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m66_4, m66_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m66_5, m66_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-29

S961364891

study_id

67) How often was your child present while the adults were handing stored hay?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m67_1, m67_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m67_2, m67_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m67_3, m67_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m67_4, m67_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m67_5, m67_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

68) How often was your child present while the adults were ensiling grass?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m68_1, m68_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m68_2, m68_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m68_3, m68_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m68_4, m68_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m68_5, m68_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

69) How often was your child present while the adults were harvesting forage grains?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m69_1, m69_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m69_2, m69_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m69_3, m69_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m69_4, m69_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m69_5, m69_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-30

S961364891

study_id

70) How often was your child present while the adults were threshing?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m70_1, m70_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m70_2, m70_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m70_3, m70_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m70_4, m70_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m70_5, m70_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

71) How often was your child present while the adults were grinding coarsely, grinding or mixing forage grains?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m71_1, m71_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m71_2, m71_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m71_3, m71_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m71_4, m71_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m71_5, m71_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

72) How often was your child present while the adults were doing field work (for example ploughing, harrowing)?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m72_1, m72_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m72_2, m72_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m72_3, m72_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m72_4, m72_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m72_5, m72_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-31

S961364891

study_id

73) How often was your child present while the adults were manuring?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m73_1, m73_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m73_2, m73_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m73_3, m73_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m73_4, m73_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m73_5, m73_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

74) How often was your child present while the adults were spraying pesticide?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m74_1, m74_1x	During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m74_2, m74_2x	In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m74_3, m74_3x	In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m74_4, m74_4x	In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m74_5, m74_5x	In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-32

9961364891

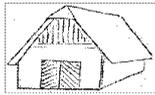
study_id

55) How often did your child have contact with sugar-beet chips?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m55_1, m55_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m55_2, m55_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m55_3, m55_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m55_4, m55_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m55_5, m55_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

Barn and storage room for animal food

The following questions concern the time your child spend in a barn or a storage room for animal food. We mean playing, helping or similar occupations during activities in these rooms.



m56 56) Was your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) in a barn?

Yes No If no, please continue with the question 59

57) How often did your child stay in a barn?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m57_1, m57_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m57_2, m57_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m57_3, m57_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m57_4, m57_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m57_5, m57_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-25

9961364891

study_id

58) What was in the barn where your child spent the most time? *Multiple answers are possible.*

	m58_1		m58_2	
	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months
Heating material or wood	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> m58_1_0x-0xx	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> m58_2_0x-0xx
Whole feeding grain	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> m58_1_1x-1xx	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> m58_2_1x-1xx
Gritted feeding grain	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> m58_1_2x-2xx	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> m58_2_2x-2xx
Whole grain corn	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> m58_1_3x-3xx	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> m58_2_3x-3xx
Gritted corn	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> m58_1_4x-4xx	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> m58_2_4x-4xx
Hay	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> m58_1_5x-5xx	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> m58_2_5x-5xx
Straw	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> m58_1_6x-6xx	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> m58_2_6x-6xx
Other animal food	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> m58_1_7x-7xx	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> m58_2_7x-7xx
Don't know	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> m58_1_8x-8xx	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> m58_2_8x-8xx

In case you answered hay: how often were there problems with mould growth in the hay storage?

	m58_3, m58_3x		m58_4, m58_4x	
	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months
Every year	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
About every second year	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
Rarely	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2
Never	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
Don't know	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 4

m59 59) Was your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) in a special food storage room?

Yes No If no, please continue with the question 62

B1-26

9961364891

study_id

60) How often did your child spend time in a special food storage room?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m60_1, m60_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m60_2, m60_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m60_3, m60_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m60_4, m60_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m60_5, m60_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

61) What was in the special food storage room where your child spent the most time? *Multiple answers are possible.*

	m61_1		m61_2	
	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months	During the pregnancy or in the first year of life	In the last 12 months
Heating material or wood	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> m61_1_0x-0xx	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> m61_2_0x-0xx
Whole feeding grain	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> m61_1_1x-1xx	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> m61_2_1x-1xx
Gritted feeding grain	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> m61_1_2x-2xx	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> m61_2_2x-2xx
Whole grain corn	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> m61_1_3x-3xx	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> m61_2_3x-3xx
Gritted corn	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> m61_1_4x-4xx	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> m61_2_4x-4xx
Hay	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> m61_1_5x-5xx	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> m61_2_5x-5xx
Straw	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> m61_1_6x-6xx	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> m61_2_6x-6xx
Other animal food	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> m61_1_7x-7xx	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> m61_2_7x-7xx
Don't know	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> m61_1_8x-8xx	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> m61_2_8x-8xx

1=yes; 0=no 1=yes; 0=no

B1-27

9961364891

study_id

Other activities

In the following section we would like to ask you questions about the presence (for example playing, helping or riding on the tractor) of your child during other farming activities.

These activities are not daily, but are seasonal or depend on the necessities of the farm. Please answer so that the frequency depicts the period of the activity (do not convert the activity to one year).

62) How often did your child play in a corn field?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m62_1, m62_1x In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m62_2, m62_2x In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m62_3, m62_3x In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

63) How often was your child present while adults were harvesting forage corn?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m63_1, m63_1x During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m63_2, m63_2x In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m63_3, m63_3x In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m63_4, m63_4x In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m63_5, m63_5x In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-28

9961364891

43) How often was your child present while the adults were cleaning the poultry stable?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m43_1, m43_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m43_2, m43_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m43_3, m43_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m43_4, m43_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m43_5, m43_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

44) How often was your child in a poultry stable independently of the activity of the adults?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m44_1, m44_1x_1xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m44_2, m44_2x_2xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m44_3, m44_3x_3xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

45) Which characteristics best describe the poultry stable where your child spent the most time?
Multiple answers are possible.

	m45_1 During pregnancy or in the first year of life		m45_2 In the last 12 months	
	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1
Cage	<input type="checkbox"/> 0	m45_1_0xx_0xx	<input type="checkbox"/> 0	m45_2_0xx_0xx
Floormanagement	<input type="checkbox"/> 1	m45_1_1xx_1xx	<input type="checkbox"/> 1	m45_2_1xx_1xx
Free range	<input type="checkbox"/> 2	m45_1_2xx_2xx	<input type="checkbox"/> 2	m45_2_2xx_2xx
Don't know	<input type="checkbox"/> 3	m45_1_3xx_3xx	<input type="checkbox"/> 3	m45_2_3xx_3xx

1=yes; 0=no 1=yes; 0=no

B1-21

9961364891

Contact with forage

The following questions concern contact to forage. We mean activities like playing, handling, spreading, seeding, feeding or similar activities.



46) Was your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) in contact with forage or litter?

Yes No

47) How often did your child have contact with freshly cut grass?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m47_1, m47_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m47_2, m47_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m47_3, m47_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m47_4, m47_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m47_5, m47_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

48) How often did your child have contact with hay?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m48_1, m48_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m48_2, m48_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m48_3, m48_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m48_4, m48_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m48_5, m48_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-22

9961364891

49) How often did your child have contact with straw?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m49_1, m49_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m49_2, m49_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m49_3, m49_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m49_4, m49_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m49_5, m49_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

50) How often did your child have contact with feeding grain? (whole grain, gritted, or grinded grain)?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m50_1, m50_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m50_2, m50_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m50_3, m50_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m50_4, m50_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m50_5, m50_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

51) How often did your child have contact with corn feed (whole grain or gritted)?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m51_1, m51_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m51_2, m51_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m51_3, m51_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m51_4, m51_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m51_5, m51_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-23

9961364891

52) How often did your child have contact with grass silage?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m52_1, m52_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m52_2, m52_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m52_3, m52_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m52_4, m52_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m52_5, m52_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

53) How often did your child have contact with corn silage?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m53_1, m53_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m53_2, m53_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m53_3, m53_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m53_4, m53_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m53_5, m53_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

54) How often did your child have contact with bought feed concentrate?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m54_1, m54_1x_1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m54_2, m54_2x_2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m54_3, m54_3x_3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m54_4, m54_4x_4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m54_5, m54_5x_5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

B1-24

9961364891

study_id

34) Where were other animals in the cattle barn where your child spend the most time?
Multiple answers are possible

	During pregnancy	In the first year of life	In the 2. and 3. years of life	In the 4. and 5. years of life	In the last 12 months
m34_1 m34_1_0x-4xx Pigs, piglets	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_2 m34_2_0x-4xx Sheep, lambs, goats, kids	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_3 m34_3_0x-4xx Poultry, chicks	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_4 m34_4_0x-4xx Horses, foals	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_5 m34_5_0x-4xx Dogs, puppies	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_6 m34_6_0x-4xx Cats, kittens	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_7 m34_7_0x-4xx Don't know	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3
m34_8 m34_8_0x-4xx No	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 3

T=Yes; 0=No

9961364891

study_id

Pig stable

We refer to a stable where pigs and piglets are held, independently of other animals that may also be in the stable. The questions concern the area where the pigs are held.



m35 35) Was your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) in a pig stable?

Yes No → If no, please continue with the question 40

36) How often was your child present while the adults were feeding the animals?

	About once a day More than 15 min.	About once a week Up to 15 min.	About once a month	Never/ almost never
m36_1 m36_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m36_2 m36_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m36_3 m36_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m36_4 m36_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m36_5 m36_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1

37) How often was your child present while the adults were littering or removing dung?

	About once a day More than 15 min.	About once a week Up to 15 min.	About once a month	Never/ almost never
m37_1 m37_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m37_2 m37_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m37_3 m37_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m37_4 m37_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m37_5 m37_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1

9961364891

study_id

38) How often was your child in the pig stable independently of the activity of the adults?

	About once a day More than 15 min.	About once a week Up to 15 min.	About once a month	Never/ almost never
m38_1 m38_1x-1xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m38_2 m38_2x-2xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m38_3 m38_3x-3xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1

T=Yes; 0=No

39) Which characteristics best describe the pig stable where your child spent the most time?
Multiple answers are possible

Construction	m39_1 During the pregnancy or in the first year of life	m39_2 In the last 12 months
Stallion barn fully filtered	<input type="checkbox"/> 0 m39_1_0x-0xx	<input type="checkbox"/> 0 m39_2_0x-0xx
Three size barn	<input type="checkbox"/> 1 m39_1_1x-1xx	<input type="checkbox"/> 1 m39_2_1x-1xx
Partly slatted floor	<input type="checkbox"/> 2 m39_1_2x-2xx	<input type="checkbox"/> 2 m39_2_2x-2xx
Slatted floor	<input type="checkbox"/> 3 m39_1_3x-3xx	<input type="checkbox"/> 3 m39_2_3x-3xx
Don't know	<input type="checkbox"/> 4 m39_1_4x-4xx	<input type="checkbox"/> 4 m39_2_4x-4xx

T=Yes; 0=No

Ventilation	m39_3 During the pregnancy or in the first year of life	m39_4 In the last 12 months
Natural	<input type="checkbox"/> 0 m39_3_0x-0xx	<input type="checkbox"/> 0 m39_4_0x-0xx
Mechanical	<input type="checkbox"/> 1 m39_3_1x-1xx	<input type="checkbox"/> 1 m39_4_1x-1xx
Don't know	<input type="checkbox"/> 2 m39_3_2x-2xx	<input type="checkbox"/> 2 m39_4_2x-2xx

T=Yes; 0=No

9961364891

study_id

Poultry stable

We refer to a stable or an enclosure where chicken, chicks or other poultry are held.

m40 40) Was your child, or the mother during the pregnancy with the child, regularly (meaning at least once a month over half a year) in a poultry stable?

Yes No → If no, please continue with the question 46

41) How often was your child present while the adults were collecting or sorting eggs?

	About once a day More than 15 min.	About once a week Up to 15 min.	About once a month	Never/ almost never
m41_1 m41_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m41_2 m41_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m41_3 m41_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m41_4 m41_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m41_5 m41_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1

42) How often was your child present while the adults were feeding the animals?

	About once a day More than 15 min.	About once a week Up to 15 min.	About once a month	Never/ almost never
m42_1 m42_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m42_2 m42_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m42_3 m42_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m42_4 m42_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1
m42_5 m42_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1

S961364851

study_id

24) How often did your child have contact to poultry or chicks?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m24_1, m24_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m24_2, m24_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m24_3, m24_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m24_4, m24_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m24_5, m24_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

25) How often did your child have contact to sheep, lambs, goats or kids?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m25_1, m25_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m25_2, m25_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m25_3, m25_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m25_4, m25_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m25_5, m25_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

26) How often did your child have contact to horses or foals?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m26_1, m26_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m26_2, m26_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m26_3, m26_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m26_4, m26_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m26_5, m26_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

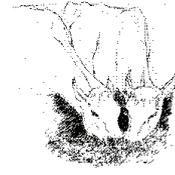
B1-13

S961364851

study_id

Activities in the stable

In the following section we would like to ask you questions about the presence of your child (for example playing, helping or similar activities) during activities in the stables.



Cattle stable

We refer to a stable where dairy cows, calves, bulls or other cattle are held, independently of other animals that may also be in the stable. The questions concern the area where the cattle are held.

m27 27) Was your child or the mother during the pregnancy with the child regularly (meaning at least once a month over half a year) in a cattle stable?

Yes No

28) How often was your child present while the adults were milking?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m28_1, m28_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m28_2, m28_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m28_3, m28_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m28_4, m28_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m28_5, m28_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

B1-14

S961364851

study_id

29) How often was your child present while the adults were feeding the animals?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m29_1, m29_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m29_2, m29_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m29_3, m29_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m29_4, m29_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m29_5, m29_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

30) How often was your child present while the adults were littering or removing dung?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m30_1, m30_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m30_2, m30_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m30_3, m30_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m30_4, m30_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m30_5, m30_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

31) How often was your child present while the adults were performing cattle care?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m31_1, m31_1x - _1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/>				
m31_2, m31_2x - _2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/>				
m31_3, m31_3x - _3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m31_4, m31_4x - _4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m31_5, m31_5x - _5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

B1-15

S961364851

study_id

32) How often was your child in the cattle stable independently of the activity of the adults?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m32_1, m32_1x - _1xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/>				
m32_2, m32_2x - _2xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/>				
m32_3, m32_3x - _3xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/>				

33) Which characteristics best describe the cattle stable where your child spent the most time?
Multiple answers are possible.

	m33_1		m33_2	
	During the pregnancy or in the first year of life		In the last 12 months	
Stallion barn, cubicle house	<input type="checkbox"/>	m33_1_0x - _0xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_0x - _0xx
Deep pen (fully littered)	<input type="checkbox"/>	m33_1_1x - _1xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_1x - _1xx
Full automated loose housing	<input type="checkbox"/>	m33_1_2x - _2xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_2x - _2xx
Open form barn (ambient temperature)	<input type="checkbox"/>	m33_1_3x - _3xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_3x - _3xx
Closed barn with mechanical ventilation	<input type="checkbox"/>	m33_1_4x - _4xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_4x - _4xx
Closed barn with natural ventilation	<input type="checkbox"/>	m33_1_5x - _5xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_5x - _5xx
Don't know	<input type="checkbox"/>	m33_1_6x - _6xx	<input type="checkbox"/>	m33_2_6x - _6xx

1 yes; 0 none

1 yes; 0 none

	m33_3		m33_4	
	During the pregnancy or in the first year of life		In the last 12 months	
Milking robot	<input type="checkbox"/>	m33_3_0x - _0xx	<input type="checkbox"/>	m33_4_0x - _0xx
Milking stand	<input type="checkbox"/>	m33_3_1x - _1xx	<input type="checkbox"/>	m33_4_1x - _1xx
Milk machine	<input type="checkbox"/>	m33_3_2x - _2xx	<input type="checkbox"/>	m33_4_2x - _2xx
Hand milking	<input type="checkbox"/>	m33_3_3x - _3xx	<input type="checkbox"/>	m33_4_3x - _3xx
Don't know	<input type="checkbox"/>	m33_3_4x - _4xx	<input type="checkbox"/>	m33_4_4x - _4xx

1 yes; 0 none

1 yes; 0 none

B1-16

9961364891

study_id

m14 14) Did the itchy rash of your child ever affect at least one of the following body parts:
The elbow or hollow of the knee, the wrists or the ankles, the thighs, the face, the neck?

Yes No

1 0

CONTACT WITH A FARM

In the following section we would like to ask you questions about the farm environment. Please read through and answer this section of questions as best you can even if you don't live on a farm



For scientific reasons, it is very important to classify the questions in different age groups. Even if it can be difficult to remember older facts, we would like to ask you to fill in the boxes for each age section that best apply. The pregnancy questions concern what applied to the mother during the pregnancy with this child.

15) Did your child ever spend his/her holiday on a farm?
This question only concerns families with children who do not live on a farm.

	Often	Once	Never	
During pregnancy	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	m15_1, m15_1x
In the first year of life	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	m15_2, m15_2x
In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	m15_3, m15_3x
In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	m15_4, m15_4x
In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	m15_5, m15_5x

L B1-9 J

9961364891

study_id

m16 16) Did your child during the first year of life or the mother during the pregnancy spend time on a farm?

Yes No

1 0

→ If no, please continue with the question 17

If yes, how many animals were held on the farm during the period when your child spent the most time on the farm?
Multiple answers are possible

	None	1 - 10	11 - 50	More than 50
m16_1, m16_1x, m16_1xx Dairy cows, other cattle, calves	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m16_2, m16_2x, m16_2xx Pigs, piglets	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m16_3, m16_3x, m16_3xx Poultry, chickens	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m16_4, m16_4x, m16_4xx Sheep, lambs, goats, kids	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m16_5, m16_5x, m16_5xx Horses, ponies, foals	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

m17 17) Did your child spend time on a farm during the last 12 months?

Yes No

1 0

→ If no, please continue with the question 18

If yes, how many animals were held on the farm during the period when your child spent the most time on the farm?
Multiple answers are possible

	None	1 - 10	11 - 50	More than 50
m17_1, m17_1x, m17_1xx Dairy cows, other cattle, calves	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m17_2, m17_2x, m17_2xx Pigs, piglets	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m17_3, m17_3x, m17_3xx Poultry, chickens	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m17_4, m17_4x, m17_4xx Sheep, lambs, goats, kids	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
m17_5, m17_5x, m17_5xx Horses, ponies, foals	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

L B1-10 J

9961364891

study_id

18) Which of the following family members grew up on an operating farm?

	Yes	No
m18_1, m18_1x Mother	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m18_2, m18_2x Father	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m18_3, m18_3x Maternal Grandmother	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m18_4, m18_4x Maternal Grandfather	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m18_5, m18_5x Paternal Grandmother	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m18_6, m18_6x Paternal Grandfather	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

Contact to animals

The following questions concern the regular (meaning at least once a month over half a year) contact with animals. By contact we mean for example petting, brushing, snuggling, feeding by hand or similar contacts.
For scientific reasons, it is very important to classify the questions in different age groups. Even if it can be difficult to remember older facts, we would like to ask you to fill in the boxes for each age section that best apply.



m19 19) Did your child or the mother during the pregnancy with the child have regular (meaning at least once a month over half a year) contact to animals?
These questions concern cats, dogs and farm animals

Yes No

1 0

→ If no, please continue with the question 27

20) How often did your child have contact to cats or kittens?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m20_1, m20_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m20_2, m20_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m20_3, m20_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m20_4, m20_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m20_5, m20_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

L B1-11 J

9961364891

study_id

21) How often did your child have contact to dogs or puppies?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m21_1, m21_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m21_2, m21_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m21_3, m21_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m21_4, m21_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m21_5, m21_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

22) How often did your child have contact to dairy cows, calves or other cattle?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m22_1, m22_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m22_2, m22_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m22_3, m22_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m22_4, m22_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m22_5, m22_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

23) How often did your child have contact to pigs or piglets?

	About once a day		About once a week	About once a month	Never/ almost never
	More than 15 min.	Up to 15 min.			
m23_1, m23_1x-1xx During pregnancy	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m23_2, m23_2x-2xx In the first year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m23_3, m23_3x-3xx In the 2. and 3. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m23_4, m23_4x-4xx In the 4. and 5. year of life	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0
m23_5, m23_5x-5xx In the last 12 months	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0

L B1-12 J

9961364851

study_id

Dear parents,

Please complete the questionnaire as well and give it to your child to bring to school on the day of the blood sampling. Our study physician will collect the questionnaire there. The day of the blood sampling will be communicated to you in advance by our GABRIEL-Team.

A few comments on the answering of the questions:

The questions with "your child" refer to the child for which you are completing the questionnaire. If more than one of your children are participating in the study, please complete one questionnaire for each child.

Please use a dark ballpoint pen (no felt-tip pen) to complete the questionnaire:

Please correct the boxes with an eraser by filling them out completely:

Please fill in the numbers clearly in the intended boxes:

Please always read the introductory sentences before the questions. They contain important information that renders the answering of the questions easier for you.

For scientific reasons, it is important to classify the questions in different age groups. Even if it can be difficult to remember older facts, we would like to ask you to fill in the box for each age section that best applies.

Please don't get scared by the size of the questionnaire! It takes about 20 but maximal 45 minutes to complete it.

We are not interested in evaluating the children or their families! We therefore ask you to answer the questions honestly and as completely as possible.

Thank you very much for completing the questionnaire!

B1-5

9961364851

study_id

FIRST YEARS OF LIFE

m1 1) **How much did your child weigh at birth?**

Less than 2500g 1
2500g to 3999g 2
Over 4000g 3

m2 2) **Was your child breastfed?**

Yes No

m2_1 **If yes, how long was your child breastfed altogether?**
m2_1x 0 -> Not breastfed

Less than 6 months 1 1
6 – 12 months 2 2
Longer than one year 3 3

m2_2 **If yes, how long was your child breastfed without adding other nutrients (meaning without formula milk, baby-food, other nutriments or juices)?**
m2_2x 0 -> Immediate adding other nutriments

Less than two months 1 1
2 – 4 months 2 2
5 – 6 months 3 3
Longer than 6 months 4 4

3) **Did your child regularly attend facilities with children from other families until school enrolment (for example kindergarten, nursery, preschool, another caretaker)?**

Yes No
m3_1, m3_1x In the first year of life 1 0
m3_2, m3_2x In the 2. to 3. year of life 1 0
m3_3, m3_3x In the 4. to 5. year of life 1 0

B1-6

9961364851

study_id

HEALTH INFORMATION

m4 4) **Has your child at any time ever had wheezing or whistling noises in the chest?**

Yes No

m5 5) **Did your child have wheezing or whistling noises in the chest whilst breathing during the last 12 months?**

Yes No

m6 6) **How many episodes of wheezing or panting did your child have during the last 12 months?**

No episodes 0
1 – 3 episodes 1
4 – 12 episodes 2
More than 12 episodes 3

m7 7) **How often did your child have to be brought to the emergency department of a hospital because of these respiratory symptoms during the last 12 months?**

Never 0
Once 1
2 times 2
More than 2 times 3

m8 8) **How often did your child have to spend the night in inpatient treatment of a hospital due to these respiratory symptoms during the last 12 months?**

Never 0
Once 1
2 times 2
More than 2 times 3

B1-7

9961364851

study_id

m9 9) **Has your child used an asthma spray during the last 12 months?**

Yes No
1 0

m10 10) **How old was your child when the first symptoms of wheezing or whistling in the chest began?**

At the age of years

m10_1 If during the first year: At the age of months
m10_1x
m10_1xx -> months in years

m11 11) **In your opinion, what were the triggers of your child's breathing problems? Multiple answers are possible**

m11

Infection (e.g. common cold, flu)	<input type="checkbox"/> 1	m11_1x, m11_1xx
Exercise (e.g. jogging, playing)	<input type="checkbox"/> 2	m11_2x, m11_2xx
Cold air, mist	<input type="checkbox"/> 3	m11_3x, m11_3xx
Psychological stress	<input type="checkbox"/> 4	m11_4x, m11_4xx
Contact with animals	<input type="checkbox"/> 5	m11_5x, m11_5xx
Contact with flowers, grass, trees	<input type="checkbox"/> 6	m11_6x, m11_6xx
Swirling dust	<input type="checkbox"/> 7	m11_7x, m11_7xx
Inhaled strong smells or sprays	<input type="checkbox"/> 8	m11_8x, m11_8xx
Specific foods	<input type="checkbox"/> 9	m11_9x, m11_9xx
None of the above	<input type="checkbox"/> 10	m11_10x, m11_10xx

1=yes; 0=no

m12 12) **Did your child ever have an itchy rash that was stronger or weaker for at least 6 months?**

Yes No

m13 13) **Did the itchy rash of your child occur during the last 12 months?**

Yes No
1 0

B1-8

9961364851

study_id

EARLY CHILDHOOD AND FAMILY

The pregnancy questions concern the biological mother of the child.

m108 108) Did the mother take antibiotics during the pregnancy with this child?

Yes No
1 0

m109 109) Did the mother smoke during the pregnancy with this child?

Yes No
1 0

m110,m110x 110) How often did you boil or wash the pacifier of your child in the washing machine during the first year of life?

My child did not have a pacifier 4
Daily 3
Weekly 2
Monthly 1
Seldomly or never 0

111) Did your child ever have to be treated by a physician for intestinal worms?

m111_1 Yes No
1 0

m111_2 ,m111_2x If yes, how often:

More than 3 times 1
2 - 3 times 2
Once 3

9961364851

study_id

112) How many people (including children) live currently in your household?

m112_1 Children between 0-18 years

m112_2 Adults (18 years and older)

113) In what year was the mother of the child born?

m113 19

114) In what year was the father of the child born?

m114 19

m115 115) Who answered the questionnaire?

m115_1x Mother 1

m115_2x Father 2

m115_3x Mother and Father 3

m115_4x Other 4

1=yes 0=no

Thank you very much for your effort and support!

L

B1-45

J

L

B1-46

J

study_id

DUST QUESTIONNAIRE BARN

1) In which year was the barn:

built up: [][][][] modbs1_1

lastly renovated: [][][][] modbs1_2

2) What is in the barn?
Multiple answers are possible.

- Heating material or wood 0 modbs2_1x
 - Whole feeding grain 1 modbs2_2x
 - Gritted feeding grain 2 modbs2_3x
 - Whole grain corn 3 modbs2_4x
 - Gritted feeding corn 4 modbs2_5x
 - Hay 5 modbs2_6x
 - Straw 6 modbs2_7x
 - Other animal food 7 modbs2_8x
 - Don't know 8 modbs2_9x
- 1=Yes; 0=No

3) In case you answered hay: How often were there problems with mould growth in the hay storage?

- Every year 1 modbs3
- About every second year 2
- Rarely 3
- Never 4
- Don't know 5

C5-1

study_id

DUST QUESTIONNAIRE ANIMAL STABLE

1) What sort of cultivation is currently being practised predominantly?

- 1 Conventional
- 2 Bio
- 3 Demeter

2) In which stable does your child spend most of its time?

- Cattle stable 1
- Pig stable 2
- Poultry stable 3
- Sheep / Horse stable 4

CATTLE STABLE

3) In which year was the cattle stable

built up: [][][][] modcs2_1 lastly renovated: [][][][] modcs2_2

4) Which criteria describe the cattle stable the best?
Multiple answers are possible.

- | | | | |
|--|--|----------------|--|
| Construction and ventilation | modcs4_1 | Milking | modcs4_2 |
| Stanton barn, cubicle house | <input type="checkbox"/> 0 modcs4_1_1x | Milking robot | <input type="checkbox"/> 0 modcs4_2_1x |
| Deep pen (fully littered) | <input type="checkbox"/> 1 modcs4_1_2x | Milking stand | <input type="checkbox"/> 1 modcs4_2_2x |
| Full automated loose housing | <input type="checkbox"/> 2 modcs4_1_3x | Milk machine | <input type="checkbox"/> 2 modcs4_2_3x |
| Open form barn (ambient temperature) | <input type="checkbox"/> 3 modcs4_1_4x | Hand milking | <input type="checkbox"/> 3 modcs4_2_4x |
| Closed barn with mechanical ventilation | <input type="checkbox"/> 4 modcs4_1_5x | | 1=Yes; 0=No |
| Closed barn with natural ventilation (i. e. by opening windows and doors and / or by a eaves-ridge-ventilation-roof) | <input type="checkbox"/> 5 modcs4_1_6x | | 1=Yes; 0=No |

C5-2

study_id

5) Which sort of animal feed did you use for the cattle in the last 2 weeks?
Multiple answers are possible.

- Corn silage 0 modcs5_1x
 - Grass silage 1 modcs5_2x
 - Concentrated feed in pellet form 2 modcs5_3x
 - Concentrated feed in chipped form 3 modcs5_4x
 - Grain shred 4 modcs5_5x
 - Grain flour 5 modcs5_6x
 - Sugar beet in chipped form 6 modcs5_7x
 - Compressed hay 7 modcs5_8x
 - Loose hay 8 modcs5_9x
 - Fresh grass cut 9 modcs5_10x
- 1=Yes; 0=No

6) What sort of litter did you use in the cattle stable predominantly in the last 2 weeks?
Multiple answers are possible.

- Mixture of lime and sand 0 modcs6_1x
 - Saw dust 1 modcs6_2x
 - Straw 2 modcs6_3x
 - Triticale 3 modcs6_4x
 - Rubber mat 4 modcs6_5x
 - No litter 5 modcs6_6x
- 1=Yes; 0=No

7) How was the cattle stable lastly cleaned?

- Dry cleaning with broom 0 modcs7_1x
 - Dry cleaning with hoover 1 modcs7_2x
 - Wet cleaning (i. e. high-pressure cleaner) 2 modcs7_3x
 - Cleaning using chemicals 3 modcs7_4x
- 1=Yes; 0=No

8) Where there also other animals in the cattle stable?
Multiple answers are possible.

- Pigs, piglets 0 modcs8_1x
 - Sheep, lambs 1 modcs8_2x
 - Goats, goatlings 2 modcs8_3x
 - Poultry, chicks 3 modcs8_4x
 - Horses, foals 4 modcs8_5x
 - Dogs, puppies 5 modcs8_6x
 - Cats, kittens 6 modcs8_7x
 - No 7 modcs8_8x
- 1=Yes; 0=No

C5-3

study_id

PIG STABLE

9) In which year was the pig stable:

built up: [][][][] modcs9_1 lastly renovated: [][][][] modcs9_2

10) Which criteria describe the pig stable the best?
Multiple answers are possible.

- | | | | |
|-----------------------------|---|---|---|
| Construction | modcs10_1 | Ventilation | modcs10_2 |
| Stanton barn fully littered | <input type="checkbox"/> 0 modcs10_1_1x | Natural (i. e. by opening windows and doors and / or by a eaves-ridge-ventilation-roof) | <input type="checkbox"/> 0 modcs10_2_1x |
| Three size barn | <input type="checkbox"/> 1 modcs10_1_2x | | |
| Partly slatted floor | <input type="checkbox"/> 2 modcs10_1_3x | | |
| Slatted floor | <input type="checkbox"/> 3 modcs10_1_4x | | |
| Build openly | <input type="checkbox"/> 4 modcs10_1_5x | Mechanical | <input type="checkbox"/> 1 modcs10_2_2x |
| Build close | <input type="checkbox"/> 5 modcs10_1_6x | | 1=Yes; 0=No |
- 1=Yes; 0=No

11) Which sort of animal feed did you use for the pigs predominantly in the last 2 weeks?
Multiple answers are possible.

- Liquid feed 0 modcs11_1x
 - Humid feed, crumbly 1 modcs11_2x
 - Fodder in pellet form 2 modcs11_3x
 - Fodder in chipped form 3 modcs11_4x
 - Fodder in a floury form 4 modcs11_5x
 - Hay/flowers 5 modcs11_6x
 - Sugar beet in chipped form 6 modcs11_7x
 - Grain 7 modcs11_8x
 - Potatoes 8 modcs11_9x
- 1=Yes; 0=No

12) What sort of litter did you use in the pig stable predominantly in the last 2 weeks?
Multiple answers are possible.

- No litter 0 modcs12_0x
 - Straw 1 modcs12_1x
 - Other litter 2 modcs12_2x
- 1=Yes; 0=No

C5-4

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Phase IIIa - Annex C1 - EDC

1920244800

Documentation Sheet Electrostatic Dustfall Sampler

ID Barcode study_id

modse1 Spot of the sampling: Nursery (EDC 1) Stable (EDC 2) Barn (EDC 3)

Date and time of the opening and positioning of the sampler: modse2_1 / modse2_2 Time (24 hours)

Date and time of the closing of the sampler: modse3_1 / modse3_2 Time (24 hours)

Height where the sampler was positioned: modse4_1 m modse4_2 cm -> modse4e

Please indicate where windows, doors, furniture etc. are located and where exactly the sampler was/were positioned. In case the spot of the sampling is a stable or a barn please indicate, where doors, boxes, vivarium, storage of fodder, crutch, waste, bales of straw etc. are located.

Sketch of the room, where the sampler was positioned.

modse5
Positioning of the sampler: Lengthwise, long side parallel to the wall 1
Crosswise, short side parallel to the wall 2

modse6
Irregularities, for example cat sat on the sampler, sampler fell down, something fell on the sampler, etc. Yes 1
No 0

If yes, please describe: modse8

modse7
1
0

C1-1

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Phase IIIa - Annex C2 - EDC

1920244800

Documentation Sheet Electrostatic Dustfall Sampler

ID Barcode stsky_id

modse1 Spot of the sampling: Nursery (EDC 1) Stable (EDC 2) Barn (EDC 3)

Date and time of the opening and positioning of the sampler: modse2_1 / modse2_2 Time (24 hours)

Date and time of the closing of the sampler: modse3_1 / modse3_2 Time (24 hours)

Height where the sampler was positioned: modse4_1 m modse4_2 cm -> modse4e

Please indicate where windows, doors, furniture etc. are located and where exactly the sampler was/were positioned. In case the spot of the sampling is a stable or a barn please indicate, where doors, boxes, vivarium, storage of fodder, crutch, waste, bales of straw etc. are located.

Sketch of the room, where the sampler was positioned.

modse5
Positioning of the sampler: Lengthwise, long side parallel to the wall 1
Crosswise, short side parallel to the wall 2

modse6
Irregularities, for example cat sat on the sampler, sampler fell down, something fell on the sampler, etc. Yes 1
No 0

If yes, please describe: modse8

modse7
1
0

C2-1

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Phase IIIa - Annex C3 - EDC

1920244800

Documentation Sheet Electrostatic Dustfall Sampler

ID Barcode study_id

modse1 Spot of the sampling: Nursery (EDC 1) Stable (EDC 2) Barn (EDC 3)

Date and time of the opening and positioning of the sampler: modse2_1 / modse2_2 Time (24 hours)

Date and time of the closing of the sampler: modse3_1 / modse3_2 Time (24 hours)

Height where the sampler was positioned: modse4_1 m modse4_2 cm -> modse4e

Please indicate where windows, doors, furniture etc. are located and where exactly the sampler was/were positioned. In case the spot of the sampling is a stable or a barn please indicate, where doors, boxes, vivarium, storage of fodder, crutch, waste, bales of straw etc. are located.

Sketch of the room, where the sampler was positioned.

modse5
Positioning of the sampler: Lengthwise, long side parallel to the wall 1
Crosswise, short side parallel to the wall 2

modse6
Irregularities, for example cat sat on the sampler, sampler fell down, something fell on the sampler, etc. Yes 1
No 0

If yes, please describe: modse8

modse7
1
0

C3-1

GABRIEL Advanced Surveys | WP 4.1 | Annotated CRF | Phase IIIa - Annex C4 - Mattress dust

3751311775

Documentation Sheet "Dust Sample"

study_id
Number of the sample

Please fill in the following form!
In addition we would like to have additional information concerning the dust sample you have collected for us:

modin1
Date of collection of the dust sample: modin2_1 Day modin2_2 Month Year

modin3
How big is the mattress of your child?
Please measure by using attached measuring tapes.
modin3 Length X modin3_2 Width cm

modin3
How old is this mattress?
1 Less than 1 year
2 Between 1 and 5 years
3 Between 5 and 10 years
4 More than 10 years

modin4
Does the mattress have a special covering against acarans?
1 Yes 2 No

modin5
What sort of floor do your child have in their bedroom?
1 Carpet
2 Plain floor with carpet
3 Plain floor without carpet

modin6
When did you clean the child's bedroom with a vacuum cleaner for the last time?
modin6 Days ago

To be filled in by the study centre: modin7_1 modin7_2
Date and time of the handling: modin7_1 / modin7_2 Time

C4-1

ANNEXE 5 : Article “Assessment of dust Sampling Methods for the study of Cultivable Microorganism Exposure in Stable”

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Dec. 2009, p. 7617–7623
0099-2240/09/\$12.00 doi:10.1128/AEM.01414-09
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 75, No. 24

Assessment of Dust Sampling Methods for the Study of Cultivable-Microorganism Exposure in Stables[∇]

Anne-Cécile Normand,^{1*} Mallory Vacheyrou,¹ Bertrand Sudre,¹
Dick J. J. Heederik,² and Renaud Piarroux³

*Franche-Comté University, UMR-CNRS 6249 Chrono-Environnement, Mycology Department, Besançon,¹ and
Department of Parasitology and Mycology, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille,³ France, and
Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Environmental Epidemiology,
Utrecht University, Utrecht, The Netherlands²*

Received 17 June 2009/Accepted 5 October 2009

Studies have shown a link between living on a farm, exposure to microbial components (e.g., endotoxins or β -D-glucans), and a lower risk for allergic diseases and asthma. Due to the lack of validated sampling methods, studies of asthma and atopy have not relied on exposure assessment based on culture techniques. Our objective was therefore to compare several dust sampling methods for the detection of cultivable-microorganism exposure in stables. Sixteen French farms were sampled using four different methods: (i) active air sampling using a pump, (ii) passive dust sampling with a plastic box, (iii) dust sampling with an electrostatic dust fall collector (wipe), and (iv) dust sampling using a spatula to collect dust already settled on a windowsill. The results showed that collection of settled dust samples with either plastic boxes or wipes was reproducible (pairwise correlations, 0.72 and 0.73, respectively) and resulted in highly correlated results (pairwise correlation between the two methods, 0.82). We also found that settled dust samples collected with a plastic box correctly reflected the composition of the samples collected in the air of the stable when there was no farmer activity. A loss of microbial diversity was observed when dust was kept for 3 months at room temperature. We therefore conclude that measurement of viable microorganisms within a reasonable time frame gives an accurate representation of the microbial composition of stable air.

Several studies published in the early 2000s have shown that the risks of becoming atopic and presenting with symptoms of hay fever and asthma are lower for children who spend their early infancy on farms (2, 9, 13, 14, 26, 32). This protective effect was found to be associated with several factors, including contact with farm animals and high-level exposure to microbial components (including endotoxins, extracellular polysaccharides, and glucans) (33). The ALEX (ALlergy and EndotoXin) study showed that continual long-term exposure to stables until the age of 5 years was associated with the lowest frequencies of asthma, hay fever, and atopic sensitization (25). More recently, the PARSIFAL (Prevention of Allergy—Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic Lifestyle) study confirmed the inverse association between bacterial endotoxins from mattress dust and atopic wheeze. This association was no longer significant, however, after adjustment for exposure to fungal $\beta(1,3)$ -glucans and fungal extracellular polysaccharides (28). In a recent review, von Mutius suggested that mold or other microbial components might modulate immune responses and thereby protect against allergic diseases, as previously suggested for endotoxins (33). Indeed, a study by Sudre et al. showed that huge amounts of pollen, bacteria, and fungi are found in the air of cowsheds (31). Last, this brief overview highlights the facts that (i) only a few antigens and

microbial substances have been studied and identified in the cowshed environment so far and (ii) it is likely, given the immunological mechanisms, that other microbes or compounds may be involved in the protective “farming effect.”

However, assessment of aerial microbial diversity in a large sample of farms and stables is difficult to perform. Ideally, such assessment would require the measurement of the inhaled dose of fungal spores and bacteria over a substantial period of time for each individual included in a cohort. Because such an approach is not applicable to large cohorts, settled-dust sampling has been proposed in numerous studies as an unsophisticated and cost-effective way to assess long-term exposure to airborne components (10, 11, 15, 17, 29, 30, 34). However, settled-dust analysis is only a surrogate measure for airborne exposure, and distortions between settled-dust and airborne-dust microbial flora should be evaluated. We present here a study aiming to assess whether the microbial composition of dust collected in cowsheds is representative of airborne microbial flora. In this study, we assess the richness and diversity of bacteria and fungi from airborne and settled dust collected by several methods in the cowsheds of 16 French farms during the winter season.

MATERIALS AND METHODS

Study design. The study was performed from February 2006 to April 2007 on 16 French farms located in the Franche-Comté region, an area located in the East of France between 46°35'4" to 47°21'9"N and 5°29'55" to 6°45'4"E. The altitude of the farms ranged from 200 m to 880 m. Ten of these farms corresponded to children who were previously included in the PASTURE study (35). Nine stables were freestall stables, and the other seven were stanchion stables. In the freestall stables, the cows were free to move until milking time; then they entered the milking room one after another. In the stanchion stables, cattle were

* Corresponding author. Mailing address: Université de Franche-Comté, UMR-CNRS 6249 Chrono-Environnement, UFR-SMP, Département de Mycologie, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France. Phone: 33 363-08-22-74. Fax: 33 363-08-22-32. E-mail: acecilenor@hotmail.com.

[∇] Published ahead of print on 9 October 2009.

hobbled, cows were tied up all the time in the cowshed, and the farmer moved between them for milking.

Sample description and sampling. In each stable, one air sample was collected before the feeding session was started (before work), and the other was collected 20 min after the feeding session (after work). Collection of airborne dust was based on active impaction of air particles (with a 3-liter/min flow) using a cassette (diameter, 37 mm; Sensidyne, Clearwater, FL) containing a Teflon filter (pore diameter, 0.45 μ m; Millipore Sensidyne, Clearwater, FL) during a 20-min pumping session using a Gil-Air 3 pump (Sensidyne, Clearwater, FL). The device was fixed on a tripod at a fixed height of 75 cm and was located at a central place in the cowshed. The filters were rinsed with 10 ml of 0.1% Tween 80-sterile water (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and were shaken for 10 min in a stomacher (AES Laboratoire, Combourg, France) with a delay of less than 3 h after field work.

In addition, two settled-dust samples were collected using a spatula on either a windowsill or the metallic stanchion bars where the cows were hampered. In order to limit contamination by soil, samples were collected from supports located higher than 1.50 m and were put in a sterile plastic box.

Two other settled-dust samples were collected using plastic boxes (24 cm long, 18.6 cm wide, and 5.5 cm high; Mobil Plastic, France). An aluminum grid with a ca. 8-mm link was placed on top of the box to prevent large amalgams from settling inside. These boxes were left for 1 month in the cattle shed, out of reach of the cows. One set of dust samples (one spatula sample and one box sample) was analyzed on the day of sampling, and the other set was kept at room temperature for 3 months before being analyzed. Dust was transferred to a sterile plastic 40-ml tube by cleaning the box with a clean, thin brush under a hood. A total of 0.3 g of the dust (box-settled or spatula dust) was weighed and washed with 20 ml of Tween 80 at 0.1%. The mixture was thoroughly vortexed for 1 min. The solution obtained was used for culture and cold storage. This washing solution was used at different dilutions depending on the culture medium.

Culturing. A total of 250 μ l of the washing solution for the Teflon filter and 100 μ l of diluted dust were spread on petri dishes containing four different media: (i) dichloran-glycerol (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) with 0.5% chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 30°C for mesophilic mold isolation, (ii) 3% malt agar (AES, Bruz, France) with 10% salt and 0.5% chloramphenicol for osmophilic fungal species, (iii) Difco actinomycete isolation agar (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) at 30°C for mesophilic actinomycetes, and (iv) R8 medium prepared according to the method of Ammer and colleagues at 52°C for the detection of thermophilic actinomycetes (1). After 7 days of incubation, colonies of molds and actinomycetes were identified using macroscopic and microscopic criteria. Another 250 μ l of washing solution and 100 μ l of diluted dust were cultured on Mueller-Hinton (MH) agar (Becton Dickinson). Bacterial colonies were counted after a 48-h incubation and were reisolated by subculturing on MH agar according to the colony morphology and the Gram staining result.

DNA extraction and PCR amplification. Bacterial DNA was further extracted as described by Drancourt et al. (6), and 100 μ l of the supernatant was collected. rD1 and rD1 were used as primers for 16S rRNA gene PCR (36). DNA was amplified with 0.5 μ M primers rD1 and rD1, 200 μ M deoxynucleoside triphosphates, 1 mM MgCl₂, 1 \times REDTaq buffer, 0.04 U of REDTaq, and 1 μ l of the DNA sample. The reaction mixture was subjected to the PCR program as reported by Paster et al. (21). The amplification products of each reaction were analyzed by electrophoresis for 60 min at 80 V in agarose (1.5%) gels. DNA bands were visualized by UV transillumination. For sequencing, the mixture contained DNA polymerase, pyrophosphatase, buffer, deoxynucleoside triphosphates, dye terminators, DNA templates, water, and the internal reverse primer P-519 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3') to sequence the 497-bp fragment. The sequencing mixture was subjected to 35 cycles consisting of 20 s of denaturation at 96°C, 20 s of primer annealing at 50°C, and 2 min of primer extension at 60°C. The reading was performed with a Ceq 8000 genetic analysis system (Beckman Coulter), and results were compared to the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Molecular identification at the genus level was defined by a sequence similarity higher than 97% (12, 22). Results are expressed in CFU per cubic meter or per gram of dust, depending on the sample analyzed.

Second winter sampling. Four additional settled-dust samples were collected on 13 of the farms during a second winter using plastic boxes (two repeated samples: W₂Box₁ and W₂Box₂) and wipes (two repeated samples: W₂Wipe₁ and W₂Wipe₂) in order to assess the reproducibility of the results. Box-settled dust from the second winter was handled the same way as dust from the first winter. Sterile wipes (10 by 12 cm) were placed down flat in a plastic lab tip box and were left for 15 days in the cowshed next to the box-settled dust collector. The wipes were then put in a sterile bag with 20 ml of Tween 80 at 0.1% and were shaken

for 10 min in a stomacher. A total of 100 μ l of the washing solution was added to petri dishes with different dilutions spanning the ranges of microorganisms (from pure washing solution to the solution diluted 10³-fold), and the microorganisms were treated as described above. The sampling strategy is depicted in Fig. 1.

A total of 92 samples were analyzed for the first winter, and 52 samples were analyzed for the second winter.

Statistical analyses. Comparisons of air measurements before and after the feeding session and between storage periods (no storage versus 3 months of storage) were conducted using the Wilcoxon matched-pair signed-rank test for each species or genus. The pairwise correlation coefficients between sampling techniques were computed. To account for multiple testing, *P* values were adjusted by the Bonferroni procedure. Statistical analyses were performed using STATA software (version 8.2; StataCorp LP, College Station, TX).

Species accumulation curves were constructed using EstimateS software (version 8.0; R. K. Colwell) to estimate the diversity of the samples. Mao Tau indices obtained with this software were then plotted.

RESULTS

Genus and species identification. Twenty fungal taxa were identified in the different samples via the culture methods. The most frequent fungal genera identified in the dusts were *Eurotium* (mainly *Eurotium amstelodami* and *Eurotium unbramosum* [46.6% of the total amount of fungi in the air and 34.8% of the total in the dust]), *Wallemia* (25.1% and 19.8%), *Aspergillus* (10.5% and 10.4%), and *Penicillium* (7.0% and 10.4%). The other fungi identified belonged to the genera *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Humicola*, and *Trichosporon*. Some fungi could not be identified at the genus level. They were classified as unidentified moniliaceae, unidentified dematiaceae, red yeasts (mainly *Rhodotorula*), and white yeasts (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Debaryomyces* spp.). Bacterial colonies collected from MH medium were classified according to Gram staining, which allowed us to identify 57.4% of gram-positive cocci in the air and 68.2% in the dust, 32.2% of gram-positive bacilli in the air and 31.6% in the dust, and 10.3% of gram-negative bacilli in the air and 29.4% in the dust. No gram-negative cocci were identified. Three species of actinobacteria cultured on Difco actinomycete isolation agar and R8 medium were identified at the species level (*Saccharomonospora viridis*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, and *Thermoactinomyces vulgaris*), whereas the other actinobacteria were grouped depending on their growth temperatures (mesophilic *Actinomycetales* and thermophilic *Actinomycetales*). Overall, partial 16S rRNA gene sequencing of bacterial colonies collected from MH medium led to the identification of 93 bacterial taxa corresponding to 41 bacterial genera. The main bacterial genera identified by biomolecular methods were *Staphylococcus* (mainly *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus xylosum* [24.2% of the total amount of culturable bacteria in the air and 39.2% of that in the dust]), *Curtobacterium* (2.3% and 3.8%), *Bacillus* (3.4% and 2.9%), and *Brachybacterium* (0.5% and 11.4%). The detailed results of this identification will be reported in a further paper concerning an inventory of the microbial farming environment. To simplify the presentation of results, we merged the microorganisms into the following 12 main groups: (i) fungi belonging to the order *Mucorales* (total *Mucorales*), (ii) *Cladosporium* species, (iii) *Wallemia sebi*, (iv) fungi from the *Eurotium* and *Aspergillus* genera, (v) other fungal species, (vi) yeasts (white and red), (vii) gram-negative bacilli, (viii) gram-positive bacilli,

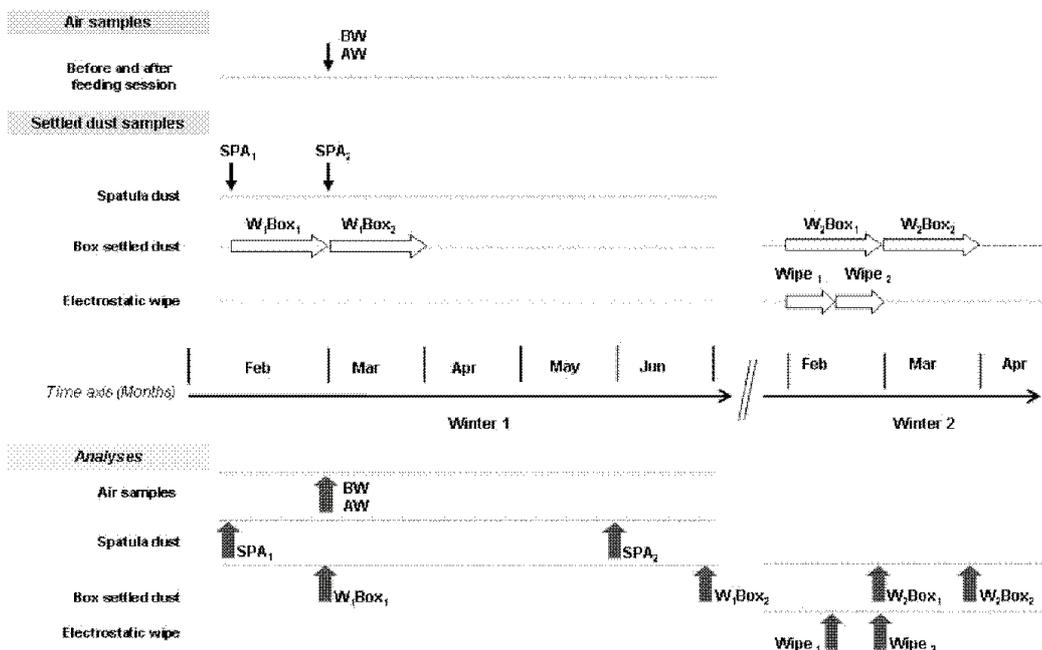


FIG. 1. Study design. Horizontal sampling arrows represent sampling over a long period (here, 15 days or 1 month). Vertical sampling arrows correspond to a short sampling time (20 min of air sampling or spatula dust sampling). The time axis is graduated into months for the first (2006) and second (2007) winters. W₁Box₁ and W₁Box₂, box-settled dust samples 1 and 2 from the first winter; W₁SPA₁ and W₁SPA₂, spatula-settled dust samples 1 and 2 from the first winter; BW, air before cattle feeding; AW, air after cattle feeding; W₂Box₁ and W₂Box₂, box-settled dust samples 1 and 2 from the second winter; W₂Wipe₁ and W₂Wipe₂, wipe-settled dust samples 1 and 2 from the second winter.

(ix) gram-negative cocci, (x) gram-positive cocci, (xi) mesophilic actinobacteria, and (xii) thermophilic actinobacteria.

Airborne and settled-dust microflora. The microbiological compositions of the airborne flora (before and after cattle feeding) and of the settled dust collected during the first winter are shown in Fig. 2. Before feeding, the airborne microflora of the stables was dominated by *Aspergillus/Eurotium* fungi and gram-positive cocci; these two groups were surpassed by a significant amount of mesophilic actinomycetes after handling of the hay. The total number of bacteria and fungi after the feeding session was higher than that before the feeding session. This increase was significant for *Eurotium* spp. ($P = 0.004$) and *Cladosporium* spp. ($P = 0.004$) (Wilcoxon matched-pair signed-rank test). Figure 2 shows that the settled dust collected in plastic boxes indicated a similar microbial composition of air before the feeding of the cattle, with a predominance of *Aspergillus/Eurotium* and gram-positive bacteria. Settled dust collected using a spatula seemed less representative of the airborne microflora, due to the relative overrepresentation of the gram-positive cocci. Pairwise correlation tests with regard to the counting of the 12 main groups showed only a weak relationship between the airborne and settled-dust samples (Table 1). However, the correlation between the airborne and settled-dust microfloras was much better, especially when the mean values for the 16 farms rather than the individual values

for each farm were considered (Table 1). The best results were obtained for comparisons of the air before the feeding session and settled dust collected in a plastic box (correlation coefficient, 0.82).

The fungal species accumulation curves performed from the two air samples and the two settled-dust samples showed that 16 farms were sufficient for correct assessment of the fungal diversity within farms (Fig. 3). These data also showed that a plateau was reached more rapidly when settled dust (collected with a plastic box or a spatula) was analyzed than when airborne dust was analyzed. In contrast, the slope of the curve did not reach any plateau for bacterial results. Regardless of the type of samples (airborne or settled dust) analyzed, therefore, these results show that a set of 16 samples is not sufficient to assess the bacterial diversity in these stables (Fig. 3).

Overall, a 3-month storage period at room temperature lowered microbial diversity in the dust samples significantly, as shown for the plastic boxes (Fig. 4) (Wilcoxon tests). In particular, we noted decreases in the levels of gram-positive cocci ($P = 0.005$), *Cladosporium cladosporioides* ($P = 0.009$), and white yeast groups ($P = 0.04$) and relative increases in those of *Aspergillus versicolor* ($P = 0.004$), mesophilic *Actinomycetes* ($P = 0.02$), *Absidia cylindrospora* (0.03), and *Scopulariopsis brevicaulis* ($P = 0.04$). The same comparison was performed for spatula-settled dust. This comparison

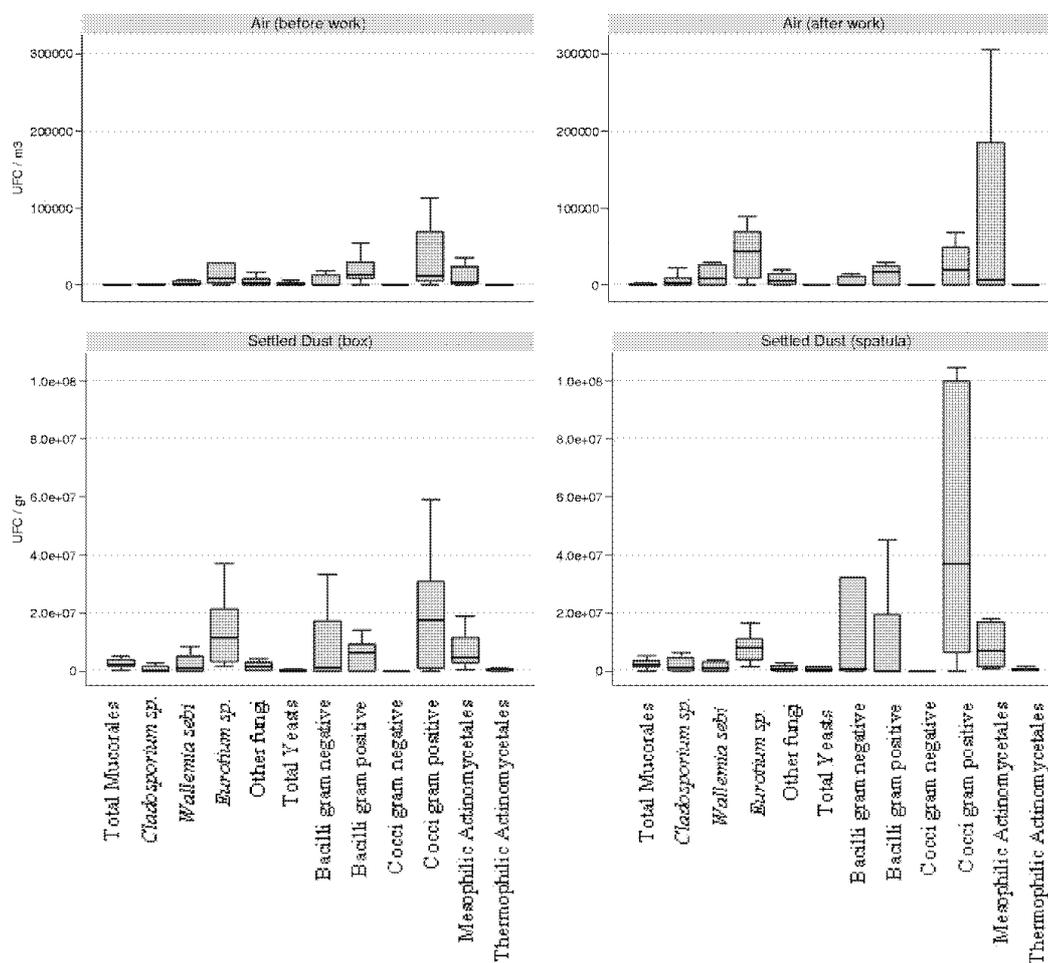


FIG. 2. Box plot profiles of the four sampling types for the first winter: air before and after work (cattle feeding), dust that had settled on a plastic box over 1 month, and dust that had settled on a dry surface and was harvested with a spatula. The bar in the middle of each box represents the median, and the lower and upper hinges represent the 25th and 75th percentiles, respectively. The whiskers correspond to the adjacent values of the lower and upper hinges. For the graphical representation, outside values were not plotted in order to produce an easily readable presentation of the data.

showed decreases in the levels of *Cladosporium cladosporioides* ($P = 0.005$), white yeasts ($P = 0.009$), red yeasts ($P = 0.01$), gram-negative bacilli ($P = 0.02$), *Eurotium* spp. ($P = 0.04$), and thermophilic *Actinomycetes* ($P = 0.04$) and an increase in the level of *Scopulariopsis brevicaulis* ($P = 0.04$).

Reproducibility of microbial recovery. The pairwise correlation test performed with the dust samples collected on 13 farms during the second winter showed that both the plastic box and wipe sampling methods exhibited good reproducibility (Table 2). This test also revealed a strong correlation between the results obtained with the plastic boxes and the wipes (Table 2).

In particular, the results corresponding to the two wipes left for two consecutive periods of 15 days were strongly correlated with those of the plastic box left for 1 month during exactly the same period. Indeed, a pairwise correlation of 0.82 means that these two types of samples shared 67% of their variability.

DISCUSSION

The composition of airborne or settled dust is complex and is known to be subject to daily and seasonal changes (20). Some studies highlight the relationships between exposure to

TABLE 1. Pairwise correlation coefficients for the different types of samples from the first winter

Sample type	Correlation coefficients (ind, mean) between samples ^a			
	Air		Dust	
	Before work	After work	W ₁ Box ₁	W ₁ Spa ₁
Air				
Before work	1			
After work	0.33** ^b , 0.76*	1		
Dust				
W ₁ Box ₁	0.09** ^b , 0.82*	0.16** ^b , 0.35*	1	
W ₁ Spa ₁	0.18** ^b , 0.69*	0.18** ^b , 0.47*	0.03** ^b , .59*	1

^a Correlation coefficients between air and dust samples for the first winter were calculated according to two methods. In the first method, each individual value for every microbial taxon was taken into account (ind) (**, $P < 0.01$). In the second method, the mean value for every microbial taxon within the 16 farms was calculated (mean) (*, $P < 0.05$).

microbial components (e.g., endotoxins, ergosterols, or β -D-glucans) and several health outcomes, including a lower risk for atopy and asthma among children raised on farms (3, 5, 7). However, it is not clear whether these molecules are responsible for the protective effect of farm environments against asthma and atopy. Therefore, there is a need to better investigate microbial biodiversity in farm environments and, in particular, to identify sampling methods that may help to assess the microbial composition of airborne dust. To the best of our knowledge, this study is the first aiming to assess the sampling methods with regard to microbial diversity in cowsheds. Even though other methods to identify microorganisms in the environment without culture steps (such as cloning [19] or denaturing gradient gel electrophoresis [16]) have already been reported, we chose not to use them, because they are time-

consuming, they are expensive given the number of samples, and they show only part of the microbial picture. Denaturing gradient gel electrophoresis or similar methods might eventually be more powerful analytically, but they have the disadvantage that they do not assess viability. In addition, our main objective was to assess whether the microbial composition of dust collected in cowsheds was representative of airborne microbial flora, not to provide an exhaustive overview of the microbial diversity in the air and settled dust.

Overall, the study showed that settled-dust sample collection with either plastic boxes or wipes was reproducible and resulted in highly correlated results (pairwise correlation, 0.82). The results also showed that settled-dust samples collected with a plastic box correctly reflected the composition of the air samples harvested in the stable before cattle feeding (pairwise correlation, 0.82 for the mean values obtained from the 16 farms). This complements the previous work of Noss et al., who showed that the use of electrostatic wipes was a valid method for measuring the average airborne endotoxin exposure in indoor environments (18). For this exposure assessment, we focused on culturable bacteria and fungi that were easily obtainable using standard culture media. We acknowledge, however, that these microorganisms represent only a subfraction of the microorganisms in the air of the cowsheds (8), because numerous bacteria and fungi are known to be unculturable or to require various specific conditions for culture. We also decided to focus on the winter, because during this season the numbers of microorganisms are high in stables due to the continuous presence of the cattle and to feeding in an enclosed environment (23, 27). Despite these limitations, our results highlight key points that need to be taken into account in order to ensure better reliability of settled-dust sampling. First, the choice of an appropriate sampling device is impor-

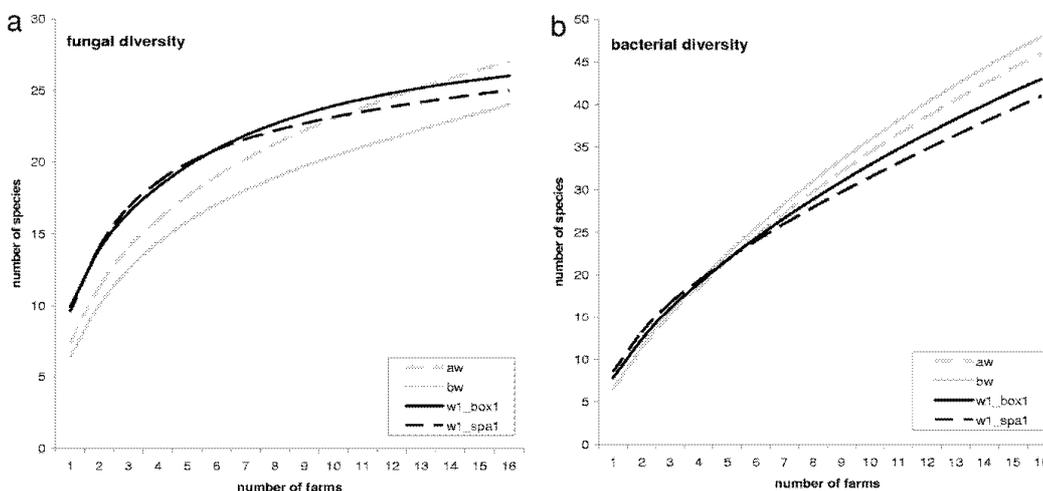


FIG. 3. Species accumulation curves for airborne dust and settled dust samples during the first winter. (a) Fungal species accumulation curves; (b) bacterial species accumulation curves. Gray lines represent the air (bw, before cattle feeding [solid line]; aw, after cattle feeding [dashed line]). Black lines represent the settled dust analyzed on the day of the sampling (w₁_box₁, box-settled dust [solid line]; w₁_spa₁, spatula-settled dust [dashed line]).

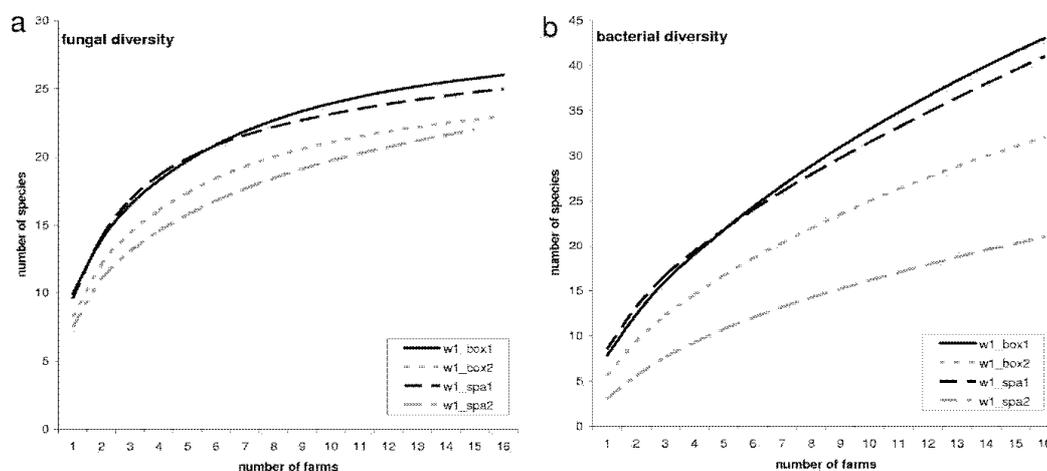


FIG. 4. Species accumulation curves for settled dust samples during the first winter. The effect of 3 months of storage at room temperature on microbial diversity are shown. (a) Fungal species accumulation curves; (b) bacterial species accumulation curves. Black lines represent the dust samples (w1_box1, box-settled dust sample 1; w1_spa1, spatula-settled dust sample 1) analyzed on the day of the sampling. Gray lines represent the samples analyzed after 3 months at room temperature (w1_box2, box-settled dust sample 2; w1_spa2, spatula-settled dust sample 2).

tant, as shown by the differences observed between the results obtained with a plastic box versus a spatula. Second, microbial analysis can be postponed to a limited extent in large studies for logistical reasons. If these two points are not considered, the evolution of the microflora in the dust results in the disappearance of some species (with a loss of diversity after a 3-month storage period) and the predominance of other species (such as gram-positive bacteria in settled dust collected with spatulas). The evolution of the microflora in settled dust with the passage of time may partially explain the poor relationships between the air and settled-dust results observed in previous studies. Chew et al. studied the results of fungal cultures derived from floor dust and indoor air samples in 397 American homes (4), demonstrating that the discrepancy between settled-dust and airborne-dust analyses may also reflect

the poor representativeness of air samples collected during a unique and short period. Our results also corroborated this conclusion, since we reported a lower correlation between settled dust and individual air sampling results than the correlation obtained when mean values were considered. This poor correlation between air sampling and settled-dust methods obtained when each farm was considered separately may therefore be indicative of the high variability of the microbial composition of airborne samples over time, even during the same day (20, 31). For instance, hay distribution resulted in increases in the levels of *Eurotium* and *Cladosporium*, molds known to use hay as a substrate for growth. Similarly, we found that mesophilic actinomycetes, which are bacteria usually found in the hay, were dominant in the airborne dust after hay handling but not before. These variations in the airborne composition of the air within stables, in relation to the substrates distributed, have been observed by several authors (24, 27). To improve the correlation between air and dust methods, a longer air sampling period in the stable may be considered, but active sampling would induce a loss in the microbial diversity by saturating the filter and desiccating the microorganisms. In contrast to air sampling, the settled-dust collection methods allow cumulative sampling over several weeks; this prolonged period might be an advantage for exposure assessment. It is noteworthy that microbial diversity was greater in the settled-dust samples than in the airborne dust, even for samples collected just after handling of the hay. It is likely that some of the microorganisms found in the settled dust might arise from previous manipulation of substrates containing species that were not present in the substrates manipulated on the day of the air sampling.

In conclusion, because of their standardization and reproducibility, settled-dust sampling methods performed using a box or an electrostatic wipe appear to be reliable ways of

TABLE 2. Pairwise correlation coefficients for the samples from the second winter

Dust collection method	Correlation coefficient ^a				
	Wipe			Box	
	W ₂ Wipe ₁	W ₂ Wipe ₂	W ₂ Wipe	W ₂ Box ₁	W ₂ Box ₂
Wipes					
W ₂ Wipe ₁	1				
W ₂ Wipe ₂	0.73*	1			
Boxes					
W ₂ Box ₁	0.78*	0.77*	0.82*	1	
W ₂ Box ₂	0.63*	0.57*	0.64*	0.72*	1

^a Every individual value for every microbial taxon was taken into account in the calculation of the correlation coefficients between the dust collection methods of the second winter season. W₂Wipe₁ and W₂Wipe₂ were placed successively in the same spot of the barn, as were W₂Box₁ and W₂Box₂. The W₂Wipe column corresponds to the compilation of W₂Wipe₁ and W₂Wipe₂ results, and it also corresponds to the same time period as W₂Box₁. *, $P < 0.01$.

assessing the composition of the airborne dust in cowsheds and to be applicable in large field studies of health effects. Because these samples can also be deployed in large-scale population studies, this work opens the field for studies investigating the relationships between airborne-microorganism diversity in a stable and protection against allergy and asthma in this specific environment.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was financially supported by the Chambre Régionale d'Agriculture de Franche-Comté and by the Conseil Régional de Franche-Comté. This work was also partly supported by the European Union through the GABRIEL project for testing of the wipe method on cultivable microorganisms.

We thank Thierry Dubief and Michel Billot for technical assistance and the French farmers who participated in the project.

REFERENCES

- Amner, W., C. Edwards, and A. J. McCarthy. 1989. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora vitidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2669–2674.
- Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, L. Grize, U. Neu, F. H. Sennhauser, H. S. Yarosh, J. C. Vuille, B. Wuthrich, et al. 1999. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin. Exp. Allergy* 29:28–34.
- Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, and E. von Mutius. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347:869–877.
- Chew, G. L., C. Rogers, H. A. Burge, M. L. Mullenberg, and D. R. Gold. 2003. Dustborne and airborne fungal propagules represent a different spectrum of fungi with differing relations to home characteristics. *Allergy* 58:13–20.
- Donwes, J., G. Le Gros, P. Gibson, and N. Pearce. 2004. Can bacterial endotoxin exposure reverse atopy and atopic disease? *J. Allergy Clin. Immunol.* 114:1051–1054.
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J. P. Gayral, and D. Rnouch. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38:3623–3630.
- Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, D. Nowak, and F. D. Martinez. 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:482–488.
- Eduard, W., and D. Heederik. 1998. Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfective microorganisms in highly contaminated work environments. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59:113–127.
- Ernst, P., and Y. Cormier. 2000. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:1563–1566.
- Halstensen, A. S., K. C. Norrby, O. Elen, and W. Eduard. 2004. Ochratoxin A in grain dust—estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11:245–254.
- Heederik, D., P. S. Thorne, and G. Doekes. 2002. Health-based occupational exposure limits for high molecular weight sensitizers: how long is the road we must travel? *Ann. Occup. Hyg.* 46:439–446.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45:2761–2764.
- Kilpeläinen, M., E. O. Terho, H. Helenius, and M. Koskenvuo. 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin. Exp. Allergy* 30:201–208.
- Klinberg, B., N. Berglund, G. Lilja, M. Wickman, and M. van Hage-Hamsten. 2001. Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a closed birth cohort from Sweden. *Eur. Respir. J.* 17:1151–1157.
- Krysińska-Traczyk, E., J. Perkowski, and J. Dutkiewicz. 2007. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14:159–167.
- Liu, X. C., Y. Zhang, M. Yang, Z. Y. Wang, and W. Z. Lv. 2007. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *J. Environ. Sci. (China)* 19:60–66.
- Moloczniak, A. 2002. Qualitative and quantitative analysis of agricultural dust in working environment. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9:71–78.
- Noss, L., I. M. Wouters, M. Visser, B. J. Heederik, P. S. Thorne, B. Brunekreef, and G. Doekes. 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5621–5627.
- Pakarinen, J., A. Hyvarinen, M. Salkinjo-Salonen, S. Laitinen, A. Nevalainen, M. J. Makela, T. Haahela, and L. von Hertzen. 2008. Predominance of Gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia. *Environ. Microbiol.* 10:3317–3325.
- Pangloli, P., Y. Dje, O. Ahmed, C. A. Donne, S. P. Oliver, and F. A. Drangholi. 2008. Seasonal incidence and molecular characterization of *Salmonella* from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:87–96.
- Paster, B. J., M. K. Russell, T. Alpagot, A. M. Lee, S. K. Boches, J. L. Galvin, and F. E. Dewhirst. 2002. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. *Ann. Periodontol.* 7:8–16.
- Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6:315–321.
- Reboux, G., R. Piarroux, F. Mauny, A. Madroszyk, L. Millon, K. Bardonnat, and J. C. Dalphin. 2001. Role of molds in farmer's lung disease in eastern France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:1534–1539.
- Reboux, G., M. Reiman, S. Roussel, K. Laattola, L. Millon, J. C. Dalphin, and R. Piarroux. 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13:267–273.
- Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358:1129–1133.
- Riedler, J., W. Eder, G. Oberfeld, and M. Schreuer. 2000. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 30:194–200.
- Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, K. Bardonnat, L. Millon, and R. Piarroux. 2004. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup. Environ. Med.* 61:e3.
- Schran-Bijkerk, D., G. Doekes, J. Donwes, M. Boeve, J. Riedler, E. Uhlager, E. von Mutius, M. R. Benz, G. Pershagen, M. van Hage, A. Scheynius, C. Braun-Fahrlander, M. Waser, and B. Brunekreef. 2005. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSITAL study. *Clin. Exp. Allergy* 35:1272–1278.
- Selim, M. I., A. M. Juchems, and W. Popendorf. 1998. Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59:252–256.
- Skaug, M. A., W. Eduard, and F. C. Stormer. 2001. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia* 151:95–98.
- Sudre, B., M. Vacheyron, C. Braun-Fahrlander, A. C. Normand, M. Waser, G. Reboux, P. Ruffaldi, E. von Mutius, and R. Piarroux. 2009. High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy* 64:1068–1073.
- Von Ehrenstein, O. S., E. Von Mutius, S. Ill, J. Baumann, O. Bohm, and R. von Kries. 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin. Exp. Allergy* 30:187–193.
- von Mutius, E. 2007. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4:212–216.
- von Mutius, E., C. Braun-Fahrlander, R. Schierl, J. Riedler, S. Ehlermann, S. Maisch, M. Waser, and D. Nowak. 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* 30:1230–1234.
- von Mutius, E., and S. Schmid. 2005. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 61:407–413.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.

ANNEXE 6 : Article “Airborne cultivable microflora and microbial transfers in farm buildings and rural dwellings.”

- soumis -

- 1 Airborne cultivable microflora and microbial transfers in farm buildings and rural dwellings.
- 2
- 3 Anne-Cécile Normand ^{1*}, Bertrand Sudre ¹, Mallory Vachevrou ¹, Martin Depner ³, Inge M.
- 4 Wouters ⁴, Ilka Noss ⁴, Dick Heederik ⁴, Anne Hyvärinen ⁵, Jon Genuneit ⁶, Charlotte Braun-
- 5 Fabrländer ⁷, Erika von Mutius ⁷, Renaud Piarroux ² and the GABRIELA Study Group.
- 6
- 7 Franche-Comté University, UMR-CNRS 6249 Chrono-environnement, Mycology
- 8 department, Besançon, France;
- 9 ²Department of parasitology and mycology, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille,
- 10 France;
- 11 ³Children's Hospital of the University of Munich, Lindwurmsstrasse 4, D-80337 Muenchen,
- 12 Germany;
- 13 ⁴Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Environmental Epidemiology, Utrecht
- 14 University, PO Box 80178, 3508 TD Utrecht, The Netherlands;
- 15 ⁵National Institute for Health and Welfare, Department of Environmental Health, PO Box 95,
- 16 70701 Kuopio, Finland;
- 17 ⁶Institute of Epidemiology, University of Ulm, Germany
- 18 ⁷Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland.
- 19
- 20 **Address correspondence to :** Normand Anne-Cécile
- 21 Université de Franche-Comté,
- 22 UMR-CNRS 6249 Chrono-Environnement,
- 23 UFR-SMP, Département de Mycologie,
- 24 19 rue Ambroise Paré,
- 25 25000 BESANCON, France.
- 26 Telephone: +33 363-08-22-74.
- 27 Fax: +33 363-08-22-32.
- 28 Email : acecilenor@hopmail.com.
- 29
- 30 **Running title:** Microbial flora in rural environments.
- 1 **Abstract**
- 2 Exposure to various microorganisms has been suggested as a major factor which protects
- 3 against development of asthma and allergies. Some studies performed in farm environments
- 4 have suggested that microbial components are being transported from the farm to the farmer's
- 5 home. The objective of this paper was to characterize the viable airborne microbial exposure
- 6 in farm and rural dwellings and to quantify the microbial contamination of farm dwellings by
- 7 the microflora of stables and barns. Airborne dust samples were collected using passive
- 8 samplers in the bedroom of three groups of children living in rural south Germany: i) living
- 9 on farms (n=144), ii) regularly exposed to farm environments but not living on farms (n=149),
- 10 and iii) never attending farms (n=150). For farmers' children, additional samples were
- 11 collected in stables and barns. All samples were subjected to fungal and bacterial culturing
- 12 methods. Samples showed more often detectable levels of microorganisms when taken from
- 13 farm dwellings than from non-exposed and exposed dwellings. Farm dwelling samples also
- 14 showed higher levels of contamination and an altered microbial profile. Moreover, microbial
- 15 counts of farm dwelling samples were significantly and positively correlated with the
- 16 corresponding counts in stables and barns. Overall, our work strongly suggests that
- 17 microorganisms are being transported from farms to farmers' dwellings. This transport clearly
- 18 modifies the composition of airborne microflora in the dwellings, especially in the child's
- 19 bedrooms and should be taken into account in exposure assessment studies.
- 20
- 21 **Key Words:** Asthma, allergy, farming environment, fungi, bacteria, protection, airborne dust.

1 Introduction

2 A number of studies have shown that the risk of becoming atopic and presenting with
3 symptoms of hay fever and asthma is lower in children raised on farms (4, 6, 11, 12, 18, 31,
4 39), particularly for those being exposed to cowsheds for even a short period every day (20
5 min) and those with frequent contacts with farm animals during early childhood (37, 40).
6 Otherwise, exposure to microorganisms has been proposed as a major factor conferring
7 protection from asthma and allergies (1, 4, 17, 30, 39). Because, environmental studies have
8 shown increased levels of microbial components such as endotoxin, beta(1-3)-glucans,
9 muramic acid and extracellular polysaccharide in farm dwellings as compared to rural non
10 farm dwellings (36, 38), we hypothesized that the children's exposure to certain fungi and
11 bacteria of the farms could be a protective factor for childhood asthma or for atopy. Indeed,
12 air in stables is known to be highly contaminated by numerous species of moulds and
13 bacteria, including high levels of actinomycetes (2, 9, 16, 27) and individuals working on a
14 farm may serve as a mode of transport for microorganisms from the stable to the dwelling
15 (19, 24).
16 The objectives of the present study were therefore to address the question whether
17 indoor microbial exposures in farm environments originate from stables and barns, and to
18 measure the levels of fungal and bacterial communities in farm and control rural dwellings.
19 We therefore studied: 1) the microbial flora in the dwellings (bedroom) of three groups of
20 children living in a rural environment in the German Alpine area; one living in farms, one
21 being occasionally exposed to farm environments, and the last one never being exposed to
22 farm environments, 2) the microbial flora collected in the stables, and barns of the farms
23 corresponding to the farm dwellings and 3) the relation between the level of contamination of
24 indoor air and the farm (stable and barn).

1 This research work is a part of the GABRIEL-Advanced study, which was designed to
2 identify the precise nature of protective exposures in farm environments. This is a multi-phase
3 cross-sectional surveys performed in rural areas of Germany, Austria and Switzerland,
4 including extensive questionnaire information on asthma, allergic diseases and environmental
5 exposures, measurement of specific IgE antibodies to inhalant allergens, and in depth
6 environmental airborne exposure assessment for viable fungal and bacterial taxa. Data
7 concerning relationships between exposure to fungal and bacterial communities and clinical
8 outcomes are presented elsewhere (7).

10 Materials and Methods

11
12 **Study design.** This environmental study is nested in Phase III of the Gabriel Advanced
13 Studies (Figure 1). In Phase I, we conducted a population-based survey among 39,983
14 children in rural areas of Bavaria, Germany to recruit subjects into the study by distributing
15 questionnaires about asthma and allergic diseases, farm characteristics and potential
16 confounding factors. For an environmental survey and biological sampling in Phase II, we
17 invited a stratified random sample of all children whose parents had given informed consent
18 to blood sampling, genetic analyses and dust sampling. Three non-overlapping strata were
19 defined: i) farm children, i.e. children living on a farm run by the family at the time of the
20 assessment; ii) exposed non-farm children, i.e. non-farm children but children regularly
21 exposed to stables, barns or cow's milk produced on a farm; and iii) non-exposed non-farm
22 children. From the children participating in all Phase II study modules, a stratified random
23 sample of 895 subjects using nine dwelling strata (three for the health status (asthmatics,
24 atopics, and controls) and three for the exposure (non-exposed, exposed, and farmer)) was
25 invited for Phase III in which we performed in-depth environmental sampling. For the nested

1 study presented herein. 444 subjects of Phase III were selected (roughly 50 subjects per
2 stratum) and data were obtained of 443. Farmers' dwelling samples were completed by
3 the corresponding barn and stable samples. Of the 443 samples, 144 dwellings were farm
4 houses, 149 fell in the category of exposed non farm families and 150 were from non exposed
5 families.
6
7 **Airborne dust samples.** Airborne dust samples were collected using a passive collection
8 method which uses Electrostatic Dust fall Collectors (EDCs). Details about the use of the
9 EDCs in indoor and stable environments have been described elsewhere as well as the results
10 of validation pilot studies (20, 22). Briefly, EDCs are plastic sample holders equipped with
11 two to four electrostatic cloths with a cloth exposure area of 0.0209m² (Zeeman, Utrecht, The
12 Netherlands) which, when exposed to air, will capture settling dust by their electrostatic
13 properties and have been validated against active dust PM10 sampling methods like the
14 Harvard impactor (22). The samplers have so far been used to collect dust and measure indoor
15 exposure to endotoxin (22), allergens (35), and glucans (21). Within each dwelling 1 EDC
16 was placed in the child's bedroom and also if applicable in the barn and/or the stable in which
17 the child spent most of his or her time, resulting in the collection of 150 EDCs from the non-
18 exposed child's bedroom, 149 EDCs from the exposed child's bedroom, 144 EDCs from the
19 farm child's bedroom, 111 from the stables and 126 from the barns. EDCs have been placed
20 by a fieldwork team member and after exposure to air for 14 days, the families closed the
21 EDCs and returned them to the study centre in Munich by mail, after which they were sent to
22 Utrecht for further processing. The four electrostatic cloths were transferred individually to
23 plastic bags and stored frozen, 3 cloths were stored at -80°C and 1 cloth was stored at -20°C.
24 Samples stored at -20°C were used for the analyses described in this manuscript and were sent
25 to the laboratory of microbiology in Besançon, France to be analyzed for microbial

1 composition with a delay of four to eight months. Sampling was performed during the winter
2 2007-2008. A total of 680 EDCs were available for analyses.
3
4 **Treatment of EDC cloths for microbiological analyses.** Microbiological analyses were
5 performed blindly with the operators being unaware of the provenance of each sample. The
6 cloths were put in a sterile bag with 20 ml of Tween® 80 at 0.1% and shaken for 10 min in a
7 Stomacher (AES Laboratoire, Combourg, France). Part of the washing solution was added to
8 different growth media suitable for a range of microorganisms, and the analyses were
9 performed as described below.
10
11 **Culturing.** One hundred microliters of wipes's washing solution and of the different dilutions
12 were plated on five different agars : 1) Dichloran-Glycerol 18 (Oxoid LTD, Basingstoke,
13 England) with 0.5% of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) incubated at
14 30°C for mesophilic mould isolation, 2) 3% malt-agar (AES, Bruz, France) with 10% salt and
15 0.5% chloramphenicol, incubated at room temperature for osmophilic fungal species, 3) Difco
16 actinomycetes isolation agar (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France) incubated at 30°C
17 for mesophilic actinomycetes, 4) R8 medium incubated at 52°C to detect thermophilic
18 actinomycetes (3), and 5) CHROMagar Orientation (CHROMagar Paris, France) incubated at
19 room temperature for bacterial growth and phenotypical differentiation. Because the different
20 samples were blindly analyzed and microbial contamination levels were unknown, four
21 dilutions (pure, 10, 100 and 1000 folds dilutions) were used for the analysis of bacteria on
22 CHROMagar Orientation medium. For fungi and actinomycetes three dilutions (pure, 10 and
23 100 folds dilutions) were systematically plated for counting and identification purpose.
24 Microbial counts were then performed from the plates with the less diluted inoculums that
25 exhibited a demumerable number of colonies.

1 farmer's lung disease. Identification of each bacterial colony at the genus or species level will
 2 be carried on in a further project of bacterial environmental characterization as every
 3 specimen of colony was reisolated by sub-culturing and frozen at -80°C for analyses.
 4 Bacterial and fungal results were expressed in Colony Forming Units (CFU) per plate and
 5 further converted to CFU per EDC and CFU/m² taking into account the dilution steps and the
 6 exposure surface area of the EDC (0.0209 m²).

7

8 **Statistical analyses.** Due to the procedure applied to the samples, levels below a value of 200
 9 CFU/EDC could not be detected. For graphical purposes, non detects have been replaced by
 10 half of the Limit Of Detection (LOD) ($1/2 \times 200 / 0.0209$ CFU/m²). For calculation of the
 11 arithmetical mean, zero values were kept as such. For calculation of the geometric mean only
 12 positive samples were used. The geometric means and confidence interval (95%) of each
 13 microbial category stratified by exposure (non-exposed / non-farmer; exposed / non-farmer;
 14 farmer) and farm locations (farmer dwelling; stable; barn) were calculated. To test for
 15 differences in the frequencies of detectable microorganisms between exposure strata, a
 16 Pearson's chi-squared test was used. Spearman's Rho was used to calculate correlations
 17 between the corresponding viable microorganisms in dwelling's room and barn (n=125
 18 matched pairs) and between dwelling's room and stable (n=110 matched pairs). We used a
 19 statistical significance at a 5% level. STATA 10 SE was used for statistical analyses (Stata
 20 Corporation, College Station, TX, USA).

21 Results

22

23

24 Numerous fungal and bacterial taxa were detected from the 680 analyzed EDCs.
 25 However, only one fungal and three bacterial taxa, i.e. *Penicillium* spp., Gram negative rods,

1

2 **Fungal identification.** After 7 days of incubation, the colonies were counted and identified
 3 using macroscopic and microscopic criteria. The combination of the culture media, the
 4 temperature of growth and the morphological criteria (shape, color, size) were used to identify
 5 the colonies. Microscopic identification was realized using a preparation on adhesive tape or a
 6 scraping off of one colony. After 14 days of incubation, the identification of slow-growing
 7 fungi was performed using the same methods. This method led to the identification of a large
 8 panel of microorganisms. A total of 44 fungal species were identified, and taxa were built to
 9 make an environmental description usable for further medical analyses. Thus, we particularly
 10 focused on genus and species that have commonly been found in the farm environment and
 11 have been suspected to provoke allergic or pulmonary diseases among farmers, namely
 12 *Aspidia* spp. (farmer's lung diseases), *Alternaria* spp. (allergy), *Aspergillus* species and more
 13 particularly *A. fumigatus* (asthma) and *Aspergillus glaucus* (farmer's lung diseases),
 14 *Cladosporium* spp. (allergy), *Penicillium* spp. (farmer's lung diseases and allergy),
 15 *Scopulariopsis* spp. (allergy), *Wallemia sebi* (farmer's lung diseases). Other fungi have been
 16 classified into yeasts, other *Micorales* species, and unidentified moulds.

17 Bacterial identification.

18 Bacterial colonies were picked from CHROMagar Orientation
 19 medium according to the colony morphology and subjected to gram staining. Here we
 20 classified and counted the bacteria according to the results of Gram staining for those which
 21 were cultured on CHROMagar Orientation medium and according to the temperature of
 22 grown for the actinomyces that were cultured on Difco actinomyces and R8 media. As for
 23 fungal identification, we chose to present results depending on bacterial taxa. We particularly
 24 focused on actinomyces counts because these bacteria are known to be present in high
 25 amounts in the farm environment and to be responsible for immuno-allergic diseases such as

1 Gram positive rods and Gram positive cocci, were found in more than 50% of samples
2 collected in the different location/environment (non-exposed dwelling, exposed dwelling,
3 farm dwelling, stable and barn). When considering the number of samples with a detectable
4 level of microorganisms by taxa and by strata, there is a marked trend towards a higher
5 proportion of detectable levels from EDCs collected from the farms than from the non-
6 exposed and exposed dwellings (Table 1). In particular, the proportion of positive samples for
7 each bacterial and fungal taxa was significantly higher in farm dwellings than in exposed or
8 non-exposed dwellings. A trend for a higher proportion of detectable fungi and bacteria in
9 exposed dwellings compared to non-exposed dwellings was found, but the difference was
10 only significant for the thermophilic *Actinomycetaceae* group (data not shown).

11 The higher exposure in farm dwellings was not only supported by the proportion of
12 detectable samples, but also by an increased concentration. As shown in table 2 the geometric
13 mean of detectable samples for every microbial parameter was higher in farm dwellings than
14 in the two other types of dwellings, with the exception of *Scapulariopsis* spp.. Moreover, for
15 most taxa (see Table 3), the microbial concentration in the farm dwellings were significantly
16 and positively correlated with the corresponding concentration in the stable and barn. The
17 congruence of the results between stables, barns and farm dwellings is also corroborated by
18 the findings presented in table 4 which show that in a majority of the farm dwellings (from 58
19 to 100% depending on the microorganism), a positive sample for a given microorganism in
20 the dwelling corresponds to a positive sample in the stable or in the barn. As shown in table 5,
21 the concentrations of different microorganisms were lower in farm dwellings as compared to
22 those in stables and barns with ratios for the arithmetic mean varying from 1/6 (*Penicillium*
23 spp.) to 1/64 (unidentified *Eurotium* spp.) for fungi and from 1/11 (Mesophilic
24 Actinomycetaceae) to 1/171 (Gram negative Rods) for the bacteria.

1 Fungal patterns of non-exposed and exposed dwellings were very similar and
2 characterized by the dominant presence of *Penicillium* spp., whereas the micro flora from the
3 farm dwellings appeared more similar to the stable micro flora with identified *Eurotium* spp.,
4 other *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. and Gram positive cocci as the
5 dominant groups of microorganisms (Figure 2). Bacterial profiles also showed similarities
6 between farm dwellings, stables and barns. Bacterial contamination of non-exposed dwellings
7 was very low when compared to farm dwellings (Figure 2).

8 Discussion

10 To the best of our knowledge this is the first time that such a large environmental
11 study is performed to describe the association between the pattern and level of viable
12 microorganisms on the farm and the living environment of children. Overall, our work
13 strongly suggests that microorganisms are transported from the stable and the barn to the
14 farming dwellings. Indeed, there is a marked tendency to an increase of the microbial amount
15 in the farming dwellings compared to the two other types of rural dwellings. Moreover, this
16 transport or flow clearly modifies the overall composition of airborne microflora in the
17 bedrooms of children. While the bedroom indoor environment of non-exposed children is
18 characterized by a predominance of *Penicillium* spp., as previously reported (26, 32), other
19 fungi such as *A. glaucus* and its teleomorph *Eurotium amstelodami* are also common in the
20 farming dwellings environment. *A. glaucus* is known to be commonly present on farms,
21 especially when hay is distributed to the cattle (14, 15, 28). Other fungal species observed in
22 the farmers child bedroom, such as *Absidia* spp. and *Wallemia sebi* and bacteria such as
23 *Actinomycetaceae* species have also been shown to be frequently detected in the farm
24 environment (27, 34) and have been suspected to be involved in farmer's lung diseases cases.

1 Moreover, our study showed that for numerous taxa, the concentrations of microorganisms in
2 stable and in the farming dwelling are positively and significantly correlated, corroborating
3 the hypothesis of a noticeable transfer from the stable to the indoor dwelling in farms. For
4 most of the fungal groups and for actinomycetes, the ratio between arithmetic mean exposures
5 in the dwelling compared to the stable is between 1/10 and 1/40. For these microorganisms, it
6 can be extrapolated that when a child has spent ten to forty hours in his or her bedroom, he or
7 she has been in contact with the same number of microorganisms as if he or she had stayed
8 one hour in the stable. Such ratios suggest that the stable is an important source of
9 contamination of the indoor environment of farming dwelling. Similarly bacterial
10 contamination of the bedroom seems also influenced by stables and barns atmosphere. This
11 may be due to the propensity of fungal and actinomycetes spores to be easily disseminated in
12 the atmosphere (24) and to be carried in dwellings through hands, clothes or contaminated
13 shoes of farmers and their children (13, 19, 41).

14 The case of *Penicillium spp.* is a different one. On one hand, the low ratio between
15 farmer's indoor air and stable air and the positive correlation between the numbers of colonies
16 found in these two settings, suggests that the indoor air in a farming dwelling is contaminated
17 by *Penicillium* spores coming from the farm. On the other hand, *Penicillium spp.* were also
18 the predominant fungal flora in non-farming dwelling, which is supported by the fact that
19 *Penicillium spp.* are among the most typical fungi found in indoor air of homes (10, 24, 29).

20 Other sources of *Penicillium* are likely to exist, which has been highlighted by other studies
21 dealing with mould contamination in indoor air (8, 25, 26, 33). An accurate identification of
22 *Penicillium* species would have been of interest to identify if the individual species pattern in
23 farmers and non-exposed dwellings would be different. However, *Penicillium* species
24 identification is particularly difficult to perform even in highly specialized laboratories,
25 needing further studies combining molecular, biochemical and physiological approaches.

1
2 In this study we focused on culturable bacteria and fungi that were easily obtained
3 using standard culture media. We acknowledge that these microorganisms represent only a
4 sub-fraction of all the microorganisms in the air because numerous bacteria and fungi are
5 difficult or even impossible to culture (5). Here we targeted mesophilic and thermophilic
6 fungi, and actinomycetæ because of their propensity to expand in indoor environments (5).
7 Other approaches, like microscopy or DNA cloning (23), that bypass the culture step could
8 also be used to assess the microbial diversity in the dwellings. However, those non-culture-
9 based methods, especially the bio-molecular ones, are at time of this study more expensive
10 and difficult to apply to large environmental studies.

11 In conclusion, this study represents an important step in the understanding of
12 microbial exposure in farmers' dwellings because it provides data about the transport of
13 microbial species between the stables and the indoor air of the farm dwellings. This transport
14 clearly modifies the composition of airborne microflora in the child's bedrooms where it
15 influences the exposition of the child, enhancing the protective effect conferred by the stable's
16 fungal and bacterial flora. Indeed, as shown in another part of the GABRIEL-Advanced study,
17 exposures to certain fungal and bacterial taxa are strongly inversely related to childhood
18 asthma or to atopy, depending of the microbial composition of the bioerosol in the child's
19 bedrooms (7).

20
21 **ACKNOWLEDGMENTS:**
22 This work was supported by the European Commission as part of GABRIEL (A
23 multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the
24 European Community) contract number 018996 under the FP6-LIFESCIHEALTHIntegrated
25 Program LSH-2004-1.2.5-1.

- 1 We thank Dr. Wulf Thierfelder and Michael Thamm from the Robert-Koch-Institute, Berlin,
2 Germany for their cooperation and the measurement of total and specific IgE that was used in
3 the definition of atopic subjects
4 The GABRIELA Study Group consists of the following members of the GABRIELA study
5 centres:
6 Austria: Katalin Kovacs, Bernhard Morass, Elisabeth Horak
7 Baden-Württemberg (Germany): Gisela Bückebe, Nikolaos Sitaridis, Jon Genuneit
8 Bavaria (Germany): Juliane Weber, Erika von Mutius
9 Poland: Anna Debinska, Hanna Dantolewicz, Barbara Sozanska
10 Switzerland: Marco Waser, Charlotte Braun-Fahrlander
- 1 REFERENCES
2
3 1. **Alven, T., C. Braun-Fahrlander, B. Brunekreef, E. von Mutius, J. Riedler, A.**
4 **Scheynius, M. van Hage, M. Wickman, M. R. Benz, J. Budde, K. B. Michels, D.**
5 **Schram, E. Uhligger, M. Waser, and G. Pershagen.** 2006. Allergic diseases and
6 atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the
7 PARSIFAL study. *Allergy* **61**:414-21.
8 2. **American Thoracic Society, M. S. o. A. I. A.** 1998. Respiratory Health Hazards in
9 Agriculture *Am J Respir Crit Care Med* **158**:S1-S76.
10 3. **Anner, W., C. Edwards, and A. J. McCarthy.** 1989. Improved medium for
11 recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*.
12 *Appl Environ Microbiol* **55**:2669-74.
13 4. **Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, L. Grize, U. Neu, F. H. Sennhauser, H. S.**
14 **Varonier, J. C. Vuille, and B. Wutrich.** 1999. Prevalence of hay fever and allergic
15 sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community.
16 SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with
17 Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* **29**:28-34.
18 5. **Eduard, W., and D. Heederik.** 1998. Methods for quantitative assessment of
19 airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work
20 environments. *Am Ind Hyg Assoc J* **59**:113-27.
21 6. **Ernst, P., and V. Cormier.** 2000. Relative scarcity of asthma and atopy among rural
22 adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* **161**:1563-6.
23 7. **GABRIELA-Study-Group.** submitted. Protection from childhood asthma and allergy
24 in farm environments - the GABRIEL Advanced Studies.

- 1 8. **Gorny, R. L., and J. Dutkiewicz.** 2002. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med* 9:17-23.
- 2 9. **Hanhela, K., K. Louhelainen, and A. L. Pasanen.** 1995. Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of *Wallemia sebi* and *Fusaria*. *Scand J Work Environ Health* 21:223-8.
- 3 10. **Hyvarinen, A., T. Reponen, T. Husman, and A. Nevalainen.** 2001. Comparison of the indoor air quality in mould damaged and reference buildings in a subarctic climate. *Cent Eur J Public Health* 9:133-9.
- 4 11. **Kilpelainen, M., E. O. Terho, H. Helenius, and M. Koskenvuo.** 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 30:201-8.
- 5 12. **Klintberg, B., N. Berglund, G. Lijja, M. Wickman, and M. van Hage-Hamsten.** 2001. Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a closed birth cohort from Sweden. *Eur Respir J* 17:1151-7.
- 6 13. **Kortbals, M., M. J. Ege, C. C. Tebbe, E. von Mutius, and J. Bauer.** 2008. Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. *J Microbiol Methods* 73:49-56.
- 7 14. **Kotimaa, M. H., L. Oksanen, and P. Koskela.** 1991. Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand J Work Environ Health* 17:117-22.
- 8 15. **Kotimaa, M. H., E. O. Terho, and K. Husman.** 1987. Airborne moulds and actinomycetes in work environment of farmers. *Eur J Respir Dis Suppl* 152:91-100.
- 9 16. **Lange, L., P. Thorne, and G. J. Kullman.** 1997. Determinants of culturable bioaerosol concentration in dairy barn. *Ann Agric Environ Med* 4:187-194.
- 10 17. **Leynaert, B., M. Guilleud-Bataille, D. Soussan, J. Benessiano, A. Guenegou, I. Pin, and F. Neukirch.** 2006. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* 118:658-65.
- 11 18. **Leynaert, B., C. Neukirch, D. Jarvis, S. Chinn, P. Burney, and F. Neukirch.** 2001. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med* 164:1829-34.
- 12 19. **Lis, D. O., G. Mainelis, and R. L. Gorny.** 2008. Microbial Air Contamination in Farmhouses - Quantitative Aspects. *Clean* 36:551-555.
- 13 20. **Normand, A. C., M. Vacheyrou, B. Sudre, D. J. Heederik, and R. Piarroux.** 2009. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol* 75:7617-23.
- 14 21. **Noss, I., I. M. Wouters, G. Bezemer, N. Metwali, I. Sander, M. Rauf-Heimsoth, D. J. Heederik, P. S. Thorne, and G. Doekes.** 2009. In press. Beta-(1,3)-glucan exposure assessment by passive airborne dust sampling and new sensitive immunoassays. *Appl Environ Microbiol*.
- 15 22. **Noss, I., I. M. Wouters, M. Visser, D. J. Heederik, P. S. Thorne, B. Brunckreef, and G. Doekes.** 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl Environ Microbiol* 74:5621-7.
- 16 23. **Pakarinen, J., A. Hyvarinen, M. Salkinoja-Salonen, S. Laitinen, A. Nevalainen, M. J. Makela, T. Haahela, and L. von Hertzen.** 2008. Predominance of Gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia. *Environ Microbiol* 10:3317-25.
- 17 24. **Pasanen, A. L., P. Kallitokoski, P. Pasanen, T. Salmi, and A. Tossavainen.** 1989. Fungi carried from farmers' work into farm homes. *Am Ind Hyg Assoc J* 50:631-3.

- 1 25. **Pietarinen, V. M., H. Rintala, A. Hyvärinen, U. Lignell, P. Karkkainen, and A.**
2 **Nevalainen.** 2008. Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building
3 materials and comparison to culture-based analysis. *J Environ Monit* 10:655-63.
- 4 26. **Reboux, G., A. P. Bellanger, S. Roussel, F. Grenouillet, S. Sornin, R. Piarroux, J.**
5 **C. Dalphin, and L. Millon.** 2009. Indoor mold concentration in Eastern France.
6 *Indoor Air* 19:446-53.
- 7 27. **Reboux, G., R. Piarroux, F. Mauny, A. Madroszyk, L. Millon, K. Bardonnet, and**
8 **J. C. Dalphin.** 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J*
9 *Respir Crit Care Med* 163:1534-9.
- 10 28. **Reboux, G., M. Reiman, S. Roussel, K. Taattola, L. Millon, J. C. Dalphin, and R.**
11 **Piarroux.** 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and
12 flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med* 13:267-73.
- 13 29. **Ren, P., T. M. Jankun, and B. P. Leaderer.** 1999. Comparisons of seasonal fungal
14 prevalence in indoor and outdoor air and in house dusts of dwellings in one Northeast
15 American county. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 9:560-8.
- 16 30. **Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch,**
17 **D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius.** 2001. Exposure to farming in
18 early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*
19 358:1129-33.
- 20 31. **Riedler, J., W. Eder, G. Oberfeld, and M. Schreuer.** 2000. Austrian children living
21 on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*
22 30:194-200.
- 23 32. **Rosas, I., C. Calderon, M. Ulloa, and J. Lacey.** 1993. Abundance of airborne
24 Penicillium CFU in relation to urbanization in Mexico City. *Appl Environ Microbiol*
25 59:2648-52.
- 1 33. **Roussel, S., G. Reboux, A. P. Bellanger, S. Sornin, F. Grenouillet, J. C. Dalphin,**
2 **R. Piarroux, and L. Millon.** 2008. Characteristics of dwellings contaminated by
3 moulds. *J Environ Monit* 10:724-9.
- 4 34. **Roussel, S., G. Reboux, J. C. Dalphin, K. Bardonnet, L. Millon, and R. Piarroux.**
5 2004. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung.
6 *Occup Environ Med* 61:e3.
- 7 35. **Samadl S, Heederik D, Krop E, Willemssen T, and W. L.** 2010. In Press. Allergen
8 and Endotoxin Exposure in a Companion Animal Hospital. *Occup Env Med.*
- 9 36. **Schram, D., G. Doekes, M. Boeve, J. Douwes, J. Riedler, E. Uhlagger, E. von**
10 **Mutius, J. Budde, G. Pershagen, F. Nyberg, J. Alm, C. Braun-Fahrlander, M.**
11 **Waser, and B. Brunekreef.** 2005. Bacterial and fungal components in house dust of
12 farm children, Rudolf Steiner school children and reference children—the PARSHAL
13 Study. *Allergy* 60:611-8.
- 14 37. **Schulze, A., R. T. van Strien, G. Praml, D. Nowak, and K. Radon.** 2007.
15 Characterisation of asthma among adults with and without childhood farm contact.
16 *Eur Respir J* 29:1169-73.
- 17 38. **van Strien, R. T., R. Engel, A. Bufe, W. Eder, M. Waser, M. Wasser, C. Braun-**
18 **Fahrlander, J. Riedler, D. Nowak, and E. von Mutius.** 2004. Microbial exposure of
19 rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust,
20 and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol* 113:860-7.
- 21 39. **Von Ehrenstein, O. S., E. Von Mutius, S. Hill, L. Baumann, O. Bohm, and R. von**
22 **Kries.** 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin*
23 *Exp Allergy* 30:187-93.
- 24 40. **von Mutius, E., and K. Radon.** 2008. Living on a farm: impact on asthma induction
25 and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am* 28:631-47, ix-x.

- 1 41. Waser, M., R. Schierl, E. von Mutius, S. Maisch, D. Carr, J. Riedler, W. Eder, M.
- 2 Schreuer, D. Nowak, and C. Braun-Fahrlander. 2004. Determinants of endotoxin
- 3 levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. Clin
- 4 Exp Allergy 34:389-97.
- 5

Figure and Table legends:

Figure 1: Of the 895 children invited for in-depth exposure assessment within the GABRIEL Advanced studies (Phase III), samples of 443 dwellings (bedrooms) were included in the current analyses. For all of them dust was collected in the child's room. For farmer's children dust was additionally collected in the farm or the stable whenever possible.

Figure 2: Geometric means and 95% confidence interval are represented. For graphical purpose, zeros values were transformed into 1/2 of the limit of detection (= 1/2 2000/0.0209 m³). Fungal taxa are depicted on the left and bacterial taxa are depicted on the right of the figure. X-axis values correspond to : 1: *Absidia* spp.; 2: Other *Mucorales* spp.; 3: *Aspergillus fumigatus*; 4: Identified *Eurotium* spp.; 5: Other *Eurotium* spp.; 6: Other *Aspergillus* spp.; 7: *Alternaria* spp.; 8: *Cladosporium* spp.; 9: *Penicillium* spp.; 10: *Scopulariopsis* spp.; 11: *Wallemia sebi*; 12: Yeasts; 13: Other fungal spp.; 14: Mesophilic *Actinomycetaceae*; 15: Thermophilic *Actinomycetaceae*; 16: Gram negative rods; 17: Gram positive rods; 18: Cocci gram negative ; 19: Cocci gram positive. Y-axis values correspond to microorganism concentration in CFU/m³.

Table 1. N = number of positive samples; frq = percentage of positive samples. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbararium*. Chi-square test statistic representing differences in frequencies between exposure strata (farmer versus exposed and farmers versus non-exposed). CHI² = Chi-square (in brackets; sig = p-value).
* = p-value <= 0.05; ** = p-value <= 0.001; *** = p-value <= 0.0001; NS = p-value > 0.05.

Tables and figures

Table 2. N = number of positive samples; GM = geometric mean; GSD = geometric standard deviation. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*. Mean values are expressed in colony forming unit by square meter (= CFU/m²).

Table 3. Spearman Rho is shown for farm children for whom EDCs from either farm sources were returned: child's room and stable: N = 110; child's room and barn: N = 125. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*. * = p-value <= 0.05; ** = p-value <= 0.001; *** = p-value <= 0.0001; NS = p-value > 0.05.

Table 4. N = 98 farm children with information of child's room, stable and barn included. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*.

Table 5. Arithmetic Mean Ratio = stable mean / farmer dwelling mean. ^a = *Aspergillus glaucus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*. ^b = one missing value.

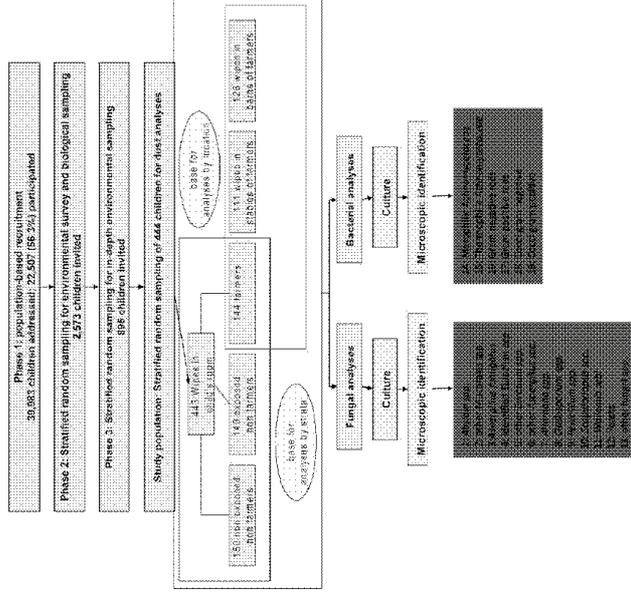


Figure 1: Flow scheme of the GABRIEL Advanced Studies in Bavaria.

Table 1. Number and frequency of detected microorganisms, stratified according to exposure status and location within the farm. Chi-square test statistics for differences in frequency between exposure strata are given.

Microorganism	Non-exposed (Farm N=120)		Exposed (Farm N=150)		Farm Dwelling N=248		Farm N=111		Farm N=110		Farm vs. Located Non-Farm Dwelling	
	N	freq (%)	N	freq (%)	N	freq (%)	N	freq (%)	N	freq (%)	CPE (log)	CPE (log)
<i>Aspergillus</i> spp.	5	3.3	7	4.7	35	24.3	64	58.0	67	61.2	2.75 (***)	2.29 (***)
<i>Other Aspergillus</i> spp.	12	8.0	11	7.4	31	21.5	48	43.2	45	41.2	10.8 (***)	11.9 (***)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	21.3	49	26.9	55	38.2	74	67.7	68	63.0	10.8 (***)	11.9 (***)
<i>Aspergillus niger</i>	24	16.0	30	20.0	81	55.0	121	110.0	105	96.0	46.2 (***)	46.2 (***)
<i>Other Aspergillus</i> spp.	57	38.0	66	44.3	95	66.0	75	67.6	87	79.1	23.6 (***)	23.6 (***)
<i>Alternaria</i> spp.	3	2.0	11	7.4	19	13.2	35	31.5	44	40.0	5.4 (*)	2.7 (NS)
<i>Other Alternaria</i> spp.	1	0.7	3	2.0	5	3.5	10	9.0	13	12.0	2.7 (NS)	2.7 (NS)
<i>Penicillium</i> spp.	113	75.3	113	75.8	117	82.2	186	172.4	179	167.0	7.8 (***)	7.8 (***)
<i>Substratum</i> spp.	5	3.3	19	12.7	41	28.5	66	59.5	69	64.0	35.2 (***)	21.1 (***)
<i>Wickerhamia</i> spp.	13	8.7	27	18.0	69	47.0	99	89.2	76	70.0	43.5 (***)	29.8 (***)
<i>Other fungi</i>	44	29.3	46	30.9	66	45.8	72	64.9	78	71.9	8.5 (***)	6.8 (***)
<i>Moraxella</i> spp.	6	4.0	5	3.3	11	7.4	19	17.2	19	17.2	16.2 (***)	16.2 (***)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	5.3	27	18.1	45	31.3	79	71.2	71	64.5	33.4 (***)	25.4 (***)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	79	52.7	87	58.4	121	84.0	85	76.6	112	101.8	44.2 (***)	37.7 (***)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	89	59.3	91	61.1	102	71.7	90	81.1	111	100.9	41.2 (***)	37.7 (***)
<i>Other staphylococci</i>	10	6.7	11	7.4	17	11.5	34	30.6	34	30.9	22.2 (***)	18.7 (***)
<i>Clostridium botulinum</i>	205	136.7	95	63.8	313	212.4	304	275.7	309	282.5	22.2 (***)	24.7 (***)

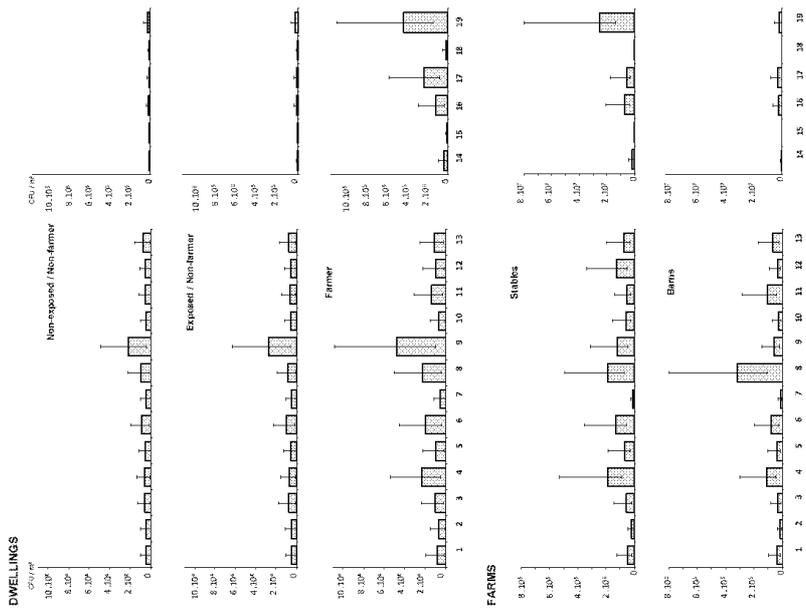


Figure 2. Microbial profiles of the 5 different environmental strata for each of the microbial groups.

Table 2. Geometric means and standard deviation of microorganisms (in CFU/m³) by exposure, strain and by location in the farm.

	Non-Exposed New Farm, Dwellings		Dwelling Non-Exposed Dwelling		Farm Buildings		Stable		Mean	
	N	GM / SD	N	GM / SD	N	GM / SD	N	GM / SD		
<i>Asiella</i> sp.	6	15 / 2.0	7	15 / 2.4	35	56 / 4.0	61	312 / 7.4	67	235 / 6.7
<i>Other Micrococcus</i> sp.	42	11 / 1.8	11	24 / 3.1	31	31 / 3.6	48	123 / 4.7	46	122 / 5.4
<i>Identified Eurotium</i> spp.	4	10 / 1.5	5	10 / 1.5	10	10 / 1.5	4	10 / 1.5	4	10 / 1.5
<i>Other Aspergillus</i> spp.	27	23 / 3.6	40	23 / 3.1	95	33 / 3.0	72	1384 / 7.0	76	959 / 6.2
<i>Unidentified Eurotium</i> spp.	21	17 / 2.7	22	23 / 2.9	51	37 / 4.0	51	147.5 / 5.2	53	696 / 5.0
<i>Other Aspergillus</i> sp.	67	25 / 3.3	66	27 / 3.5	95	42 / 3.6	78	641 / 6.2	87	273 / 6.0
<i>Aspergillus</i> spp.	7	21 / 3.7	7	21 / 3.7	11	24 / 3.8	11	24 / 3.8	11	24 / 3.8
<i>Chaetomium</i> spp.	77	21 / 3.7	73	17 / 2.4	116	33 / 3.0	62	633 / 4.3	104	705 / 4.6
<i>Penicillium</i> spp.	113	30 / 3.2	113	46 / 3.4	127	65 / 3.3	60	430 / 3.6	73	342 / 4.2
<i>Zoopagomyces</i> spp.	5	10 / 1.0	10	40 / 4.9	41	21 / 3.1	65	441 / 5.3	68	199 / 4.5
<i>Other fungi</i>	12	13 / 2.1	19	20 / 2.9	44	52 / 3.6	72	740 / 5.0	49	854 / 4.4
<i>Yeast</i>	44	22 / 2.8	46	22 / 3.1	69	32 / 3.3	72	242 / 4.9	78	341 / 4.8
<i>Mycoplasma</i> spp.	36	15 / 2.2	45	21 / 3.0	111	77 / 5.1	109	1824 / 6.5	117	980 / 7.3
<i>Thermophilic Actinomyces</i>	8	12 / 1.5	27	18 / 3.1	45	39 / 4.8	79	213 / 7.1	71	123 / 7.4
<i>Gram negative rods</i>	78	40 / 3.5	87	42 / 5.1	121	227 / 7.0	95	23877 / 7.2	112	4835 / 8.0
<i>Gram positive rods</i>	83	40 / 3.1	79	42 / 5.1	121	227 / 7.0	95	23877 / 7.2	111	4835 / 8.0
<i>Cocci gram positive</i>	41	41 / 4.3	44	46 / 4.9	67	118 / 6.2	26	11825 / 4.9	39	521 / 4.6
<i>Cocci gram negative</i>	106	54 / 6.6	95	83 / 8.3	132	882 / 8.7	64	116533 / 7.0	106	4039 / 8.7

25

Table 3. Spearman correlation coefficients between levels of microorganisms in the farm dwelling and the levels in stable or barn.

	Farm Dwelling / Stable Spearman rho	p	Farm Dwelling / Barn Spearman rho	p
<i>Asiella</i> sp.	0.52	***	0.54	***
<i>Other Micrococcus</i> sp.	0.09	NS	0.21	*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.5	***	0.44	***
<i>Identified Eurotium</i> spp.	0.54	***	0.42	***
<i>Other Eurotium</i> spp.	0.33	***	0.17	NS
<i>Other Aspergillus</i> spp.	0.42	***	0.35	***
<i>Alternaria</i> spp.	0.22	*	0.16	NS
<i>Chaetomium</i> spp.	0.19	*	0.13	NS
<i>Penicillium</i> spp.	0.2	*	0.19	*
<i>Sauvignaniopsis</i> spp.	0.25	**	0.28	**
<i>Wickerhamia</i> spp.	0.25	**	0.27	**
<i>Yeast</i>	0.22	*	0.19	*
<i>Other fungi</i>	0.23	*	0.15	NS
<i>Mycoplasma</i> spp.	0.48	***	0.36	***
<i>Thermophilic Actinomyces</i>	0.37	***	0.22	*
<i>Gram negative rods</i>	0.27	**	0.36	***
<i>Gram positive rods</i>	0.29	**	0.31	***
<i>Cocci gram positive</i>	0.11	NS	0.17	NS
<i>Cocci gram negative</i>	0.47	***	0.32	***

NS: non significant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

26

Table 4. Number of samples with or without specified microorganisms identified in farm dwellings and / or other indoor farm source (stable or barn).

	Present in farm dwelling / Stable or Barn			Proportion of all farm dwellings positive		Proportion of all farm dwellings negative	
	n	%	n	%	n	%	
<i>Abdolesia</i>	30	0	39	29	100%	43%	
Other <i>Fiber</i> spp.	36	8	39	15	63%	48%	
<i>Aspergillus</i> spp.	16	3	46	33	93%	26%	
Identified <i>Candida</i> spp.	3	9	26	35	86%	23%	
Other <i>Candida</i> spp.	3	8	36	51	89%	25%	
Other <i>Penicillium</i> spp.	42	7	36	67	89%	24%	
<i>Alternaria</i> spp.	42	3	45	8	73%	48%	
<i>Chaetomium</i> spp.	0	4	19	75	95%	0%	
<i>Penicillium</i> spp.	1	12	10	75	86%	9%	
<i>Stachybotrys</i> spp.	19	5	49	23	83%	28%	
<i>Wickerhamia</i>	16	8	37	37	82%	36%	
Yeast	24	0	82	32	100%	36%	
Other fungi	11	5	40	82	86%	22%	
<i>Meningium</i> , <i>Actinomyces</i>	0	0	17	81	100%	0%	
<i>Thermophilic Actinomyces</i>	11	2	52	53	94%	17%	
<i>Gram</i> negative rods	0	1	17	80	98%	0%	
<i>Gram</i> positive rods	2	3	8	55	97%	30%	
Cocci <i>Gram</i> negative	29	19	24	26	58%	55%	
Cocci <i>Gram</i> positive	2	3	6	87	97%	25%	

Table 5. Arithmetic means (in 10³ CFU/m³) and arithmetic mean ratio of microorganisms levels found in the stable and farm dwellings.

	Arithmetic means (10 ³ CFU/m ³)		Arithmetic Mean Ratio (stable / farm dwelling)
	Stable (N=11)	Farm dwelling (N=14)	
<i>Abdolesia</i> spp.	836	32	26
Other <i>Fiber</i> spp.	145	14	10
<i>Aspergillus</i> spp.	1,055	59	18
Unidentified <i>Candida</i> spp.	4,012	177	23
Other <i>Candida</i> spp.	3,086	47	64
Other <i>Penicillium</i> spp.	1,724	75	23
<i>Alternaria</i> spp.	75	4	19
<i>Chaetomium</i> spp.	2,183	51	43
<i>Penicillium</i> spp.	659	109	6
<i>Stachybotrys</i> spp.	817	13	63
<i>Wickerhamia</i>	1,411	54	26
Yeast	1,584	31	83
Other fungi	715	31	23
<i>Meningium</i> , <i>Actinomyces</i>	6,584	624	11
<i>Thermophilic Actinomyces</i>	1,073	66	16
<i>Gram</i> negative rods	173,551	1,013	171
<i>Gram</i> positive rods	279,564	3,270	85
Cocci <i>Gram</i> negative	15,733	431 ^b	37
Cocci <i>Gram</i> positive	388,52	5,334	81

ANNEXE 7 : Article “Microbial cultivable communities of raw cow milk, and potential transportations in the stables of sixteen French farms responding to Comté cheese regulation”

- soumis -

1 Microbial cultivable communities of raw cow milk, and potential transport/flows in the
2 stables of sixteen French farms responding to Comté cheese regulation.
3
4 Suggestion for an abbreviated running title:
5 Microbial cultivable flora of raw cow milk and flows in the stables.
6
7
8 Vacheyrou Mallory ^{1*}, Normand Anne-Cécile ^{2a*}, Guyot Philippe³, Cassagne Carole²,
9 Piarroux Renaud², Bouton Yvette³,
10
11 1 Franche-Comté University, UMR-CNRS 6249 Chrono-environnement, Mycology
12 department, Besançon, France,
13 2 Department of parasitology and mycology, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille,
14 France.
15 3 Comité Interprofessionnel du Gruyère de Comté, R&D Unit, INRA UR 342, Poligny,
16 France
17
18 * corresponding authors.
19 Mallory Vacheyrou at : mallory.vacheyrou@univ-fcomte.fr
20 Anne-Cécile Normand at : accilenor@hotmail.com
21
22 ^a The two authors contributed equally to the paper.

23 ABSTRACT
24
25 Milk consumption has shown an impact on allergy and asthma development and protection,
26 and thus, milk microbial composition has an interest not only in cheese industry but also in
27 public health. Our objectives were here to enlarge the knowledge of milk microbial
28 composition and to highlight microbial flows/transports from the stable to the milk.
29 Sixteen French farms with either stanchion barn or freestall barn configurations were sampled
30 in eight different locations and/or times: active air sampling using a pump, passive dust
31 sampling with a plastic box, cow's teat surface using a wipe, hay, and milk.
32 Results showed that the most potential source of milk contamination is the teat surface, but
33 also that many microorganisms identified in the milk are not recovered by our methods in the
34 other farm compartments. We also observed that despite the separation existing between the
35 stable and the milking room in the freestall barn configuration, microorganisms identified in
36 the living place of the cows were recovered in the milk, implying a flow/transport from the
37 stable to the milking room.
38 This work highlights the microbial composition of milk samples regardless of the industrial
39 implication by screening a large panel of microorganisms. It also shows the different
40 potentials flows/transports that exist within the farm building.
41
42 KEYWORDS: Milk, Microbial diversity, Microbial flows, Farm, Comté cheese.

43 **INTRODUCTION**

44 The farming environment is rich in microbiologic structures that may protect against asthma

45 and allergy (Braun-Faloidander et al., 2002; Debarry et al., 2007). On a recent study, combined

46 exposure to *Levotium spp.* and *Bacilli* gram positive have been shown to have a strong

47 protective factor for childhood asthma and exposure to *Bacilli* gram negative was inversely

48 related to atopy (article Gabriel-A Overview submitted). The association with a decreased risk

49 of asthma and allergy has not only been seen with airborne microorganisms but also with the

50 ingested ones. Thus, recently, an inverse association of farm milk consumption with asthma

51 and allergy was observed (Debarry et al., 2007; Waser et al., 2007). Likewise in medicine, the

52 dairy farm environment has become a focus of interest in cheese technology since it may

53 influence the microbial communities in milk (Montel et al., 2003). The indigenous microflora

54 in raw milk plays an important role in the formation of the cheese flavour diversity (Benvier

55 and Buchin, 2004; Caillon et al., 2005; Bouton et al., 2009). Moreover it may have a

56 protective effect against growth of pathogens (Domélely, 2001). For instance a growth

57 inhibition of *Listeria monocytogenes* was observed in different types of raw-milk cheeses

58 (Gay and Amgar, 2005; Millet et al., 2006).

59 Most of the studies dealing with the factors affecting the contamination of milk described

60 variations in microbial load and composition of the milk by enumerating several group of

61 microorganisms on various media, but less so with identifying the microorganisms at the

62 species level (Tormo et al., 2006). Others studies including identification of the

63 microorganisms at the genus or species level treated of pathogenic or spoilage bacteria such

64 as *Listeria monocytogenes* (Samaa et al., 1993), *Bacillus cereus* (Christiansson et al., 1999;

65 Magnusson et al., 2007), *Streptococcus uberis* (Lopez-Benavides et al., 2007) and a specific

66 group of lactic acid bacteria namely *Enterococcus* and *Lactobacillus* (Kagkli et al., 2007).

67 One study described largely the microbial communities in goat milk during a lactation year by

68 using molecular methods (Caillon et al., 2007).

69 The sources of contamination and the factors that might affect the microbial communities in

70 milk have not been completely elucidated. For example, microorganisms associated with

71 bedding material can contaminate the surface of teats and further milk (Sevi et al., 2003;

72 Zdanowicz et al., 2004; Bouton et al., 2005). Thus, the hygienic practices of farmers during

73 milking – washing of milking equipment, pre- and post-milking udder preparation- influence

74 the contents in useful cheese-making and spoilage microorganisms (Michel et al., 2001). If

75 milking is a well-known factor of milk quality, effect of feeding factors and the role of

76 airborne particles on milk quality appear to have been overlooked.

77 The aim of the present work was to study (i) the microbial flora of milk samples in several

78 dairy farms in Franche-Comté (France), not only the bacteria known to be likely recovered in

79 raw milk Comté cheese but also the environmental bacteria, yeasts and fungi, and (ii) the

80 contamination route of cow milk by these microorganisms by comparing, during the winter

81 season, the microbiological composition of hay, airborne particles, dust, teat surface and milk

82 samples from farms with stanchion barn or with freestall barns.

83

84 **MATERIAL AND METHODS**

85

86 **Study population.** Sixteen French farms were selected in Franche-Comté depending on their

87 agricultural practices and on their belonging to the Comté cheese regulation (Normand et al.,

88 2009). Nine farms were freestall barns and possessed a milking room independent from the

89 leaving area of the cows. The other seven farms were traditional stanchion barns, where the

90 livestock was hobbled and the milking was performed in the leaving space of the cows,

91 through a pipeline. All farms were visited in winter 2006, from February to March.

92 116 Hay was also collected daily during one month, in a plastic bag, by the farmer (Hay of the

93 **Questionnaire.** Farmers were asked questions about their milking procedures, farm

94 characteristics and cattle care. Among other, the number of cows constituting the herd was

95 referenced along with feed storage methods, udder preparation methods, temperature of milk

96 conservation in the tank, and milking system washing methods.

97

98 **Sampling.** A total of 121 samples (Air before work (16), Air after work (16), Air of the

99 Milking room (9), Hay of the day (16), Hay of the month (16), Settled dust (16), Teat surface

100 (16), and Milk (16)) was taken to explore every potential source of microorganisms observed

101 by the technician.

102 The air was first collected at a rest period, before any activity of the farmer in the stable (Air

103 before work). Then, the air was collected ten minutes after the food distribution in the stable

104 (Air after work), and last, it was sampled in the milking room five minutes after the beginning

105 of the milking (Air in the milking room). Collection of airborne dust was based on active

106 impaction of air particles (with a 3 L/min flow) using a cassette (37 mm; Sensidyne,

107 Clearwater, U.S.A) containing a Teflon[®] filter (pore diameter of 0.45 µm - Millipore

108 Sensidyne, Clearwater, U.S.A) during 20 min pumping sessions using a Gil-Air 3 pump

109 (Sensidyne, Clearwater, USA), positioned on a 75 cm high tripod.

110 A sample of the hay distributed to the cattle between the two air sampling sessions was put in

111 a sterile plastic box (Hay of the day). Last, ten cows were randomly selected during the

112 milking and two of their four teats surface (the area that can enter in contact with the pump)

113 were sampled -- after pre-milking udder preparation by the farmer - with one sterile wipe per

114 cow, wet by vaporization of a solution of Tween[®] 20 (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)

115 diluted 100 times and collected in a unique sterile plastic bag (Teat surface).

116 Hay was also collected daily during one month, in a plastic bag, by the farmer (Hay of the

117 month). During the same period, dust was collected in a plastic box (24 cm long, 18.6 cm

118 width and 5.5 cm high, Mobil Plastic, France) on the top of which an aluminum grid with a

119 ca. 8 mm link was placed to prevent large amalgams from settling inside (Settled dust).

120 Last, milk was sampled in the tank after the end of the milking and when the conservation

121 temperature of the tank was reached. Milk was collected with a sterile 50mL syringe and

122 transferred in a plastic sterile box stored in a polystyrene refrigerated box. Thus, milk samples

123 were taken either from a mixture of the morning and evening milking refrigerated or solely

124 from the morning milking.

125

126 **Sample handling.** All the air samples were handled the same way. The filters were rinsed

127 with 10 mL of 0.1% Tween[®] 80 (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) and shaken for 10

128 min in a Stomacher[®] (AES Laboratoire, Combourg, France) with a delay of less than 3 hours

129 after fieldwork. 250 µL of the thoroughly mixed washing solution of the air filters were

130 inoculated to the different culture media.

131 Both hay of the day and hay of the month samples were analysed following one unique

132 protocol. Five grams of hay were put in a sterile bag. 80 ml of Tween 80[®] 0.1% were added,

133 and the sample was washed vigorously by a Stomacher[®]. The inoculation of the different

134 media was made by 100 µL of the hay's mixed washing solution except for the growth of

135 lactobacilli and propionibacteria. For these microorganisms, the inoculation of media was

136 made after an enrichment step, Man Rogosa Sharpe broth (MRS, Difco), for the growth of

137 thermophilic lactobacilli and sterilised milk (Lait G, Laboratoires Standa, Caen, France) for

138 the growth of facultative heterofermentative lactobacilli were inoculated with 5% of the hay's

139 mixed washing solution and incubated for 2 days at 45°C and 30°C respectively. YEL broth

140 (Hettinga et al., 1968) for the growth of PAB was inoculated with 10% of the hay's mixed

141 washing solution and incubated 2 days at 30°C. After incubation each mixture was spread on
142 MRS, FH and SLAC agar media.
143 The teat surface wipe's samples were washed by addition of 100 mL of Tween 20® 0.1%
144 supplemented by 0.5% of Lait G powder and washed vigorously by a stomacher during 1
145 minute as exposed by Michel et al. (Michel et al., 2006). Then, 250µL of the mixed washing
146 solution of the ten wipes were used for the inoculation of the different media.
147 Dust (0.3g accurately known) was washed for one minute in a sterile plastic box with 20 mL
148 of Tween 80® 0.1% by vigorous mixing. As for the hay samples, 100µL of the obtained
149 mixed solution was used for culture in the different culture media.
150 The milk samples were stored at 4°C until analyses, and did not necessitate special handling
151 before 250 µL of the liquid were put on the different media for the culture.
152
153 **Culture.** The previously cited volumes of the different kind of samples were spread on two
154 different media for fungal culture: i) Dichloran-Glycerol (Oxoid LTD, Basingstoke, England)
155 with 0.5% of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 30°C for mesophilic
156 mould isolation, and ii) 3% malt-agar (AES, Bruz, France) with 10% salt and 0.5%
157 chloramphenicol for osmophilic fungal species.
158 Seven culture media were used for bacterial growth. Two of them were specific to
159 *Actinomyces* species: i) Difco actinomyces isolation agar (Becton Dickinson, le Pont de
160 Claix, France) at 30°C during 7 days for mesophilic actinomyces, and ii) R8 medium
161 according to Anner and colleagues at 52°C during 7 days to detect thermophilic
162 actinomyces (Anner et al., 1989). Two media were used for the culture of environmental
163 bacteria: i) Mueller-Hinton (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), at 30°C during 2 days for
164 numerous environmental bacteria, and ii) Drigalski (Oxoid, Basingstoke, Hampshire,
165 England), at 30°C during 2 days for non demanding gram negative bacteria. Three culture

166 media were used by means of a Spiral system apparatus (DS model, Interscience, France) for
167 the growth of bacteria of technologic interest - lactobacilli and propionibacteria - i) MRS
168 medium for the isolation of presumptive thermophilic lactobacilli after incubation for 72h at
169 45°C under anaerobic conditions generated by a Merck Anaerocult®, ii) Propionibacteria were
170 enumerated on SLAC agar (Drinan and Cogan, 1992) after incubation at 30°C for 6 days
171 under anaerobic conditions and, iii) "Facultativ Heterofermentativen Laktobazillen" agar (FH)
172 (Isolini et al., 1990) for the isolation of facultative heterofermentative lactobacilli after an
173 anaerobic incubation for 72h at 37°C.
174
175 **Fungal identification.** After seven days of incubation at the respective temperatures, molds
176 colonies were identified using macroscopic and microscopic criteria as exposed by Reboux et
177 al. (Reboux et al., 2006b)
178
179 **Bacterial identification.** The identification of the actinomyces was based on macroscopic
180 criteria. Environmental bacteria were counted and reisolated by sub-culturing on Mueller-
181 Hinton (MH) agar according to the colony morphology and result of gram staining.
182 Identification based on partial sequencing of the 16S rRNA genes of individual isolates
183 recovered from each of the eight samples on the different culture media was performed as
184 previously described (Normand et al., 2009). Results are expressed in Colony Forming Unit
185 (CFU) per cubic meter, per g, per mL or per wipe (two teats surface) depending on the sample
186 analyzed.
187 Lactobacilli and propionibacteria were taken from each of the MRS, FH and SLAC plates and
188 purified on either MRS or YEL agar. Isolates were examined microscopically. Growth at
189 15°C and gas production from D-glucose were checked for facultative heterofermentative
190 lactobacilli (FHL). Total DNA was extracted from 1.5 mL samples of fresh MRS or YEL

191 cultures in the exponential growth phase using the guanidine method as described by Godon
192 et al. (Godon et al., 1997) except that cell lysis was performed by a microwave oven
193 treatment. Genus-specific PCRs for *Lactobacillus* sp., *Propionibacterium* sp. and species-
194 specific primers for *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. curvatus*,
195 *L. delbrueckii* spp., *P. jensenii*, *P. freudenreichii* spp. and *P. acidipropionici* were performed
196 as previously described (Dasen et al., 1998; Tisala-Timisjärvi and Alaiossava, 2001;
197 Dubernet et al., 2002; Depouilly et al., 2004). Isolates that could not be allotted to any
198 *Lactobacillus* sp. with the specific PCR used were subjected to 16S rRNA gene sequence
199 analysis.

200
201 **Statistical analyses.**

202 The results are presented based on ten fungal categories defined as follow: Mucorales order,
203 *Wallenia sebi*, *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp.,
204 *Penicillium* spp., Red Yeasts, White Yeasts, and Other fungi spp. For environmental bacteria,
205 five categories were used according to macro- and microscopic observation and Gram
206 staining: Mesophilic *Actinomycetaceae*, Thermophilic *Actinomycetaceae*, Bacilli Gram
207 negative, Bacilli Gram positive, and Cocci Gram positive. The frequency of identification was
208 used for construction of environmental profiles. The three gram staining groups were then
209 divided into the corresponding bacterial species for transport/flow chart construction, along
210 with the lactobacilli and propionibacteria. Spearman correlation coefficients were computed
211 between air samples, for comparison of the environment of the stable and of the milking
212 room. Samples were compared between stanchion barns and freestall barns with a Mann-
213 Whitney test. Statistical analyses were performed using STATA software (version 8.2, Stata
214 Corp LP, College Station, TX, USA).

215

216 **RESULTS**

217
218 **Questionnaires.** Questionnaires were analysed and farms were characterized depending on
219 the farmers habits, herd size and farm characteristics. Main characteristics of the stable are
220 exposed in table 1.

221
222 **Microbial composition of the samples.** The 15 environmental microbial taxa were recovered
223 in each of the 8 different types of samples except in milk where *Alternaria* spp. was not
224 present (Tables 2 and 3). Five taxa were frequently identified in the total samples: 1)
225 *Eurotium* spp. (in 93% of the samples), 2) the mesophilic actinomyces (in 91%), 3)
226 *Penicillium* spp. (in 76%), 4) the Cocci gram positive (in 76%), and 5) *Aspergillus* spp. (in
227 74%). Table 2 provides detailed data about the frequency of every microbial species cultured
228 on the different media (bacteria and fungi) in every type of samples. In milk, *Eurotium* spp.,
229 *Penicillium* spp. white yeast, bacilli gram positive and gram negative, cocci gram positive and
230 mesophilic actinomyces were present from 56 to 94 % of samples.

231 From 659 DNA extracts obtained after culture on Mueller-Hinton and Drigalski media and
232 analysed by bio molecular methods, 136 bacterial species have been identified corresponding
233 to 54 bacterial genera (Table 2). Thirteen bacterial species of lactobacilli and PAB have been
234 identified from 631 DNA extracts obtained after culture on MRS, FH and SLAC media
235 (Table 2). Table 3 gives information about the mean amount of the microbial taxa (Mueller-
236 Hinton and Drigalski bacteria grouped into gram staining characteristics) and shows that in
237 the different types of samples, bacteria, in particular gram positive bacteria, were generally
238 more abundant than fungi.

239

240 **Milk composition.** Sixty-two bacterial DNA extracts obtained after culture on Mueller-
241 Hinton and Drigalski media and 293 bacterial DNA extracts retrieved on EHL, MRS and SLAC
242 media from the milk samples of the sixteen farms were analysed by molecular biology.
243 Forty-seven bacterial species corresponding to twenty-five bacterial genera were identified in
244 the milk by PCR and sequencing methods or by PCR species-specific (Table 2).
245 Two bacterial taxa and nine fungal taxa were identified by culture methods, given a total of
246 fifty-eight different microbial taxa identified in the sixteen milk samples.
247 Most of bacteria belong to the gram positive group that includes lactic acid bacteria,
248 propionibacteria, coryneform bacteria, and coagulase-negative staphylococci. Other gram
249 positive were present in one or two farms. Gram negative were present at most in one farm
250 except *Acinetobacter* sp. which was sequenced four times. Variability in milk microbial
251 composition is important and most of the environmental bacterial genera identified in this
252 kind of sample were at most identified in 56% of the samples (*Staphylococcus* spp.). Few of
253 the environmental bacteria were recovered in at least one fourth of the milk samples such as
254 *Acinetobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus* sp. However,
255 some lactic acid bacteria (LAB) were observed in an important amount in one or two milks.
256 For example, *Lactococcus lactis*, identified in only two milks, was present in a geometric
257 mean of 2 191 CFU/mL of milk, and *Enterococcus faecalis* was present in only one milk but
258 at a concentration of almost 3 000 CFU/mL of milk (data not shown). Bacteria of technologic
259 interest such as *Lactobacillus delbrueckii* ssp., *L. paracasei* and *Propionibacterium*
260 *freudenreichii* ssp. were identified in 50 to 88% of milk samples. Fungi and especially Yeasts
261 were identified more frequently in the milks. Four of the nine fungal taxa were identified in
262 more than one fourth of the samples (White yeasts (14 samples), *Penicillium* spp. (10
263 samples), *Eurotium* spp. (10 samples), and *Aspergillus* spp. (4 samples)). The fungal
264 concentration of the nine fungal taxa identified in the milk, with a maximum geometric mean

265 of 56 CFU/mL for the white yeasts, was not as high as the environmental bacterial
266 contamination.
267 The sixteen different milks contained a mean of about ten different microbial species
268 (minimum 8, maximum 14), with no difference depending on the collected farm
269 characteristics ($p = 0.41$ with a Mann-Whitney test). The global contamination of the milk
270 samples was significantly different when considering the total amount of microorganisms
271 between the two types of farms ($p = 0.04$), milk from the stanchion barns being more
272 contaminated than milk from freestall barns. However, the fungal contamination was not
273 different ($p = 0.15$) between the two different types of farms.
274

275 **Transport/flow identification.** Microorganisms identified in the milk samples or on the teat
276 surface are represented in figure 1. Their frequencies in the eight kinds of samples are
277 represented by histograms. The environmental bacteria, too numerous to be represented in a
278 graphic are grouped depending on their gram staining. The frequencies of identification in the
279 eight environments are high for most of the fungal species and environmental bacteria while
280 useful cheese-making bacteria –lactobacilli and PAB– are frequently identified in the milk
281 and on the teat surface (up to 14 of the farms) but rarely in other environments (in less than
282 four farms).
283 Figure 2 represent a chart in which the different bacterial species identified in the milk
284 (Bacilli and Cocci groups detailed) are listed for the different kind of environmental samples.
285 Most of the environmental bacteria (17/38) are identified in more than one environmental
286 source as it is the case for *Staphylococcus* sp. (*S. equorum*, *S. xylosois*), *Bacillus* sp. and
287 *Acinetobacter* sp. which are present in seven to eight kinds of samples or for *Aerococcus*
288 *viridans*, *Microbacterium* sp. and *Pantoea* sp. which can be identified in six of the eight kinds
289 of samples. Useful cheese-making bacteria –lactobacilli and PAB– are rarely found in the

290 environment. *Lactobacillus curvatus* and *L. plantarum* are the two species that have the most
291 various possible sources with three different kinds of samples. A total of twenty-one bacterial
292 species have never been identified in other but milk samples, and their potential origin
293 remains unknown. The teat surface shares the higher bacterial diversity with the milk, with
294 twenty bacterial milk's species also identified in this kind of sample. Air in the stable (Before
295 and After Work), hay and settled dust samples also seems to be non-negligible contaminants
296 of the milk with thirteen to sixteen milk's species identified in each of the different kinds of
297 samples. Moreover, considering the microbial diversity of air, dust and hay samples, air
298 contamination of the stable seems to be a consequence of hay handling or of dust moving.

299

300 **Comparison of microbial flora between the stable and the milking room.** As indicated by
301 the figure 2 chart, most of the milk bacteria identified in the air of the milking room are also
302 identified in the air of the stable, suggesting that both air of the stable and air of the milking
303 room are bound. Spearman correlation coefficients were calculated between the three kinds of
304 samples to evaluate the bound between them. Results are exposed in table 4. Correlations
305 between each microbial taxa in the air of the stable and air of the milking room are poor and
306 non significant except for 3 taxa (mesophilic Actinomycetes, *Haltemia sebi*, and Red Yeasts).

307 However, correlations between air of the stable and air of the milking room are good and
308 significant if the microbial total is taken into account ($\rho = 0.53$, $p < 0.0001$) between air of
309 the milking room and air before work, and $\rho = 0.54$, $p < 0.0001$ between air of the milking
310 room and air after work). The air of the milking room still seems to be less contaminated than
311 the air in the stable as shown by geometric mean values (table 3).

312

313 **DISCUSSION**

314

315 The farming environment is an important source of exposure to microorganisms which can
316 cause respiratory disorders such as farmer's lung disease (Reboux et al., 2006a). Stable's air
317 and milk microbial composition have often been studied for health and cheese production
318 outcomes. Raw milk consumption has been proved to be associated with a diminution of
319 asthma and allergic diseases among farm children (Riedler et al., 2001; Perkin and Strachan,
320 2006; Waser et al., 2007). The farm environment is known to own a high microbial diversity
321 and studies have been carried on to highlight specific problematic, such as fungal
322 identification related to the farmer lung disease (Gregory and Lacey, 1963; Reboux et al.,
323 2001; Roussel et al., 2005), useful cheese-making bacteria for characterization of Comté raw
324 milks (Tormo et al., 2006; Kagkli et al., 2007), and pathogenic bacteria for milk quality
325 improvement (Christiansson et al., 1999; Magnusson et al., 2007). Microbial composition of
326 raw milk has often been described for characterization of Comté cheese but without
327 establishing how the farm environment influence the milk composition (Bouton et al., 1998;
328 Bouton et al., 2000; Berthier et al., 2001; Depoutilly et al., 2004). Our study goals were to
329 enlarge the knowledge of the microbial composition of raw milk and to identify the potential
330 routes of milk contamination in the farm by estimating the microbial contamination of
331 numerous environmental sources.

332 Considering all culture media, a total of 58 microbial taxa were identified in the milk samples,
333 47 of which were either fungi or environmental bacteria that are for most of them, not usually
334 looked for in the milk samples.

335 Lactobacilli and PAB were poorly found in farm samples except for the milk and cow teat
336 surface. The milk bacterial community included not only LAB and PAB (*Aerococcus*,
337 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*) but also
338 bacteria already encountered in cow milk such as *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*,
339 *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Shigonomas* and *Enterobacteriaceae*

340 (*Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pantoea*) (Delbes et al., 2007; Ercolini et al., 2009; Giannino
341 et al., 2009; Rasolof et al., 2010). Other adventitious bacteria (*Brachybacterium*,
342 *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Leuconobacter*, *Microbacterium* and coagulase-negative
343 staphylococci) commonly encountered at the surface of smear-ripened cheese (Denis and
344 Iringer, 2008) and previously detected in milk (Delbes et al., 2007) were also present.
345 However, the genus *Dermacoccus*, and *Pseudochorobacter* also encountered at the surface of
346 cheese and the genus *Deinococcus* and *Paracoccus* have never been mentioned in milk.
347 Microorganisms found on the teat surface may come from the cow litter on which they laid
348 before the milking (Zdanowicz et al., 2004), or natural flora of the cow skin.
349 Several bacterial species which have not been identified in other but milk samples in this
350 study (*Achromobacter hoggii*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *L. delbrueckii* sp.,
351 *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium oxydans*, *Paracoccus* sp.) could be originated
352 from the teat canal or from calf intestinal tracts (Gill et al., 2006; Kagkli et al., 2007; Busconi
353 et al., 2008). Krause et al. (Krause et al., 2003) showed that cow diet is a major factor
354 regulating the ecology of LAB and *Escherichia coli* along the digestive tract. Some halophilic
355 species such as *Dermacoccus* sp. which has been isolated in the salt used in elaborated food
356 (Contero and Zumalacargui, 2000) could come from animal feed. Others such as
357 *Deinococcus* sp. has been described in soil (Rainey et al., 2005).
358 In the air, dust and hay samples, the proportion of environmental microorganisms is so
359 important that it become difficult for minority bacteria to grow on the different culture media.
360 The resort to medium specialized in the growth of such bacteria doesn't allow to detect them
361 in environments in which they are too diluted, due to the limit of detection associated with the
362 different types of samples. The use of real time PCR on the different samples, targeting useful
363 cheese-making bacteria would have permit to identify and evaluate the presence and quantity
364 of such bacteria. However, most of the milk bacteria were also identified on the teat surface,

365 indicating that this compartment is probably, as shown by other authors (Christiansson et al.,
366 1999; Kagkli et al., 2007), a privileged route of milk contamination.
367 Overall, according to our knowledge, this study gives for the first time a good representation
368 of the microbial cultivable composition of the different compartments of the stables, including
369 air, hay, dust, milk, and cow skin. An important number of environmental bacteria and fungi
370 have been identified among the different samples. Environmental bacteria are numerous but
371 they are often found in only one kind of sample. Despite the important microbial
372 contamination of the stables, less than a third of the bacterial diversity is recovered in the milk
373 samples, indicating that there is an efficient but not impermeable barrier between the stable
374 and the milk. The same observation can be made for *Aspergillus* spp. which is often identified
375 in most of the samples but which is rarely found in the milk. The higher milk contamination
376 observed in stanchion barns compared to freestall barns can thus be explained by the physical
377 separation existing between the cows' living space and the milking room and by the cleaning
378 methods of the milking rooms in the freestall barn case. Fungal microorganisms identified in
379 the milk samples have been recovered in all other kind of samples. Particularly, white yeasts,
380 *Eurotium* spp. and *Penicillium* spp. were frequently identified in the milk, in the teat surface
381 and in the hay samples. The population of *Eurotium* ssp. and *Halleteria sebi*, the most
382 numerous fungi in hay samples reached a high level around 45000 CFU/g as previously
383 observed (Reboux et al., 2006a). Spearman correlation tests performed on stable air and
384 milking room air samples showed that there is an airborne transport/flow from the stable to
385 the milking room.
386
387 In conclusion, milk contamination by stable's environment remains considerable, even with
388 the presence of a milking room. Due to the difficulty to identify some microbial species in
389 the different types of samples, targeted real time PCR or DNA chips could be envisioned to

390 detect light presence of these bacteria in the different types of samples. Other sources of
 391 microbial contamination may be considered and samples like milking material (tank, piping),
 392 cow hairs and cow droppings may be sampled for further studies on farm microbial flows.
 393 This study gave us a wide overview of microbial flora in many environmental compartments
 394 of the farm and highlight teat surface and stable's air as the main sources of milk
 395 contamination.
 396
 397 **ACKNOWLEDGEMENTS**
 398 The work was financially supported by the Chambre Régionale d'Agriculture de Franche-
 399 Comté and by the Conseil Régional de Franche-Comté. The authors wish to thank Thierry
 400 Dubief and Michel Billot for technical assistance and the French farmers who participated in
 401 the project.

402 Amner, W., Edwards, C., McCarthy, A.J., 1989. Improved medium for recovery and
 403 enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridix*. Applied and
 404 environmental microbiology 55, 2669-2674.
 405 Berthier, F., Beuvier, E., Dassen, A., Grappin, G., 2001. Origin and diversity of mesophilic
 406 lactobacilli in Comté cheese as revealed by PCR with repetitive and species specific primers.
 407 Int. Dairy J. 11, 293-305.
 408 Beuvier, E., Buchin, S., 2004. Raw milk cheeses : Chemistry, Physics and Microbiology.,
 409 Elsevier Ltd, pp. 319-345.
 410 Bouton, Y., Buchin, S., Duboz, G., Pochet, S., Beuvier, E., 2009. Effect of mesophilic
 411 lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk
 412 Swiss-type cheese. Food Microbiology 26, 183-191.
 413 Bouton, Y., Guyot, P., Berthier, F., Beuvier, E., 2000. Investigation of bacterial community
 414 development from raw milk and whey starter to curd and mature Comté cheese.. Abstracts of
 415 IDF Symposium "cheese ripening and technology". Banff, Canada, p. 85.
 416 Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R., 1998. Preliminary characterization of microflora of
 417 Comté cheese. Journal of applied microbiology 85, 123-131.
 418 Bouton, Y., Tessier, L., Guyot, P., Beuvier, E., 2005. Relationships between dairy farmer
 419 practices and the levels of microbiological populations in milk used for Comté cheese-
 420 making. Rev. Rech. Ruminants 12, 403.
 421 Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Wasser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr,
 422 D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R.P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., von Mutius, E.,
 423 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.
 424 The New England journal of medicine 347, 869-877.
 425 Busconi, M., Reggi, S., Fogher, C., 2008. Evaluation of biodiversity of lactic acid bacteria
 426 microbiota in the calf intestinal tracts. Antonie van Leeuwenhoek 94, 145-155.
 427 Callon, C., Berdague, J.L., Dufour, E., Montel, M.C., 2005. The effect of raw milk microbial
 428 flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. Journal of dairy science 88, 3840-
 429 3850.
 430 Callon, C., Duthoit, F., Delbes, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Cremoux, R., Montel,
 431 M.C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year:
 432 molecular approaches. Systematic and applied microbiology 30, 547-560.
 433 Christiansson, A., Bertilsson, J., Svensson, B., 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk:
 434 factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Journal of dairy science
 435 82, 305-314.
 436 Cordero, M.R., Zumalacarrégui, J.M., 2000. Characterization of *Microcococcus* isolated
 437 from salt used for Spanish dry-cured ham. Letters in Applied Microbiology 31, 303-306.
 438 Dassen, G., Smuty, J., Teuber, M., Meile, L., 1998. Classification and identification of
 439 propionibacteria based on ribosomal RNA genes and PCR. Systematic and applied
 440 microbiology 21, 251-259.
 441 Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe,
 442 A., Gacermann, S., Renz, H., Holst, O., Heine, H., 2007. *Acinetobacter baumannii* and
 443 *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective
 444 properties. The Journal of allergy and clinical immunology 119, 1514-1521.
 445 Delbes, C., Ali-Mandjee, L., Montel, M.C., 2007. Monitoring bacterial communities in raw
 446 milk and cheese by culture-dependant and independent 16S rRNA gen-based analyses.
 447 Applied and environmental microbiology 73, 1882-1891.
 448 Denis, C., Iringer, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms : Aerobic
 449 coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. International Journal
 450 of food microbiology 126, 311-315.

451 Depoutilly, A., Druifene, F., Beuvier, E., Berthier, F., 2004. Genotypic characterisation of the
452 dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait* 84, 153-167.

453 Donnelly, C.W., 2001. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses
454 prepared from raw-milk : a review. *Bulletin of the International Dairy Federation* 369, 16-27.

455 Driman, F.D., Cogan, T.M., 1992. Detection of propionic acid bacteria in cheese. *The Journal*
456 *of dairy research* 59, 65-69.

457 Dubernet, S., Desmaures, N., Gueguen, M., 2002. A PCR-based method for identification of
458 *Lactobacilli* at the genus level. *FEMS microbiology letters* 214, 271-275.

459 Ercolini, D., Russo, F., Ferracino, L., Villani, F., 2009. Molecular identification of mesophilic
460 and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26, 228-231.

461 Gay, M., Amgar, A., 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk
462 and in soft cheese made from raw milk. *Lait* 85, 153-170.

463 Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., Felgini, M., 2009. Study of microbial diversity
464 in raw milk and fresh curd for Fontina cheese production by culture-independent methods.
465 *International journal of food microbiology* 130, 188-195.

466 Gill, J.J., Sabour, P.M., Gong, J., Yu, H., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., 2006.
467 Characterization of bacterial populations recovered from the test canals of lactating dairy and
468 beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 56, 471-481.

469 Godon, J.J., Zumbstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial
470 diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis.
471 *Applied and environmental microbiology* 63, 2802-2813.

472 Gregory, P.H., Lacey, M.E., 1963. Mycological examination of dust from mouldy hay
473 associated with farmer's lung disease. *Journal of general microbiology* 30, 75-88.

474 Hettlinga, D.H., Vedamuthu, E.R., Reinbold, G.W., 1968. Pouch method for isolating and
475 enumerating Propionibacteria. *Journal of dairy science* 51, 1707-1709.

476 Isohni, D., Grand, M., Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und
477 fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweizerische Milchwissenschaftliche Forschung*
478 *19, 57-59.*

479 Kakkil, D.M., Vancannest, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M., 2007. *Listerococcus*
480 and *Listobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International*
481 *journal of food microbiology* 114, 243-251.

482 Krause, D.O., Smith, W.J.M., Conlan, L.L., Gough, J.M., Williamson, M.A., McSweeney,
483 C.S., 2003. Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the
484 digestive tract of cattle : neural networks and 16S rRNA. *Microbiology* 146, 57-65.

485 Lopez-Benavides, M.G., Williamson, J.H., Pullinger, G.D., Lacey-Hulbert, S.J., Cursons, R.T.,
486 Leigh, J.A., 2007. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a
487 pasture-based dairy farm. *Journal of dairy science* 90, 5558-5566.

488 Magnusson, M., Christjánsson, A., Sveinsson, B., 2007. *Bacillus cereus* spores during housing
489 of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of dairy science* 90, 2745-
490 2754.

491 Michel, V., Hauwuy, A., Chambaz, J.F., 2006. [Gestion de la flore microbienne des laits crus
492 par les pratiques des producteurs.]. *Revue Rech. Ruminants* 13, 309-312.

493 Michel, V., Hauwuy, A., J.F., C., 2001. Raw cow milk microflora : diversity and influence of
494 conditions of production. *Lait* 81, 575-592.

495 Millet, L., Saubusse, M., Didiemne, R., Tessier, L., 2006. Control of *Listeria*
496 *monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International journal of food microbiology* 108, 105-114.

497 Montel, M.C., Beuvier, E., Hauwuy, A., 2003. [Pratiques d'élevage, microflore du lait et
498 produits dérivés.]. *INRA Prod. Anim* 16, 279-282.

499 Normand, A.C., Vacheyrou, M., Sudre, B., Heederik, D.J., Piarroux, R., 2009. Assessment of
500 dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Applied*
501 *and environmental microbiology* 75, 7617-7623.

502 Perkin, M.R., Strachan, D.P., 2006. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse
503 association with childhood allergy? *The Journal of allergy and clinical immunology* 117,
504 1374-1381.

505 Rainey, F.A., Ray, K., Ferreira, M., Gatz, B.Z., Nobre, M.F., Bagaley, D., Rash, B.A., Park,
506 M.J., Earl, A.M., Shank, N.C., Small, A.M., Henk, M.C., Battista, J.R., Kamper, P., da
507 Costa, M.S., 2005. Extensive Diversity of Ionizing-Radiation-Resistant Bacteria Recovered
508 from Sonoran Desert Soil and Description of Nine New Species of the Genus *Deinococcus*
509 Obtained from a Single Soil Sample. *Applied and environmental microbiology* 71, 5225-
510 5235.

511 Rasolofoa, A.E., Si-Celalis, D., Lapointe, G., Roy, D., 2010. Molecular analysis of bacterial
512 population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk.
513 *International journal of food microbiology* 138, 108-118.

514 Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnet, K., Dalphin,
515 J.C., 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *American journal of*
516 *respiratory and critical care medicine* 163, 1534-1539.

517 Reboux, G., Reiman, M., Roussel, S., Taattola, K., Millon, L., Dalphin, J.C., Piarroux, R.,
518 2006a. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish
519 and French farms. *Ann Agric Environ Med* 13, 267-273.

520 Reboux, G., Roussel, S., Grenouillet, F., 2006b. [Fungi in agricultural environment]. *Journal*
521 *de Mycologie Médicale* doi:10.1016/j.mycomed.2006.09.003.

522 Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Wasser, M., Maisch, S., Carr, D.,
523 Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., 2001. Exposure to farming in early life and
524 development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129-1133.

525 Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.C., Pernet, D., Laplante, J.J., Millon, L., Piarroux, R.,
526 2005. Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study.
527 *Mycopathologia* 160, 273-279.

528 Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J.L., Scricsys, F., 1993. Risk factors associated with
529 contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *Journal of dairy science*
530 *76, 2891-2898.*

531 Sevi, A., Alhenzio, M., Muscio, A., Casamassima, D., Centoducati, P., 2003. Effects of litter
532 management on airborne particulates in sheep houses and on the yield and quality of ewe
533 milk. *Livestock Production Science* 81, 1-9.

534 Tilsala-Timisjärvi, A., Alatosava, T., 2001. Characterization of the 16S-23S and 23S-5S
535 rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-
536 specific primers by PCR. *International journal of food microbiology* 68, 45-52.

537 Torro, H., Ali Haimoud, D., Laifher, C., 2006. Useful microflora of raw cow and goat milk :
538 main sources, impact of breeding practices. *Revue Rech. Ruminants* 13, 305-308.

539 Wasser, M., Miehsel, K.B., Biedl, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M.,
540 Riedler, J., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Lauener, R., Braun-
541 Fahrlander, C., 2007. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy
542 in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37, 661-670.

543 Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A., 2004.
544 Bacterial populations on test ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either
545 sand or sawdust. *Journal of dairy science* 87, 1694-1701.

546
547

Table 3: Geometric mean and confidence interval of the 15 environmental microbial taxa in the eight kind of samples.

Microbial taxa	Air		Milk		Milk + Air		Milk + Air + Milk		Milk + Air + Milk + Room		Milk + Air + Milk + Room + Air		Milk + Air + Milk + Room + Air + Milk		Milk + Air + Milk + Room + Air + Milk + Room	
	N	GM	N	GM	N	GM	N	GM	N	GM	N	GM	N	GM	N	GM
Mueller-Hinton and Drigalski media	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Bacillus	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Streptococcus	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Enterococcus	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Clostridium	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Staphylococcus	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microcococcus	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microbacterium	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microthricum	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microthricum	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microthricum	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3
Microthricum	10	1.2	10	1.5	10	1.8	10	2.1	10	2.4	10	2.7	10	3.0	10	3.3

Legend: N = number of positive farms, GM = geometric mean by positive farms, GM/100 = geometric mean divided by 100%, L-CI95 = Lower 95% Confidence Interval, U-CI95 = Upper 95% Confidence Interval, L-CI95/100 = Lower 95% Confidence Interval divided by 100%, U-CI95/100 = Upper 95% Confidence Interval divided by 100%. ¹ Bacilli gram negative, Bacilli gram positive and Clostridium positive grouped. ² all fungal species growing on Maltagar and DG18 grouped.

Table 4: correlation between microbial quantity in the air of the stable and in the air of the milking room.

	Air Before Work vs Air Milking Room		Air After Work vs Air Milking Room	
	Spearman's rho	p	Spearman's rho	p
Mueller-Hinton and Drigalski media				
Bacilli gram negative	0.30	0.43	0.18	0.68
Bacilli gram positive	0.10	0.64	-0.15	0.59
Clostridium positive	-0.43	0.25	0.35	0.39
Difco actinomycetes medium				
Micropilactinomyces	0.35	0.12	0.65	0.02*
R8 medium				
Thermophilic Actinomyces	0.22	0.55	-0.13	0.74
Maltagar and DG18 media				
Aspergillus spp.	0.11	0.78	0.09	0.91
Othofungi	0.49	0.16	0.51	0.16
Candida spp.	0.27	0.48	0.69	0.10
Eurotium spp.	0.38	0.32	0.20	0.61
Wine yeasts	-0.43	0.24	0.45	0.13
Rod yeasts	0.31	0.42	0.75	0.02*
Mucorales spp.	0.04	0.81	0.12	0.75
Penicillium spp.	0.47	0.20	0.89	0.10
Valoniopsis spp.	0.78	0.01*	0.81	0.01*
Total microorganisms	0.35	<0.0001*	0.56	<0.0001*

Legend : * = p < 0.05.

ANNEXE 8 : Article “High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment?”

Allergy 2009 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.01958.x

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Munksgaard
DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.01958.x

Original article

High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment?

Background: There is evidence of an allergy protective effect in children raised on farm. It has been assumed that microbial exposure may confer this protection. However in farm, little attention has been given to the pollen level and to concomitant microbiological exposure, and indoor pollen concentrations have never been precisely quantified.

Methods: The kinetics of pollen in dairy farms have been studied in a pilot study ($n = 9$), and exposure in a sub-sample of the ongoing European birth cohort PASTURE ($n = 106$). Measurements of viable microorganisms and pollen were performed in air samples. To identify factors that modulate the pollen concentration multivariate regression analyses were run.

Results: Indoor pollen (95% of *Poaceae* fragments and grains) were significantly higher in winter than in summer ($P = 0.001$) and ranged between 858 to 11 265 counts/m³ during feeding in winter, thus exceeding typical outdoor levels during the pollen season. Geometric mean in French farms was significantly higher than in German and Swiss farms (7 534, 992 and 1 079 count/m³, respectively). The presence of a ventilation system and loose housing systems significantly reduced indoor pollen levels. This pollen concentration rise after feeding was accompanied by an increase in fungal and actinomycetal levels, whereas the concentration of bacteria was not associated with feeding.

Conclusions: Farmers and their children who attend cowsheds during the feeding sessions are exposed perennially to high pollen concentrations. It might be speculated that the combined permanent exposure to microbes from livestock and grass pollen may initiate tolerance in children living on a farm.

B. Sudre¹, M. Vacheyrou¹, C. Braun-Fahrländer², A.-C. Normand¹, M. Waser², G. Roboux¹, P. Ruffaldi¹, E. von Mutius³, R. Piarroux^{1,4} and the PASTURE study group*

¹CNRS-Université de Franche-Comté/UMR 6249 Laboratoire Chrono-environnement, France;

²Institute of Social and Preventive Medicine, University of Basel, Switzerland; ³University of Munich, University Children's Hospital, Germany;

⁴University hospital de la Timone, Parasitology and mycology laboratory, Marseille, France

Key words: allergens; asthma; environment; epidemiology; hygiene hypothesis; pollens.

Sudre Bertrand

CNRS-University of Franche-Comté/UMR 6249

Laboratoire Chrono-environnement

Parasitology-Mycology department

University hospital of Besançon

France

*The PASTURE study group: G. Weiß, E. Üblagger, C. Humer, M. Rußegger, J. Riedler (Austria); R. Juntunen, R. Tiihonen, P. Tiittanen, M. R. Hirvonen, K. Huttunen, S. Virtanen, T. Kauppi, A. Novalainen, A. Hyvärinen, T. P. Tuomainen, A. Karvonen, M. Roponen, S. Remes, J. Pekkanen (Finland); D. A. Vaitton, J. C. Dalphin, M. L. Dalphin, S. Roussel (France); M. J. Ege, G. Büchele, S. Schmid, S. Hill, N. Korherr, J. Genuneit, R. Peter, Serdar Sel, N. Blüner, P. Pfefferle, I. Herzum, S. Krauss-Etschmann, H. Renz (Germany); U. Gehring, B. Brunekreef (the Netherlands); S. Bitter, F. H. Sennhauser, S. Loeliger, J. Steinle, R. Frei, R. P. Lauener (Switzerland).

Accepted for publication 24 November 2008

Charles Harrison Blackley observed that ‘farmers and other individuals who were chronically exposed to high levels of pollen appeared to be unaffected by this exposure’ (Blackley, 1873). From the turn of the 21st century, the ‘farmer paradox’ has received new support from epidemiological studies, which gave evidence for a protection against allergic diseases by farm environments (1, 2). These studies have become part of the ‘hygiene hypothesis’, assuming that microbial exposure in farm environments confers this protection (3–5). Whereas the

protective influence of massive inhalation of cat and/or dog allergens has been shown (6–8), raising the hypothesis of tolerance induction by antigen exposure in early life (9), pollen exposure on a farm has not received much attention and has never been precisely quantified.

The interest in measuring pollen exposures within farms in addition to microbial compounds has been further stimulated by recent findings of the ongoing birth cohort PASTURE including 500 farm children and 500 nonfarm children from rural areas of five European

countries (10). The study provided evidence of an inverse relationship between maternal exposure to animal sheds during pregnancy and infants' cord blood immunoglobulin E (IgE) against seasonal allergens which was enhanced by maternal contact to hay during pregnancy (11).

We hypothesized that subjects attending cowsheds might (1) be exposed not only to high levels of microbes but also to high levels of grass pollen and (2) that different farm characteristics might influence the indoor pollen concentrations. To evaluate these hypotheses, we measured levels of pollen and bacteria in air samples of stables of a subgroup of PASTURE farms.

Materials and methods

Study design

A pilot study was performed in nine French farms located in the Franche-Comté region to establish the kinetics of pollen settlement after hay distribution for cattle feeding. Measurements were performed in winter before starting the feeding session (T1), 5 min after starting the feeding session (T2) and 5 min (T3), 30 min (T4) and 55 min after completing the feeding session (T5) respectively (Fig. 1). Each farm has been sampled two times in winter season for pollen kinetic assessment.

Among the PASTURE cohort families (10), a random sample of 106 farmer's families were selected to participate in the exposure study. Farms were visited once in winter (2004/2005) and once in summer 2005. Pollen measurements were performed 20 min before feeding (T1) and 5 min after the beginning of fodder distribution

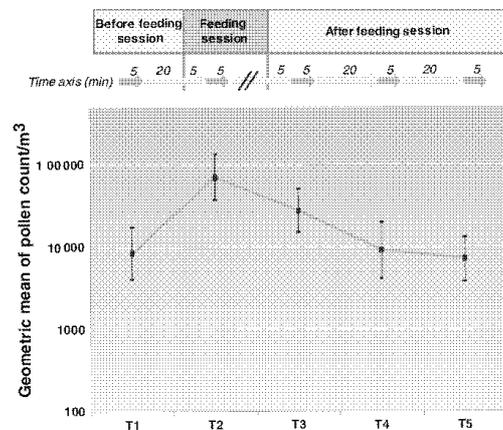


Figure 1. Indoor pollen counts/m³ in winter before, during and after the feeding session in nine French cowsheds (geometric means and 95% confidence intervals, $n = 18$ per time point). Measurements were taken during 5 min intervals each. (T1) 25 min before the start of the feeding session, (T2) 5 min after the start of the feeding session, (T3) 5 min, (T4) 30 min and (T5) 55 min after the end of the feeding session.

(T2). During summer, T2 samples could only be measured in 63% of the farms, because cattle was not fed in the cowsheds.

For a sub-sample of 70 farms, additional measurements of bacteria and fungi in air samples were available. These samples were collected at (T1) and immediately following (T3) during 20 min each. The samples were collected by fieldworkers and analysed in the Parasitology and Mycology Laboratory of the University of Franche-Comté, the Swiss and German samples being sent by express mail. Information about farm characteristics and agricultural practices was obtained by the main PASTURE questionnaires (10) and an additional short questionnaire completed during the field visit.

Pollen measurements

Collection of pollen was based on active impaction of air particles (with a 3 L/min flow) on a membrane during a 5-minute pumping session using an Gil-Air 3 pump (Sensidyne®, Clearwater, FL, USA), fixed on a tripod at a fixed height of 75 cm. The device was located at a central place of the cowshed. The pumps were equipped with a removable plastic cassette (37 mm; Sensidyne) that contained a polypropylene membrane covered with a mixed petrolatum/toluene solution. In the laboratory, the membrane was transferred and fixed on a glass slide, then coloured with fuchsin for counting. Microscopic examination was performed by direct reading, covering 11 adjacent fields (CF) of 0.48 mm in diameter from centre (CF1) to periphery (CF10 and CF11). Counting included pollen grains, folded pollen and fragments of pollen grains which were summed up to total pollen counts. To estimate the pollen count (PC) of the central part of the membrane (5.28 mm²), the following formula was used:

$$PC = 1.5[CF1 + 4(CF2 + CF3) + 8(CF4 + CF5) + 12(CF6 + CF7) + 16(CF8 + CF9) + 20(CF10 + CF11)]$$

Identification of pollen was performed by palynologists according to reference manuals (12). Results were expressed in pollen counts per membrane and further converted to pollen counts/m³.

Bacterial measurements

Bacterial samples were collected on the same device using a cassette (37 mm; Sensidyne) containing a Teflon® filter (pore diameter of 0.45 µm; Millipore Sensidyne). Filters were rinsed with 10 ml of 0.1% Tween 80 sterile water (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and shaken for 10 min in Stomacher (AES Laboratoire, Combourg, France). Two-hundred and fifty microliters of 10-fold dilutions was spread on Petri dishes with Müller-Hinton medium (MH; Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) incubated at 30°C for culture of thermotolerant aerobic bacteria species, with Difco actinomycetes isolation agar (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France) at 30°C for mesophilic actinomycetes and with R8 medium according to Amner and colleagues at 52°C to recognize thermophilic actinomycetes (13). Actinomycetes colonies were identified on macroscopic and microscopic criteria and hydrolysis of casein and temperature test. Results were expressed in Colony Forming Unit per cubic meter (CFU/m³) after 48 h of incubation for thermotolerant aerobic bacteria species and after 7 days of incubation period for actinomycetes. The five most frequent phenotypes of thermotolerant aerobic bacteria species were isolated based on macroscopic characteristics, stained by Gram procedure and conserved at -80°C in glycerol-heart-brain medium.

Phenotypes from before work ($n = 33$) and after work ($n = 30$) samples were identified by sequencing polymerase chain reaction (PCR) at species level. Bacterial DNA of given phenotypes was extracted as described by Drancourt et al. (14) and 100 μ l of the supernatant was collected. rD1 and rD1 were used as primers for 16S rDNA PCR (15). DNA amplification was performed with 0.5 μ M of primers rD1 and rD1, 200 μ M of dNTP, 1 mM of MgCl₂, 1x of redTaq buffer, 0.01 U of redTaq, and 1 μ l of DNA sample. The reaction mixture was subjected to the PCR program as reported by Paster et al. (16). The amplification products of each reaction were analysed by electrophoresis for 60 min at 80 V in agarose (1.5%) gels. DNA bands were visualized by UV transillumination. For sequencing, the mix contained DNA polymerase, pyrophosphatase, buffer, dNTPs, dye terminators, DNA templates, water and internal reverse primer P-519 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'), that allowed to sequence a 497-bp fragment. The sequencing mixture was subjected to 35 cycles of 20 s denaturation at 96°C, 20 s primer annealing at 50°C and 2 min primer extension at 60°C. The reading was performed with Ceq8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and compared to the NCBI genbank database using Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Molecular identification at genus level was defined by sequence similarity higher than 97% (17, 18).

Fungal measurements

Two-hundred and fifty microliters rinsing solution from filter were spread on two different Petri dishes: Dichloran-Glycerol (Oxoid LTD, Basingstoke, England) with 0.5% of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 30°C for mesophilic mould isolation and 3% malt-agar (AES, Bruz, France) with 10% salt and 0.5% chloramphenicol for osmophilic fungal species. Fungal colonies were identified on macroscopic and microscopic criteria and results were expressed in CFU/m³ after 7 days of incubation period.

Statistical analysis

Pollen and microbial counts were log transformed and expressed as geometric mean counts/m³ for different sampling time points. Zero values were replaced by half of the detection limit. Comparison of viable species count was performed with Wilcoxon paired test. To evaluate the association between pollen concentrations and farm characteristics taking into account the repeated measurements, a generalized linear latent and mixed model (GLLAMM in STATA) was run with farm as random effect. Variables associated with pollen counts in univariate analyses ($P < 0.25$) were included in the final multivariate model. Results were expressed as (adjusted) geometric means ratio and 95% confidence interval (CI). The analyses were restricted to winter pollen measurements. To evaluate factors associated with an increase of pollen concentration between T1 and T2 a separate multivariate regression model was run with the difference between T1 and T2 (log transformed) as the dependent variable. Statistical analyses were performed using Stata 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Results

Microscopic examination of the pollen glass slides indicated that more than 95% of the pollen grains, folded grains and fragments originated from Poaceae (grass

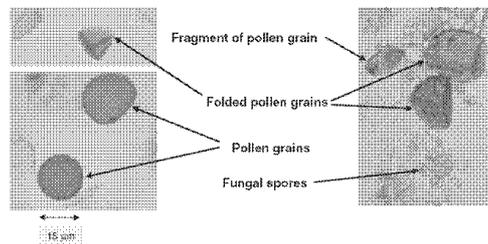


Figure 2. Microscopic examination of a pollen sampling membrane. Microscopic examination of pollen slide preparation at magnification $\times 400$.

family); the remaining 5% included Apiaceae, Pinaceae, Betulaceae and Asteraceae (Fig. 2). The size of the pollen grains (60% of total counts) ranged between 15 and 25 μ m; pollen fragments were $< 15 \mu$ m in diameter and accounted for 15% of total counts.

Figure 1 illustrates that pollen counts/m³ were the highest during the feeding session (T2), persisted after the feeding session at T3 and then dropped rapidly. Country-specific geometric means of pollen counts/m³ at T1 and T2 in winter are shown in Fig. 3. During feeding, mean pollen counts/m³ increased by a factor of 17.2, 10.2, and 3.0 in France, Switzerland and Germany respectively and ranged between 858 and 11 265 counts/m³. In the nine French pilot farms, the observed values exceeded 15 000 counts/m³.

Mean indoor pollen counts in winter were significantly higher than in summer [pollen counts/m³ T1 winter 345 (95% CI 231–516), T2 winter 2 214 (95% CI 1368–3581) T1 summer 120 (95% CI 78–183), T2 summer 167 (95% CI 93–300)]. Geometric means of thermotolerant aerobic

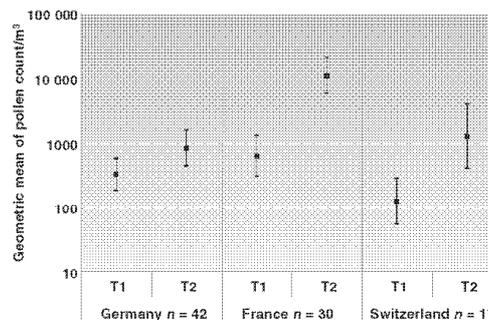


Figure 3. Country-specific indoor pollen counts/m³ in winter before (T1) and during (T2) feeding session (geometric means and 95% CI); $n = 89$ cowsheds. (T1) 25 min before the start of the feeding session and (T2) 5 min after the start of the feeding session.

Table 1. Farm characteristics, stratified by country

		Total, n = 106 (%)†	Germany, n = 57 (%)	France, n = 32 (%)	Switzerland, n = 17 (%)	P-value*
Cowshed characteristics						
Altitude meters above sea level, arithmetic mean (95% CI)		639 (607–671)	686 (667–706)	592 (499–684)	577 (520–633)	0.007
Type of cowshed	Tie-stalls	67	75	55	60	0.129
	Loose housing systems	33	25	45	40	
Number of cows	Geometric mean (95% CI)	42.4 (36.3–49.5)	39.3 (30.0–50.1)	58.9 (48.1–72.0)	26.9 (18.9–38.3)	0.010
Cowshed volume (m ³)	Geometric mean (95% CI)	1015 (822–1253)	795 (595–1063)	2084 (1624–2850)	594 (392–899)	0.002
Ventilation system	Yes	23	26	19	12	0.304
	No	77	72	81	88	
Agricultural practices						
Hay storage system	Loose hay only	35	43	13	49	<0.001
	Storage of hay balls	31	16	68	13	
	Both systems	34	41	19	38	
Fodder type	Hay only	35	4	74	67	<0.001
	Hay and silage (grass and/or maize)	65	96	26	33	
Transport of hay to stable	Manually	78	70	81	100	0.036
	Hole in the ceiling	22	30	19	0	
Feeding system	By hand	90	85	93	100	0.191
	Mechanical	10	15	7	0	
Quantity of fodder (kg/day)						
Quantity of hay	Geometric mean (95% CI)	277 (223–343)	147 (118–183)	573 (414–794)	413 (270–634)	<0.001
Quantity of silage (hay and/or maize)	Geometric mean (95% CI)	810 (584–1123)	952 (594–1305)	1118 (364–3436)	142 (29–703)	0.002
	No silage	39	12	69	71	

CI, confidence interval.

†Computed among those answering a specific question. Internal nonresponse/missing rate was <15% for all characteristics.

*P-value from chi-squared test (categorical variables) or ANOVA test (continuous variables) to assess differences between countries.

bacteria species were 2.82×10^4 CFU/m³ and 3.62×10^4 CFU/m³ before (T1) and after work (T3) respectively, corresponding to a nonsignificant increase by a factor of 1.3 ($P = 0.28$). About 75% of the bacteria were gram positive and 25% gram negative. The three genera representing more than 70% of species identified by PCR were *Staphylococcus* spp. (46.5% and 47.8% before and after work, respectively), *Corynebacterium* spp. (16.3% and 5.4%) and *Bacillus* spp. (15.3% and 18.3%).

Geometric mean of total of fungi spp. significantly increased between T1 (7.8×10^3 CFU/m³) and T3 (27.4×10^3 CFU/m³) by a factor of 3.51 ($P < 0.001$). The same trend was found for actinomycetes spp. comparing T1 (1.8×10^3 CFU/m³) and T3 (4.7×10^3 CFU/m³) leading to an increase of a factor 2.7 ($P < 0.001$). The results will be presented in detail in a separate paper.

Farm characteristics differed in many aspects between the countries (Table 1). The associations between these farm characteristics and winter indoor pollen counts/m³ were evaluated in multivariate regression models (Table 2). In cowsheds with loose housing systems, indoor pollen counts were significantly lower than in tie-stalls and the use of mechanical ventilation system significantly lowered indoor pollen levels. In French farms, significantly higher indoor pollen levels were

measured than in German and Swiss farms and none of the tested farm characteristics could explain this difference.

To evaluate factors associated with an increase in pollen counts/m³ between T1 and T2, multivariate models were run indicating that the increase was somewhat higher in French farms compared with German farms [adjusted odd ratio (OR) (95% CI) 5.66 (0.90–35.5), $P = 0.06$], when only hay was fed compared to silage and hay [adjusted OR (95% CI) 4.78 (0.87–26.2), $P = 0.07$], when loose hay was stored compared to storage in balls [adjusted OR (95% CI) 3.44 (0.99–11.9), $P = 0.05$], but lower in loose housing systems compared with tie-stalls [adjusted OR (95% CI) 0.13 (0.03–0.62), $P = 0.01$]. The quantity of fodder did not further explain the increase in pollen counts/m³.

Discussion

This study demonstrates that exposure to grass pollen in cowsheds is massive and peaks during cattle feeding. Its level is recorded all year round, exceeds outdoor concentrations by a large amount (19, 20) and is particularly high in winter. Farmers and their children who attend stables during the feeding sessions are thus perennially exposed to high pollen concentrations.

Role for the allergy-protective effects of environment

Table 2. Crude and adjusted association between farm characteristics and indoor pollen counts/m³ GMR and 95% CI, n = 89 cowsheds

Predictor variables	Geometric mean pollen count/m ³	Crude models		Mutually adjusted model	
		GMR (95% CI)	P-value	GMR (95% CI)	P-value
Time point*	T1	345	1	1	
	T2	2214	6.50 (3.71–11.40)	<0.001	5.87 (3.36–10.26)
Country	Germany	992	1	1	
	France	7634	4.79 (2.37–9.68)	<0.001	4.73 (1.83–12.20)
	Switzerland	1079	0.77 (0.33–1.81)	0.554	0.75 (0.28–1.99)
Type of cowshed	Tie-stalls	2499	1	1	
	Loose housing systems	1278	0.65 (0.31–1.34)	0.239	0.30 (0.14–0.66)
Cowshed volume (m ³)	1st tertile (70–710)	1305	1	1	
	2nd tertile (750–1470)	2312	1.28 (0.58–2.83)	0.534	0.99 (0.49–2.02)
	3rd tertile (1471–18 900)	2690	1.96 (0.86–4.48)	0.111	1.41 (0.56–3.52)
Ventilation system	Yes	915	1	1	
	No	2503	2.04 (0.92–4.51)	0.079	3.17 (1.53–6.56)
Hay storage system	Loose hay only	1377	1	1	
	Bales with/without loose hay	2457	2.16 (1.07–4.35)	0.031	1.18 (0.63–2.20)
Fodder type	Hay only	5415	1	1	
	Hay and silage	1063	0.35 (0.18–0.70)	0.003	0.82 (0.35–1.93)

GMR, geometric means ratios; CI, confidence interval.

*T1) 25 min before the start of the feeding session and (T2) 5 min after the start of the feeding session.

The presence of a ventilation system and loose housing systems significantly reduced indoor pollen levels. Yet, in French farms, significantly higher pollen levels were measured compared with German or Swiss farms and this difference could not be explained by taking into account farm characteristics, which significantly differed between the countries. The increase in pollen concentrations during a feeding session was most notably related to feeding hay only and not feeding silage. On some of the French farms (especially in Franche-Comté), feeding silage is not allowed because of cheese production regulations and this might partly explain the high pollen levels measured in French farms, notably in those of the pilot study.

Concomitant to the rise in pollen concentrations associated with feeding the cattle, levels of total fungi also increased, whereas the airborne levels of thermotolerant aerobic bacteria were not significantly related to the feeding process. This is most likely because hay is not the predominant source of bacteria in cowsheds. In addition, only a limited part of the bacterial biodiversity was measured in the present study. In line with previous research on the bacterial composition of animal shed dust, the present study of stable air samples found *Bacillus* spp. to be one of the most prevalent bacterial species. *In vitro*, *Bacillus licheniformis* spores have been found to activate a Th1-cytokine expression profile (21). Other bacterial species, abundant in cowshed microflora, namely *Lactococcus lactis* (gram-positive) and *Acinetobacter baumannii* (gram-negative), have recently been shown to protect mice against the development of an allergic airway inflammation that might be because of the Th1 promoting effect of these bacteria (22).

The present study showed that in addition to microbial exposure in stable air high levels of grass pollen could be

measured. One might therefore speculate that differential pollen exposure patterns contribute to the 'protective farming effect' because of tolerance induction in subjects exposed to repeated and massive inhalation of pollen. Although specific immunotherapy leading to tolerance uses 'low doses' of allergens, 'high dose' induction of tolerance against allergic sensitization is suggested by the epidemiological studies, which show a negative relationship between cat allergen exposure in infancy and risk of sensitization to cat and more generally atopic sensitization (7, 23). Animal models suggest that continuous exposure is likely to be crucial. In mice models of allergenic sensitization, acute or discontinuous inhalation of the allergen induced IgE sensitization, bronchial hyperresponsiveness and inflammation, but chronic exposure to the same allergen led to tolerance. Interestingly, inhalational tolerance induced by continuous ovalbumin exposure demonstrated bystander suppression of cockroach allergen-mediated airway eosinophilia (24). Such a 'bystander effect' could explain why children living on a farm are not only protected against allergy to seasonal allergens but also, more globally, to other environmental allergens. However, farming exposure could lead to tolerance in a more complex way (25) and a possible role for an 'allergen-induced tolerance', mainly driven by continuous exposure to pollen, does not preclude the additional and decisive influence of microbial components of the farm environment. The most recent results of the PASTURE study suggest that combined permanent exposure to livestock and grass pollen through their mothers may initiate tolerance in children living on a farm in their foetal life (11). But more research is needed to determine how these exposures interact with the developing immune system. Yet, high levels of allergen

exposure together with high levels of microbial (bacterial and fungal) exposure may result in the allergy protective

effect of childhood animal shed exposure as seen in numerous farm studies.

References

1. von Mutius E, Radon K. Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;**28**:631–647. ix–x.
2. von Mutius E. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc Am Thorac Soc* 2007;**4**:212–216.
3. Braun-Fahrlander C, Lauener R. Farming and protective agents against allergy and asthma. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:409–411.
4. Remes ST, Iivanainen K, Koskela H, Pekkanen J. Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:427–434.
5. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:969–977 (quiz 978).
6. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001;**357**:752–756.
7. Platts-Mills TA, Vaughan JW, Blumenthal K, Pollart Squillace S, Sporik RB. Serum IgG and IgG4 antibodies to Fel d 1 among children exposed to 20 microg Fel d 1 at home: relevance of a nonallergic modified Th2 response. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;**124**:126–129.
8. Custovic A, Hallam CL, Simpson BM, Craven M, Simpson A, Woodcock A. Decreased prevalence of sensitization to cats with high exposure to cat allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**108**:537–539.
9. Hesselmar B, Aberg N, Aberg B, Eriksson B, Björkstén B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy* 1999;**29**:611–617.
10. von Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 2006;**61**:407–413.
11. Ege MJ, Herzum I, Buchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Roponen M et al. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:407–412. 412 e1–e4.
12. Smith E. Sampling and Identifying Allergenic Pollens and Molds: An Illustrated Identification Manual for Air Samples. Texas: Blewstone Press, 1990.
13. Amner W, Edwards C, McCarthy AJ. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *Appl Environ Microbiol* 1989;**55**:2669–2674.
14. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:3623–3630.
15. Weisburg WG, Barns SM, Peletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991;**173**:697–703.
16. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;**183**:3770–3783.
17. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001;**6**:313–321.
18. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:2761–2764.
19. Burr ML, Emberlin JC, Treu R, Cheng S, Pearce NE. Pollen counts in relation to the prevalence of allergic rhinoconjunctivitis, asthma and atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:1675–1680.
20. Jaeger S. Exposure to grass pollen in Europe. *Clin Exp Allergy Rev* 2008;**8**:2–6. Available at <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119421539/PDFSTART>.
21. Vogel K, Blumer N, Korhals M, Mittelstadt J, Garn H, Ege M et al. Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:307–312.
22. Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E et al. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**:1514–1521.
23. Woodfolk JA. High-dose allergen exposure leads to tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;**28**:43–58.
24. Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharaee-Kermani M, Phan SH et al. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. *Am J Pathol* 2004;**164**:295–304.
25. Stern DA, Riedler J, Nowak D, Braun-Fahrlander C, Swoboda I, Balic N et al. Exposure to a farming environment has allergen-specific protective effects on TH2-dependent isotype switching in response to common inhalants. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**:351–358.

PERMIS D'IMPRIMER

**THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° 25.10.07

Présentée par Madame, Monsieur, **NORMAND Anne-Cécile**
Né(e) le 23 Avril 1981

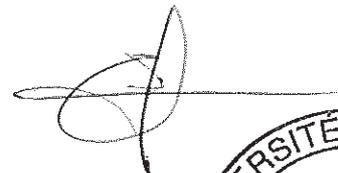
et ayant pour titre : *Etude des flux microbiens dans les étables de
production laitière de Franche-Comté et de Bavière.
Intérêts dans les domaines de l'asthme et de l'allergie*

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le 8 7 2010

Le Directeur de Thèse,

Le Directeur de l'U.F.R. S.M.P.



Le Professeur E. SAMAIN



PROPOSITION DE MOTS-CLÉS :

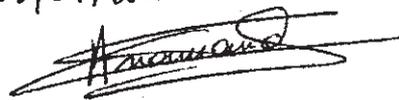
1 environnement
2 ferme
3 micro-organismes
4 bactéries

5 champignons
6 asthme
7 allergies
8 atopie

AUTORISATIONS :

- OUI, la thèse est diffusable dans le respect des droits à l'image, droits d'auteurs et droits voisin :
- En texte intégral
 - Après retrait des œuvres ou extraits significatifs d'œuvres protégées et signalées comme telles dans la thèse
- NON : préciser obligatoirement
- Je n'autorise pas la diffusion de ma thèse sur Internet après sa numérisation
 - Je n'autorise pas la reproduction de ma thèse aux frais de l'Etat sous forme de microfiches

DATE ET SIGNATURE DE L'AUTEUR

08/07/2010


À REMPLIR PAR LE SERVICE DE DOCTORAT

ÉTABLISSEMENT



CONFIDENTIALITÉ PRONONCÉE PAR LE PRÉSIDENT DE L'ÉTABLISSEMENT

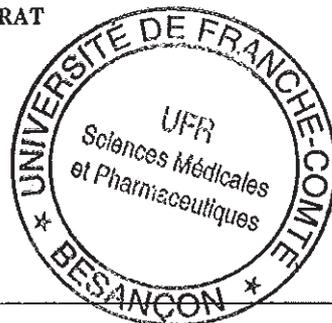
- NON
- OUI : thèse confidentielle JUSQU'EN (préciser obligatoirement)

CORRECTIONS : une possibilité uniquement

- Pas de correction demandée
- Thèse corrigée dans le délai de 3 mois après la soutenance
- Thèse non corrigée dans le délai de 3 mois après la soutenance

APRÈS VÉRIFICATION, DATE et CACHET DU SERVICE DE DOCTORAT

le 9/07/2010



Résumé

A la fin des années 1980 a émergé l'hypothèse hygiéniste selon laquelle le contact précoce des enfants avec les allergènes de l'environnement leur confère une protection contre l'asthme et les maladies allergiques. Les nombreuses études menées depuis ont montré une tendance à développer moins de symptômes allergiques ou asthmatiques chez les enfants vivant en contact avec les étables et les animaux de la ferme et buvant du lait cru.

Les endotoxines, composants de la paroi des bactéries dites « à Gram négatif », jouent un rôle primordial dans cette protection contre l'asthme. Afin d'accroître nos connaissances sur l'asthme et les autres maladies allergiques ainsi que de mettre en place les outils méthodologiques nécessaires à la surveillance de l'environnement de ces enfants, il a été établi une sorte de carte d'identité des étables, qui va être exposée ici.

L'exposition des enfants à l'environnement de la ferme prend plusieurs voies : respiratoire via l'air et la poussière, et digestive via le lait. Des prélèvements d'origine diverse provenant des fermes ont donc été analysés dans le cadre de deux études distinctes, une régionale (AgriSanté) et une européenne (GABRIEL).

Ces deux études démontrent que l'environnement dans les fermes est complexe et très varié, et ce dans l'ensemble des compartiments analysés. Le prélèvement de poussière sédimentée sur une lingette électrostatique est apparu comme étant le plus reproductible et le plus représentatif d'une exposition durable de l'enfant. En effet, il apparaît que cette technique permet de s'affranchir des variations journalières de l'environnement fermier en mettant en évidence l'ensemble des espèces retrouvées par les autres méthodes (foin, paille, air, nourriture et autres). De plus, le prélèvement par lingette électrostatique s'avère le plus facile à mettre en place, en termes de coût et de logistique.

Grâce à l'étude AgriSanté, il a été montré que la flore présente dans le lait provient de la surface des trayons des vaches, en contact avec le matériel de traite. Ce résultat a été obtenu un associant un inventaire des espèces bactériennes et fongiques cultivables et une analyse métagnéomique des bactéries présentes dans les échantillons de poussière de trois fermes.

L'analyse en parallèle de l'état de santé des habitants tel qu'il apparaît dans les questionnaires de l'étude GABRIEL et des micro-organismes détectés dans leur environnement par la technique des lingettes électrostatiques a montré que la présence de certains taxa fongiques et/ou bactériens est associée à un moindre risque d'asthme, et/ou à un moindre risque d'atopie.

En conclusion, ces deux études ont mis en évidence certaines voies de contaminations de l'air des étables et des chambres des fermes, ainsi que certaines voies de contamination du lait en fin de traite, tel qu'il est consommé par certains enfants d'agriculteurs.

La mise en place d'études faisant appel à des techniques de PCR en temps réel ciblant spécifiquement certaines espèces est maintenant envisageable. Il sera ainsi possible de rechercher sélectivement la présence de microorganismes d'intérêt. Des protocoles de clonage sur des échantillons de poussière peuvent également être envisagés afin de parfaire l'exploration de la diversité bactérienne et fongique de nos prélèvements.

Ce travail, fort des résultats qu'il apporte, est un premier pas dans une nouvelle approche de la lutte contre les maladies respiratoires. Ses résultats pourront servir de base à d'autres travaux dans les domaines de l'allergie et de l'asthme, tandis que les nouvelles techniques présentées ici pourraient s'appliquer dans de nombreux autres domaines.