

Année 2009

N° 25.09.12

Université de Franche-Comté

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques

Doctorat d'Université en Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale « Homme, Environnement, Santé »

UMR 6249 CNRS/UFC Chrono-environnement

Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie

Centre Hospitalo-Universitaire de Besançon

Bioaérosols de l'environnement agricole et protection contre l'allergie

Monsieur Bertrand Sudre

Né le 3 septembre 1972

Thèse dirigée par le Mr. Le Professeur Renaud Piarroux

Soutenue le 15 décembre 2009 à Besançon devant la commission d'examen:

Frédéric de Blay (Professeur, Université de Strasbourg)	Rapporteur
Denis Charpin (Professeur, Université de la Méditerranée)	Rapporteur
Renaud Piarroux (Professeur, Université de Franche-Comté)	Directeur de thèse
Jean-Charles Dalphin (Professeur, Université de Franche-Comté)	Examineur
Erika von Mutius (Professeur, Université de Munich)	Examineur
Francine KAUFFMAN (Directrice de recherche, INSERM Paris XI)	Examineur

Résumé

Bioaérosols de l'environnement agricole et protection contre l'allergie

L'augmentation de la fréquence des pathologies allergiques est un problème de santé publique. Les études portant sur les enfants ayant issus de l'environnement fermier ont démontré des prévalences faibles de maladies allergiques, cependant les facteurs protecteurs environnementaux n'ont pas tous été identifiés.

Nous présentons les résultats microbiologiques et palynologiques du bioaérosol en milieu agricole (composition et variation), et principalement ceux de l'étude PASTUREmicrobio rassemblant des fermes et des logements (fermiers et ruraux) de la cohorte de naissance européenne PASTURE.

La contamination en hiver des étables est de l'ordre de 104 UFC/m³ pour les bactéries cultivables, de [104-105] grains/m³ de pollens de graminées, de [104-105] UFC/m³ pour les actinomycètes et de [105-106] spores-UFC/m³ pour les spores et les micro-organismes fongiques. Les facteurs significativement associés à cette contamination sont la saison et la distribution d'alimentation au bétail. La fréquentation de l'étable expose à de fortes concentrations polliniques après distribution de foins, dépassant les valeurs mesurées à l'extérieur en saison estivale. La contamination des chambres d'enfant fermier est influencée par celle de l'étable, plus diversifiée et significativement plus élevée en hiver par rapport aux chambres d'enfants ruraux.

Il existe une exposition différentielle entre enfants ruraux et fermiers au bioaérosol à l'étable et au domicile : exposition répétée et perannuelle aux pollens de graminées à l'étable accompagnée d'une importante co-exposition microbienne bactérienne et fongique. Ces caractéristiques sont des facteurs potentiels pour expliquer la protection du milieu fermier vis-à-vis des maladies allergiques.

Abstract

Bio-aerosols of the agricultural environment and protection against allergic diseases

The increase in allergic diseases is a public health problem. Studies on farmer's children have shown that children early exposed to farm environment are protected against allergy and asthma and few environmental factors have being yet identified.

We present the microbiological and palynologic results of bio-aerosol contamination in farming setting, its variability and its kinetic, and the results of the PASTUREmicrobio study focusing on a sub-set of farms and dwellings (farmer/ rural) within the European PASTURE cohort.

The level of airborne contamination of cattle sheds in winter is 104 UFC/m³ for cultivable bacteria, [104-105] grains/m³ for graminaceous pollens, [104-105] UFC/m³ for actinomycetes and [105-106] UFC-spores/m³ for fungal micro-organisms and spores. Factors significantly associated with the airborne contamination are the seasonal variation and the feeding distribution to livestock. Pollen concentrations measured in winter in cattle shed exceeds the outdoor ones during the summer season. The contamination of farm child rooms is linked to the cattle shed's one which is diversified and significantly higher in winter compared to indoor contamination of rural children. A differential exposition between rural and farmer children regarding bio-aerosols in the stables and dwellings also exist.

This work highlights a high and per annual pollen exposure within cattle sheds in parallel with a high bacterial and fungal co-exposure. Those characteristics are potential factors that might explain the protective effect of farming environment on allergic diseases.

Mots clefs en français

Bioaérosol, allergie, exposition, maladies atopiques, ferme, agriculture, bactérie, moisissure, actinomycète, levure, pollen, épidémiologie environnementale.

Mots clefs en anglais

Bio-aerosol, allergy, exposure, atopic diseases, farm, agriculture, bacteria, mould, actinomycetes, yeasts, pollen, environmental epidemiology.

Intitulé et adresse de l'unité

Le Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie du Centre Hospitalo-universitaire de Besançon (boulevard A. Fleming 25030 Besançon cedex) est rattaché à l'UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques et est associé au Laboratoire CHRONO-ENVIRONNEMENT (UMR 6249 CNRS).

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des exploitants agricoles sans qui ce travail scientifique n'aurait pas eu lieu. Leur bon sens avait déjà identifié nombre de paramètres régissant l'exposition aux micro-organismes et aux pollens dans leurs fermes. Ils ont pressenti l'intérêt de ces travaux éclairant leur profession comme une gardienne d'un environnement traditionnel, voir « naturel, Docteur ! ». Ayons l'humilité de dire que nous avons posé des chiffres sur ces déductions empiriques pleines de bon sens. Je leur exprime ici ma profonde gratitude pour leur accueil chaleureux sans lequel ces travaux n'auraient pas vu le jour.

Au laboratoire de Parasitologie et Mycologie de Besançon, qui m'a accueilli pendant ces années de travail. Que l'ensemble du personnel – Dr F.Grenouillet, techniciennes de laboratoire et personnels techniques – soit assuré de mon estime et reçoit mes meilleurs vœux de réussite pour la prise en charge des patients du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. Bien sûr au Dr Gabriel Reboux pour m'avoir fait découvrir la microbiologie fongique environnementale – astucieuse et belle biologie que celle des champignons - et aux nombreux débats passionnés : c'est dans le débat que l'on avance !, et au Prof. Laurence Million pour leurs appuis logistiques et leurs regards critiques sur ces travaux scientifiques qui ont agrémenté ce travail. Qu'ils reçoivent mes meilleurs vœux de réussite professionnelle dans leurs futurs travaux. Je présente bien sûr mes sincères remerciements à mes confrères et aux collègues de paillasse de la fédération : merci pour votre patience et votre aide en bactériologie dominicale, de jour comme de nuit...

Aux collaborateurs de l'Institute of Social and Preventive Medicine de l'Université de Bâle et leur « Swiss touch », au Dr. Marco Waser de m'avoir épaulé et hébergé durant ce travail collaboratif, au Dr. Christian Schindler pour les discussions enrichissantes sur la modélisation et une pensée particulière au Prof. Charlotte Braun-Fahrländer pour sa clairvoyance, son aide, sa gentillesse et sa disponibilité.

Aux scientifiques internationaux qui m'ont aidé dans les différentes facettes de ce projet : au Prof. Erika Von Mutius pour son accueil dans les projets européens, ses conseils éclairés et sa confiance. Son parcours professionnel est un exemple pour le « junior scientist » que je suis. Aux Prof. Stephane Weilandt, Dr Leticia Grize, Dr Sondhja Bitter, Dr Gisela Buchele et Suzanne Schmitt pour leur aide dans le projet en Allemagne et en Suisse et l'ensemble des travailleurs de terrain.

Au Prof. Dick Heederick et Inge Wounters pour leurs conseils en épidémiologie environnementale et les passionnants et « statistiquement ésotériques » échanges que nous avons partagés.

À mes compagnons de thèse,

Au Dr Sandrine Roussel, ma voisine « d'aquarium » au début de cette aventure. Nous avons ramé dans le même navire, comme l'équipage du Victoria revenant à Séville, traversé le détroit de Magellan, affronté mers d'huile, tempêtes et ouragans, exploré routes comtoises enneigées, affronté scorbut financier et bérubéri logistique, battu en brèche attaques et mutineries, perdus navigateur et hommes d'équipage, subi crises de paludisme et parasites tropicaux*, Mais la « Terre promise des publications, jardin d'Éden des jeunes scientifiques » semble aujourd'hui en vue ... Haut les cœurs ! Je te dirai volontiers tout bourguignon que je suis, « Comtois rends toi, nenni ma foi »

(*: dédicace aux techniciennes du Laboratoire, Nannou, Anne, Isabelle, Pascale, Florence, Catherine et Karine pour leurs diagnostics pertinents et la transmission de leurs savoirs sur les espèces de Plasmodium et autres parasites exotiques...)

A Mallory Vacheyrou pour son aide, sa bonne humeur, son efficacité légendaire et j'espère qu'elle n'est pas devenue allergique aux pollens de graminées ! A Dorothee Chaillet, qui avait

débuté ce travail sur les pollens, nous l'avons mené à son terme, mais sans l'impulsion initiale d'une collaboration transversale, il n'aurait pas été. A Anne-Cécile Normand pour les discussions bactériologiques, ornithologiques, et le travail de biologie moléculaire. Aux stagiaires Abdhella Merazig, Morgane Alix et au Dr Stéphanie Drillon pour leur contribution respective aux projets de recherche.

À tous, travailler avec vous a été un réel plaisir, et j'espère partagé ...

Aux Dr Martine Piarroux et au Dr. Didier Bompangue et leurs familles pour leur amitié, les travaux communs et les dérapages scientifiques cholériques, répétés et incontrôlés sur les maladies infectieuses et tropicales, certes hors sujet de cette thèse, mais bien consentis !

À mes Maîtres,

... épidémiologistes, Prof. Jean-François Viel, Prof. Mariette Mercier, Dr Frédérique Mauny, merci pour l'utilisation de vos bibliothèques, votre disponibilité et vos conseils ! ... aux palynologues Dr. Pascale Ruffaldi et Floriane Bosch-Canot... géographes, Pascal Handschumacher et Martine Piarroux,

... écologues Prof. Patrick Giraudoux et Dr Francis Raoul pour leur transmission des concepts de l'Écologie et, pour l'altruisme envers les « toubibs » qui ont parfois, certes, des difficultés à comprendre les enseignements de l'écologie évolutive des populations appliquées à leur propre système ,

... immunologiste Prof. Dominique-Angèle Vuitton pour nos discussions immunologiques captivantes, ses ouvrages, son aide et son chaleureux accueil et pneumologue Prof. Jean Charles Dalphin pour m'avoir donné les premiers enseignements sur les pathologies respiratoires et l'environnement ; tous deux coordonnateurs de la cohorte Pasture France sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu.

Vos motivations, vos travaux et l'esprit de transversalité, l'essence de l'approche Environnement, Santé, Société sont une ligne scientifique à suivre.

À mon Directeur de Thèse, le Prof. Renaud Piarroux. Qu'il soit remercié pour le parcours effectué ensemble pendant ces années, pour à avoir changé ma vision des véhicules des professeurs d'Université, du mikeke d'Uvira, des maladies infectieuses et de leurs complexités biologiques, et enfin pour avoir dirigé ces travaux en « supportant » un thésard multitâche. Ses connaissances transversales, son approche scientifique et son esprit de synthèse ont été des paramètres indéniables de la réussite de ce projet. Est-ce que le « scarabée » approche maintenant de la voie de la sagesse eco-épidémiologique ?

À mes amis de l'école médicale, et particulièrement Dr Nathalie Roch et Dr Emmanuel Kus ... pour leurs conseils avisés H₂₄.

À ma famille, à ma mère Geneviève et feu André-Marie mon Père, à Frédéric pour nos discussions stratégiques de noctambules, Laurence et Vincent, leurs enfants, Catherine et Paul, et tous les Bassignots fermiers ou non fermiers,

A Odile, Amélie, Benjamin et Valentine, dont la patience et le soutien resteront toujours à mon esprit.

Et enfin, à la curiosité et la soif de savoir, ennemies de mon sommeil pendant toutes ces soirées passionnantes,

Promis, demain, j'arrête...

Publications

*et présentations, collaborations et encadrement connexe sur la thématique
allergie et microbiologie de l'environnement fermier.*

Publications

Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. Fenoglio CM, Reboux G, **Sudre B**, Mercier M, Roussel S, Cordier JF, Piarroux R, Dalphin JC. *European Respiratory Journal*. 2007 29(4):706-12.

Dust and airborne concentrations of endotoxins in Strasbourg and in a rural environment (Haut-Doubs). De Blay F, Reboux G, Casset A, Roussel S, Humbert K, **Sudre B**, Piarroux R, Dalphin JC. 63rd Annual Meeting of the American-Academy-of-Allergy-Asthma-and-Immunology; 2007 Feb 23-27; San Diego, CA: Mosby-Elsevier; 2007. p. 96.

Evaluation of bioaerosol variability in indoor farming environments. **Sudre B**, Reboux G, Roussel S, Waser M, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Vacheyrou M et Piarroux R. (Soumission juil. 2009 *Occup Environ Med*).

High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? **Sudre B**, Vacheyrou M, Braun-Fahrlander C, Normand AC, Waser M, Reboux G, Ruffaldi P, von Mutius E, Piarroux R. *Allergy*. 2009 Feb 12.

Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort. Roussel S, **Sudre B**, Reboux G, Waser M, Büchele G, Vacheyrou M, Dalphin JC, Millon L, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Piarroux R. Accepted with correction (07.2010). *Environmental Research Journal*.

Assessment of Dust Sampling Methods for the Study of Viable Micro-organism Exposure in Stables. Normand AC, Vacheyrou M, **Sudre B**, Heederik D, Piarroux R *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(24):7617-23. Epub 2009 Oct 9.

Collaboration aux publications du PASTURE Study Group

Specific IgE to allergens in cord blood is associated with maternal immunity to *Toxoplasma gondii* and rubella virus. Ege MJ, Herzum I, Büchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Bitter S, Roponen M, Remes S, Vuitton DA, Riedler J, Brunekreef B, Dalphin JC, Braun-Fahrlander C, Pekkanen J, Renz H, von Mutius E; PASTURE Study Group. *Allergy*. 2008 Nov;63(11):1505-11. *Collaborators: Weiss G, Ublagger E, Humer C, Russegger M, Juntunen R, Tiihonen R, Tiittanen P, Hirvonen MR,*

*Huttunen K, Virtanen S, Kauppila T, Nevalainen A, Hyvärinen A, Tuomainen TP, Karvonen A, Dalphin ML, Piarroux R, Reboux G, Roussel S, **Sudre B**, Schmid S, Illi S, Korherr N, Genuneit J, Peter R, Sel S, Blümer N, Pfefferle P, Gehring U, Sennhauser FH, Loeliger S, Steinle J, Frei R.*

Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) Study. Pfefferle PI, Sel S, Ege MJ, Büchele G, Blümer N, Krauss-Etschmann S, Herzum I, Albers CE, Lauener RP, Roponen M, Hirvonen MR, Vuitton DA, Riedler J, Brunekreef B, Dalphin JC, Braun-Fahrlander C, Pekkanen J, von Mutius E, Renz H; *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Oct;122(4):717-8. *Collaborators: Weiss G, Ublagger E, Humer C, Russegger M, Juntunen R, Tiihonen R, Tiittanen P, Hyvärinen A, Kauppila T, Nevalainen A, Remes S, Dalphin ML, Piarroux R, Reboux G, Roussel S, **Sudre B**, Schmid S, Illi S, Korherr N, Bitter S, Sennhauser FH, Loeliger S, Steinle J, Frei R.*

Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. Ege MJ, Herzum I, Büchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Roponen M, Hyvärinen A, Vuitton DA, Riedler J, Brunekreef B, Dalphin JC, Braun-Fahrlander C, Pekkanen J, Renz H, von Mutius E; Protection Against Allergy Study in Rural Environments (PASTURE) Study group. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):407-12. *Collaborators: Weiss G, Ublagger E, Humer C, Russegger M, Juntunen R, Tiihonen R, Tiittanen P, Hirvonen MR, Huttunen K, Virtanen S, Kauppila T, Nevalainen A, Remes S, Tuomainen TP, Karvonen A, Dalphin ML, Piarroux R, Reboux G, Roussel S, **Sudre B**, Schmid S, Illi S, Korherr N, Genuneit J, Peter R, Sel S, Blümer N, Pfefferle P, Gehring U, Bitter S, Sennhauser FH, Loeliger S, Steinle J, Frei R.*

Mémoire et thèse d'exercice

Étude de la valeur diagnostique des précipitines dans la maladie du poumon de fermier. Thèse d'exercice de Médecine. Université de Franche-Comté, 2005.

Evaluation de la variabilité de la mesure des micro-organismes de l'air des étables et de ses déterminants. DEA Environnement Santé Société, Université de Franche-Comté, Juin 2004.

Communication affichée

Étude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Intérêts dans les domaines de la production fromagère. Normand AC, Vacheyrou M, Guyot P, Bouton Y, Dubief T, Billot M, **Sudre B**, Cussenot R, Piarroux R. XIIIème Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté et Université de Bourgogne, Dijon, 14-15 Juin 2007.

Titres et activités spécifiques sériques des IgG et IgA anti-Bacillus licheniformis et Saccharomonospora viridis chez des patients atteints de la maladie du poumon de fermier (Doubs): Indicateurs d'exposition ou de maladie ? Kane H, Roussel S, Dufour V, **Sudre B**, Piarroux R et Meillet D. XIIIème Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté et Université de Bourgogne, Dijon, 14-15 Juin 2007.

Recherche de nouveaux indicateurs immunologiques ou microbiologiques d'exposition ou de maladie du poumon de fermier (PDF) chez des agriculteurs dans le Doubs. Kane H, **Sudre B**, Maillard S, Piarroux R, Meillet D. Colloque des Biologistes des Hôpitaux. Université de Bourgogne, Dijon, mai 2007.

Grass pollen and microbiological exposure in dairy farm from the North alpin area: Part 1 pollen analysis. **Sudre B**, Vacheyrou M, Waser M., Roussel S., Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Ruffaldi P, Reboux G, Dalphin JC, Vuitton DA, Piarroux R. Second Annual Meeting of Gabriel Project. February 2008 (Maison de la chimie) Paris.

Communication orale

Diagnostic des Pneumopathies d'Hypersensibilité: Valeur diagnostique des précipitines. Journées d'allergologie Max Bourgeois. 26 mars 2004, Besançon.

Étude de l'environnement microbiologique de 78 fermes et logements dans trois pays européens. Roussel S, Reboux G, **Sudre B**, Büchele G, Vacheyrou M, Waser M, Grize L, Millon L, Schmid S, Dalphin JC, Vuitton D, Weiland S, Braun-Fahrlander C, Von Mutius E, Piarroux R. Congrès de la Société Française de Parasitologie. Besançon, mai 2005.

Présentation réunions internationales du projet PASTURE (Besançon-2006) , et FORALLVENT-PASTURE meeting (Bâle-20.4.2007).

Encadrement

Co-direction: Mémoire d'ingénieur du Génie sanitaire de l'Ecole Nationale de Santé Publique (2006).

Composition bactérienne et fongique de l'atmosphère des étables et protection de l'enfant contre les maladies allergiques. ALIX Morgane. Ecole Nationale de la Santé Publique (E.N.S.P.). Rennes. Code INIST-CNRS 002B30A11.

Analyses statistiques:

Environnement bactérien et allergie en milieu rural. Abdellah MERAZIG. DEA Environnement Santé Société, Université de Franche-Comté, Juin 2005.

Microbial flows in rural environments. A study of Electrostatic Dust Fall Collector in indoor and farm buildings. Normand AC et al. (2009)

Profil de la sensibilisation atopique de l'enfant, au cours de la première année de vie, en milieu rural: la cohorte franc-comtoise de l'étude européenne PATURE (Protection contre l'Allergie: Étude du milieu rural et de son Environnement). Drillon Stéphanie. Thèse d'exercice. Besançon. 2007. Code INIST-CNRS 002B30A11. (Analyse statistique et participation au Jury de thèse)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	18
LES MALADIES ATOPIQUES	24
<i>L'atopie, la sensibilisation et les maladies allergiques</i>	24
<i>L'asthme</i>	28
Définition	28
Épidémiologie	29
<i>La rhinite allergique</i>	31
Définition	31
Épidémiologie	31
<i>Les allergies alimentaires</i>	32
Définition	32
Épidémiologie	32
<i>La dermatite atopique</i>	33
Définition	33
Épidémiologie	33
<i>La marche atopique</i>	34
LES FACTEURS ASSOCIES AUX MALADIES ALLERGIQUES	37
L'exposition aux allergènes	38
Les facteurs génétiques	40
Les autres facteurs associés aux maladies allergiques	46
L'HYPOTHESE HYGIENISTE	52
<i>Définition</i>	52
<i>Les débats autour de l'hypothèse hygiéniste</i>	53
<i>Les bases immunologiques</i>	57
La polarisation du système immunitaire	57
Le schéma immunologique des maladies allergiques	64
<i>Les études en allergologie dans l'environnement fermier</i>	67
Les études épidémiologiques	67
Les études environnementales	76
Les études sur la modulation du système immunitaire	78
L'ENVIRONNEMENT MICROBIOLOGIQUE ET LES COMPOSANTS DU BIOAEROSOL DES FERMES	82
<i>Définition</i>	82
<i>Les méthodes de mesures du bioaérosol</i>	85

<i>Les méthodes d'analyses du bioaérosol</i>	87
<i>Les données de la littérature sur la composition du bioaérosol : de l'air extérieur à la ferme</i>	92
La composition microbiologique	94
Les pollens	104
LES APPROCHES METHODOLOGIQUES ET STATISTIQUES	111
ÉTUDE	119
OBJECTIFS	119
MATERIELS ET METHODES	120
<i>Les études pilotes</i>	120
La validation de la mesure	120
<i>L'étude environnementale PASTURE microbiologie</i>	135
Population étudiée	135
Méthodes de prélèvement et de culture	140
Paramètres microbiologiques étudiés	143
Questionnaires	144
Analyse statistique	145
RESULTATS	148
<i>Les études pilotes</i>	148
Évaluation au laboratoire	148
Étude de la cinétique d'exposition	149
Étude de la variabilité	156
<i>L'étude environnementale PASTURE microbiologie</i>	164
Les données de santé	164
Les caractéristiques des fermes	166
La contamination microbiologique du bioaérosol des logements et des fermes	169
Étude des facteurs associés à la contamination microbiologique du bioaérosol des fermes	190
DISCUSSION	198
CONCLUSION	232
ANNEXES	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	288

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE CHEZ L'HOMME (OU <i>PATTERN RECOGNITION RECEPTORS</i> , PRR).	44
TABLEAU II : FACTEURS INDIVIDUELS ET ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX MALADIES ALLERGIQUES.	48
TABLEAU III : RESULTATS DES ETUDES EUROPEENNES PORTANT SUR LA PROTECTION DES MALADIES ALLERGIQUES EN MILIEU AGRICOLE.	73
TABLEAU IV : NIVEAUX DE CONTAMINATION AERIENNE PAR LES MICRO-ORGANISMES BACTERIENS DANS L'ENVIRONNEMENT FERMIER EVALUES PAR METHODE DE CULTURE ET/OU COMPTAGE.	100
TABLEAU V : NIVEAUX DE CONTAMINATION AERIENNE PAR LES MICRO-ORGANISMES FONGIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT FERMIER EVALUES PAR METHODE DE CULTURE ET/OU COMPTAGE.	101
TABLEAU VI : POTENTIEL ALLERGISANT DES POLLENS.	107
TABLEAU VII : CONCENTRATION DU BIOAEROSOL (10^3 X ELEMENTS/M ³) EN FONCTION DES TEMPS D'ECHANTILLONNAGE DE L'ETUDE PILOTE DE LA CINETIQUE.	154
TABLEAU VIII : TABLEAU DE SYNTHESE DES ECHANTILLONS DISPONIBLES DE L'ETUDE PILOTE DE LA VARIABILITE POUR LES TROIS PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES EN FONCTION DU TYPE DE FERME.	157
TABLEAU IX : CARACTERISTIQUES ET PRATIQUES AGRICOLES DE L'ETUDE PILOTE SUR LA VARIABILITE EN FONCTION DU TYPE DE FERME.	158
TABLEAU X : MOYENNES ARITHMETIQUES, COEFFICIENTS DE VARIATION ET RESULTATS DU TIRAGE AU SORT POUR LES TROIS PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES DE L'ETUDE PILOTE DE LA VARIABILITE EN FONCTION DU TYPE DE FERME ET DU TEMPS D'ECHANTILLONNAGE.	162
TABLEAU XI : RESULTATS DE L'ANALYSE MULTIVARIEE DE L'ETUDE PILOTE DE LA VARIABILITE.	163
TABLEAU XII : FREQUENCE DES MALADIES ALLERGIQUES ET DE LA SENSIBILISATION AUX GRAMINEES CHEZ LES PARENTS DES ENFANTS DES ETUDES PASTURE ET PASTURE _{MICROBIO} .	165
TABLEAU XIII : CARACTERISTIQUES DES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	167
TABLEAU XIV : ÉCHANTILLONS DISPONIBLES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} EN FONCTION DU LIEU DE PRELEVEMENTS ET DE LA SAISON.	168
TABLEAU XV : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES IDENTIFIES PAR CULTURE PENDANT LA SAISON D'ETE DANS LES LOGEMENTS RURAUX ET FERMIERS DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	172
TABLEAU XVI : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES IDENTIFIES PAR CULTURE PENDANT LA SAISON D'HIVER DANS LES LOGEMENTS RURAUX ET FERMIERS DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	173
TABLEAU XVII : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES ISOLEES PAR CULTURE PENDANT LA SAISON D'ETE DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	178
TABLEAU XVIII : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES ET DES POLLENS IDENTIFIES PAR EXAMEN DIRECT PENDANT LA SAISON D'ETE DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	179
TABLEAU XIX : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES ISOLEES PAR CULTURE PENDANT LA SAISON D'HIVER DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	182

TABLEAU XX : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES BACTERIENS ISOLES PAR CULTURE PENDANT LA SAISON D'HIVER DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	183
TABLEAU XXI : FREQUENCE D'ISOLEMENT ET CONCENTRATION MOYENNE DES MICRO-ORGANISMES ET DES POLLENS IDENTIFIES PAR EXAMEN DIRECT PENDANT LA SAISON D'HIVER DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	185
TABLEAU XXII : RAPPORT DES MOYENNES ARITHMETIQUES ENTRE LES PRELEVEMENTS DE L'ETABLE AVANT ET APRES TRAVAIL ET DE LA CHAMBRE DU DOMICILE FERMIER SELON LA SAISON DE PRELEVEMENTS.	187
TABLEAU XXIII : ASSOCIATIONS BIVARIEES ET MULTIVARIEES ENTRE LES CARACTERISTIQUES DES FERMES ET LA CONCENTRATION TOTALE DES MICRO-ORGANISMES FONGIQUES DANS L'AIR DE L'ETABLE EN HIVER APRES SESSION DE TRAVAIL.	191
TABLEAU XXIV : ASSOCIATIONS BIVARIEES ET MULTIVARIEES ENTRE LES CARACTERISTIQUES DES FERMES ET LA CONCENTRATION TOTALE D'ACTINOMYCETES DANS L'AIR DE L'ETABLE EN HIVER APRES SESSION DE TRAVAIL.	193
TABLEAU XXV : ASSOCIATIONS BIVARIEES ET MULTIVARIEES ENTRE LES CARACTERISTIQUES DES FERMES ET LES CONCENTRATIONS POLLINIQUES DE L'ETABLE EN HIVER.	195

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : MECHANISMES DE LA REACTION ALLERGIQUE	26
FIGURE 2 : EFFETS BIOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE 12.	59
FIGURE 3 : EFFETS BIOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE 10.	60
FIGURE 4 : DESCRIPTION SCHEMATIQUE DES REGULATIONS CELLULAIRES DANS L'HYPOTHESE DE LA BALANCE IMMUNOLOGIQUE TH1/TH2.	63
FIGURE 5 : ASSOCIATIONS ENTRE LES EXPOSITIONS EN MILIEU FERMIER ET LE RISQUE INDIVIDUEL D'ALLERGIE.	69
FIGURE 6 : CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES AEROSOLS D'INTERET EN MEDECINE ENVIRONNEMENTALE ET POURCENTAGE DE LA FRACTION PENETRANTE EN FONCTION DU DIAMETRE AERODYNAMIQUE (FRACTION INHALABLE, THORACIQUE ET ALVEOLAIRE).	84
FIGURE 7 : DISTRIBUTION DE FOIN LORS DE LA SESSION DE TRAVAIL EN HIVER DANS UNE EXPLOITATION AGRICOLE FRANCOIS.	93
FIGURE 8 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA STRUCTURE D'UN GRAIN DE POLLEN	105
FIGURE 9 : IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE GRAINS DE POLLEN.	105
FIGURE 10 : VARIATION MOYENNE DES CONCENTRATIONS DES POLLENS DE GRAMINEES DANS L'AIR EXTERIEUR DANS TROIS REGIONS EUROPEENNES (NORD-EST DE LA FRANCE, CENTRE DE LA SUISSE (REGION DE ZURICH) ET LES PRE-ALPES ALLEMANDES).	107
FIGURE 11 : COMPARAISON DES APPROCHES INDIVIDUELLES ET DE GROUPE DANS L'EVALUATION D'UNE EXPOSITION EN EPIDEMIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE.	113
FIGURE 12 : STRATEGIE ET PARAMETRES MESURES DANS LES ETUDES ENVIRONNEMENTALES.	125
FIGURE 13 : SCHEMA DU COMPTAGE DES PARTICULES SEDIMENTEES SUR UNE MEMBRANE POLYPROPYLENE	126
FIGURE 14 : MEMBRANE POLYPROPYLENE MONTEE SUR LAME DE VERRE POUR EXAMEN AU MICROSCOPE	126
FIGURE 15 : ÉTABLES DE FERMES MODERNES ET TRADITIONNELLES.	129
FIGURE 16 : ÉCHANTILLONNAGE DE TERRAIN ET STRATEGIE D'ANALYSE.	130
FIGURE 17 : CARTE DES ZONES GEOGRAPHIQUES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	139
FIGURE 18 : PHOTOGRAPHIES D'UNE MEMBRANE POLYPROPYLENE.	150
FIGURE 19 : ÉVOLUTION DES MOYENNES GEOMETRIQUES (ET IC _{95%}) DES DIFFERENTS COMPOSANTS DU BIOAEROSOL EN FONCTION DES TEMPS D'ECHANTILLONNAGE (ETUDE PILOTE DE LA CINETIQUE).	155
FIGURE 20 : MOYENNES GEOMETRIQUES (ET IC _{95%}) PAR FERME DE L'ETUDE PILOTE DE LA VARIABILITE.	159
FIGURE 21 : MOYENNES GEOMETRIQUES (ET IC _{95%}) DES CONCENTRATIONS DES MICRO-ORGANISMES FONGIQUES, DES LEVURES, DES ACTINOMYCETES ISOLEES PAR CULTURE ET DES SPORES FONGIQUES ET DES GRAINS DE POLLEN IDENTIFIES PAR EXAMEN DIRECT EN FONCTION DE LA SAISON ET DE LA SESSION DE PRELEVEMENTS DANS LES FERMES DE L'ETUDE PASTURE _{MICROBIO} .	189

LISTE DES ABREVIATIONS

C. : Cellule

C.-à-d. : c'est-à-dire

CD : *Cluster of differentiation* ou classe de differentiation (par abus de langage molécules de surface des sous-populations cellulaires du système immunitaire)

CPE : cellules présentant les épitopes

DA : dermatite atopique

Diam. : diamètre

EAACI : *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

IC_{95%} : intervalle de confiance 95 %

IFN- γ : interféron- γ

Ig (M,G,A ou E) : immunoglobuline (M, G, A ou E)

Il : interleukine

LPS : lipopolysaccharide bactérien

TLR : *Toll-like receptors*

Th1 : cellule lymphocytaire T *helper* ou cellule lymphocytaire T auxiliaire de type 1

Th2 : cellule lymphocytaire T *helper* ou cellule lymphocytaire T auxiliaire de type 2

NK : Natural Killer ou cellules tueuses résultant de la différenciation de cellules souches lymphoïdes produites par la moelle osseuse.

p. ex. : par exemple

vs. : *versus*

On mesure l'intelligence d'un individu à la quantité d'incertitudes qu'il est capable de supporter.

Emmanuel Kant.

INTRODUCTION

L'augmentation des maladies allergiques dans les pays développés durant ces dernières décennies constitue un problème de santé publique. Un certain nombre d'hypothèses sont proposées pour expliquer les raisons de cette augmentation, mais elles demeurent incertaines à ce jour. Face à ce phénomène, les recherches scientifiques récentes en allergologie, épidémiologie et immunologie ont apporté une accélération des connaissances fondamentales et médicales sur les maladies allergiques. Les résultats de ces travaux permettent de percevoir leur complexité et les liens avec l'environnement. Les avancées dans la compréhension de ces interactions avec l'environnement nécessitent la collaboration de disciplines scientifiques complémentaires comme la médecine, l'épidémiologie, la biologie fondamentale et les sciences de l'environnement.

D'une façon générale, il est envisageable que les changements de mode de vie intervenus depuis les années soixante aient pu jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation des maladies allergiques. Ces changements globaux sont rassemblés sous la notion venue de l'anglicisme « *westernization* » ou occidentalisation. Ils correspondent aux modifications du régime alimentaire, à une baisse de l'activité physique, à une progression de l'obésité en particulier infantile, au recours à la vaccination et à l'utilisation fréquente des antibiotiques, à l'exposition à un nombre croissant de molécules chimiques issues de l'industrie, et enfin à un changement de milieu de vie – du rural vers l'urbain – entraînant non seulement une exposition accrue aux pollutions atmosphériques urbaines, mais aussi la perte du contact précoce avec l'environnement dit « naturel ».

Les études sur les enfants issus du milieu fermier, particulièrement en Europe et pour les fermes d'élevage, ont révélé des prévalences minimales de maladies allergiques. Le contraste était particulièrement marqué en comparaison avec les enfants des zones urbaines, mais également pour les études portant sur les enfants vivants en zone rurale sans contact fermier. Dès lors, il a été possible de poser l'hypothèse que le milieu fermier représente un environnement singulier identifié, au moyen de l'épidémiologie, comme protecteur des maladies allergiques. Cette « niche » épidémiologique pourrait rassembler à la fois (i) l'absence de facteurs aggravants des maladies allergiques

potentiellement retrouvées dans un mode de vie occidentalisé, mais aussi (ii) la présence d'un ou plusieurs facteurs protecteurs vis-à-vis des maladies allergiques.

L'environnement agricole est caractérisé par la présence d'un grand nombre micro-organismes. Il est le lieu d'une exposition microbienne importante et variée. Pour ces raisons, la protection observée au sein de l'environnement fermier a été proposée comme une nouvelle déclinaison de l'hypothèse hygiéniste ; après son implication dans la protection des maladies allergiques des enfants ayant grandi en crèche et chez les enfants issus de familles nombreuses. Cette hypothèse propose que les infections humaines (apparentes ou inapparentes) et les expositions microbiennes non invasives puissent influencer la réponse immunitaire innée ou acquise et en conséquence diminuer le risque d'allergie.

L'évidence épidémiologique d'une protection du milieu fermier envers les maladies allergiques s'est construite au fur et à mesure des études scientifiques depuis un dizaine d'années. D'une façon corollaire, des questions sur la composition de l'environnement fermier et sur l'exposition des personnes fréquentant le milieu fermier ont légitimement émergé. Elles ont porté sur la composition microbiologique des étables et ses conséquences sur l'immunité innée et adaptative. De plus, une meilleure connaissance de l'exposition aux pollens des graminées est apparue nécessaire au regard des résultats concordants des études du milieu fermier qui révélaient une protection marquée de l'environnement fermier vis-à-vis du « rhume des foins ». Ces deux interrogations ont constitué le socle de notre problématique pour les études environnementales menées dans le cadre de ce travail de thèse.

Ce rapport de thèse comporte deux grandes parties :

La **première partie** concerne l'étude bibliographique avec pour objectif de situer le contexte du travail. Elle est présentée en suivant deux axes :

- le **premier axe** portera sur les définitions et les principaux aspects épidémiologiques des maladies allergiques. Nous présenterons d'abord l'importance des liens entre les maladies allergiques, exposition environnementale et facteur génétique reliées à l'immunité innée et humorale. Dans un deuxième temps, nous présenterons les travaux sur l'asthme et la rhinite allergique dont les liens avec l'environnement rural et fermier ont été étudiés durant la dernière décennie. Nous excluons de notre propos l'urticaire, l'eczéma de contact, l'anaphylaxie et les réactions allergiques aux médicaments et aux venins. Enfin, nous reviendrons avec un intérêt particulier sur la définition de l'hypothèse hygiéniste, ses bases immunologiques, ses controverses, ses liens avec la microbiologie environnementale et les études épidémiologiques réalisées dans l'environnement fermier.
- Le **second axe** présentera l'environnement microbiologique et les composants du bioaérosol des études environnementales dans le milieu agricole. Nous rapporterons d'abord les méthodes de mesures et les méthodes d'analyses microbiologiques des prélèvements environnementaux du bioaérosol. Ensuite, les connaissances sur la composition bactérienne et fongique du bioaérosol des fermes seront présentées sous forme d'une revue de la littérature. Pour conclure, nous résumerons les approches méthodologiques statistiques de l'évaluation de l'exposition en épidémiologie environnementale.

Ces notions générales ont pour objet de situer notre travail au sein d'une recherche scientifique au croisement des sciences médicales, microbiologiques et environnementales, et de construire le cadre de discussion des résultats de l'étude principale.

La **seconde partie** sera composée de l'étude personnelle sur l'environnement microbiologique des fermes. Elle a pour objectif principal la caractérisation du bioaérosol des étables et des principaux paramètres environnementaux influençant les niveaux de contamination dans l'environnement fermier. Elle comportera deux étapes successives :

- la présentation **des études pilotes sur la variabilité de l'exposition** aux composés biologiques dans l'environnement intérieur des fermes,
- les résultats d'une **étude environnementale centrée sur la caractérisation de l'exposition aérienne aux composés bactériens, fongiques et polliniques du bioaérosol** au sein de l'étude européenne de cohorte de naissance multicentrique PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environments).

Enfin, nous discuterons ces résultats et leurs implications possibles dans les travaux de recherches portant sur la protection de maladies allergiques de l'environnement fermier.

Le savoir est la seule chose qui augmente quand on le partage.

Michel Serres

LES MALADIES ATOPIQUES

L'ATOPIE, LA SENSIBILISATION ET LES MALADIES ALLERGIQUES

L'atopie peut se définir comme la capacité génétiquement déterminée d'un individu à fabriquer des anticorps, ou immunoglobulines de type E (IgE), en réponse à de faibles doses d'antigènes. Cette prédisposition génétique entraîne une production d'IgE lors de l'exposition à des allergènes, appelée sensibilisation, sans induire systématiquement de symptôme clinique.

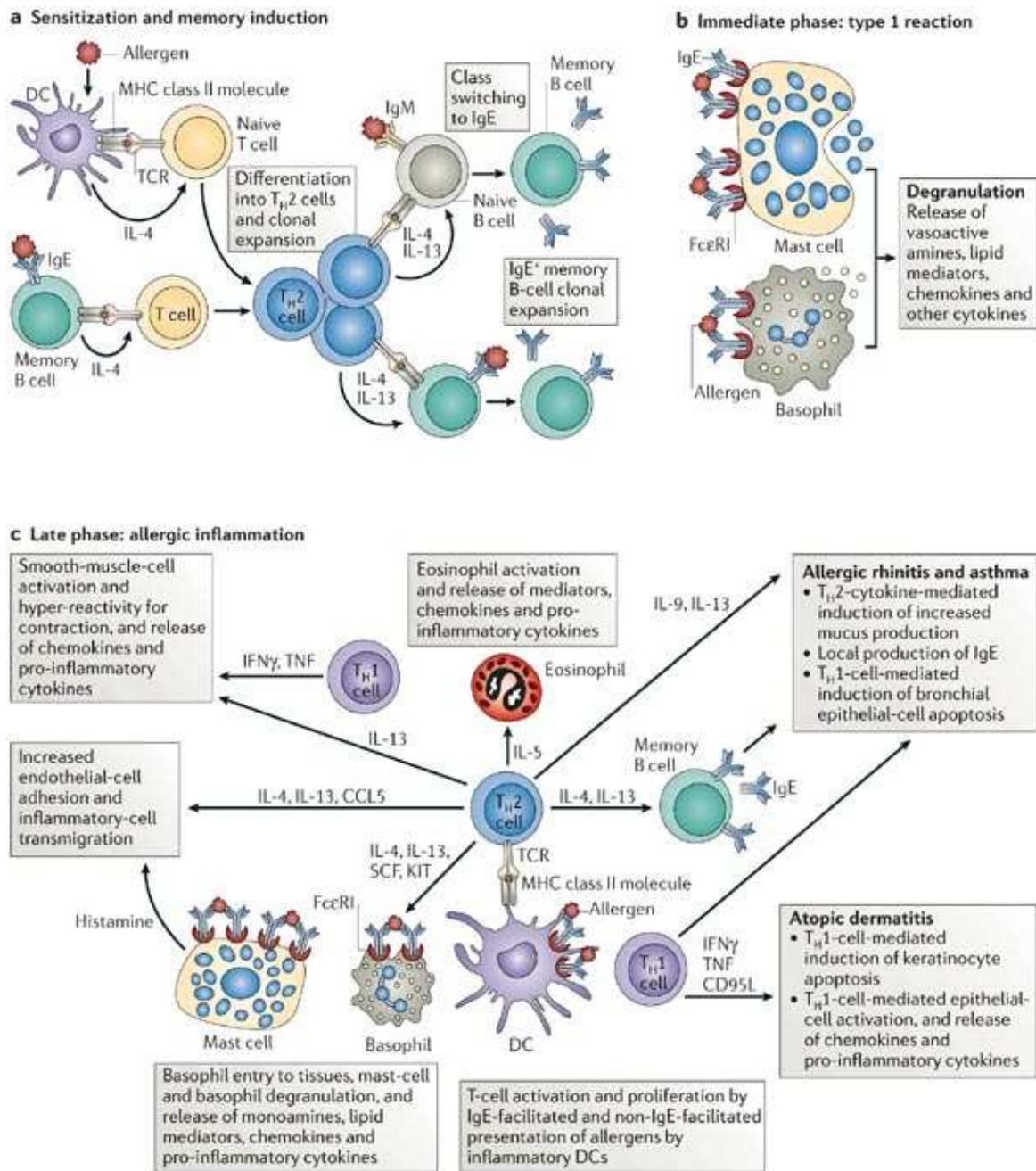
L'*European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) a publié en 2001 une nomenclature des définitions clefs en allergologie. Elle précise que le terme atopie est réservé au trait clinique et à la prédisposition génétique et non à la description d'une maladie [1]. En conséquence, l'allergie est définie comme une réaction d'hypersensibilité initiée par des mécanismes immunologiques IgE ou non-IgE médiée. L'allergie IgE médiée se définit alors comme l'expression clinique d'une sensibilisation et rassemble trois versants : (1) le contexte génétique ou terrain atopique individuel, (2) la sécrétion d'IgE spécifiques d'un allergène et (3) un profil clinique dans lequel les premiers symptômes apparaissent généralement au niveau de l'organe de contact avec l'allergène, et ce, à chaque exposition. L'allergie rassemble donc différentes manifestations cliniques comme l'asthme, la rhinite allergique, la dermatite atopique, l'urticaire, l'eczéma de contact, l'allergie alimentaire et médicamenteuse et le choc anaphylactique.

Un allergène est défini comme une structure, en général protéique et de faible poids moléculaire, qui contient un ou plusieurs déterminants antigéniques qui réagissent avec différents types d'immunoglobulines. Deux allergènes peuvent avoir des déterminants antigéniques communs, amenant à une sensibilisation croisée. Les allergènes aériens pénétrant dans l'arbre respiratoire sont appelés pneumallergènes (syn. aéroallergènes) et ceux d'origines alimentaires trophallergènes. Schématiquement, la sensibilisation aux trophallergènes est plutôt associée aux allergies digestives accompagnées ou non de manifestations cutanées, et la sensibilisation pour ceux d'origine aérienne est reliée aux allergies respiratoires au sens large.

La réponse immunologique à un allergène chez le sujet non atopique est caractérisée par une sécrétion modérée d'immunoglobulines (IgG1 et IgG4) et une prolifération limitée de cellules lymphocytaires auxiliaires dites T *helper* de type 1 (Th1) accompagnée d'une sécrétion d'interféron- γ (IFN- γ) [2, 3].

A l'opposé, chez les sujets atopiques, la réponse est constituée par une sécrétion d'IgE sériques et une prolifération des cellules lymphocytaires auxiliaires dites T *helper* de type 2 (Th2). L'assemblage « IgE spécifique-allergène » interagit avec les cellules cibles via la liaison avec les récepteurs membranaires (Fc ϵ RI et Fc ϵ RII) entraînant le développement d'une réponse inflammatoire immédiate et retardée. D'une façon générale, ces maladies dites atopiques sont considérées comme le résultat d'une sensibilité immédiate de type I à la phase précoce et retardée à la phase tardive selon la classification de Gell & Coombs (Type I : réaction immédiate IgE dépendante ; Type II : réaction cytotoxique ; Type III : réaction semi-retardée avec la présence de complexes immuns circulants ; et Type IV : réaction retardée [2]). Cette classification qui a été définie au début des années soixante a bénéficié d'une adaptation par un comité d'expert de l'EAACI aux connaissances nouvelles de la régulation du système immunitaire [1]. Ces modifications sont présentées de façon didactique dans les deux revues de la littérature « Avancées en immunologie » de Kay [3, 4]. Une présentation schématique issue de la revue Nature Reviews Immunology est présentée en Figure 1 (p 26) [3].

Figure 1 : Mécanismes de la réaction allergique



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

D'après Larché et al. Nature Reviews Immunology 6, 761-771 (October 2006).[3]

Légende :

a | Sensibilisation aux allergènes et développement de mémoire spécifique des lymphocytes B et T.

La différenciation et l'expansion clonale des lymphocytes Th2 mènent à la production des cytokines (interleukine-4 (IL-4) et IL-13), qui induisent la production d'IgE et l'expansion clonale des populations naïves de lymphocyte B (naïf et sécrétant ou IgE+). L'activation du lymphocyte T en présence d'IL-4 augmente la différenciation vers les cellules de Th2.

b | Réaction d'hypersensibilité de type 1 (phase immédiate de la réaction allergique).

L'assemblage « IgE spécifique-allergène » interagit avec les cellules cibles (mastocytes et basophiles) via la liaison avec les récepteurs membranaires FcεRI (récepteur de haute affinité pour l'IgE) conduit à la libération d'amines vasoactives (histamine), des médiateurs lipidiques (tels que la prostaglandine D, le platelet-activating factor, les leukotriènes C₄ (LTC₄), LTD₄ and LTE₄), des chemokines (CXCL8, CXCL10 et CCL2) et d'autres cytokines (tels que l'IL-4, IL-5 et IL-13). L'ensemble de ces mécanismes conduit aux symptômes immédiats de la maladie allergique.

c | Inflammation allergique (phase en retardée de la réaction allergique). Cette phase conduit à la migration des populations cellulaires sur le site de contact avec l'allergène. Sous l'influence des chemokines et d'autres cytokines, les cellules T allergène-spécifiques sont réactivées avec un développement clonal. La présentation locale de l'antigène par les cellules dendritiques augmente l'activation des cellules T. La production locale d'IgE est observée dans la rhinite allergique et l'asthme, mais pas dans l'inflammation allergique de la peau (l'exemple principal est la dermatite atopique).

Les éosinophiles sont l'une des cellules inflammatoires principales dans les poumons des individus asthmatiques (constituant jusqu'à 50 % de l'infiltrat cellulaire) mais pas dans le cas de la dermatite atopique (1-2 % de l'infiltrat cellulaire). Les cellules Th1, qui produisent l'IFNγ et le TNF-α contribuent à l'activation et à l'apoptose des kératinocytes (dans la peau), des cellules épithéliales bronchiques et des cellules musculaires lisses pulmonaires. L'activation des mastocytes et des basophiles, qui libèrent de l'histamine, des chemokines et d'autres cytokines, contribue également à la réaction allergique de tardive.

CD95L, ligand CD95 ; SCF, stem-cell-factor (également connu sous le nom de ligand de KIT) ; TCR, récepteur à cellule T.

L'ASTHME

Définition

L'asthme est un syndrome caractérisé par une hyperréactivité bronchique et une inflammation des voies aériennes associée à une obstruction bronchique réversible avec ou sans traitement [4]. C'est une maladie inflammatoire des bronches touchant à la fois la partie endoluminale (présence de polynucléaires neutrophiles) et la partie pariétale de la paroi des bronches (présence de polynucléaires éosinophiles, de lymphocytes et de mastocytes).

L'hyperréactivité bronchique peut être déclenchée par de nombreux stimuli. Elle est diagnostiquée en se basant sur des tests de provocation bronchique. Lors de ces tests, l'arbre respiratoire est exposé à des stimuli divers dont les agonistes bronchoconstricteurs comme la métacholine. Lors de ce test à la métacholine, un sujet sain ne doit pas déclencher une bronchoconstriction avant le seuil de 3000 µg de métacholine. La réversibilité de la bronchoconstriction, caractéristique de l'asthme, est affirmée par le test de la réversibilité du trouble ventilatoire obstructif au débitmètre de pointe après inhalation d'une quantité donnée de médicaments β2-mimétique.

Dans l'asthme allergique classique IgE médié, les allergènes déclenchant l'hyperréactivité bronchique sont nombreux : par exemple, les substances domestiques (acariens des poussières de maison, allergènes des plantes d'intérieurs), les allergènes provenant des animaux domestiques (chiens, chats, et rongeurs) et les allergènes extérieurs (les espèces fongiques, les pollens d'herbacées ou d'arbres). D'une façon générale, l'asthme est associé à une sensibilité IgE médiée pour des pneumallergènes de grande taille et 80 % des patients présentent des réactions cutanées positives aux pneumallergènes communs. Le mécanisme allergique est identifié dans 80 % des cas d'asthme de l'enfant et dans seulement 40-50 % de l'asthme de l'adulte [5, 6]. L'association avec une composante IgE médiée mesurable n'est pas systématiquement retrouvée. On parle alors d'asthme non allergique ; les termes « asthme endogène » ou « asthme intrinsèque » ne devant plus être employés. L'accentuation de l'asthme allergique classique IgE médié peut être aussi reliée aux polluants d'origine extérieure, notamment aux pollutions urbaines saisonnières liées aux microparticules de diesel, aux oxydes d'azote et à l'ozone [7-9]. L'activité professionnelle peut également être source

d'asthme à de nombreux postes de travail exposés aux poussières ou à certains composés chimiques [10, 11].

Les études prospectives sur l'asthme ont permis d'identifier différents phénotypes pendant l'enfance, l'adolescence et la vie adulte. Avant l'âge de trois ans, le diagnostic d' « asthme du nourrisson » est suspecté à partir de 3 épisodes de sifflements par an. Ce phénotype asthmatique est appelé en anglais « transient infant wheezing » [12]. Il régresse autour du troisième anniversaire et n'est pas associé à l'atopie. Il est aggravé par le tabagisme maternel et se manifeste cliniquement lors des infections virales (dont le rhinovirus et le virus syncytial respiratoire). Ce phénotype sifflements sans atopie (« transient infant wheezing ») a un bon pronostic avec une disparition des symptômes au cours de l'enfance, sans répercussion sur la fonction respiratoire.

Mais certains enfants présentent des sifflements persistants à l'âge scolaire associés ou non à l'atopie. L'atopie chez le nourrisson est d'autre part statistiquement associée au développement d'asthme et/ou de rhume des foies plus tard dans l'enfance [13, 14]. Ainsi, le phénotype « sifflements avec atopie » peut conduire à des signes cliniques de sifflements persistants à l'âge adulte avec un retentissement sur la fonction respiratoire [15].

Épidémiologie

Dans le monde, l'Organisation mondiale de la santé estime à 300 millions de personnes souffrant d'asthme. Elle est considérée comme la maladie chronique la plus courante chez l'enfant. On note que de nombreux cas d'asthme sont sous diagnostiqués et qu'une large part des décès liés à l'asthme surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire [16, 17].

En 1998, la phase I de l'étude ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) a démontré de fortes disparités géographiques de la prévalence de l'asthme et des sifflements. Pour ce dernier paramètre, la prévalence variait de 4.1 % à 32.1 % chez les enfants et de 2.1 % à 32.3 % chez les adolescents suivant les pays étudiés [18]. Dans cette étude, il n'a cependant pas été possible de faire la différence entre l'asthme allergique et non allergique [19]. Dans les pays européens, la prévalence de l'asthme tout âge confondu est de 7 à 10 % et proche de 10 % chez l'enfant. En France, selon une enquête de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) basée sur un

autoquestionnaire portant sur 1 675 enfants âgés de 11-14 ans et 20 982 adultes âgés de 15 ans ou plus, 12,7 % des enfants ont répondu avoir déjà eu de l'asthme et 8,3 % des déclarants avoir eu des sifflements dans les douze derniers mois. La prévalence de l'asthme actuel chez les adultes, définie par la survenue d'une crise d'asthme dans les douze derniers mois ou la prise actuelle d'un traitement pour asthme, était estimée à 6 % et la prévalence des sifflements dans les douze derniers mois à 12 % [20].

L'augmentation de la prévalence de l'asthme observée durant les trois dernières décennies du 20^{ème} siècle pourrait être liée à un meilleur diagnostic et à un signalement des cas plus opérant. Toutefois, il est admis qu'il existe durant ces dernières décades une réelle augmentation, en particulier dans les pays développés, où la courbe de prévalence de l'asthme a été considérée par certains auteurs comme similaire à un phénomène épidémique [21]. Cette augmentation semble toutefois se ralentir dans les pays développés [22] comme en Allemagne [23], en Grande-Bretagne [24], en Italie [25], en France [26], en Suisse [27], en Espagne [28], en Australie [29] et à Hong-Kong [30]. Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce plateau : (1) l'effet des influences environnementales délétères a atteint son maximum et a touché l'ensemble de la population susceptible d'exprimer une pathologie allergique clinique (appelé effet de cohorte liée à une génération en épidémiologie), (2) une stabilisation d'un ou plusieurs facteurs aggravants et/ou (3) une incidence stable accompagnée d'une prise en charge optimale médicale entraînant une diminution progressive de la prévalence observée.

Dans les études épidémiologiques, l'asthme de l'enfant est généralement recherché par un questionnaire standardisé portant notamment sur les symptômes de sifflement (*wheezing* en anglais), le diagnostic médical et les traitements médicamenteux. Il peut être associé au questionnaire la recherche d'une hypersensibilité immédiate (dosage des IgE totales et spécifiques et/ou tests cutanés), le dosage des cytokines inflammatoires et, de façon plus rare, mais appelée à devenir plus fréquente, le génotypage et les explorations fonctionnelles respiratoires (recherche de l'hyperréactivité bronchique et dosage du monoxyde d'azote expiré).

Définition

La rhinite allergique se définit comme l'inflammation des voies aériennes supérieures chez une personne sensibilisée en présence d'un allergène. Les symptômes associent une rhinorrhée, des éternuements, une obstruction et un prurit nasal. On peut distinguer schématiquement deux entités cliniques IgE médiée : **la rhinite allergique pollinique saisonnière** (pollinose ou rhume des foins) associée à une conjonctivite et parfois à une crise d'asthme et, **la rhinite allergique persistante** qui peut-être reliée à la sensibilisation aux allergènes domestiques (p. ex. acariens des poussières ou animaux).

Depuis 2000, la classification de la rhinite allergique ARIA (*Allergic Rhinitis Initiative in Asthma*) modifie la classification rhinite perannuelle/saisonnière en rhinite intermittente/ persistante avec trois classes d'intensité croissante (légère, modérée ou sévère) [31]. La recherche d'une sensibilisation peut être associée au diagnostic clinique par le dosage des IgE ou la réalisation de tests cutanés. Une alternative pour l'étude en population générale est d'utiliser un score pour le diagnostic : le *Score for Allergic Rhinitis* (SFAR) offre des performances satisfaisantes [32].

Épidémiologie

Dans les études épidémiologiques, la rhinite allergique est fréquemment recherchée en utilisant un questionnaire, associé ou non au diagnostic médical, portant sur l'identification des signes cliniques évocateurs en dehors d'un épisode infectieux des voies aériennes supérieures. Dans la revue de la littérature de Guillam et Segala sur l'épidémiologie de la rhinite allergique, il apparaît une relation entre les indicateurs sanitaires de rhinite allergique pollinique et les comptes polliniques [33]. En 2009, un bilan général de la phase III de l'étude multicentrique international ISAAC portant sur la rhino-conjonctivite a été publié [34]. Dans ce travail, la prévalence des symptômes de rhino-conjonctivite est de 8.5 % pour les enfants âgés de 6-7 ans et de 14.6 % pour les 13-14 ans. Toutefois, il est reporté des variations importantes entre pays, avec les prévalences les plus élevées dans les pays en voie de développement de l'Amérique latine et de l'Afrique. En France, la prévalence de la rhinite pollinique est estimée entre 11 et 27 % chez les adolescents de 13-14 ans [35] et à 18.5 % chez les adultes [36, 37].

Définition

Les allergies alimentaires (AA) sont l'ensemble des manifestations cliniques liées à une réponse allergique vis-à-vis d'un allergène alimentaire. Elles apparaissent dès les premières années de la vie, en général avant l'âge de quatre ans, alors que le système digestif ainsi que le système immunitaire sont encore en phase de maturation. L'eczéma, l'asthme et la rhinite allergique surviennent plus tardivement. Les réactions d'hypersensibilité immédiate de type I sont les plus fréquentes, mais une hypersensibilité de type IV (retardée, à médiation cellulaire) est impliquée dans les allergies aux protéines du lait de vache non IgE dépendante. Les signes cliniques associés peuvent toucher différents organes, mais chez l'enfant la dermatite atopique (DA) est la manifestation cutanée prédominante associée à l'allergie alimentaire.

Épidémiologie

Les études sur les allergies alimentaires dans la population générale sont complexes. En effet, le diagnostic est basé sur des critères anamnestiques, cliniques, biologiques (recherche d'une réponse IgE médiée) et des tests de provocation. L'ensemble de ces critères ne peut être obtenu dans les études épidémiologiques larges, en particulier chez le nourrisson. En conséquence, un questionnaire portant sur les symptômes après ingestion fournit un diagnostic sans certitude sur l'origine IgE médiée des symptômes si finalement la recherche d'une sensibilisation n'y est pas associée. On note que les allergies alimentaires peuvent être associées à une sensibilisation aux pneumallergènes et à un asthme [38]. La prévalence des AA aurait doublé dans les deux dernières décennies. Il est difficile de savoir si cette augmentation est liée à un meilleur signalement des cas ou à une augmentation de l'incidence annuelle. La prévalence de l'allergie alimentaire est estimée entre 1.4 et 1.8 % dans la population générale européenne et en Angleterre, [39] et entre 2 et 3 % aux Pays-Bas [40]. Dans une revue de la littérature, la prévalence européenne serait estimée à 3,2 % chez l'adulte et 4.7 % chez l'enfant [41]. Selon G. Dutau, il est raisonnable d'estimer la prévalence des allergies alimentaires entre 2 et 4 % pour l'ensemble des tranches d'âge [42]. Dans la population générale française, la prévalence des allergies alimentaires évolutives a été estimée à 3.2 % (3.6 fois plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte) [43].

Définition

L'eczéma/dermatite atopique (ou parfois appelée dermite atopique) est une maladie dermatologique caractérisée par des lésions cutanées sèches, squameuses, et prurigineuses. Elles apparaissent en général entre l'âge de 3 mois et 2 ans. Elles guérissent dans une majorité des cas avant l'adolescence, mais des rechutes tardives sont possibles. La dermatite atopique est souvent, mais pas systématiquement, associée à un niveau élevé d'une ou plusieurs IgE sériques pour les pneumallergènes et les trophallergènes [44]. L'EAACI a proposé que le syndrome eczéma/dermatite atopique soit la correspondance *atopic eczema/dermatitis syndrome* ou AEDS en anglais [1].

Épidémiologie

Le diagnostic dans les études épidémiologiques est généralement basé sur un questionnaire portant sur le diagnostic médical et sur les symptômes (signes cliniques, durée, âge d'apparition et localisations cutanées). Un score clinique peut y être associé pour juger de la sévérité de l'eczéma (le SCORAD, *SCORing Atopic Dermatitis*).

La prévalence estimée dans les pays développés est comprise entre 10 et 20 %. La synthèse de l'étude ISAAC entre la Phase I et la Phase III a permis de conclure à une stabilisation (avec un plateau maximum de 20 %), voire une décroissance de l'eczéma chez les enfants âgés de 13-14 ans avec de fortes diminutions au Royaume-Uni et en Nouvelle-Zélande. Dans les pays en voie de développement, une augmentation pour les sujets jeunes est enregistrée avec cependant de fortes variations géographiques [45].

LA MARCHE ATOPIQUE

L'étude de l'histoire naturelle des maladies atopiques a permis de définir le concept de « marche atopique ». Cette dernière se rapporte à la séquence chronologique de la sensibilisation et de l'expression clinique des maladies allergiques au cours de la vie d'un individu. Certes, il existe des variations inter-individuelles importantes, mais les études épidémiologiques, notamment prospectives, ont permis de définir la succession des principaux évènements de santé associés à l'allergie constituant la « marche atopique » [46-48].

Dès le début du siècle, il a été proposé que la sensibilisation de l'enfant pouvait débuter *in utero*, mais les mécanismes immunologiques sont actuellement encore débattus [49, 50]. *In utero*, il est admis que la capacité des lymphocytes auxiliaires T *helper* fœtaux à répondre aux stimulations antigéniques augmente avec l'âge gestationnel et que la polarisation initiale de la réponse immune des lymphocytes fœtaux est de type lymphocyte T *helper* 2 [51, 52]. Le transfert des allergènes au travers du placenta a été démontré expérimentalement pour l'ovalbumine et l'allergène majeur du bouleau. Ce transfert est accentué par la présence d'IgG spécifiques (membrane placentaire) [53]. Il a été confirmé *in vivo* pour les allergènes d'acariens Der p 1 avec une exposition fœtale d'une part transamniotique à la 16^{ème} semaine de gestation et d'autre part vasculaire mesurée au sang du cordon au terme de la grossesse [54].

Les conséquences de cette exposition sur le système immunitaire fœtal restent encore à déterminer [55]. Il existe cependant quelques éléments de réponse. En effet, le fœtus est capable de produire des IgE dès la 11^{ème} semaine de gestation [56] et il existe une influence du mode de vie alimentaire de la mère sur la positivité des IgE au sang du cordon [57]. Néanmoins à la naissance, la quantité d'IgE détectable reste en général faible et le pourcentage de positivité est variable en fonction des allergènes ; par exemple, jusqu'à 8 % pour les allergènes saisonniers, 16 % pour les allergènes alimentaires et 24 % pour les 20 allergènes courants de l'étude de Pferfelle et al. [58]. Il est admis que la grossesse et les premiers mois de vie constitue une période favorable à la sensibilisation aux allergènes de l'environnement bien que les mécanismes sous-jacents à l'exposition *in utero* et leurs conséquences sur le système immunitaire restent discutés [54, 59-61]. Cette période représente bien une fenêtre temporelle pendant

laquelle d'une part le fœtus reçoit des signaux de l'environnement via la mère, et d'autre part où il s'établit probablement des mécanismes épigénétiques de régulation de son système immunitaire. Les sensibilisations précoces concernent le plus souvent les protéines alimentaires, dont l'œuf de poule et le lait de vache : plus de 10 % des enfants à l'âge de 1 an ont des IgE pour ces allergènes alimentaires [58, 62].

La deuxième étape correspond à la sensibilisation dans les premières années de vie. Cette seconde étape est la résultante de la prédisposition génétique et de l'action des facteurs environnementaux protecteurs ou aggravants des maladies allergiques. Il a été décrit qu'il existe une relation dose-réponse précoce entre les allergènes d'acariens domestiques/de chats et la sensibilisation durant les premières années de l'enfant [63]. Par ailleurs, une forte sensibilisation aux protéines alimentaires serait associée à une plus grande capacité de sensibilisation notamment aux pneumallergènes [64]. Or la période de sensibilisation pour les enfants sans prédisposition génétique atopique serait plus courte car l'orientation immunitaire de type Th1 (Lymphocyte T *helper* 1) surviendrait plus rapidement comparativement aux enfants prédisposés à l'atopie. À l'inverse, les enfants prédisposés à l'atopie présenteraient à la fois une période plus longue propice à la sensibilisation et un risque de sensibilisation pour des concentrations plus faibles d'allergènes. Il a en effet été démontré, chez les enfants ayant des antécédents familiaux d'atopie, un risque accru de sensibilisation, mais pas d'asthme aux allergènes d'acariens domestiques et de chats pour des concentrations faibles d'allergènes dans l'environnement [65, 66].

La dermatite atopique est la première manifestation allergique de la marche atopique. Elle peut survenir durant les trois premières années de vie. Ces déterminants sont la sévérité des symptômes et la sensibilisation associée [67]. Au sein de l'étude allemande multicentrique de cohorte de naissance « *Multicentre Allergy Study* », la prévalence cumulée de la DA dans les deux premières années de vie a été de 21.5 % , avec une rémission des symptômes dans environ la moitié des cas au deuxième anniversaire [67]. Il est intéressant de noter que dans cette cohorte, une dermatite atopique précoce est associée à un asthme à l'âge de sept ans [67]. Une méta-analyse de van der Hulst en 2007 portant sur les études de cohorte prospective a estimé un risque significativement augmenté d'asthme pour les enfants ayant présenté de l'eczéma avant 4 ans (pooledOR 2.14, IC_{95%} 1.67-2.75) [68]. Il a été démontré d'autres liens avec les

maladies allergiques : l'allergie à l'œuf à l'âge de 4-5 ans a été associée à un risque accru de sensibilisation aux pneumallergènes, d'asthme et de rhinite allergique [62, 69].

La rhino-conjonctivite allergique aux pollens apparait en général après le troisième anniversaire ; une période pendant laquelle les enfants ont été sensibilisés aux pneumallergènes polliniques [70]. Pour l'asthme, la description est plus complexe. En effet, il existe des enfants de moins d'un an présentant des sifflements respiratoires (*transient infant wheezing*) mais parmi ceux-ci seulement une fraction est susceptible de présenter une poursuite des symptômes cliniques (cf. paragraphe sur l'asthme).

LES FACTEURS ASSOCIES AUX MALADIES ALLERGIQUES

Les maladies allergiques ont bénéficié durant les dernières décennies d'un grand nombre d'études épidémiologiques avec deux axes principaux : l'un centré sur l'individu et l'autre sur l'environnement. Elles ont permis de mettre en évidence deux facteurs majeurs de risque des maladies allergiques : la composante génétique et l'exposition individuelle aux allergènes. Cependant, de nombreux autres facteurs de risque au niveau individuel ont été mis en avant et l'on peut citer, à titre d'exemple : l'obésité, les vaccinations, la prise d'antibiotiques ou la prise de paracétamol dans l'enfance. Il faut ajouter aussi des facteurs environnementaux d'intérêt en santé publique pouvant jouer un rôle dans la survenue ou l'aggravation des maladies allergiques. On retiendra les conséquences de l'alimentation, de la pollution atmosphérique sur les affections respiratoires dont l'asthme [7, 71], et du mode de vie dans l'enfance : urbain, rural et vie « à la ferme ».

Ces études épidémiologiques ont conduit à de nouvelles interrogations :

- Comment intégrer simplement les maladies allergiques dans un schéma physiopathologique cohérent si elles sont la conséquence d'une étiologie multifactorielle?
- Quels sont les effets de la variabilité génétique des populations étudiées dans ces études environnementales ? Ces variations pourraient-elles entraîner un biais lors de l'identification des facteurs de risques des maladies allergiques ?

Dans cette partie consacrée à l'épidémiologie, nous allons tout d'abord présenter une synthèse bibliographique de ces principaux facteurs reliés aux maladies allergiques et, plus en détail, l'exposition individuelle aux allergènes et la composante génétique de ces maladies. Cette synthèse n'a pas pour but d'être exhaustive, mais de situer les connaissances de la recherche en épidémiologie au sein desquelles ont pris naissance les études sur l'environnement fermier. Dans une seconde partie, nous approfondirons notre présentation sur les études portant spécifiquement sur l'environnement fermier et les maladies allergiques. Ces dernières constituent le support de la problématique de notre travail d'étude environnementale.

L'exposition aux allergènes

Par définition, l'allergie se définit comme le versant clinique de la sensibilisation d'un individu à un ou plusieurs allergènes. Cette exposition allergénique est extrêmement complexe, car il existe en effet plusieurs centaines d'allergènes pouvant conduire à une sensibilisation, comme illustrée dans le dictionnaire des allergènes de G. Dutau [72]. La dénomination des allergènes est basée sur l'utilisation des trois premières lettres du nom de genre et la première lettre du nom d'espèce accolée d'un chiffre spécifique [73]. Ce sont en général des molécules protéiques ayant des fonctions biologiques données, de petites tailles (< 70kDa), faiblement hydrophobes et chargées négativement [73]. L'exposition allergénique peut se faire par voie respiratoire pour les pneumallergènes ou par voie digestive pour les trophallergènes mais finalement seule une fraction limitée de ces allergènes est responsable de la majeure partie de la sensibilisation de la population.

Les principaux pneumallergènes de l'environnement intérieur responsables de sensibilisation sont les allergènes :

- des acariens [allergènes majeurs : Der p1 (pour *Dermatophagoides pteronyssinus*), Der f1 (pour *D. farinae*) et Eur m1 (pour *Euroglyphus maynei*)] et des blattes (allergènes majeurs : Bla g1 et g2),
- des animaux de compagnie (allergènes majeurs : pour le chat Fel d1 (*Felis domesticus*), pour le chien Can f1, d1 et f2 (*Canis Familiaris*)),
- des moisissures du domicile dont la plus importante est *Alternaria alternata* (allergène majeur : Alt a2).

Dans le milieu extérieur, les principales sources allergéniques sont d'origine fongique et végétale, avec les pollens de graminées et d'arbres (dont le bouleau fréquent en Scandinavie, *Betula sp.*). Les graminées sont constituées par six tribus : les Festucées (dactyles), les Hordées (orge), les Avenées (avoine), les Phalaridées, les Agrostidées (fléole des prés, *Phleum pratense* ; allergènes majeurs : Phl p1 et Phl p5) et les Chloridées. Les pics de pollinisation se situent en juin-juillet, accompagnés généralement par un second pic en septembre-octobre avec des variations régionales. Les fréquences de sensibilisation varient par conséquent en fonction du climat et de la couverture végétale de la région étudiée, par exemple élevée pour le cyprès en Europe du Sud [74] ou le bouleau en Scandinavie [75, 76].

Pour les allergies alimentaires, les aliments les plus couramment en cause dans les sensibilisations sont les trophallergènes d'œuf Gal d1 (pour ovomocoïde) et Gal d2 (pour l'ovalbumine), d'arachides (allergènes majeurs : Ara h1, h2 et h3), du lait (allergènes majeurs : les caséines et la bêta-lactoglobuline) et du poisson (allergène majeur : allergène M (pour la morue)). Il existe des réactions croisées entre trophallergènes et pneumallergènes qui peuvent être en cause dans les manifestations respiratoires de l'allergie alimentaire.

Les facteurs génétiques

L'immunité est caractérisée par sa capacité d'adaptation à l'environnement et les maladies allergiques atopiques sont le résultat d'interactions entre un nombre indéterminé de gènes et des facteurs environnementaux. Une présentation clinique allergique identique (appelée phénotype) entre les parents et leurs enfants ou à l'intérieur de la fratrie sont en faveur de l'existence d'un ou plusieurs gènes associés au phénotype. Il est reconnu que le principal facteur de risque qui prédispose aux maladies allergiques et à l'asthme est un ou plusieurs antécédents familiaux. En conséquence, l'ensemble des études épidémiologiques récentes tient compte des antécédents familiaux de maladies allergiques comme facteurs d'ajustement dans les modèles statistiques des calculs de risque. À titre d'exemple, il existe une héritabilité de 60 % chez des jumeaux pour l'asthme ou la dermatite atopique [77, 78]. Mais ces publications anciennes ne rendent pas compte des avancées considérables survenues dans les dix dernières années dans la recherche portant sur les liens entre susceptibilité génétique, atopie et maladies allergiques.

Actuellement, le caractère polygénique de la maladie est accepté et de nombreux gènes sont proposés comme des candidats potentiels de l'asthme et des maladies allergiques. Cette situation complexe s'explique par le nombre élevé de médiateurs et de récepteurs cellulaires impliqués dans la réponse d'hypersensibilité et dans la régulation des populations lymphocytaires. Parmi ces gènes candidats, deux groupes présentent un intérêt particulier pour leur implication potentielle avec les facteurs environnementaux microbiens :

- ✓ Pour l'asthme, un **premier groupe** de gènes a une relation étroite avec l'interface cutanée et muqueuse de l'homme et de son environnement. Cet aspect a été revu en 2004 par Cookson [79]. Il est constitué des gènes présents dans l'épithélium bronchique terminal : le GPRA codant pour un récepteur de la protéine G (*G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility*), le DPP10 (*dipeptidyl peptidase 10*) qui interagirait avec des protéines inflammatoires [80, 81] et le gène codant pour la protéine SPINK5 du complexe de différenciation épidermique (*serine protease inhibitor known* ou LEKTI). Le polymorphisme génétique de la protéine SPINK5 modifie le risque de développer une sensibilisation mesurée par un taux élevé d'IgE, une

dermatite atopique et un asthme [82, 83]. Cette protéine sécrétée au niveau des follicules cutanés contient des domaines antiprotéases pouvant jouer un rôle dans la protection des atteintes cutanées invasives à *Staphylococcus aureus* dans la dermatite atopique sévère [84]. Un certain nombre d'autres gènes ayant une liaison avec les muqueuses ont été proposés comme candidats (polymorphisme de gène de l'IL-13, du récepteur à l'IL-4 ou FcεRI des mastocytes). L'asthme et la dermatite atopique ont été aussi reliés à une mutation du gène codant pour la filaggrine – protéine de structure déterminante pour la fonction de barrière de la peau et de certaines muqueuses – dans la population européenne, mais cette association n'a pas été retrouvée dans une étude récente chinoise démontrant la nécessité de la réplication des études génétiques [85, 86]. Une méta-analyse récente vient de confirmer que la mutation du gène de la filaggrine est un facteur de risque robuste d'eczéma et d'asthme [87]. Pour conclure pour ce premier groupe, nous soulignons ici l'importance du polymorphisme des gènes liés à la barrière épithéliale cutanée et/ou pulmonaire et l'importance potentielle des interactions de cette interface avec les stimulations environnementales [79].

- ✓ Un **second groupe** concerne la famille des récepteurs de profil de reconnaissance des structures microbiennes spécifiques (PAMP pour *pathogen-associated molecular patterns*). Ces récepteurs de l'immunité innée sont appelés récepteurs de reconnaissance des motifs ou PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs ont été très conservés au cours de l'évolution. Ils permettent une différenciation des flores commensales et pathogènes, mais aussi une réponse anti-infectieuse multifactorielle à l'étape initiale de l'infection. Ces PRR comprennent trois familles importantes jouant un rôle dans la reconnaissance de l'infection et conduisant à des effets différents sur le système inflammatoire :

- les récepteurs sécrétés.
- les récepteurs intracellulaires NOD1 et NOD2 (*nucleotide-binding oligomerisation domain*) et PKRs (*RNA-dependent protein kinase*).
- les récepteurs de surface des cellules de signalisation ou TLR (*Toll-like receptors*) et les récepteurs spécifiques des cellules myéloïdes

(CD14). Les récepteurs TLR sont présents à la surface de nombreuses cellules de l'immunité. Ces récepteurs jouent un rôle clé à l'interface du système immunitaire et de l'environnement [88]. Une synthèse des fonctionnalités des TLR, actualisée et adaptée de la littérature sur les PRR et les liens avec l'allergologie, est présentée dans le Tableau I (p44) [89-92]. À la lecture de ce tableau, on mesure l'importance des stimulations microbiennes sur le système immunitaire et les liens immunologiques potentiels avec les maladies allergiques. Les voies d'activation intracellulaire sont complexes, comme l'a rapporté Yamamoto et al. [93]. Pour aller plus loin, une série de posters de synthèse sont disponibles en ligne sur le site de *Nature immunology reviews*. On retiendra pour cette section *Innate immunity sensing and signaling* (www.nature.com/nri/posters/innate/index.html) et *Toll-like receptor signalling* (www.nature.com/nri/posters/tlr/nri1397.html).

- La susceptibilité asthmatique a aussi été associée au polymorphisme des gènes impliqués dans la reconnaissance des structures microbiennes spécifiques comme :
 - le TIM1 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 1*, ou HAVCR1) [94] en relation avec une séroconversion pour l'hépatite A,
 - le NOD2 (ou CARD15) codant pour une protéine intracellulaire pour le lipopolysaccharide bactérien (LPS) [95]
 - les gènes codant pour les récepteurs cellulaires de surface de l'immunité innée (TLR2, TLR4 et CD14)[96, 97].

Pour le gène du neuropeptide S receptor 1 (NPSR1), considéré comme un gène candidat pour l'asthme, une interaction entre son polymorphisme et le contact animal fermier a été mise en évidence récemment dans la population de l'étude PARSIFAL (*Prevention of Allergy-Risk Factors for Sensitization in Children Related to Farming and Anthroposophic Lifestyle*) [98]. Une revue complète des

gènes impliqués dans l'asthme a été récemment publiée [99] et nous reviendrons plus en détail sur les articles de génétique reliés à l'environnement fermier dans la section correspondante (cf. infra paragraphe sur les études du milieu fermier).

Au travers de ces exemples, la prise en compte des progrès de la génétique dans la connaissance des maladies allergiques est incontournable et essentielle. Ceci nous conduit à souligner deux conséquences majeures dans les recherches futures :

- La première concerne l'épidémiologie des maladies allergiques. Le caractère polygénique d'une maladie est un obstacle avéré à la stabilité des résultats dans les méta-analyses classiques qui rassemblent des études portant sur des populations génétiquement hétérogènes. En effet, la magnitude de l'association entre un facteur de risque et la maladie étudiée peut être modifiée par un effet de composition génétique de la population étudiée [99]. Cet effet de composition peut être dû à un ou plusieurs gènes de susceptibilité, à des polymorphismes génétiques ou à des modifications épigénétiques comme proposé cette année pour l'expression du gène codant pour l'IFN- γ [100].
- La seconde se rapporte à la composante environnementale. En effet, il est maintenant acquis que les interactions entre l'environnement et les gènes constituent un couple critique dans l'apparition, la persistance et la protection des maladies allergiques [79, 101].

Une amélioration des connaissances de la composition de l'environnement, notamment microbien, est devenue et sera une étape déterminante dans l'interprétation et la compréhension des mécanismes génétiques des maladies allergiques [102, 103].

Tableau I : Récepteurs de l'immunité innée chez l'homme (ou *Pattern Recognition Receptors*, PRR).

	ÉLÉMENTS RECONNUS	EXPRIME PAR	FONCTIONS
Peptides antimicrobiens			
Defensins	Membranes microbiennes (chargée négativement)		Opsonisation, lyse des C. microbiennes, chimio attractant des C. du système immunitaire
α-Defensins		Polynucléaire neutrophile, C. de Paneth (épith. intestinal)	
β-Defensins		Épithélium	
Cathelicidine (LL-37)		Polynucléaire neutrophile, macrophage, épith.	
Dermocidin		Glande sudoripare	
Récepteurs Toll-like (TLR)			
TLR-1	Lipoprotéines bactériennes, acide lipotéichoïque ¹ (B.G+)	C. épithéliale et du système immunitaire	Activation cellulaire, dimérisation avec TLR-2
TLR-2	Lipoprotéines bactériennes, peptidoglycane ² , acide lipotéichoïque ¹ (B.G+), <i>Heat shock protein</i> , lipoarabinomannan ³ , zymosan ⁴	C. épithéliale et du système immunitaire	Activation cellulaire, dimérisation avec TLR-1 ou TLR-6
TLR-3	ARN viral double brin (virus du groupe III de la classification de Baltimore)	C. dendritique, Lymphocyte B	
TLR-4	Endotoxine bactérienne ⁵ (B.G-), <i>Heat shock protein</i> , protéine enveloppe du virus respiratoire syncytial humain		
TLR-5	Protéines du flagelle bactérien ⁶		
TLR-6	Lipoprotéines bactériennes, acide lipotéichoïque ¹ (B.G+)	C. épithéliale et du système immunitaire	Activation cellulaire, dimérisation avec TLR-2
TLR-7	ARN double brin (virus du groupe IV et V de la class. de Baltimore)		
TLR-8	ARN double brin (virus du groupe IV et V de la class. de Baltimore)		
TLR-9	Motif CpG non-méthylé de l'ADN bactérien/viral		
TLR-10	Inconnu		
MD-2	Endotoxine bactérienne ⁵ (B.G-)	C. épithéliale et du système immunitaire	Co-récepteur au TLR-4
CD14	Endotoxine bactérienne ⁵ (B.G-)		Stimulateur du TLR-4
Protéine liante du LPS ⁵	Endotoxine bactérienne ⁵ (B.G-)	C. hépatique	Stimulateur du TLR-5

1/2

(1) Les acides téichoïque et lipotéichoïque sont des longues chaînes de glycérol et d'acide phosphorique présentes à la surface des bactéries Gram positif ; (2) le peptidoglycane est constitué de chaînes d'acides aminés présents à la surface des staphylocoques, streptocoques et bacilles Gram positif ; (3) le lipoarabinomannan (LAM) est un glycolipide de surface et un facteur de virulence de *Mycobacterium tuberculosis* ; (4) les β(1-3)glucans sont des composants de la paroi cellulaire fongique et des levures ; (5) les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries Gram négatif (la toxicité associée au lipide A et l'immunogénicité associée aux composants polysaccharidiques) ; (6) la flagelline est la principale protéine constitutive du flagelle bactérien .

Tableau I : Récepteurs de l'immunité innée (ou *Pattern Recognition Receptors* - PPR). (2/2)

	ÉLÉMENTS RECONNUS	EXPRIME PAR	FONCTIONS
Récepteurs à la lectine de type C			
Récepteur au mannose	Mannan microbien	Macrophage	Activation cellulaire, endocytose/phagocytose production de médiateurs
Dectin-1	β(1-3)glucans	Macrophage, C. dendritique, polynucléaire neutrophile et lymphocytes	
Dectin-2	Mannose de l'hyphe fongique ⁷	Macrophage, C. dendritique	
DC-SIGN	Mannose de l'hyphe fongique ⁷	C. dendritique immature	
Collectins			
MBL	Mannose, fructose, n-acetyl glucosamine microbien	Foie	Activation du complément
Protéines A et D du surfactant	Oligosaccharides microbiens	C. alvéolaire de type II, C. de l'épithélium pulmonaire nonciliée	Opsonisation, production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires
NOD-like receptors			
NOD-1	Peptidoglycanes des bactéries Gram négatif	Ubiquitaire	Activation cellulaire
NOD-2	Peptidoglycane bactérien (muramyl dipeptides)	Macrophage, C. dendritique, C. de Paneth, épithélium gastro- intestinal	
NLRP1	Toxine de l'anthrax	Monocyte et polynucléaire neutrophile	Protéine du complexe de l'inflammasome
NLRP3 (cryopyrin)	ARN microbien, cristaux d'urée, de silice et d'amiante		
NLRC4	Protéines du flagelle bactérien		
Autres PRRs			
Protéine C réactive (CRP)	Phosphorylcholine des bactéries et C. en apoptose, histones nucléaires	Foie	Activation du complément, opsonisation par le biais du récepteur Fcγ et de la protéine activatrice du complément C1q
Récepteur à la N-formyl methionine	N-formyl methionine bactérienne	Phagocyte	Phagocytose
RIG-1 et MDA-5	ARN simple double brin (virus du groupe IV et V de classification de Baltimore)		

2/2

(7) Les hyphes fongiques caractérisent les Deuteromycètes (ou champignons « imparfaits » (*Fungi imperfecti*) dont les *Penicillium* et *Aspergillus*).

Les autres facteurs associés aux maladies allergiques

L'augmentation de l'asthme et des maladies allergiques observée à partir des années 1970 peut être liée, du moins en partie, à un meilleur diagnostic conduisant à une amélioration de la détection des cas dans les études épidémiologiques [104]. Mais cet unique paramètre ne peut probablement pas avoir contribué seul à cette augmentation. De nombreux travaux scientifiques ont pu identifier d'autres facteurs, en particulier environnementaux, qui pouvaient être à l'origine de ces modifications de prévalence. Dans ce contexte, une hypothèse globale a été avancée sur les modifications du mode de vie occidentalisé (*westernization* en anglais) qui rassemble à la fois une réduction des infections par une meilleure hygiène infantile (baisse de la stimulation Th1 considérée comme protectrice des maladies allergiques), une modification des habitudes alimentaires (apport de nouveaux allergènes, rôle délétère de la sédentarité et de l'obésité), une modification de l'habitat (confinement de l'habitat et augmentation des concentrations des allergènes de l'environnement intérieur) et enfin la pollution urbaine photochimique (oxydes d'azote et ozone) et particulaire fine (liée principalement aux véhicules au diesel). Une synthèse des principaux facteurs associés à l'asthme et aux maladies allergiques est résumée sous forme d'un tableau synoptique (Tableau II, p48).

Tableau II : Facteurs individuels et environnementaux associés aux maladies allergiques.

FACTEURS	LIEN EPIDEMIOLOGIQUE	HH	EFFETS	REMARQUES
INDIVIDUEL				
Génétique et sexe	Avééré		Modulation du risque	Lien avec l'hérédité, polymorphisme génétique
Accouchement par césarienne	Probable	✓	Augmentation du risque allergique chez les sujets prédisposés	Modification de la flore microbienne du nouveau-né
Complication(s) anté- et péri-natale(s)	Probable		↗ asthme	
Petit poids de naissance	Peu d'évidence		↘ eczéma et sensibilisation	Facteurs de confusion avec une affection anténatale ?
Durée de l'allaitement maternel	Probable		Effet protecteur des maladies atopiques chez les enfants non prédisposés	Résultats variables
Taille de la fratrie	Liaison récurrente	✓	Effet protecteur rhinite allergique, eczéma et asthme	Par augmentation des contacts avec les agents infectieux (influence Th1) ? Par modification épi-génétique <i>in utero</i> ?
Obésité	Probable		↗ asthme	Lien avec le système endocrinien (leptine)
Activité physique	Probable		Facteur protecteur	Diminution du risque de surpoids
Vaccination	Discuté	✓	↘ positivité des tests cutanés ↘ asthme et allergie	Résultats contradictoires pour la vaccination antituberculeuse Vaccination DTP et polio historiquement, mais une méta-analyse : pas de lien avec le BGC et coqueluche.
Consommation d'antibiotiques	Probable	✓	↗ asthme, rhinite allergique et eczéma	Modification de flore bactérienne sur les épithéliums
Consommation de paracétamol	Probable		↗ asthme de l'enfant	Plausibilité biologique existante
Hormonaux	Pas d'évidence			? effet de la contraception orale
Saison de naissance	Peu d'évidence		↘ sensibilisation	Si exposition à la naissance
ENVIRONNEMENTAUX				
Pollution atmosphérique				
Photochimique et particulaire	Avééré / régressions écologiques et plausibilité biologique		Co-exposition particulaire et allergène = augmentation de la sensibilisation ? Potentialisation réponse chez des sujets prédisposés	Inflammation pulmonaire distale <i>in vitro</i> (modèle murin) ↗ Expression ARNm codant pour cytokine Th2
Tabagisme				
In utero ou passif	Avééré		↗ asthme	

(✓) Facteurs entrant dans l'hypothèse hygiéniste (HH) ; (↗) augmentation du risque ; (↘) diminution du risque.

1/2

Tableau II : Facteurs individuels et environnementaux associés aux maladies allergiques.

FACTEURS	LIEN EPIDEMIOLOGIQUE	HH	EFFETS	REMARQUES
Exposition				
- Aux pesticides/aux poussières	Avéré / Probable		↗ asthme pour l'exposition professionnelle	
- Aux allergènes	Avéré		↗ de la sensibilisation, de l'asthme et de la rhinite	Pour les pollens +++
- Aux nouveaux allergènes	Peu d'évidence		Changement du profil de sensibilisation	En augmentation actuellement
- Aux endotoxines	Très probable et plausibilité biologique	✓	Protecteur en fonction des quantités, de la population et de la fenêtre d'exposition	Étudié dans le cadre de l'environnement fermier
- Aux animaux domestiques	Discuté	✓	Effet protecteur si précoce, aggravation si tardif	Exposition aux chats et aux chiens
- Aux animaux de la ferme	Probable	✓	Effet protecteur des maladies atopiques	Exposition aux bétails
Infection virale, parasitaire ou bactérienne				
- Hépatite A	Liaison récurrente		Effet protecteur des maladies atopiques	Infection virale dans les 1 ^{re} années
- Herpès virus (HSV1) / rougeole	Discuté			Études rétrospectives seulement
- <i>Toxoplasma gondii</i>	Liaison récurrente		Mécanismes biologiques inconnus	Études rétrospectives
- Helminthes	Liaison récurrente		Effet protecteur biologique plausible	
- <i>Helicobacter pylori</i>	Liaison récurrente		Mécanismes biologiques inconnus	Études rétrospectives
Alimentation				
Acide gras (ω -3 polyinsaturés) ; antioxydants et/ou Vitamines E	Évidence modérée		Effet protecteur biologique plausible	
Lait de vache non pasteurisé	Évidence en augmentation	(✓)	Effet protecteur biologique plausible	Résultats à confirmer
Modification des aliments lors de leur transformation industrielle	Pas d'évidence		↗ sensibilisation	Effet des conservateurs/colorants alimentaires ?
Consommation de probiotique	Très probable (essai clinique)	✓	↘ dermatite atopique	Mécanisme(s) biologique(s)
Variation de la composition de flore intestinale	Probable, mais discutée	✓	effet protecteur biologique plausible	Peu d'études
Mode de vie				
Fréquentation de la crèche	Liaison récurrente	✓	effet protecteur prévalence allergie	
Habitat	Evidence modérée		↗ sensibilisation ?	↗ [] de l'environnement intérieur par la baisse de la ventilation des habitats modernes.
"Westernization" vs. le mode de vie "anthropophile"	Probable		↗ sensibilisation et des maladies allergiques	Baisse de stimulation microbienne
Vie "à la ferme"	Liaison récurrente	✓	↘ sensibilisation, RdF et selon études de l'asthme	Variation géographique 2/2

(✓) facteurs entrant dans l'hypothèse hygiéniste (HH) ; (↗) augmentation du risque ; (↘) diminution du risque, RdF : Rhume des foies.

On n'est intelligent qu'à plusieurs.

Albert Einstein.

L'HYPOTHESE HYGIENISTE

DEFINITION

En 1989, l'hypothèse hygiéniste (HH) a été proposée par David Strachan de l'Université Saint-Georges de Londres lors d'une étude épidémiologique recherchant une association entre la prévalence de la rhinite allergique pollinique (*hay fever*) et la taille de la fratrie [105]. Cet auteur propose que les infections de la petite enfance transmises par le contact non-hygiénique des membres de la fratrie ou acquises pendant la période prénatale soient des facteurs de prévention du développement de maladies allergiques. Cette hypothèse pourrait alors expliquer l'augmentation des maladies allergiques observées dans les sociétés occidentalisées et urbanisées au sein desquelles les enfants en bas âge seraient moins exposés au « fardeau » microbiologique de l'environnement (*microbiological burden* en anglais).

Une vingtaine d'années plus tard, Erika Von Mutius précise trois points essentiels relevant de l'hypothèse hygiéniste : (1) les infections humaines (apparentes ou inapparentes) liées aux virus ou aux bactéries pourraient diminuer le risque de développer des maladies allergiques, (2) les expositions microbiennes non invasives peuvent diminuer le risque d'allergie et (3) l'ensemble de ces expositions microbiennes (invasive ou non) pourrait influencer la réponse immunitaire innée ou acquise [106]. Il est nécessaire de mentionner qu'il existe dans cette hypothèse plusieurs niveaux de complexité :

- dans la définition des phénotypes des maladies allergiques comme illustré dans la partie introductive,
- dans la fenêtre temporelle d'exposition de l'individu aux micro-organismes et/ou aux facteurs potentiellement protecteurs,
- et incontestablement dans l'interaction du patrimoine génétique individuel avec ces deux facteurs.

Durant ces 15 dernières années, un nombre croissant d'études épidémiologiques a cherché à mettre en évidence des facteurs protecteurs ou aggravants des maladies allergiques entrant dans ce cadre conceptuel (cf. Tableau II, p48 ; les principaux facteurs portant sur l'hypothèse hygiéniste sont reportés dans la colonne HH). Cette théorie a suscité nombre de revues de la littérature dont l'article de D. Strachan au dixième anniversaire de sa théorie [107], les deux articles successifs de A. Liu [108, 109], les synthèses parues depuis 2001 par E. von Mutius et coll. [106, 110-112].

LES DEBATS AUTOUR DE L'HYPOTHESE HYGIENISTE

Néanmoins, cette hypothèse scientifique a soulevé de nombreuses controverses remettant en cause sa relation avec l'augmentation des maladies allergiques. Citons tout d'abord en 2001 l'éditorial de l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* opposant les aspects de vue d' E. von Mutius et T. Platts-Mills. Ce dernier auteur souligne plusieurs points non expliqués par l'hypothèse de l'hygiène concernant l'augmentation de l'asthme. Considérant l'augmentation de l'asthme en Amérique du Nord qui a eu lieu entre les années 1970 et 2000, l'auteur pose la question de l'existence pendant cette période d'un réel changement d'exposition microbiologique lié à l'hygiène. En effet, les changements majeurs ont été acquis antérieurement à cette période – comme l'éradication du paludisme (1910), la chloration des ressources en eau potable (autour de 1920) et le contrôle des principales maladies infectieuses avant la Seconde Guerre mondiale ... – ce qui, pour l'auteur, ne plaide pas en faveur d'une relation de cause à effet pour l'asthme. Par ailleurs, les populations les plus touchées par l'asthme aux États-Unis sont les minorités pauvres pour lesquelles les conditions d'hygiène sont dégradées. Ce second point va, lui aussi, à l'encontre de l'hypothèse de l'hygiène. Enfin, l'auteur propose une polarisation alternative à l'orientation Th1, appelée Th2 modifiée [113]. Cette orientation immunitaire serait liée à l'exposition à de plus grandes quantités d'allergènes issues du milieu intérieur et favoriserait la sécrétion IgG et IgG4 sans IgE et sans risque d'asthme associé [113]. Il évoque enfin le lien entre l'augmentation de l'asthme et celle de l'obésité et de la diminution de l'activité physique. Notons que l'auteur a repris son argumentation dans un article « original » dans la revue *Allergy* en 2005 en soulignant le lien possible entre obésité/baisse de l'activité physique et asthme [114].

En 2003 et 2004 dans deux articles à l'orientation similaire, C. van Schayck oppose à l'hypothèse de l'hygiène le manque de validité statistique des études observationnelles (transversale ou longitudinale) et l'absence de travaux basés sur des études interventionnelles randomisées [115, 116]. Cependant, même si l'argument est juste, la faisabilité de ce type d'étude est discutable dans le cadre de l'hypothèse de l'hygiène. Les auteurs évoquent aussi la possibilité d'un biais lié à une sélection de la population des fermiers (sur le modèle du « *healthy worker effect* » ou effet du travailleur sain en épidémiologie des maladies professionnelles). En effet, le comportement des parents fermiers pourrait avoir influencé la vocation de travail à la ferme de la génération suivante ; les enfants ayant eu des symptômes respiratoires ou des manifestations atopiques dans l'enfance ne seraient pas orientés par le milieu familial vers un emploi d'exploitant agricole. Ainsi, une sélection progressive des générations pourrait conduire à l'attribution à tort d'un effet protecteur à l'environnement fermier, en fait relié à un processus de sélection des populations. Ce point a été appuyé par les travaux de Brabäck et al. en Suède [117]. Les études génétiques entre fermier, ruraux et urbains apporteront probablement des éléments de réponse dans l'avenir sur cette hypothèse d'isolement génétique.

En 2005, M. Wjst a publié un article portant sur des hypothèses alternatives originales de la protection observée des maladies allergiques dans les préAlpes bavaoises. Soulignant d'abord que les preuves scientifiques pour usage clinique d'un traitement pour l'asthme et les maladies atopiques n'étaient pas encore retenues par l'*European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, l'auteur revient sur les études portant sur le lien entre maladies infectieuses et maladies atopiques dont le support pour l'hypothèse de l'hygiène reste modeste. Il met en perspective les travaux portant sur les composants bactériens de la poussière, notamment l'acide muramique et les endotoxines, sans rejeter pour autant leurs actions immunologiques dans les études fondamentales. Pour les endotoxines, M. Wjst souligne qu'il n'existe pas de données quantitatives humaines pertinentes et que la plausibilité biologique reste discutable au regard : (i) des quantités très faibles mesurées lors de l'exposition en comparaison avec les flores bactériennes cutanée et intestinale humaines et (ii) de l'effet délétère, et donc contradictoire avec un mécanisme de protection, de l'exposition aux endotoxines sur la fonction respiratoire par l'induction d'une réponse inflammatoire des voies aériennes. Des explications alternatives sont proposées dans cet article portant sur la fréquence diminuée des maladies allergiques des enfants fermiers, nous retiendrons : (i) un

isolement génétique démontré des populations rurales [118] – et donc objectivement possible pour les populations de fermier – et (ii) la moindre fréquence dans la population des fermiers de supplémentation en vitamine D (la vitamine D ayant un action dépressive de la réponse Th1 chez l'animal) [119].

Citons pour conclure, les travaux de J. Douwes et N. Pearce qui ne remettent pas en cause l'hypothèse hygiéniste, mais l'intègre dans les changements globaux de la vie occidentalisée ou « *westernization package* » [120]. En 2005, ces auteurs rapportent la stabilisation de « l'épidémie d'asthme » et notent la contradiction avec l'absence d'une modification des habitudes de vie dans les pays développés vers les facteurs protecteurs traditionnels de l'hypothèse hygiéniste (pas d'augmentation de la taille de la famille, pas de retour à des conditions de vie « non hygiénique », pas d'augmentation quantitative des maladies infectieuses...). Cette tendance a été confirmée ultérieurement et pourrait être en relation avec un effet plateau pour lequel l'ensemble de la population susceptible a été atteinte [121]. Ceci est d'ailleurs compatible avec le cadre conceptuel de l'hypothèse de l'hygiène si l'on suppose que l'ensemble des sujets génétiquement prédisposés dans la population a été atteint. Ce commentaire de J. Douwes et N. Pearce a fait par ailleurs l'objet d'un débat ouvert et argumenté avec A. Linnenberg sur le rôle de la perte de la tolérance aux allergènes communs (lié à la diminution de l'exposition dans les sociétés occidentalisées) et l'accroissement des maladies allergiques [122, 123]. En 2008, un échange de points de vue entre W. Maziak et N. Pearce illustre bien que le débat sur la validité de l'hypothèse hygiéniste est loin d'être clos [124].

A l'issue de cette revue des débats autour de l'hypothèse hygiéniste et de la protection des maladies allergiques, nous mesurons l'importance d'une vision élargie en terme de temps et d'espace de l'évolution de l'épidémiologie des maladies allergiques et la multiplicité des facteurs potentiels en cause [125]. Dans ces conditions, les postulats de causalité épidémiologie – consistance des résultats entre les études, relation dose réponse entre l'exposition et la maladie, importance de l'effet et la plausibilité biologique – sont en conséquence difficiles à rassembler pour chaque facteur pris séparément. Une coopération des disciplines et des scientifiques sur des lignes de recherche claires et argumentées permettront de poursuivre le débat. De façon à mieux comprendre l'hypothèse de prévention des maladies allergiques, nous nous proposons de revenir sur les aspects immunologiques et sur les études portant sur l'environnement fermier.

LES BASES IMMUNOLOGIQUES

L'allergie est le résultat d'une cascade d'événements de régulation immunologique. La première étape est la fixation de l'allergène sur 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 (notamment Th1, Th2, Th3 et Th17).

La polarisation du système immunitaire

Dès la vie fœtale, la voie Th2 serait une voie « par défaut » réorientée en fonction des cytokines présentes (c.-à-d. les interleukines Il-12 pour Th1 ou Il-6, Il-23 et Il-1 β pour Th17). DE façon schématique, l'intervention de facteurs de microenvironnement comme les molécules activatrices de la voie des TLR – mais pas seulement – s'ajouterait dans la régulation de cette polarisation. Chez un sujet sain, la réponse immune va s'orienter vers la voie Th1 et la production d'IgG1 spécifique de l'allergène. Chez le sujet allergique pour lequel les populations de cellules Treg ont été décrites comme moins fréquentes, la production des anticorps va s'orienter vers l'isotype IgE spécifique sous une réponse immune dominée par la polarisation Th2.

Selon l'hypothèse hygiéniste, le contact microbien pourrait induire un statut immunitaire favorable à la tolérance des allergènes par le biais :

- de l'augmentation de la réponse immune des lymphocytes T *helper* 1 ou voie Th1 [augmentation de production des cytokines IL-12 et Interféron- γ (IFN- γ)] favorable à une réponse immune cytotoxique (cellules NK, lymphocytes T CD8, macrophages et cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps IgG1)
- et de la diminution de l'expression d'une réponse des lymphocytes T *helper* 2 ou voie Th2 favorable à une réponse immunologique IgE médiée [126, 127]. Cette réponse immunologique IgE médiée est effectuée par les lymphocytes B qui sont orientés par les lymphocytes Th2 produisant les interleukines 4, 5, 6, 9 et 13.

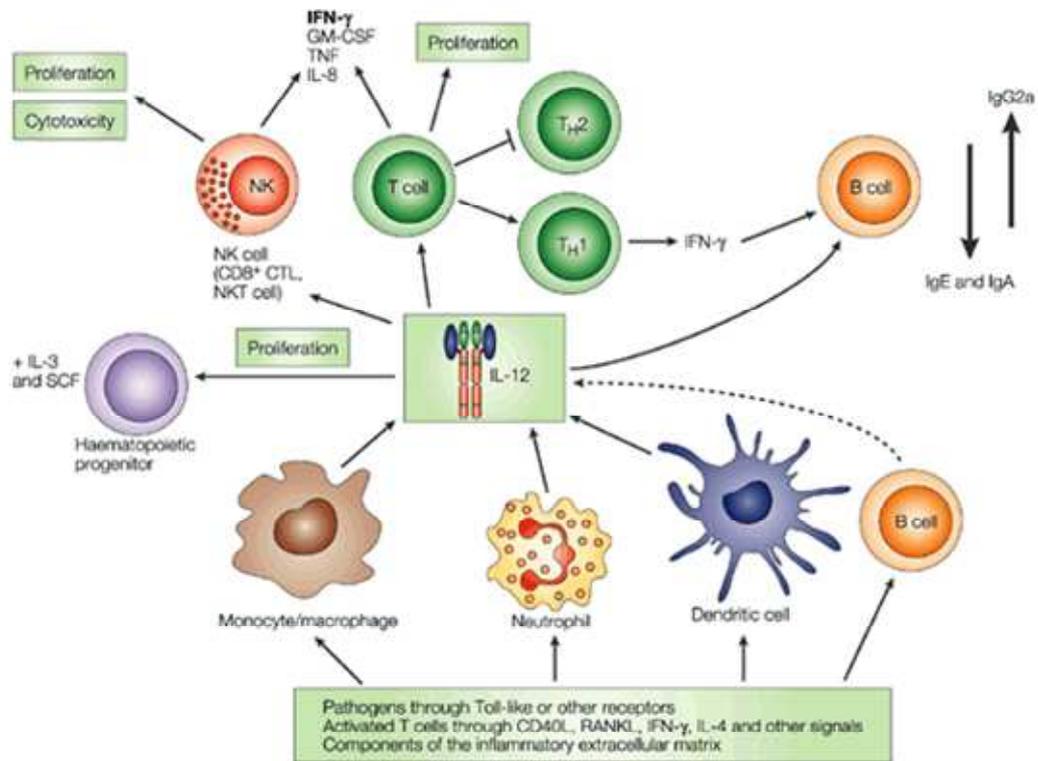
La classification basée sur la dualité des populations lymphocytaires Th1/Th2, initialement décrite chez la souris, a été largement utilisée pour expliquer la physiopathologie des maladies allergiques en les reliant à une réponse Th2 exacerbée [128]. Cet équilibre de populations lymphocytaires a aussi été appelé balance Th1/Th2, équilibre Th1/Th2 ou paradigme Th1/Th2. Ce déséquilibre vers la voie Th2 a été considéré par certains auteurs comme le résultat d'une réponse immunitaire inappropriée liée à une déviation immunitaire manquante vers le profil Th1 ou « *missing immune deviation* » en anglais [126, 129].

D'après Prescott, le profil des cytokines induit par une stimulation allergénique du fœtus et du nouveau-né est de type Th2 majoritaire [51, 52]. L'enfant peut reconnaître une exposition allergénique provenant de la mère et présenter un profil cytokinique favorable à la sensibilisation.

Dans les premiers mois de vie, les enfants sans prédisposition atopique vont graduellement développer une réponse de type Th1 (augmentation IFN- γ). La période précédant l'âge de deux ans serait la plus favorable à l'acquisition du profil Th1 [130]. Pour les enfants atopiques, la sécrétion retardée dans le temps d'IFN- γ laisserait la possibilité de l'expression du phénotype Th2 (sécrétion IL-4 et IL-13) et d'une sensibilisation IgE médiée [131, 132].

Figure 2 : Effets biologiques de l'Interleukine 12.

Effets biologiques de l'Interleukine 12



Nature Reviews | Immunology

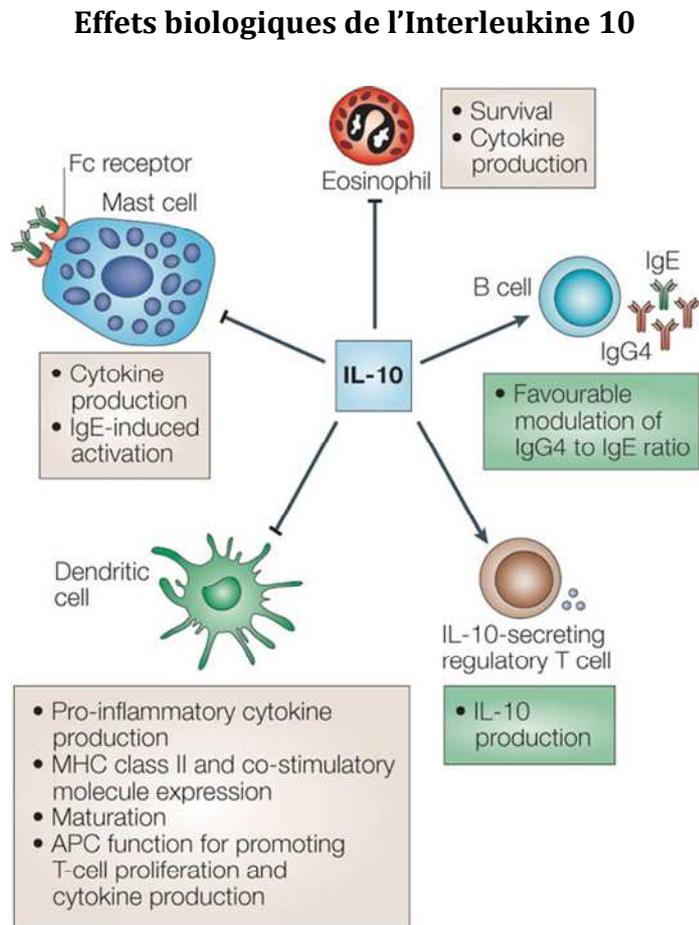
Copyright © Nature Publishing Group

Légende : Les producteurs physiologiques principaux d'interleukine 12 (IL-12) sont des phagocytes (monocytes/macrophages et polynucléaires neutrophiles) et les cellules dendritiques, en réponse aux microbes pathogènes (bactéries, mycètes, parasites intracellulaires et virus) au moyen des récepteurs Toll (TLRs) , aux signaux membranaires et solubles des cellules T activées et des cellules tueuses naturelles (NK), et enfin aux composants de la matrice extracellulaire inflammatoire (par exemple, acide hyaluronique de faible poids moléculaire) par CD44 et TLRs. Les cellules cibles physiologiques les plus importantes sont : les **cellules hématopoïétiques souches**, pour lesquelles, dans la synergie avec d'autres facteurs stimulants, IL-12 induit la formation et la prolifération ; **les cellules de NK, les cellules de NKT et les cellules T**, pour lesquelles l'IL-12 induit la prolifération, la cytotoxicité, l'expression des médiateurs cytotoxiques, et la production des cytokines, en particulier l'interféron-γ (IFN-γ) ; et favorise **la différenciation des cellules qui produisent de cytokines de type 1** (Th1, TC1 et NK1) ; et les **cellules de B** (via IL-12, directement ou indirectement par les effets des cytokines de type 1 tels que l'IFN-γ qui augmente l'activation et la production des classes d'immunoglobulines de type Th1).

CTL, cytotoxic T lymphocyte; **GM-CSF**, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; **RANKL**, receptor activator of nuclear factor-κB ligand; **SCF**, stem-cell factor; **TC1**, T cytotoxic 1; **TH1**, T helper 1; **TNF**, tumour-necrosis factor.

D'après Trinchieri, G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(2): p. 133-46 [133].

Figure 3 : Effets biologiques de l'Interleukine 10.



Nature Reviews | Immunology

Copyright © Nature Publishing Group

Légende : Les fonctions de l'interleukine-10 (IL-10) qui sont reliées à l'allergie et à l'asthme. L'IL-10 est une **cytokine pléiotropique** dont il a été démontré qu'elle bloque l'activation, et la génération de cytokine des mastocytes et des éosinophiles. Elle empêche également la fonction de présentation de l'antigène, y compris la maturation des cellules dendritiques, l'expression de la classe de MHC II et l'activation des cellules Th2. IL-10 a été reliée à la favorisation de la commutation d'isotype des immunoglobulines pour les cellules B, et elle pourrait favoriser l'induction de Treg sécrétant de l'IL-10.

D'après Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(4): p. 271-83 [134].

En conséquence et dans l'hypothèse d'une stimulation précoce d'origine microbienne, il pourrait y avoir un basculement du profil Th2 vers un profil de l'immunité anti-infectieuse Th1 défavorable à l'expression des maladies allergiques. Cette stimulation précoce pourrait être médiée par la sécrétion d'IL-12 (Figure 2, , p59) par les macrophages et/ou d'IFN- γ par les lymphocytes NK (natural killer) sans exclure un rôle propre de la quantité d'allergènes et le temps d'exposition sur l'équilibre Th1/Th2 [135].

Une hypothèse complémentaire plus récente porterait sur l'effet de l'exposition microbienne sur les cellules T régulatrices (Treg). Leur activation serait diminuée par la baisse de la stimulation microbienne [129, 136, 137]. Les populations cellulaires effectrices Th1/Th2 ont en effet un lien en amont avec les lymphocytes T régulateurs (CD24+ CD25+). Ces cellules Treg contrôleraient la polarisation des lymphocytes T CD4+ (chargé de la reconnaissance des épitopes d'origine endogène, p. ex. des bactéries, virus, ou parasites intracellulaires) et des lymphocytes CD8+ (chargés de la reconnaissance des épitopes exogènes : environnementaux ou extracellulaires). En conséquence, ces cellules Treg participeraient au contrôle du type de réponse immune face aux antigènes environnementaux. Elles expriment le facteur de transcription FoxP3 (ou C. Treg CD24+ CD25+ FoxP3+) qui est impliqué dans la production de TGF bêta et d'IL-10. Ces derniers induisent une diminution de la réponse inflammatoire allergique chez la souris [90, 138]. D'autres marqueurs sont aussi exprimés par les C. Treg comme le CD25, le *glucocorticoid-induced TNF receptor* (GITR) ou le lymphocyte activation gène 3 (LAG3). Un défaut de régulation ou une population cellulaire réduite de lymphocytes Treg (CD24+ CD25+) contribue au développement ou à la progression de l'allergie. Cela est démontré indirectement par le succès de la désensibilisation qui est dépendante de l'induction des cellules Treg. Pour une étude exhaustive sur le rôle des C. Treg, nous pouvons nous reporter à une revue de la littérature a été publiée par Akdis en 2009 [139].

Cette dernière hypothèse ne remet pas en cause les bases immunologiques de l'hypothèse hygiéniste, mais démontre l'extrême complexité du système immunitaire sous-jacent à l'expression des maladies allergiques [136] dont la barrière conceptuelle entre immunité innée et adaptative est discutée [140]. Une représentation schématique

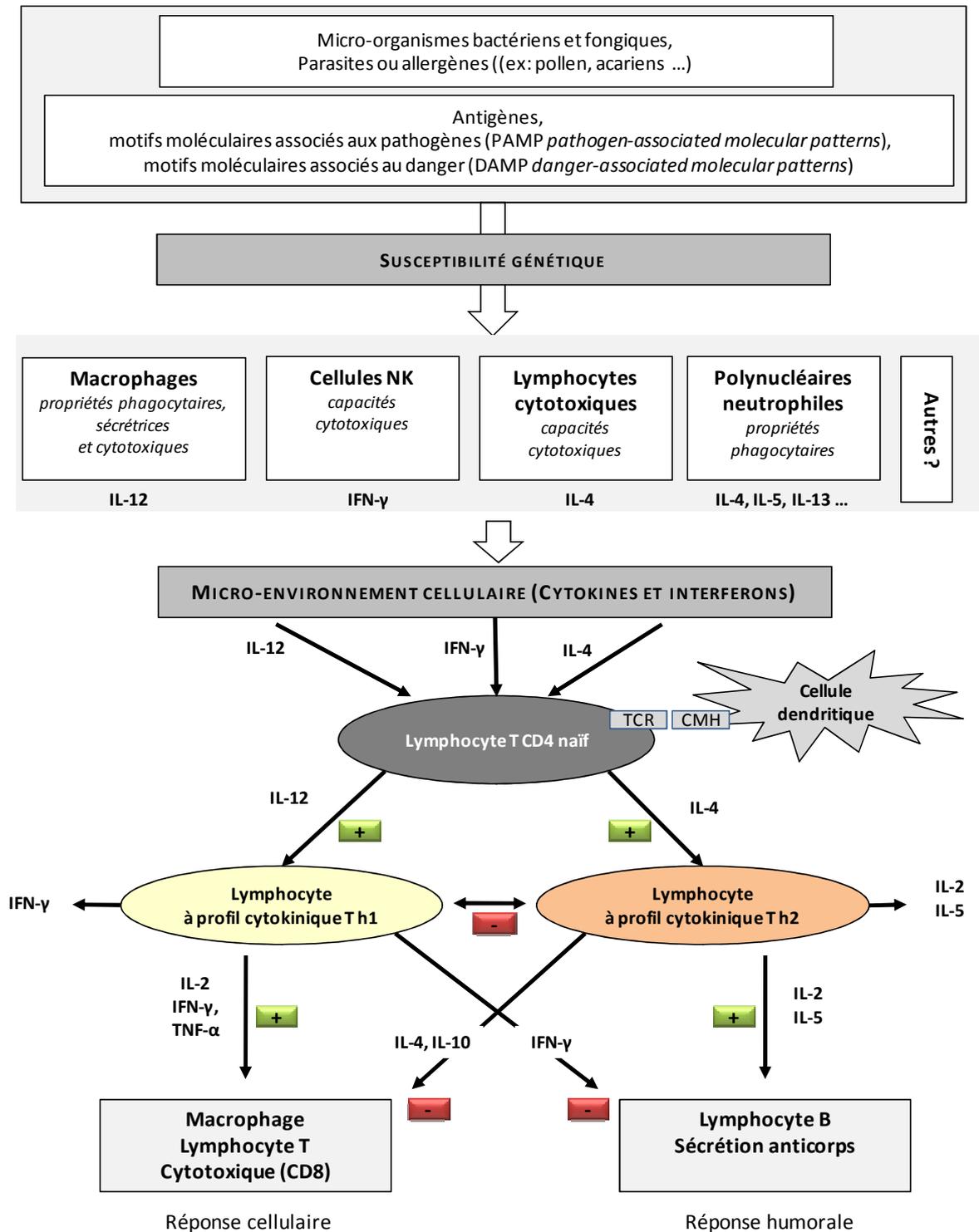
de l'orientation de la réponse immunitaire en fonction du stimulus est présentée en Figure 4 (p63) [141].

Enfin, cette notion dogmatique d'équilibre Th1/Th2 a été enrichie par l'étude d'autres populations cellulaires pouvant participer à la reconnaissance antigénique et à la régulation du système immunitaire. On peut notamment citer, en plus des cellules T régulatrices, les cellules dendritiques qui pourraient promouvoir la différenciation des cellules T naïves vers la voie Th1, Th2 ou Th17 en fonction du microenvironnement après avoir (i) lié l'allergène par endocytose sur le site d'exposition, (ii) migré vers les ganglions lymphatiques et (iii) acquis un phénotype mature [142, 143].

Par exemple, la sécrétion d'IL-12 favorise la différenciation des cellules T naïves vers la voie Th1. L'interaction entre les cellules dendritiques avec les signaux microbiens et de dangers (PAMPs et DAMPs), le LPS, ou des molécules issues du métabolisme (acide urique et ATP) n'est pas encore clairement explicitée comme soulignée cette année par Wilart et Lambrecht [143]. On notera par ailleurs que d'autres populations lymphocytaires (Th17) sont des candidats dans la régulation des maladies atopiques, mais les mécanismes de régulation doivent être confirmés dans des études de large ampleur [144]. Pour approfondir, une figure en Annexe I issue du poster de O'Shea de *Nature reviews immunology* expose les sous-populations lymphocytaires issues des lymphocytes T CD4+, leurs voies de signalisation, les cytokines et les facteurs de transcription associés à leurs différenciations [145].

Le rôle de ces populations cellulaires a été fréquemment discuté, mais il reste un élément central de l'immunologie et de l'allergologie appelé à se développer à l'avenir [136, 146]. Une meilleure conception de l'implication des cellules T régulatrices et des cellules dendritiques permettra peut-être de mieux comprendre l'augmentation, durant les dernières décades, des maladies inflammatoires à profil Th1 exacerbé comme la maladie de Crohn et la sclérose multiple [147]. Cette augmentation concomitante des maladies à profil Th1 exacerbé a souvent été un argument épidémiologique opposé à l'hypothèse de l'hygiène.

Figure 4 : Description schématique des régulations cellulaires dans l'hypothèse de la balance immunologique Th1/TH2.



Légende :TCR, récepteur à l'antigène des lymphocyte ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité.

Adapté en accord avec l'auteur d'après DA Vuitton, Immunologie collection « Simplissime ! », Edition Pradel, Wolters Kluwer France, 2009, ISBN 978-2-913996-78-6.[141]

Le schéma immunologique des maladies allergiques

Pour l'asthme, la présentation de l'allergène aux lymphocytes T *helper* est réalisée par les cellules présentant les épitopes (CPE) qui peuvent être les cellules dendritiques, les cellules épithéliales pulmonaires et/ou les macrophages de la paroi bronchique. Au départ, lors de la première présentation d'un antigène, les lymphocytes Th0 appartiennent à une population lymphocytaire naïve (ou lymphocyte T naïf) 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.

Des travaux sur le modèle murin ont permis de démontrer que l'antagonisation de la réponse Th2 par l'apport d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cytokines/récepteurs Th2 ou l'adjonction de cytokines Th1 (IL-12 ou IFN- γ) bloquent la sensibilisation ou l'expression de la maladie allergique [148-150]. De plus, les souris déficientes du gène de l'IL-4 étaient dans l'impossibilité de présenter une hyperréactivité bronchique accompagnée d'une inflammation à éosinophile après la sensibilisation à l'ovalbumine [151]. Il est admis que les 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 [152-154]. De plus, les lymphocytes T *helper* sont retrouvés dans le mucus bronchique avec une expression prédominante de cytokines favorisant la voie Th2 [152, 155, 156].

Pour la rhinite allergique, les symptômes cliniques initiaux sont dus à la libération de cytokines par les mastocytes de la muqueuse nasale. Dans un second 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.

Pour l'allergie alimentaire, la première étape est la sensibilisation vis-à-vis d'un allergène suivi de la production d'IgE spécifique sans symptomatologie clinique. La symptomatologie s'exprimera seulement lors d'un contact ultérieur avec l'allergène en cause. Lors de ce contact, son pontage avec les IgE membranaires des polynucléaires basophiles et des mastocytes va entraîner la libération des cytokines pro-inflammatoires et de l'histamine (responsable des manifestations cliniques variables suivant les individus). Chez le nourrisson, le profil immunitaire intestinal est de type Th2 avec une prédominance des cytokines (IL-4 et IL-5). Ce profil se modifie autour de l'âge de 3 ans

vers une réponse immune de type Th1 (IL-12 et IFN- γ) permettant une résistance aux affections bactériennes. Une hypothèse physiopathologique des allergies alimentaires est basée sur la persistance du profil immunitaire Th2 susceptible de favoriser la sensibilisation puis l'expression clinique de maladies allergiques. L'étude de la flore bactérienne intestinale à la naissance et à l'âge d'un an de deux groupes d'enfants (l'un Suédois : haute prévalence d'atopie) et (l'autre Estonien : basse prévalence d'atopie) met en évidence une colonisation par les Lactobacilles chez le groupe à basse prévalence. Chez les sujets atopiques, cette colonisation était composée en majorité de coliformes et de *Staphylococcus aureus* ce qui pourrait être en lien avec la persistance du profil Th2 selon les auteurs.

Une hypothèse alternative, qui pourrait avoir un impact sur l'apparition des maladies allergiques, serait une diminution du nombre d'enfants bénéficiant de l'allaitement maternel en lien avec des modifications des comportements sociaux. En effet, le lait maternel contient des facteurs de croissance qui participent à la construction et à la maturation immunologique de la barrière intestinale. Ainsi, la diversification alimentaire précoce est associée à une augmentation du risque d'eczéma [157]. Cependant, la prédisposition génétique reste un facteur conséquent de risque d'allergie alimentaire : elle est plus fréquente chez les atopiques que chez les non-atopiques (57 % chez les atopiques vs. 17 % chez les non atopiques, $p < 0.01$) [43]. La capacité d'activation lymphocytaire était plus élevée chez les enfants atteints de dermatite atopique associée à une allergie au lait de vache. Cette activation a été mesurée par une importante expression des molécules membranaires CD25 (récepteur de l'IL-2) et CD30 (considéré comme un marqueur d'activation Th2).

Pour la dermatite atopique enfin, il existe toujours des incertitudes sur sa physiopathologie, mais le lien avec la balance Th1/Th2 est admis [158, 159]. On soulignera le rôle des cellules de Langerhans qui sont des cellules dendritiques issues de la moelle osseuse et situées dans le tissu cutané. Ce sont des CPE qui possèdent de nombreux récepteurs aux IgE. Elles sont impliquées dans la genèse de la dermatite atopique par le biais de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et par la présentation aux lymphocytes T des allergènes de contact. Des essais cliniques ont clairement souligné le lien entre dermatite atopique et la microbiologie du tube digestif (pour approfondir sur la flore tube digestif voir Turroni et al. [160]). Citons parmi ceux-ci l'administration périnatale par voie orale de probiotique (*Lactobacillus rhamnosus*)

qui a démontré un effet préventif sur le développement de la dermatite atopique chez les sujets à risque dans un essai randomisé contre placebo [161]. On note aussi que l'administration de *Lactobacillus brevis* inactivé par la chaleur dans un modèle murin a diminué de façon dose dépendante le développement de la dermatite et la production d'IgE. De plus, il existe de récentes avancées thérapeutiques basées sur des extraits de *Lactobacillus plantarum* en application cutanée dans la dermatite atopique [162, 163]. Elles fournissent des arguments indirects sur le rôle bénéfique de la stimulation par des micro-organismes dans la dermatite atopique.

Il est nécessaire de garder à l'esprit que ces travaux *in vitro* sur l'étude des profils cytokiniques ont été réalisés avec des modèles cellulaires. Les connaissances obtenues dans ces conditions particulières ne sont pas forcément superposables telles qu'elles *in vivo*. A titre d'exemple, la dermatite atopique peut combiner les profils Th1 et Th2. Cette affection démontre bien la complexité immunologique sous-jacente, parfois en contradiction modèles *in vitro* simplificateur, et la nécessité d'une compréhension globale du système immunitaire.

Cette présentation des bases immunologiques de l'hypothèse hygiéniste a permis de souligner l'implication des micro-organismes dans la modulation du système immunitaire, et plus précisément leurs liens possibles avec les maladies allergiques. En contraste avec la complexité biologique des mécanismes immunologiques en cause, une succession d'études épidémiologiques observationnelles simples, dès la fin des années 90, a permis d'argumenter l'importance protectrice du milieu agricole sur l'asthme et les maladies allergiques. Cet environnement agricole est reconnu par ailleurs en médecine du travail comme étant un environnement caractérisé par des quantités importantes de micro-organismes bactériens et fongiques [164].

Les études épidémiologiques

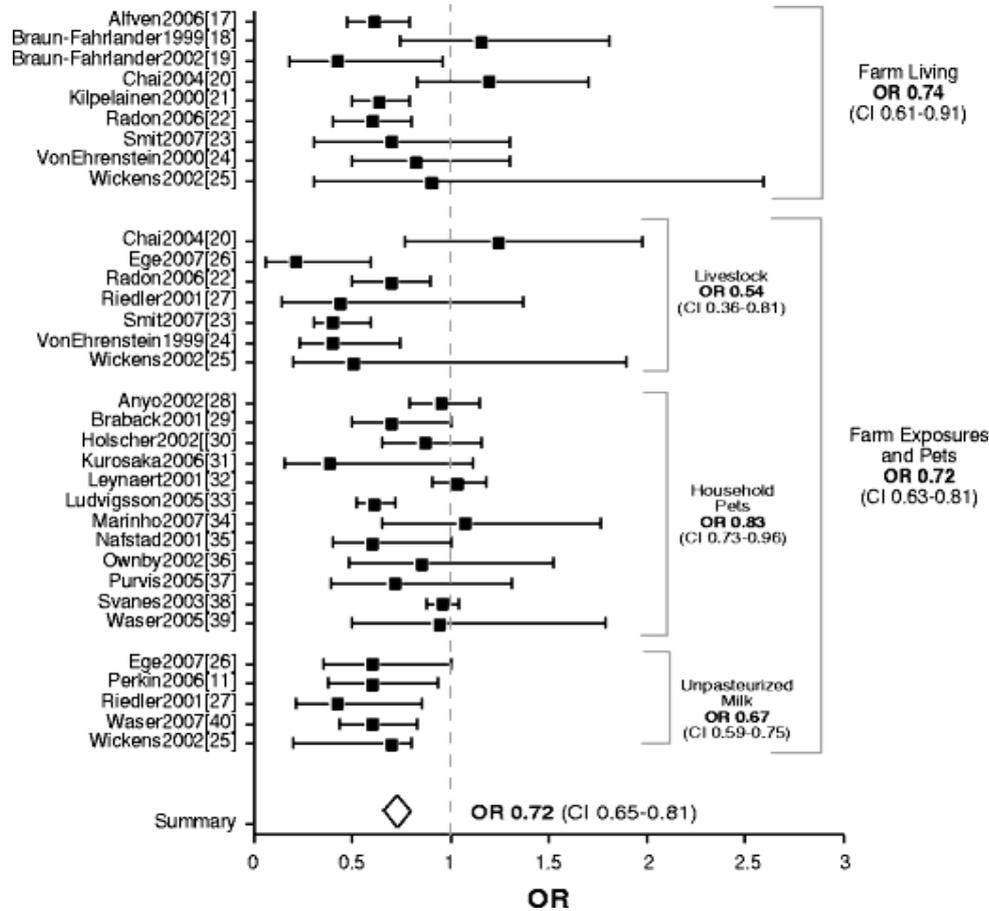
L'évidence épidémiologique de la protection de l'environnement fermier en Europe vis-à-vis des maladies allergiques s'est construite grâce aux études épidémiologiques observationnelles réalisées durant ces dix dernières années. Ces observations ont donné lieu à des revues de la littérature, et l'on retiendra d'abord Johnson en 2002 [165], puis Naleway en 2004 [166] et E. Von Mutius en 2007 pour les études européennes [167] puis en 2008 pour les implications cliniques sur l'asthme et la vie dans l'environnement fermier [168]. Les résultats d'une méta-analyse réalisée en 2007 par Tse sur les associations entre les expositions liées au milieu fermier et le risque allergique sont présentés dans la Figure 5 (p69). Ils démontrent l'abaissement du risque de maladies allergiques dans les populations liées au mode de vie fermier [91]. Pour parfaire cette figure, un résumé didactique des principaux résultats des études européennes sur les liens entre maladies allergiques et le milieu fermier est présenté dans le Tableau III (p73). Dans presque toutes ces études, il est rapporté une diminution de prévalence de la rhinite allergique et du rhume des foins (par autoquestionnaire ou diagnostic médical) pour les sujets vivant ou ayant fréquenté la ferme dans l'enfance. Cette association est cependant moins constante avec l'asthme et les symptômes de sifflements. La prévalence de la sensibilisation est aussi significativement diminuée, en particulier pour les pneumallergènes du chat, chien et des pollens de graminées et de bouleau (Tableau III, p73).

À l'extérieur de l'Europe, ces résultats ont été confirmés par Ernst et al. en 2000 lors de l'étude des marqueurs de maladies allergiques (questionnaire ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) au Canada portant sur 1119 enfants de 12 à 19 ans du milieu rural. La vie actuelle à la ferme en comparaison à la vie rurale sans contact fermier était associée à une prévalence diminuée de sifflements (aOR 0.72, IC_{95%} 0.56-0.99), d'hyperréactivité bronchique (aOR 0.80, IC_{95%} 0.56-0.87), d'asthme (aOR 0.71, IC_{95%} 0.37-0.98) et d'atopie (aOR 0.62, IC_{95%} 0.48-0.80) définie comme une réaction positive à au moins l'un des 20 tests cutanés aux allergènes communs locaux [169]. En 2006, une seconde étude tendait vers les mêmes résultats [170]. En 2007 et toujours au Canada, une autre étude cette fois longitudinale confirme un risque abaissé d'asthme chez les enfants fermiers et une augmentation du risque chez

les enfants urbains par rapport aux enfants ruraux non fermiers [171]. L'évidence de la protection de l'environnement fermier n'a pas été identifiée de façon aussi constante notamment pour l'asthme atopique en Finlande et en Russie [172]. Elle pourrait être en lien avec la présence de facteurs de confusion du milieu agricole favorisant l'allergie comme l'exposition aux pesticides [173]. De plus, nous devons souligner l'utilisation, dans cette étude, de questions simples pour le diagnostic d'asthme et non de questions validées ainsi que l'absence d'un diagnostic médical. Des études croisées ne retrouvent pas de façon évidente cette association protectrice du milieu fermier avec l'atopie. Cela pourrait être expliqué, entre autres, par un environnement agricole très différent sous le climat méditerranéen [174, 175].

En Nouvelle-Zélande, une première étude n'avait pas mis en évidence d'effet protecteur de l'exposition à la ferme avant l'âge d'un an, mais une relation protectrice avec les produits laitiers correspondant à une consommation de lait non pasteurisé et de yaourts dans l'enfance [176]. Une seconde étude transversale plus récente portant sur 1899 enfants de 5-17 ans a finalement montré que la combinaison d'une exposition prénatale et actuelle à la ferme était associée à une prévalence diminuée de sifflements (aOR 0.48, IC_{95%} 0.28-0.80), d'asthme (aOR 0.50, IC_{95%} 0.33-0.76), de rhume des foins (aOR 0.47, IC_{95%} 0.30-0.73) et d'eczéma atopique (aOR 0.46, IC_{95%} 0.30-0.70) [177]. Dans une cohorte d'enfants ruraux de l'Iowa aux États unis, la naissance dans l'environnement fermier a été associée, à une diminution du diagnostic de maladies allergiques et de la sensibilisation mesurée par les IgE sériques pour 8 allergènes communs [178]. Dans cette étude, la participation à l'élevage de cochon et à l'adjonction d'antibiotiques à la nourriture a été reliée avec une augmentation du risque d'asthme, de sifflements et de toux à l'exercice. Une seconde étude américaine transversale dans le Wisconsin portant sur des enfants ruraux d'âge scolaire (n=4247) a permis d'associer la vie à la ferme (dans l'enfance et/ou actuelle) à une diminution des symptômes d'asthme (aOR 0.78, IC_{95%} 0.63-0.93) et, pour les enfants de plus de 10 ans uniquement, à une diminution du rhume des foins (aOR 0.71, IC_{95%} 0.51-0.99)[179]. Il n'existe qu'une seule étude épidémiologique portant sur le milieu agricole utilisant un modèle de régression écologique [180]. Dans cette étude en Caroline du Nord, la prévalence d'asthme et de sifflements décroît avec l'augmentation des indicateurs d'activités agricoles du comté comme unité géographique statistique. Ces indicateurs agricoles étaient le nombre de fermes, la surface de prairie et le nombre de vaches.

Figure 5 : Associations entre les expositions en milieu fermier et le risque individuel d'allergie.



D'après [91]. Légende : l'odds-ratio (OR) est représenté par un carré noir et l'intervalle de confiance 95 % par la barre d'erreur ; **farm living**, vie à la ferme ; **livestock**, bétail ; **household pets**, animaux domestiques ; **unpasteurized milk**, lait non pasteurisé.

Références spécifiques de la figure ci-dessus :

11. Perkin MR, Strachan DP (2006) Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy. *J Allergy Clin Immunol* 117 :1374-1381 17. Alfven T, Braun-Fahrlander C (2006) Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the PARSIFAL study. *Allergy* 61 :414-421 18. Braun-Fahrlander C, Gassner M, (1999) Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 29 :28-34 19. Braun-Fahrlander C, Riedler J (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 347 :869-877 20. Chai SK, Nga NN, (2004) Comparison of local risk factors for children's atopic symptoms in Hanoi, Vietnam. *Allergy* 59 :637-644 21. Kilpelainen M, Terho EO, (2000) Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 30 :201-208 22. Radon K, Schulze A, (2006) Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood : protection, underreporting or selection. *Allergy* 61 :443-446 23. Smit LA, Zuurbier M, (2007) Hay fever and asthma symptoms in conventional and organic farmers in The Netherlands. *Occup Environ Med* 64 :101-107 24. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E (2000) Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 30 :187-193 25. Wickens K, Lane JM, (2002) Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 57 :1171-1179 26. Ege MJ, Frei R, (2007) Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 119 :1140-1147 27. Riedler J, Braun-Fahrlander C, (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy : a cross-sectional survey. *Lancet* 358 :1129-1133 28. Anyo G, Brunekreef B, (2002) Early, current and past pet ownership : associations with sensitization,

bronchial responsiveness and allergic symptoms in school children. *Clin Exp Allergy* 32 :361-366 29. Braback L, Kjellman NI, (2001) Atopy among schoolchildren in northern and southern Sweden in relation to pet ownership and early life events. *Pediatr Allergy Immunol* 12 :4-10 30. Holscher B, Frye C (2002) Exposure to pets and allergies in children. *Pediatr Allergy Immunol* 13 :334-341 31. Kurosaka F, Nakatani Y (2006) Current cat ownership may be associated with the lower prevalence of atopic dermatitis, allergic rhinitis, and Japanese cedar pollinosis in schoolchildren in Himeji, Japan. *Pediatr Allergy Immunol* 17 :22-28 32. Leynaert B, Neukirch C (2001) Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood. *Am J Respir Crit Care Med* 164 :1829-1834 33. Ludvigsson JF, Mostrom M, (2005) Exclusive breastfeeding and risk of atopic dermatitis in some 8,300 infants. *Pediatr Allergy Immunol* 16 :201-208 34. Marinho S, Simpson A (2007) Rhinoconjunctivitis in 5-year-old children : a population-based birth cohort study. *Allergy* 62 :385-393 35. Nafstad P, Magnus P (2001) Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life. *Allergy* 56 :307-312 36. Ownby DR, Johnson CC, (2002) Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA* 288 :963-972 37. Purvis DJ, Thompson JM (2005) Risk factors for atopic dermatitis in New Zealand children at 3.5 years of age. *Br J Dermatol* 152 :742-749 38. Svanes C, Heinrich J, (2003) Pet-keeping in childhood and adult asthma and hay fever : European community respiratory health survey. *J Allergy Clin Immunol* 112 :289-300 39. Waser M, von Mutius E, (2005) Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 60 :177-184 40. Waser M, Michels KB C (2007) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37 :66.

Après cette revue de la littérature internationale portant sur les relations entre le milieu agricole fermier et les maladies allergiques, plusieurs points sur l'exposition en milieu nécessitent d'être soulignés :

- ✓ Le premier point concerne la fenêtre d'exposition individuelle à la ferme. Il semble en effet que la protection vis-à-vis des maladies allergiques et de la sensibilisation soit optimale lors d'un contact précoce, qu'il soit dans la période prénatale et/ou dans les premières années de vie (en particulier avant l'âge d'un an) [177, 181, 182]. Cette protection pourrait être maintenue lors de la poursuite de l'exposition entre l'enfance et l'âge adulte [183, 184] et ce, en opposition avec une exposition à l'âge adulte dont l'effet sur la sensibilisation atopique a été contradictoire, tendant, selon les études, vers sa réduction [184, 185] ou son augmentation [181]. Un effet de protection graduelle du contact précoce avec les animaux sur la sensibilisation atopique a été confirmé : pour l'exposition pendant la grossesse (aOR 0.36, IC_{95%} 0.25-0.51), pour l'exposition pendant la première année de vie (aOR 0.54, IC_{95%} 0.32-0.92), après la première année de vie (aOR 0.77, IC_{95%} 0.49-1.22) et enfin pour une exposition actuelle (aOR 0.71, IC_{95%} 0.43-1.20) [97]. Il existe cependant une hétérogénéité de protection en fonction des pays de l'étude (non significative en Suède où l'habitat est quasi systématiquement séparé de l'exploitation agricole). Notons que le contact de la mère en période prénatale, notamment avec les animaux de la ferme et l'étable, a été relié : (i) avec une modification de l'expression des gènes de l'immunité innée (TLR2, TLR4 et CD14) chez la descendance suggérant l'intervention de mécanismes épigénétiques précoces [97] et (ii) avec une diminution de la sensibilisation aux allergènes saisonniers au sang du cordon (aOR 0.38, IC_{95%} 0.21-0.70) dans l'étude de cohorte de naissance PASTURE [186]. Ces résultats sont cohérents avec la notion pour laquelle les facteurs précoces influençant le système immunitaire interviennent dans la survenue des maladies allergiques (comme synthétisé dans la revue de la littérature de Boyle et Tang [60]).

- ✓ Le second point est relié à l'intensité d'exposition au milieu fermier. Une relation dose-effet avec la fréquentation de l'environnement fermier a été notifiée dans plusieurs études transversales [187-189], et ce, même chez des enfants non-fermiers mais ayant un contact régulier avec la ferme [182, 190].
- ✓ Le troisième point se rapporte à l'aspect qualitatif de cette exposition mesurée dans ces études épidémiologiques. De nombreux travaux ont démontré que le contact avec les animaux de la ferme est un facteur épidémiologique robuste de la protection des maladies allergiques : dans une région d'élevage d'Australie [191], en Allemagne [188], en Finlande [184, 192], au Népal [193], en Angleterre [194] et aux États-Unis pour l'asthme atopique chez les femmes [173]. En Finlande, Remes a mis en évidence une relation dose-effet de la fréquence du contact avec le bétail [184]. La notion de contact avec un chat ou un chien dans l'enfance a été identifiée comme un facteur significativement associé à une protection, s'ajoutant au contact avec le bétail. À côté du lien avec les animaux, le contact fréquent avec l'étable, la grange ou la distribution de foin a été associé avec une diminution des symptômes de rhino-conjonctivite allergique des 12 derniers mois ($p=0.007$) [97]. Par ailleurs, la vie à la ferme peut influencer les habitudes alimentaires. C'est ainsi qu'un effet additionnel protecteur a été relié à la consommation de produits laitiers (lait non pasteurisé et dérivés) et ce, de façon indépendante à la protection liée à la fréquentation de l'étable ou du bétail [176, 182, 186, 194, 195]. Ces deux associations, consommation de produits laitiers/contact avec les animaux de la ferme, ont aussi été retrouvées comme protectrices pour les enfants vivants en zone urbaine en Crète ; avec un profil de protection augmentant avec l'intensité d'exposition. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés chez les enfants crétois ruraux étudiés [174].

L'étude de l'exposition à l'environnement fermier identifié comme facteur protecteur en épidémiologie reste complexe. En effet, elle doit tenir compte :

- non seulement de la présence de différents agents (micro-organismes pathogènes ou non, consommation de produits laitiers, composés végétaux, produits phytosanitaires, poussières minérales et diverses espèces animales et leurs cortèges de micro-organismes spécifiques)
- mais aussi du temps et de la fréquence du contact des individus en fonction de leur statut (agriculteur, employé agricole, ou enfant fermier ou non-fermier).

Ces difficultés expliquent pourquoi il n'existe qu'un nombre restreint d'études épidémiologiques portant sur les maladies allergiques s'attachant à examiner l'exposition aux micro-organismes. Nous allons maintenant détailler les études environnementales en allergologie, puis nous présenterons celles portant sur l'environnement fermier dans le cadre plus large de la médecine du travail en milieu agricole et de l'évaluation du risque en santé publique.

Tableau III : Résultats des études européennes portant sur la protection des maladies allergiques en milieu agricole.

PAYS (REGION)	TYPE	PRINCIPAUX RESULTATS
Allemagne [196]	Etude séro-épidémiologique annuelle sur les enfants de 15 ans : enfant fermier, avec contact occasionnel et sans contact fermier (n=1100)	La prévalence du rhume des foins, de la sensibilisation aux aéroallergènes communs (fléole, bouleau, acariens et chats) était plus faible chez les enfants de fermiers en comparaison avec les enfants du même âge sans contact fermier. Une tendance vers une relation dose-effet avec le contact fermier a été notée pour les symptômes et la sensibilisation.
Allemagne (2 districts de Bavière) [188]	Étude transversale observationnelle d'enfants de 5-7 ans issus de familles fermières et d'un groupe référence (n=10 163)	La vie à la ferme était associée à une fréquence plus faible : de sifflements par un diagnostic médical (aOR 0.52, IC _{95%} 0.28-0.99) de rhino-conjonctivite par un diagnostic médical (aOR 0.52, IC _{95%} 0.28-0.99) Chez les enfants fermiers, les risques étaient diminués pour les enfants de parents fermiers à temps plein (réf : temps partiel /diminution des maladies atopiques pour l'exposition aux bétails (aOR 0.41, IC _{95%} 0.23-0.74)).
Allemagne (région d'Ausburg) [197]	Etude transversale observationnelle à partir de trois groupes : rural, suburbain et urbain. (MONICA/KORA study) (n=6640)	Les résidents urbains (réf. résidents des villages ruraux) présentaient un risque significativement augmenté de sensibilisation aux pollens de fléole et/ou du bouleau (aOR 1.5, IC _{95%} 1.2-1.9), de sensibilisation atopique (aOR 1.5, IC _{95%} 1.2-1.9) et de rhinite allergique pollinique (aOR 1.5, IC _{95%} 1.2-1.9). Une tendance homogène mais non significative de diminution de risque pour les fermiers (réf. résidents des villages ruraux) pour la sensibilisation aux pollens de fléole et/ou du bouleau (aOR 0.5, IC _{95%} 0.2-1.1), de sensibilisation atopique (aOR 0.8, IC _{95%} 0.5-1.4) et de rhinite allergique pollinique (aOR 0.6, IC _{95%} 0.3-1.5).
Allemagne [198]	Étude transversale et de séroprévalence (n=321)	Le contact régulier avec la ferme avant l'âge de 7 ans est associé avec une diminution de l'atopie objectivée par la mesure des IgE aux allergènes communs (aOR 0.49, IC _{95%} 0.26-0.96). Cette association était robuste aux différents facteurs d'ajustement (facteurs indépendants associés consommation de lait cru et IgG pour <i>H.pylori</i>)
Allemagne (Basse Saxe) [181]	Étude transversale sur une cohorte d'adultes âgés de 18-44 ans (n=4053)	La sensibilisation atopique a été rapportée comme diminuée au contact avec la ferme dans l'enfance seulement (aOR 0.44, IC _{95%} 0.31-0.64), dans l'enfance et à l'âge adulte (aOR 0.65, IC _{95%} 0.50-0.85). Une tendance identique a été identifiée pour la sensibilisation atopique accompagnée de symptômes nasaux ; cependant dans ce cas la fréquentation actuelle de la ferme sans y avoir été exposé dans l'enfance était associée à une augmentation du risque (aOR 2.4, IC _{95%} 1.1-5.2).
Allemagne [199]	Etude transversale portant sur des adultes de 18-44 ans (n=1595)	La vie à la ferme avant l'âge de trois ans était associée à une diminution de la sensibilisation aux allergènes communs (aOR 0.7, IC _{95%} 0.6-0.9), de rhinite allergique (aOR 0.5, IC _{95%} 0.4-0.8), d'asthme (aOR 0.7, IC _{95%} 0.4-1,1) et après stratification sur la sensibilisation d'asthme avec sensibilisation (aOR 0.5, IC _{95%} 0.3-1.0).
Autriche (Tyrol) [200]	Étude cohorte de naissance	Le risque relatif d'hospitalisation pour asthme est diminué pour les enfants vivant à la ferme (RR 0.22, IC _{95%} 0.05-0.87).
Suisse (Grabs, Langnau, Payerne) [187]	Étude transversale observationnelle d'enfants d'âge scolaire (SCARPOL study) (n=1620)	Avoir un des parents agriculteurs était associé : à un taux plus faible de rhume des foins (aOR 0.34, IC _{95%} 0.12-0.89) et une sensibilisation atopique moins importante (aOR 0.31, IC _{95%} 0.13-0.73). Cette sensibilisation était associée à l'emploi des parents : fermier à temps partiel (ns) : (aOR 0.54, IC _{95%} 0.15-1.96) ; fermier à temps plein : (aOR 0.24, IC _{95%} 0.09-0.66).
Suisse Autriche Allemagne [182]	Étude transversale observationnelle des enfants d'âge scolaire (zones rurales) (n=812)	Les enfants ayant fréquenté l'étable avant l'âge d'un an, par rapport à ceux n'ayant pas fréquenté l'étable ni eu d'exposition au lait de ferme, étaient associés à une fréquence plus faible : d'asthme (aOR 0.14, IC _{95%} 0.04-0.48) de rhume des foins (aOR 0.20, IC _{95%} 0.08-0.50) et de sensibilisation atopique (aOR 0.32, IC _{95%} 0.17-0.62)

Tableau III : Résultats des études européennes portant sur la protection des maladies allergiques en milieu agricole (2/3).

PAYS (REGION)	TYPE	PRINCIPAUX RESULTATS
Suisse Autriche Allemagne Pays-Bas Suède [201]	Étude transversale observationnelle d'enfants de 5-13 ans issus de familles fermières, anthroposophiliques et d'un groupe référence (PARSIVAL Study) (n=14893)	La vie à la ferme était associée à une fréquence plus faible : d'asthme par un diagnostic médical (aOR 0.74, IC _{95%} 0.60-0.92) de rhino-conjonctivite par un diagnostic médical (aOR 0.39, IC _{95%} 0.26-0.58) de sensibilisation atopique (aOR 0.53, IC _{95%} 0.42-0.67) Le mode de vie anthroposophilique était associé à une fréquence plus faible : de rhino-conjonctivite par un diagnostic médical (aOR 0.72, IC _{95%} 0.55-0.94) de sensibilisation atopique (aOR 0.73, IC _{95%} 0.58-0.92)
Danemark (national birth cohort) [202]	Étude par interview téléphonique transversale nichée dans une cohorte de naissance (n= 13070)	Le ratio d'incidence de la dermatite atopique a été associé à la vie à la ferme ainsi qu'à un nombre élevé d'enfants dans la fratrie, et à la présence d'animaux domestiques. Les infections dans l'enfance ne semblent pas avoir d'effet sur la dermatite atopique.
Danemark (Sund Stald study) [185]	Étude transversale sur une cohorte d'étudiants danois fermiers et leurs conscrits ruraux.	La sensibilisation atopique aux allergènes communs (IgE ou test cutané) a été trouvée significativement et indépendamment diminuée en association avec la vie actuelle à la ferme et l'enfance à la ferme. La vie à la ferme dans l'enfance a été retrouvée associée à une prévalence plus faible de symptômes respiratoires et d'hyperréactivité bronchique.
Norvège [203]	Etude transversale d'une population d'adultes fermiers (n=2106), d'une population rurale (n=351) et urbaine (n=727)	La prévalence de l'asthme chez les fermiers est diminuée par rapport à la population générale (OR 0.52, IC _{95%} 0.36-0.75). La tendance est identique pour l'asthme atopique (OR 0.33, IC _{95%} 0.15-0.69) et l'asthme non atopique (OR 0.60, IC _{95%} 0.39-0.93).
Norvège [204]	Etude transversale en 1996 (n=2148) et 2006 (n=1700) sur une population d'enfants de 7-8 ans	La prévalence de la sensibilisation a augmenté de 20.6% en 1996 à 29.9% en 2006 pour au moins un allergène testé. La vie à la ferme était associée à une protection vis de la sensibilisation pour au moins un allergène testé (aOR 0.29, IC _{95%} 0.09-0.93)). Cette association n'a pas été retrouvée comme significative en 2006.
Suède [205]	Etude rétrospective sur les registres nationaux masculins [Swedish Military Service Conscript Register, le Register of the Total Population and the Population and Housing Censuses]	La vie à la ferme était associée à une fréquence diminuée : de rhinite allergique depuis les années 50 d'asthme (aOR 0.85, IC _{95%} 0.79-0.91) seulement depuis les années 70.
Suède (île du Gotland) [206]	Étude rétrospective sur une cohorte de naissance à l'âge 7-8 ans (n= 707)	La vie à la ferme était associée à une fréquence diminuée: d'asthme RR 0.26 (IC _{95%} 0.08-0.82) et de rhume des foins RR 0.39 (IC _{95%} 0.16-0.96) mais pas de sensibilisation allergique. On note cependant une tendance marquée pour les allergènes du pollen de fléole des prés (RR 0.57, IC _{95%} 0.31-1.03) et du chat (RR 0.52, IC _{95%} 0.27-1.02).
Finland [207]	Étude transversale portant sur 366 enfants fermiers et 344 enfants ruraux non-fermiers de 6-13 ans.	L'atopie (basée sur les IgE de six aéroallergènes communs dont les pollens de graminées) était diminuée par la vie à la ferme en générale (aOR 0.56, IC _{95%} 0.40-0.78), par la vie à la ferme laitière (aOR 0.62, IC _{95%} 0.41-0.93) ou d'élevage (aOR 0.46, IC _{95%} 0.23-0.89) et par la consommation de légumes crus (aOR 0.60, IC _{95%} 0.38-0.95). L'association chez les sujets ayant vécu dans une ferme laitière avant l'âge d'un an étant la plus prononcée pour l'atopie (aOR 0.51, IC _{95%} 0.28-0.93) aussi la présence d'un chat ou d'un chien dans l'enfance (aOR 0.60, IC _{95%} 0.42-0.85).

Tableau III : Résultats des études européennes portant sur la protection des maladies allergiques en milieu agricole (3/3).

PAYS (REGION)	TYPE	PRINCIPAUX RESULTATS
Finland [208]	Étude transversale portant sur 366 enfants fermiers et 344 enfants ruraux non-fermiers de 6-13 ans.	La vie à la ferme était associée à une fréquence plus faible: de sensibilisation atopique aux allergènes communs (aOR 0.60, IC _{95%} 0.43-0.84). Les sujets ayant vécu dans une ferme ont une fréquence diminuée de rhinite allergique : au chien (aOR 0.32, IC _{95%} 0.15-0.67), au chat (aOR 0.45, IC _{95%} 0.22-0.88) et aux pollens - fléole des prés, bouleau et armoise - (aOR 0.58, IC _{95%} 0.37-0.90).
Finland [209]	Etude transversale par enquête postale portant sur 10667 étudiants finnois en première année universitaire (18-24 ans)	La vie à la ferme dans l'enfance (entre 0-6 ans) était associée à une fréquence plus faible : de rhinite/conjonctivite allergique par diagnostic médical (aOR 0.63, IC _{95%} 0.50-0.79) et d'asthme/sifflement par diagnostic médical (aOR 0.71, IC _{95%} 0.54-0.93). L'effet n'a pas été modifié dans l'analyse stratifiée dans les groupes avec/sans antécédents parentaux de maladies atopiques.
Finland [210]	Etude de cohorte prospective Évaluation à l'âge de 31 ans (n=5192)	Un risque diminué d'atopie (tests cutanés aux allergènes courants) a été associé au statut enfant de fermier combiné à la parité (aOR 0.50, IC _{95%} 0.42-0.60).
Finland (région de Tucku) [211]	Étude transversale nichée de sensibilisation/paramètres respiratoires portant sur un échantillon randomisé parmi les 10667 étudiants finnois (18-24 ans)	La vie à la ferme dans l'enfance (entre 0-6 ans) était associée à une fréquence plus faible : non significative de sensibilisation mesurée par les tests cutanés aux pollens de fléole des prés (aOR 0.33, IC _{95%} 0.09-0.12) et aux pollens de bouleau (aOR 0.28, IC _{95%} 0.07-0.1.15) ; significative aux acariens (aOR 5.43, IC _{95%} 0.160-18.46). Pour la sensibilisation mesurée par les IgE spécifiques, l'association entre IgE et vie à la ferme n'a été seulement retrouvée que pour le chat (aOR 0.10, IC _{95%} 0.02-0.47).
Finland (région de Kiopio) [212]	Étude transversale de trois groupes de mères fermières, travaillant à la ferme et rurales (n= 466)	L'activité d'agricultrice était associée à un risque diminué de symptômes des voies aériennes supérieures associés aux pollens (aOR 0.6, IC _{95%} 0.4-1.0) et aux animaux de compagnie (aOR 0.3, IC _{95%} 0.3-0.7). La protection était la plus accentuée pour la vie à la ferme dans l'enfance combinée avec la vie actuelle soit un aOR 0.43, IC _{95%} 0.22-0.82) pour les pollens et un aOR 0.09 (IC _{95%} 0.02-0.43) pour les animaux de compagnie.
France (Paris et Grenoble) [213]	Étude transversale portant sur 600 jeunes adultes tirés au sort au sein de l'étude European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)-II.	La vie à la ferme avant l'âge de 1 an était associée à une fréquence plus faible de rhinite allergique (aOR 0.54, IC _{95%} 0.29-1) et de sensibilisation atopique (aOR 0.47, IC _{95%} 0.24-0.93). L'association étant la plus prononcée chez les sujets ayant vécu à la ferme avant l'âge d'un an et porteur du polymorphisme du TLR CD14 (CD14-159TT) : de rhinite allergique (aOR 0.26, IC _{95%} 0.07-0.94) et de sensibilisation atopique (aOR 0.21, IC _{95%} 0.05-0.93).
Grande-Bretagne (district du Shropshire) [194]	Étude transversale à deux niveaux (questionnaire - ISAAC study , n= 4767) et (tests allergologiques, n=879) portant sur des enfants d'âge scolaire	La vie actuelle à la ferme dans l'enfance était associée à une fréquence plus faible : d'asthme actuel (aOR 0.67, IC _{95%} 0.49-0.91) et de rhino-conjonctivite saisonnière (aOR 0.50, IC _{95%} 0.33-0.77). La consommation de lait cru était associée à une positivité plus faible des tests cutanés (aOR 0.27, IC _{95%} 0.12-0.60) et de plus l'association était présente quelque soit le groupe étudié (famille de non-fermier, de travailleur agricole ou de fermier). Cette association a été retrouvée avec une diminution des IgE (acarien et pollen de graminées) et avec une augmentation de l'IFN-γ. La consommation de lait cru et la fréquentation de la ferme ont été identifiées comme des facteurs protecteurs statistiquement significatifs et indépendants avec les symptômes de rhinite allergique saisonnière.
Europe [214]	Étude transversale multicentrique (Etude ECRHS) (n=6251)	La vie à la ferme pendant l'enfance a été associée à une diminution du risque de sensibilisation à l'âge adulte aux 5 allergènes communs des pays étudiés (aOR 0.76, IC _{95%} 0.60-0.97) dont les allergènes de chat (aOR 0.63, IC _{95%} 0.41-0.96) et de fléole des prés (OR 0.68, IC _{95%} 0.50-0.94). Un lien fort, mais non significatif a été retrouvé avec les symptômes de rhinite pollinique (OR 0.80, IC _{95%} 0.64-1.02). Il existe par ailleurs une accentuation nette de l'effet protecteur pour les individus nés après 1961, et ce par augmentation des prévalences des maladies allergiques chez les sujets non fermiers.

Les études environnementales

Les études environnementales reliées à l'allergologie utilisent des marqueurs de contamination microbiologique : les concentrations d'endotoxines comme marqueur des bactéries Gram négatif ou les concentrations de $\beta(1-3)$ glucans et d'EPS fongiques (EPS : *extracellular polysaccharides*) comme marqueurs d'exposition fongique [215]. Ces trois paramètres ont été rapportés comme significativement augmentés dans l'environnement intérieur des domiciles fermiers [216].

Dans l'étude multicentrique internationale ALEX (*Allergy and EndotoXin study*) portant sur 319 enfants fermiers et 493 enfants non fermiers de trois régions rurales Européennes (Allemagne, Autriche et Suisse), la quantité d'endotoxines dans la poussière du matelas de la chambre des enfants était inversement associée à la prévalence de sensibilisation atopique, d'asthme atopique et de rhume des foins pour l'ensemble de la population étudiée après ajustement aux facteurs de confusion [217]. L'analyse spécifique du groupe non fermier a mis en évidence un effet protecteur significatif des endotoxines sur le rhume des foins et les symptômes rhino-pharyngés durant l'année précédente. De plus, une tendance non significative de la protection vis-à-vis de la sensibilisation et de l'asthme atopique a été identifiée. Il existe cependant avec un effet aggravant significatif sur les symptômes de sifflements non atopiques.

Une étude complémentaire sur cette même population, utilisant l'acide muramique comme marqueur de la charge globale bactérienne du matelas, n'a pas permis de mettre évidence de relation avec la sensibilisation et les maladies allergiques mais seulement avec une diminution des symptômes de sifflements dans les 12 derniers mois après ajustement sur la concentration d'endotoxines du matelas [218].

Dans l'étude multicentrique internationale PARSIFAL, les niveaux moyens d'endotoxines, de $\beta(1-3)$ glucans et d'EPS étaient plus élevés chez les enfants contrôles (n=441) en comparaison aux enfants atopiques avec symptômes de sifflements. Ces associations disparaissent lors de l'ajustement sur le statut fermier/non-fermier [219].

Une autre étude environnementale portant sur un échantillon randomisé de fermiers et leurs épouses du sud-est de la Norvège a retrouvé une association significativement inverse entre la quantité d'endotoxines et la prévalence de l'asthme atopique (mais pas avec l'asthme non atopique). On notera avec intérêt que l'exposition aux spores fongiques a été identifiée elle aussi comme ayant un profil de protection similaire [220].

Enfin, dans une étude transversale néerlandaise basée sur une matrice emploi-exposition de 877 fermiers et travailleurs agricoles, un niveau élevé d'endotoxine a été relié à une prévalence diminuée de rhume des foins (aOR 0.62, IC_{95%} 0.49-0.78), mais aussi à une augmentation significative de la prévalence des symptômes respiratoires : sifflements (aOR 1.46, IC_{95%} 1.16-1.72) et de toux journalière (aOR 1.29, IC_{95%} 1.18-1.90) [221].

Compte tenu des propriétés immuno-stimulatrices des composants retrouvés dans l'environnement agricole – avec comme chef de file les endotoxines – et de leurs relations épidémiologiques avec les maladies allergiques, un axe de recherche s'est raisonnablement orienté au début des années 2000 vers les conséquences de ces expositions microbiennes sur le système immunitaire.

Les études sur la modulation du système immunitaire

Les interactions de l'environnement fermier sur le système immunitaire inné, évaluées par l'expression des récepteurs Toll (TLR-2, TLR-4 et CD14), ont d'abord été étudiées au sein des enfants suisses fermiers-non fermiers de l'étude ALEX. À partir des leucocytes sanguins stimulés *in vitro* par le LPS, l'expression des gènes codant pour les récepteurs TLR-2 et CD14 a été significativement plus élevée chez les enfants ayant grandi à la ferme par rapport à leurs contrôles [222]. Il existe donc une amplification de l'expression des gènes des récepteurs de l'immunité innée anti-infectieuse chez les enfants fermiers. Cette amplification est à mettre en relation avec leur environnement microbiologique à la fois divers et fortement contaminé. Les conséquences de cette interaction – gène de l'immunité innée-environnement – sur l'immunité adaptative et la sécrétion d'immunoglobulines restent toutefois à déterminer.

Au sein de la même étude multicentrique, le polymorphisme du récepteur TLR-2 a été identifié comme un déterminant majeur de la susceptibilité de l'asthme et des allergies chez les enfants fermiers [96]. De plus, dans cette population, le polymorphisme du récepteur CD14 (allèle TT avec allèle CC comme référence) était associé avec un risque augmenté d'IgE spécifique (i) lors du contact avec les animaux de la ferme (aOR 2.56, IC_{95%} 1.07-6.15) et (ii) lors de l'exposition aux quantités élevées d'endotoxines bactériennes dans la poussière du matelas de l'enfant (aOR 7.0, IC_{95%} 1.63-36.02). Ces associations étaient non significatives pour les quantités plus faibles d'endotoxines et pour une exposition aux animaux domestiques concomitants. Ces résultats confirment la nécessité de la prise en compte à la fois de l'exposition, mais aussi du polymorphisme génétique pour expliquer le niveau de sensibilisation d'une population donnée [223].

Ces résultats sur les TLR ont été confirmés dans un échantillon d'enfants suisses de l'étude PARSIFAL (n=322) où la relation entre l'expression des récepteurs de l'immunité innée a été reliée à l'exposition de la mère à l'environnement fermier pendant la grossesse. En effet, l'expression des gènes codant pour les récepteurs TLR-2, TLR-4 et CD14 chez l'enfant augmente graduellement pour chaque espèce animale supplémentaire avec laquelle la mère a été en contact pendant sa grossesse. Cette association n'a pas été modifiée par la restriction des analyses aux enfants fermiers et reste robuste après ajustement à l'exposition durant la première année de vie [97]. De plus, le signal environnemental microbien, mesuré indirectement par le nombre

d'espèces animales différentes au sein de la ferme, est associé à une modification à long terme de l'immunité innée du fœtus encore perceptible à l'âge scolaire. Une hypothèse de transmission de modification de l'expression génétique dans la descendance par des mécanismes épigénétiques de méthylation des gènes a été avancée [100, 101, 224]. Toutefois, l'ensemble des cytokines régulatrices (Th1 et Th2) est diminué chez les enfants de fermiers après stimulation par le LPS (TLR-4 ligand). Ceci évoque une voie de régulation alternative éventuellement médiée par les cellules dendritiques ou les cellules T régulatrices [222, 225].

Un travail récent au sein des populations des études ALEX et PARSIVAL a mis en évidence une modulation par le polymorphisme du récepteur CD14 de l'effet protecteur de la consommation de lait cru. Ce point apporte un argument supplémentaire sur le rôle déterminant des récepteurs de l'immunité innée dans la protection contre l'asthme, la rhino-conjonctivite allergique et la sensibilisation aux pollens [226]. Le rôle probable d'une interaction gène-environnement du récepteur CD14 a aussi été observé dans une étude française qui souligne que son polymorphisme pourrait modifier le développement de l'atopie [213]. Le polymorphisme du TLR-2 a été associé à l'asthme et celui du CD14 à l'asthme atopique dans l'étude française EGEA en 2009 (*Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy*) [227].

Dans cette même thématique, le polymorphisme d'une autre famille de récepteurs pour les mucopeptides (présent chez les bactéries à Gram négatif) a été identifié comme interagissant avec l'environnement fermier. Eder et al. a identifié que le polymorphisme du gène pour la protéine CARD4 (*Caspase recruitment domain protein*) modifiait l'effet protecteur de l'environnement fermier chez les enfants homozygotes à l'allèle T [228].

Un second versant des relations entre environnement fermier et système immunitaire est constitué par l'aspect qualitatif de la réponse humorale. Ce point a été publié au sein de l'étude ALEX (n=812) par l'analyse des concentrations sériques chez les enfants fermiers et non-fermiers des immunoglobulines de type G1, G2, G3, G4 et E, spécifiques de quatre allergènes communs. Ces allergènes étaient la fléole des prés (*Phleum pratense* ou *Timothy-grass*, Phl p1 et Phl p5), l'allergène majeur du chat (Fel d1) et l'allergène majeur des acariens (Der p2)) [229]. L'effet de l'environnement fermier correspond à une diminution ciblée des isotypes IgG1, IgG4 et IgE spécifique de

l'allergène étudié. Cette diminution est en effet particulièrement marquée pour l'allergène de graminées. Les auteurs proposent le terme d' « effet fermier allergène spécifique ».

Cependant, l'examen détaillé des profils isotypiques a démontré que la plupart des enfants (atopiques) sécrétant des IgE spécifiques présentaient aussi des IgG1, mais que seule une partie d'entre eux produisait en plus des IgG4 (**IgG4+**). Ce sous-groupe, de profil isotypique IgG1+**IgG4**+IgE+, est significativement associé au rhume des foins, aux symptômes rhinopharyngés dans les 12 derniers mois, à l'asthme et aux sifflements récents par rapport au groupe référence (IgG1+**IgG4**-IgE+). L'association de ce profil isotypique IgG1+**IgG4**+IgE+ était positive et significative avec les pathologies allergiques pour les deux allergènes de graminées, mais de façon inattendue négative et non significative pour l'allergène de chat. Ceci suggérerait une protection « chat-spécifique » de la co-expression IgG4/IgE.

Du point de vue quantitatif, les profils isotypiques IgG1+IgG4+IgE+ spécifiques des deux allergènes de graminées et d'acariens des poussières avaient des taux sériques IgE totale plus élevés que le groupe référence (IgG1+IgG4-IgE+). Ainsi, la coproduction IgG4/IgE entraîne une amplification de la réponse quantitative en IgE totale, et ce, de façon très marquée pour les allergènes de graminées. Les auteurs soulignent bien ici la complexité des interactions entre le profil isotypique des immunoglobulines et l'exposition à l'environnement fermier. Ces interactions pourraient être le résultat de voies de modulation distinctes pour chaque allergène, cité comme « *allergen- and switch stage-specific* » que l'on pourrait traduire par une commutation isotypique allergène spécifique. La protection de l'environnement fermier est particulièrement marquée pour l'ensemble des immunoglobulines IgG1/IgG4/IgE des pollens de graminées et pourrait être le résultat de mécanismes multiples et synergiques restant à élucider. La coproduction IgG4/IgE a été associée chez les enfants non fermiers aux symptômes d'asthme et de rhinite allergique [230].

Récemment, une étude de Schaub et al. a évalué l'effet de la fréquentation de la ferme sur la réponse immune inhibitrice sur la voie Th2 des cellules Treg dans le sang du cordon issue d'une population de femmes en fin de grossesse (60 non fermières et 22 fermières). La stimulation des Treg a été réalisée avec un extrait de peptidoglycane (Ppg), un mitogène PHA et un extrait de l'allergène Der p 1. L'évaluation de la réponse immune a porté sur la sécrétion cytokinique et un ensemble de paramètres cellulaires

des cellules T reg : récepteurs de surface CD4⁺CD25⁺, expression de FOXP3 et de son répresseur transcriptionnel, et du niveau de méthylation du locus FOXP3 [231]. Les cellules T régulatrices étaient plus nombreuses dans le sang du cordon des mères vivant à la ferme, avec une expression plus importante de FOXP3 après stimulation (Der p 1 + Ppg). La suppression des cellules effectrices Th2 était plus efficace pour les mères vivant à la ferme. La déméthylation du gène FOXP3 était plus importante pour les mères ayant une consommation de lait de ferme. Ces résultats suggèrent une modification épigénétique de la méthylation (l'accessibilité à la transcription) du gène FOXP3 et donc de deux interactions successives et complémentaires :

- l'une gène(s)-environnement fermier au sens large chez la mère induisant une modification de la réponse immune,
- la seconde materno-fœtale conditionnant l'orientation du système immunitaire du nouveau-né puis potentiellement de l'enfant jusqu'à l'âge scolaire [97].

En conséquence, l'absence de cette stimulation précoce conduirait à l'apparition des maladies allergiques. Pour ces auteurs, l'exposition à la ferme des mères enceintes pourrait être un modèle d'immunothérapie pouvant influencer le système immunitaire de sa descendance.

Les travaux épidémiologiques portant sur les maladies allergiques dans l'environnement fermier et sur la modulation du système immunitaire soulignent l'intérêt de l'étude de la microbiologie de l'environnement. Cependant, les approches de l'évaluation de l'exposition basées sur la mesure de molécules (p. ex. endotoxines, acide muramique... dans des prélèvements de poussières) ne reflètent la charge microbienne globale de l'environnement et ne permettent pas d'appréhender de manière fine la biodiversité des micro-organismes présents. La connaissance de cette biodiversité est pourtant indispensable pour comprendre les interactions entre la microbiologie de l'environnement, l'immunité innée et la protection contre les maladies allergiques. La section suivante a pour objectif de présenter les connaissances microbiologiques sur le bioaérosol au sein de l'environnement fermier.

L'ENVIRONNEMENT MICROBIOLOGIQUE ET LES COMPOSANTS DU BIOAÉROSOL DES FERMES

DEFINITION

Emprunté à l'anglais, le terme bioaérosol juxtapose la notion de vivant (du grec « bios ») et la notion d'aérosol définie comme une suspension dans l'air de particules solides ou liquides de faible taille. Le bioaérosol a été défini par l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) [232] comme l'ensemble des particules aériennes, des molécules et des composés volatiles qui proviennent des organismes vivants.

Sous cette définition, on regroupe les micro-organismes (les bactéries dont les actinomycètes, les virus, les moisissures, les levures et les protozoaires), les pollens, les fragments de plantes et d'insectes, les protéines animales ou végétales et les molécules biologiquement actives qui peuvent être des antigènes ou des composés dérivés des micro-organismes (p. ex. des enzymes, des endotoxines pour certaines bactéries ou des $\beta(1-3)$ glucans pour les champignons). Ces éléments peuvent être présents sous forme d'agrégats dans l'aérosol. Les composants du bioaérosol ont des diamètres aérodynamiques qui varient sur une gamme de 0.1 à 100 μm , soit d'un facteur 1000 (Figure 6 adaptée de J. Vincent [233] et de l'*American Thoracic Society*, p84). On distingue les particules selon leur diamètre aérodynamique en micromètres. Les trois catégories habituellement utilisées en métrologie sont les PM 10 (diamètre aérodynamique inférieur à 10 μm , notées PM en anglais pour *Particulate Matter*), les particules fines PM 2,5 (diam. < 2.5 μm) et ultrafines (diam. < 0.1 μm). Notons qu'à côté des particules d'origine biologique, le bioaérosol peut contenir des composés chimiques, des polluants atmosphériques issus du trafic automobile pouvant interagir avec les composés biologiques.

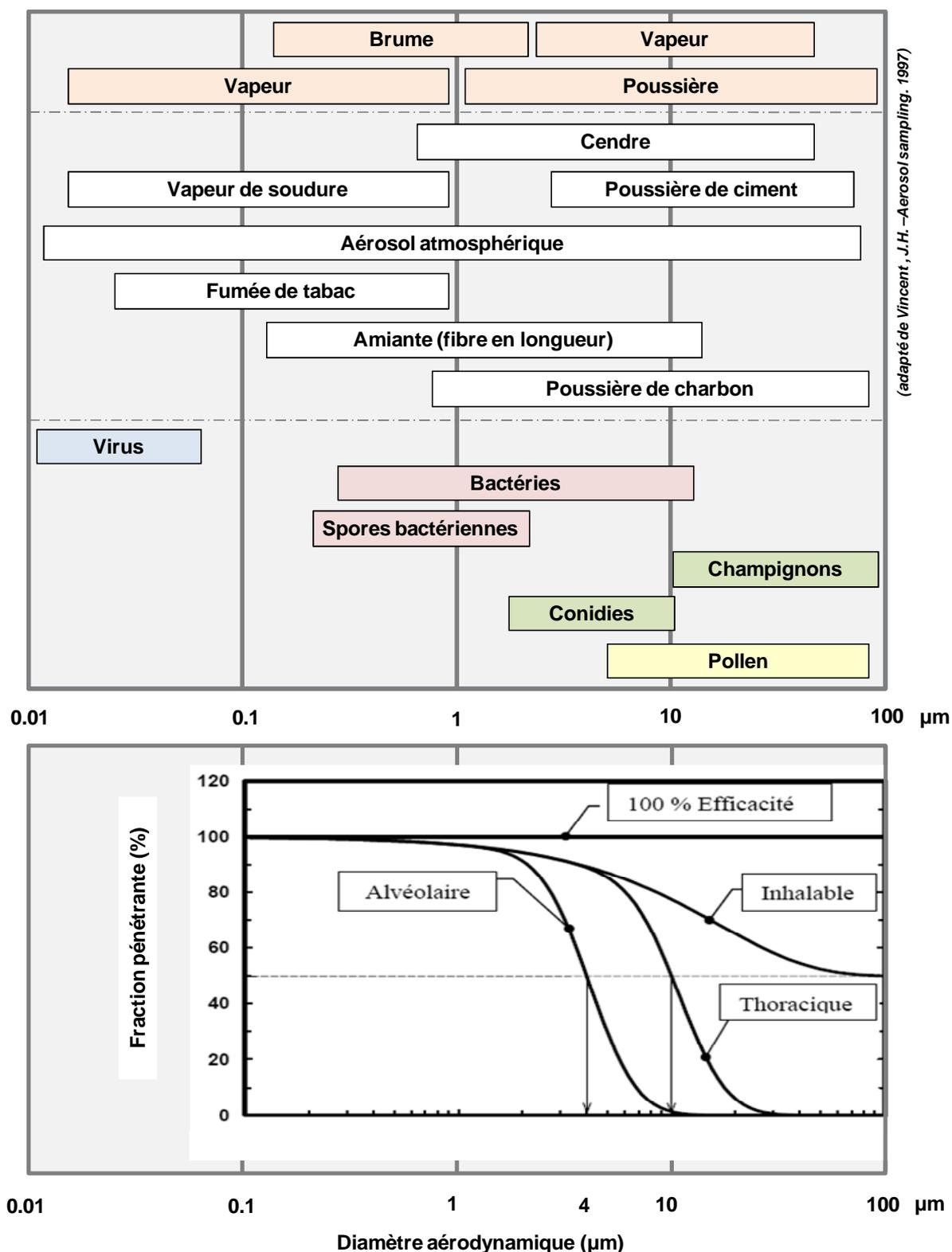
Les concentrations des particules dans l'air sont dépendantes de nombreux facteurs, parmi lesquels la quantité émise à la source, le mode d'émission et de dispersion, leurs caractères intrinsèques (taille et poids, vitesse de sédimentation, liaison avec des agrégats, condition de croissance ou de prolifération des micro-organismes...) et les paramètres de l'environnement (émission intérieure ou extérieure, hygrométrie, ventilation...). Mais la quantité déposée dans l'arbre respiratoire dépend

essentiellement de leur taille et de la concentration aérienne des particules et de l'activité individuelle. La Figure 6 présente les trois fractions du bioaérosol au niveau de l'arbre respiratoire en fonction de leur diamètre (Comité Européen de Normalisation [234], *International Organization for Standardization* [235] et ACGIH [236]). D'une façon schématique, on peut en déduire que les grandes particules sont arrêtées par la partie proximale de l'arbre respiratoire alors que les particules plus petites peuvent accéder aux compartiments distaux. Par convention, on définit les fractions suivantes :

- La fraction inhalable : particules totales inhalées par le nez et par la bouche,
- La fraction thoracique : pénétration au-delà du larynx,
- La fraction trachéo-bronchique : pénétration au-delà du larynx, mais pas dans les voies aériennes non ciliées,
- La fraction alvéolaire : pénétration dans les voies aériennes non ciliées.

Notons que le terme pénétration estime la fraction pénétrante, mais ne correspond pas à celle déposée au sein de l'arbre respiratoire (variation en fonction du débit respiratoire, de l'âge, pathologies respiratoires ...). D'une façon générale, l'évaluation de l'exposition au bioaérosol est complexe, mais essentielle compte tenu des risques sanitaires encourus [164, 237]. Les trois paramètres indispensables à prendre en compte sont les sources d'émission et de prolifération, les caractéristiques de la dispersion de l'agent en cause et les modes d'exposition des individus. Les aérosols en milieu industriel sont en général reliés spécifiquement à un poste de travail ou à une tâche particulière. Il est alors possible d'identifier les conditions d'émission et de mesurer les niveaux d'exposition lors d'une activité professionnelle donnée et les associer, en dépit de leurs variations, à un évènement de santé.

Figure 6 : Classification simplifiée des aérosols d'intérêt en médecine environnementale et pourcentage de la fraction pénétrante en fonction du diamètre aérodynamique (fraction inhalable, thoracique et alvéolaire).



Il existe de nombreuses méthodes pour la mesure des micro-organismes dans l'air. La norme européenne AFNOR (EN 13098-2000) a établi un guide d'évaluation de l'exposition aux micro-organismes sur le lieu de travail [238]. Basé sur cette norme, on distingue trois grands types de méthodes de prélèvement :

- ✓ L'échantillonnage **par impaction** sur un support solide ou semi-solide. La surface de ce support est généralement constituée d'une gélose nutritive qui varie en fonction des micro-organismes recherchés. L'aspiration d'air permet le dépôt des particules à la surface de la gélose qui est ensuite mise en culture. Après incubation, le nombre de colonies est compté puis converti en unité formant colonie (UFC) par m³. La précision des mesures est acceptable, et le temps d'échantillonnage court afin d'éviter la saturation du milieu d'impaction. En effet, il n'est pas possible d'effectuer des dilutions *a posteriori* de l'échantillon. En dépit de la capacité de détection élevée de ce type d'échantillonnage dans des environnements faiblement contaminés, il peut exister une sous-estimation de la quantité de micro-organismes dans l'air due à la présence d'agrégats de spores ou de bactéries qui ne formeront qu'une seule colonie [239]. Certains de ces systèmes de prélèvement possèdent des grilles de sélection permettant un tri des particules en fonction de leurs caractéristiques aérodynamiques (p. ex. impacteur d'Andersen). Le support peut aussi être remplacé par une membrane adhésive permettant une identification directe sous microscope.
- ✓ L'échantillonnage **en milieu fluide** ou « *impingers* » recueille les micro-organismes dans un milieu fluide (eau additionnée d'agents de préservation des micro-organismes). Cette solution pourra être diluée, cultivée sur différents milieux appropriés et examinée par lecture directe au microscope ou analysée par des méthodes de biologie moléculaire. Cet échantillonnage présente l'avantage de pouvoir combiner plusieurs stratégies analytiques complémentaires.

- ✓ L'échantillonnage **sur filtre** collecte les particules du bioaérosol à sa surface. Un système de pompage à débit fixe aspire l'air au travers du filtre contenu dans une cassette plastique. Les filtres peuvent être composés de différentes matières (cellulose, fibre de verre, téflon ...) et présenter différentes porosités en fonction de la stratégie d'échantillonnage choisie (pores de diamètres : 0.1 μm à 10 μm). Ces filtres peuvent être lus soit par examen direct au microscope ou en microscopie à fluorescence, soit mis en culture par application directe sur une gélose nutritive ou indirecte par la mise en culture de sa solution de rinçage. Ce rinçage permet un recueil optimal des micro-organismes et la séparation des agrégats par un lavage de l'ensemble du filtre et des parois de la cassette [240]. Cette technique présente des avantages logistiques (simplicité d'utilisation, envoi des échantillons par voie postale) et analytiques (dilution et mise en culture sur différents milieux, étude par biologie moléculaire possible).

Il est préférable d'utiliser des impacteurs jusqu'à 10^4 spores/ m^3 [241] ; au-delà de ce seuil, les méthodes d'aspiration sur filtre sont préférentiellement utilisées [242]. Le système de pompage peut être individuel ou en poste fixe avec un faible vent relatif [243]. Cependant, l'échantillonnage sur filtre n'est pas optimal pour le prélèvement d'un environnement faiblement contaminé et pour la recherche par culture des micro-organismes sensibles à la dessiccation provoquée par le flux d'air traversant le filtre lors d'un temps de pompage prolongé [244].

Une alternative aux techniques d'échantillonnage actives présentées ci-dessus est l'utilisation d'un système passif non volumétrique de recueil de la poussière sur une surface horizontale après un temps d'exposition donné [245-247]. Ce système est peu coûteux et permet une collecte des micro-organismes pendant une période longue (jours ou semaines). Les mesures sont néanmoins biaisées, car soumises aux conditions du lieu de prélèvements (variation saisonnière) et varient en fonction des capacités aérologiques des particules en surreprésentant celles qui sédimentent le plus facilement [248]. En 2008, une nouvelle procédure de prélèvement, utilisant une lingette électrostatique, a été validée pour l'échantillonnage de l'endotoxine bactérienne de la poussière sédimentée du bioaérosol [249].

Pour approfondir sur les caractéristiques et les performances des méthodes de prélèvements, on pourra se reporter aux travaux de Jensen [250, 251], d'Hauswirth

[252] et aux revues de la littérature d'Eduard en 1998 [240], de Dillon l'année suivante [253] et de Leventin en 2002 pour l'aérobiologie fongique [254]. On retiendra différents guides et rapports sur le sujet dont « les bioaérosols en milieu du travail » de l'Institut canadien de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) [241], une étude bibliographique exhaustive de 2002 portant sur l'évaluation des risques liés aux bioaérosols générés par le compostage [255] et des notes documentaires de l'Institut National de Recherche et de Sécurité sur le bioaérosol microbien [256, 257].

LES METHODES D'ANALYSES DU BIOAEROSOL

L'analyse est conditionnée par la méthode d'échantillonnage et par les paramètres microbiens recherchés. On oppose à ce stade les méthodes de culture et les méthodes non cultivables. Cette opposition n'est que méthodologique, car chacune d'elle apporte des informations complémentaires. Les choix seront effectués avec discernement en fonction du contexte de l'évaluation de l'exposition [258].

Les **méthodes par culture** sont fréquemment utilisées pour le dénombrement et l'identification des bactéries et des champignons. D'un coût raisonnable, elles nécessitent cependant un niveau d'expertise élevé dans l'identification des micro-organismes. Elles peuvent être utilisées avec l'ensemble des méthodes d'échantillonnage mentionnées ci-dessus et il est possible de coupler cette étape de culture initiale avec une identification moléculaire. L'analyse de l'échantillon est basée sur une sélection des espèces en fonction des conditions d'incubation et du type de milieu utilisé. C'est un avantage pour rechercher un ou plusieurs micro-organismes définis, mais cela induit un biais de sélection en défaveur des micro-organismes non-cultivables sur les milieux de culture usuels. La culture bactérienne est réalisée en atmosphère aérobie ou anaérobie sur des milieux non-sélectifs en fonction des espèces recherchées (gélose au sang, Müller-Hinton, l'Agar de tryptone de soja pour les bactéries et actinomycètes). Pour les micro-organismes fongiques, les milieux les plus utilisés sont des géloses au Dichloran Glycérol (DG18) ou à l'extrait de malt, additionné d'un antibiotique pour inhiber la croissance bactérienne [254]. Le comptage des colonies sur boîte de culture doit être effectué sur une gamme de valeurs comprises entre 30 et 300 colonies. Au-delà, des dilutions additionnelles de la solution mère seront effectuées [259]. Les méthodes de culture sous-estiment la biodiversité des micro-organismes présents dans les échantillons et selon les espèces leur quantité au sein du bioaérosol. Mais elles

présentent l'avantage d'être plus facilement réalisables que les méthodes complexes de biologie moléculaire [253, 260].

Les **méthodes non cultivables** peuvent être séparées en plusieurs items en fonction du type de paramètres étudiés :

- Les méthodes de **comptage direct**. Elles s'effectuent en microscopie classique directement sur la membrane d'impaction ou à partir de la solution de rinçage ou de *l'impinger*. Elle a l'avantage d'énumérer l'ensemble des composants visibles et elle est utilisée en routine dans les réseaux nationaux d'aéro-surveillance pour l'identification des pollens et des spores fongiques. Il est possible de coupler cette lecture avec la coloration au moyen d'un fluorochrome avec un microscope à épifluorescence [261]. Cependant, cette technique présente des limites de discrimination, car uniquement basée sur la morphologie. De plus, le marquage avec un fluorochrome des spores fongiques peut être masqué sous estimant le comptage [240]. Ainsi en lecture directe, les petites spores d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. ne peuvent être morphologiquement séparées [262]. Pour éviter une erreur de mesure liée au dépôt des particules au centre du filtre, le comptage doit être effectué soit sur des champs aléatoires, ou soit du centre vers la périphérie [263]. La microscopie électronique peut être utilisée pour l'identification des structures fines – par ex. les spores d'actinomycètes 0.5-1.5 µm – mais elle n'est pas une méthode de routine. La cytométrie de flux avec marquage spécifique (hybridation *in situ* par fluorescence) est une technique complémentaire, mais complexe et coûteuse à mettre en œuvre [258].
- Les **dosages de composants organiques**. De nombreux constituants organiques du bioaérosol peuvent être directement mesurés. La technique d'échantillonnage choisie est dictée par les méthodes de dosage et les contraintes techniques. Leur dosage permet une souplesse dans la stratégie d'analyse, car les molécules sont en général stables et permettent un échantillonnage plus long et individuel [264].

Ces dosages comprennent :

- *Les endotoxines bactériennes.* Elles correspondent au composant lipopolysaccharidique (LPS) de la paroi des bactéries Gram négatif et sont en règle générale dosées par la méthode spectrophotométrique du Lysat d'Amabocytes de Limule (LAL)[265]. Ce dosage est spécifique pour le LPS glucosamine mais n'est pas un dosage de l'activité biologique à proprement parler. Elles ont été étudiées fréquemment en médecine du travail et en allergologie du fait de leur rôle dans les maladies pulmonaires et de leurs propriétés immuno-stimulatrices. Elles sont stables dans l'environnement et libérées lors de la division cellulaire et de l'apoptose bactérienne. Elles peuvent être mesurées dans l'air, dans la poussière provenant du matelas ou encore sédimentée (activement par aspiration ou à l'aide d'un système de recueil passif) [266, 267].
- *Le peptidoglycan.* Parfois appelé muropeptide, c'est un polymère de la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique (Acide N-acétyl-muramique) constituant de la paroi bactérienne des Gram positif et Gram négatif. Il est cependant nettement plus abondant dans la paroi des bactéries Gram positif, ce qui rend possible la coloration. [264]
- *Les $\beta(1-3)$ glucans, les EPS (mold extracellular polysaccharides), la chitine et l'ergostérol.* Ce sont des composants de la paroi fongique. Leur dosage est considéré comme un marqueur de la charge fongique de l'échantillon. Néanmoins, l'intérêt des glucanes pour mesurer la biomasse fongique dans les environnements agricoles est limité, car cette molécule est aussi présente dans les végétaux. Une alternative est le dosage de la chitine absente des végétaux, mais présente dans l'exosquelette des arthropodes, ou le dosage de l'ergostérol composant de paroi de la membrane des cellules fongiques [268]. On retiendra cependant que les $\beta(1-3)$ glucans ont des propriétés stimulatrices de l'immunité cellulaire et humorale [269, 270]. Pour les EPS, il existe un certain niveau de spécificité antigénique au genre fongique [253]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le peptidoglycane, les acides téichoïques et le LPS sont absents des parois fongiques.

- *Les allergènes.* Ils induisent une réponse immunitaire humorale et peuvent être responsables de symptômes d'allergie. Ce sont en général des protéines d'origine végétale, animale ou microbiologique. Les méthodes de mesures sont basées sur l'immunohistochimie en utilisant un anticorps spécifique de l'allergène recherché.
 - *Les mycotoxines et les composés organiques volatiles.* Les mycotoxines sont produites par les micro-organismes fongiques. Ces substances ont des propriétés immunologiques marquées [271]. Les composés organiques volatiles ont été associés à des symptômes respiratoires et des exacerbations d'asthme. Ces deux familles nécessitent une technique d'analyse complexe par chromatographie (HPLC, *high-performance liquid chromatography* et ses dérivés) et elles ne sont pas dosées en routine.
 - *La spectrométrie de masse.* Son utilisation permet une caractérisation fine des concentrations des bio-marqueurs choisis (endotoxine, acide muramique ou ergostérol)[264].
- Les méthodes de **biologie moléculaire**. Elles sont basées sur l'amplification en chaîne par polymérisation (en anglais *Polymerase Chain Reaction* ou PCR) [272]. En développement depuis plusieurs années, elles offrent la possibilité de détecter la présence d'une faible quantité de matériel génétique microbien. Elles sont sensibles, spécifiques, et permettent d'identifier la présence de micro-organismes non ou difficilement cultivables [260]. Plusieurs stratégies d'analyses sont possibles. La première est qualitative et repose sur la caractérisation des micro-organismes par le séquençage d'un fragment du génome ribosomique [acide ribonucléique ribosomique 16S (ARNr 16S) pour les bactéries et ARNr 18S pour les micro-organismes fongiques] [273]. Les séquences obtenues sont comparées aux séquences hébergées dans les bases de données internationales en tenant compte d'un pourcentage d'homologie pour une identification au genre ou à l'espèce. Elles ne conduisent cependant pas de façon systématique à une identification d'espèce en particulier pour les micro-organismes de l'environnement dont les séquences ne sont pas encore disponibles [274, 275]. Elle peut être utilisée pour l'identification de colonies microbiennes après culture

ou directement sur les prélèvements d'air [260]. La seconde approche moléculaire ciblée sur un micro-organisme défini est la PCR temps réel (Real-time PCR) ou PCR quantitative (qPCR) [276, 277]. Elle permet de quantifier la concentration d'ADN présente dans l'échantillon en utilisant un marqueur fluorescent à chaque temps d'amplification et un ADN de référence à différentes concentrations. La comparaison à des échantillons de référence permet d'extrapoler la quantité initiale d'ADN [278]. La corrélation avec les méthodes culture est viable suivant les espèces [279]. Il existe une troisième approche moléculaire basée sur la réalisation d'une PCR universelle (ARNr 16S et rpoB) pour les bactéries, ARNr 18S pour les champignons, suivie d'un clonage des produits de PCR et leur séquençage. Cette méthode permet de s'affranchir des étapes de culture sans avoir à définir *a priori* les genres et les espèces microbiennes recherchées.

LES DONNEES DE LA LITTERATURE SUR LA COMPOSITION DU BIOAEROSOL : DE L'AIR EXTERIEUR A LA FERME

Nous avons effectué une revue de la littérature portant sur la composition des bioaérosols étudiés au sein des exploitations agricoles en insistant sur les fermes d'élevage et de production laitière. Il s'agit d'une recherche multibase (Pubmed, OvidSP et Web of Knowledgesm) qui utilise la requête suivante : [(bio-aerosol* OR pollen*) AND (farm* OR cowshed*)]. Nous rapportons les concentrations des spores et des cultures fongiques et bactériennes, les principales espèces isolées et les études portant sur les pollens. Nous évoquons simplement les évaluations de contamination environnementale basée sur les techniques non cultivables (utilisant des marqueurs biologiques) qui n'entrent pas directement dans notre travail de recherche.

L'exposition à la poussière est fréquente dans le milieu agricole d'élevage et varie en fonction des travaux agricoles, de la saison et des caractéristiques architecturales du bâti [280-282]. Cette poussière contient de nombreux composés biologiques dont principalement des bactéries et des moisissures, mais aussi des antigènes d'origine végétale ou animale, des débris végétaux et des poussières minérales [283, 284]. La quantité importante de poussière mise en suspension lors de la distribution d'alimentation est bien illustrée par le cliché photographique ci-dessous pris dans une ferme laitière de la région Franche-Comté (Figure 7, p93).

La concentration particulaire est de l'ordre de 0.5 à 1 mg/m³ dans les fermes laitières et d'élevage bovin selon la revue de littérature d'Omland [164]. Ces concentrations peuvent augmenter selon les tâches agricoles échantillonnées, jusqu'à plusieurs dizaines de milligrammes par mètre cube d'air en fonction des études [220, 283, 285-290]. Par exemple, les quantités inhalées ont été estimées dans une ferme polonaise de polyculture en fonction des activités agricoles. Pour l'activité de soins aux bovins, la fraction inhalée était de 3.8 mg/m³ [2.1-5.0], la fraction thoracique de 0.9 mg/m³ [0.5-1.9] et la fraction alvéolaire de 0.15 mg/m³ [0.08-1.3] [291]. Une étude allemande portant sur des fermes d'élevage bovin rapporte des médianes de concentrations inhalables de 1.7 mg/m³ (diam. < 10 µm) et respirables de 0.12 mg/m³ (diam. < 4.75 µm) [292].

Figure 7 : Distribution de foin lors de la session de travail en hiver dans une exploitation agricole franc-comtoise.



Commentaire : Les particules en suspension sont visibles par leurs reflets lors de l'utilisation du flash pour la prise de vue.

La composition microbiologique

Les micro-organismes bactériens

Il existe environ 250 genres de bactéries et un nombre indéterminé d'espèces dont une faible fraction est pathogène pour l'homme. Ces cellules procaryotes sont ubiquitaires dans l'environnement et de morphologies variables par leur forme (bâtonnets, coque ...) et leur taille (0.5-15 μm). Leur paroi est constituée de peptidoglycanes qui permettent la coloration de Gram. Cette coloration distingue les bactéries à Gram négatif (couche mince de peptidoglycane) de celles à Gram positif (couche épaisse de peptidoglycane). La combinaison de la morphologie, de la coloration de Gram, et des conditions de culture (aérobie/anaérobie) offre une séparation des principaux genres bactériens dont :

- **Les bactéries à Gram positif** séparées sur leur morphologie et leur capacité de croissance en milieu aérobie ; les cocci (dont les streptocoques spp. et staphylocoques spp.) et les bacilles (dont les *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* spp.). Elles ont été associées à l'agriculture d'élevage [239, 293]. Certaines espèces bactériennes sont capables de sporuler sous l'effet de facteurs de stress environnementaux, p. ex. les bacilles des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Cette sporulation permettra une dispersion dans l'environnement.
- Les bactéries filamenteuses à Gram positif appelées **actinomycètes**. Elles ont fréquemment été isolées du milieu fermier d'élevage et présentent la particularité d'avoir une croissance ramifiée et de produire des spores de faible taille (Figure 6, p84). Elles sont présentes dans le bioaérosol notamment lors de la manipulation des substrats contaminés : foin et fourrages, céréales ou compost [239, 293, 294]. Le foin moisi peut être source d'une grande quantité d'actinomycètes thermophiles [295, 296]. Ces bactéries filamenteuses (*Saccharopolyspora rectivirgula* ou *Thermoactinomyces vulgaris*) sont reconnues comme des agents étiologiques d'une alvéolite allergique extrinsèque du milieu agricole, appelée maladie du poumon de fermier [297].

- Les **bactéries à Gram négatif** qui sont ubiquitaires dans l'environnement. La famille des *Enterobacteriaceae* est présente dans l'appareil intestinal des mammifères, et notamment du bétail. Elles sont abondantes dans l'environnement fermier d'élevage et céréalier [239, 294]. Elles représentent une source majeure d'endotoxines bactériennes.

Dans l'environnement extérieur, les médianes de contaminations bactériennes de l'air sont généralement comprises entre 100 et 200 UFC/m³ mesurées avec un impacteur d'Andersen. Il existe des variations saisonnières (augmentation en été) selon une étude autrichienne rurale [298] et une étude américaine en zone suburbaine [299]. Les concentrations de l'environnement domestique sont du même ordre de grandeur, soit 200 UFC/m³ [300] et 900 UFC/m³ dans des bureaux [301]. En opposition, le milieu agricole est logiquement une source importante de bactéries. Il existe en effet un nombre important de sources potentielles d'émission : le bétail, leurs excréta, les fourrages et les litières [280]. La contamination bactérienne aérienne est possible à proximité des bâtiments agricoles d'élevage laitier en Croatie [302] jusqu'à 100 mètres des bâtiments d'une porcherie en Westphalie [303]. Par ailleurs, il a été démontré que la contamination bactérienne dans les domiciles urbains est moins importante que dans les domiciles fermiers [304]. Dans cette étude, Lis pose l'hypothèse d'un transfert des micro-organismes de l'environnement agricole au domicile par les vêtements des fermiers. Ce transfert a aussi été évoqué pour les bactéries de l'étable [305] et les spores d'actinomycètes en Finlande [306].

Les micro-organismes fongiques

Les Mycota (ou mycètes) forment le cinquième règne dit fongique. Les organismes appelés couramment champignons sont regroupés au sein de ce taxon. Deux embranchements sont remarquables en aérobiologie : (1) les ascomycètes (Ascomycota) dont les ascospores sont produites pour la reproduction sexuée à l'intérieur d'asques puis expulsées à maturité à l'extérieur [pour certaines espèces, la multiplication asexuée utilisant des conidiospores les a fait classer dans les champignons imparfaits (fungi imperfecti) , par exemple les *Aspergillus* et les *Penicillium*.] , et (2) les basidiomycètes (Basidiomycota) dont les basidiospores sont fabriquées à l'apex des basides puis activement larguées à maturité pour être dispersées passivement par le vent.

Un grand nombre de champignons pathogènes pour l'homme appartient au groupe des *Deuteromycetes* pour lesquels la reproduction sexuée n'est pas connue ou naturellement observable (seulement dans des conditions particulières de culture). Ce groupe a une implication directe en aérobiologie du fait de la production de spores asexuées, ou conidies. Notons un point de nomenclature : on définit par convention la forme sexuée, ou téléomorphe, et la forme asexuée ou anamorphe. Par exemple, *Aspergillus glaucus* est la forme asexuée et *Eurotium herbariorum* la forme téléomorphe isolée en culture au laboratoire. Finalement, en fonction des groupes et des conditions environnementales, les moisissures ont la capacité de disperser dans le bioaérosol des spores sexuées ou asexuées, par exemple les conidies de taille de 2-3 μm pour *Aspergillus fumigatus* [254]. On peut ajouter la présence, dans le bioaérosol, de fragments des formes filamenteuses d'une taille comprise entre 20 et 100 μm mis en suspension lors de la manipulation d'un substrat contaminé.

Une alternative de regroupement est basée sur la physiologie des micro-organismes. Cette approche est utile pour décrire des communautés aux capacités optimales de croissance commune : 25°C pour les champignons mésophiles (dont les genres *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Wallemia*) et 35°C pour les thermophiles (certains *Aspergillus* et *Geotrichum*).

Les concentrations fongiques de l'air extérieur sont variables pendant l'année et constituent le reflet de l'activité biologique fongique rythmée par les saisons, la lumière et les conditions climatiques [307]. Les genres les plus courants sont *Alternaria*, impliqués dans l'asthme, *Epicoccum* et *Cladosporium*. Les concentrations fongiques totales mesurées avec un impacteur d'Andersen sont de l'ordre de 200 UFC/m³ [298, 299], avec des variations importantes intra- et inter-espèces allant jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10³ UFC/m³ [307-309]. Une revue de la littérature portant sur les logements d'Europe centrale et de l'est rapporte des concentrations fongiques variant de 10 à 10³ UFC/m³ [309, 310]. Dans les logements du nord-est des USA, les concentrations moyennes en micro-organismes fongiques cultivables sont de 800 UFC/m³ dans les chambres d'enfants et de 1000 UFC/m³ dans les salons [311]. Dans cette étude les genres les plus fréquemment isolés étaient *Cladosporium* et *Penicillium*. Une autre revue de la littérature de Pieckova et Jesenska portant sur la contamination des logements par

les micro-organismes fongiques d'intérêt médical retient sept genres importants : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, et *Wallemia*.

Par ailleurs, l'étude comparative des spores fongiques de logements fermiers et urbains a mis en évidence une contamination augmentée d'un facteur 10 à 10³ des logements fermiers [306]. Le profil des espèces des logements fermiers était qualitativement différent comprenant les genres fongiques non isolés dans les logements urbains, mais présents dans les fermes (c.-à-d *Acremonium*, *Alternaria*, *Botrytis* et *Chrysosporium*). On note qu'il a été décrit une contamination environnementale fongique à proximité immédiate des bâtiments laitiers agricoles en Pologne [312] retrouvée en Wesphalie pour une porcherie [303].

Les fermes sont un environnement professionnel où l'exposition aux micro-organismes fongiques est reconnue comme importante [313]. Cette exposition agricole a été reliée avec des pathologies respiratoires professionnelles dont maladie du poumon de fermier. Dans le massif du Jura Français (Doubs), *Absidia corymbifera* et dans une moindre mesure, *Wallemi sebi* or *Eurotium amstelodami* ont été mis en cause comme un agent étiologique de la maladie du poumon de fermier [314]. Le fourrage a été identifié comme étant une source environnementale majeure pour ces trois micro-organismes [281]. Par ailleurs, les espèces fongiques peuvent être aussi une source d'allergènes entraînant une réaction immunitaire humorale IgE médiée (*Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium* spp.). Il n'existe pas d'étude formelle sur l'implication des micro-organismes dans l'asthme professionnel mais ils restent néanmoins une source importante de $\beta(1-3)$ glucans.

Les niveaux de contaminations fongiques dans l'environnement agricole d'élevage bovin et de production laitière sont rapportés dans le Tableau V (p101). Au sein de ces fermes, les principales espèces dans l'air appartiennent aux *Alternaria* spp., *Absidia* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. et *Wallemia sebi* [282, 307, 312, 314-317]. Le nettoyage, le déplacement des animaux et la distribution d'alimentation (notamment de foin moisi) sont des tâches qui augmentent la contamination aérienne du bioaérosol [315, 318-320]. Dans l'exploitation agricole, il existe des variations nycthémérales avec une contamination moyenne qui tend à s'abaisser la nuit, mais ces variations sont moins marquées que pour la contamination bactérienne de l'air [284]. En milieu agricole, Adhikari a comparé avec un système de recueil par filtration la stratégie

d'échantillonnage individuelle et d'échantillonnage en poste fixe ; il n'existe pas de différence significative du recueil des spores fongiques [315].

L'exposition aux espèces fongiques dans le bioaérosol n'est pas limitée aux espèces identifiables par culture. Des fragments de structures intracellulaires, des conidies et des parois des hyphes fongiques peuvent être mises en suspension à des concentrations élevées [321]. Gorny souligne que ces fragments de taille inférieure à 0.5 μm , c.-à-d compris dans la fraction respirable, peuvent se déposer profondément dans l'arbre respiratoire au niveau des bronchioles et des alvéoles. On notera cependant que la majorité des particules de diamètre supérieur à 10 μm sont recueillies dans la région nasotrachéale [322]. Green a démontré que les concentrations de fragments des hyphes fongiques étaient plus importantes que les conidies des espèces correspondantes. De plus, ces fragments sont porteurs d'allergènes qui peuvent être combinés aux IgE humaines spécifiques d'après cet auteur [321, 323]. Les conséquences immunologiques liées à ces particules, dont la taille peut être de l'ordre du micron, ne sont pas connues.

Tableau IV : Niveaux de contamination aérienne par les micro-organismes bactériens dans l'environnement fermier évalués par méthode de culture et/ou comptage.

EXPLOITATION AGRICOLE		TYPE	METHODES D'ECHANTILLONNAGE	CONCENTRATIONS (UFC ou spore/m ³)									REFERENCES
				10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
Élevage	USA	Total bac. mésophile	Filtre/ milieu ND			◀	—	—	—	—	▶	[324]	
		Actinomycètes	Filtre/ milieu ND			✕ _{ma}						[324]	
Laitières	Pologne	Total bact. mésophile	Mas-100/ MPA agar/48h 37°C			◀	▶					[312]	
		Staphylocoque	Mas-100/ Chapman/6 j à 26	◀	—	▶						[312]	
Élevage et céréalières	Norvège	Total bactérie	Filtre/ milieu ND			✕ _{mg}						[220]	
Élevage bovin (dont laitières)	Europe ¹	Total bactérie	Filtre/Plate-Count-Agar				✕ _{mg}					[284]	
		Total <i>Enterobacteriaceae</i>	Filtre/ Violet-Red-Bile-Agar				✕ _{mg}					[284]	
Élevage et céréalières	Norvège	Total bactérie	nd				◀	—	▶			[286]	
Laitières	Suède	Total micro-organisme	Filtre/ épifluorescence							✕ _{ma}		[325]	
Laitières	Pologne	Thermoactinomycetes	nd	◀	—	—	▶					[287]	
Laitières, écuries, porcheries	Pologne	Bacille Gram négatif	nd	◀	—	▶						[287]	
Laitières	Croatie	Total bact. mésophile	Mas-100/ Columbia agar/24h				✕ _{ma}					[302]	
Elevage	Canada	Total bacterie	Andersen/nd					✕ _{med}				[326]	
Laitières	USA	Total bact. mésophile	Impinger					✕ _{mg}				[327]	
Laitières	USA	Total bact. thermophile	Impinger			✕ _{mg}						[327]	
Elevage bovin	Allemagne	Total bact aérobie	Andersen			◀	—	▶				[328]	
Élevage bovin	Allemagne	Total anaérobie bact.	Andersen			◀	—	▶				[328]	
Élevage bovin	Allemagne	Clos. perfringens	Andersen	◀	—	—	▶					[328]	

Adapté d'Eduard et mis à jour en 04/2009.

Abréviations : (✕_{ma}) moyenne arithmétique ; (✕_{mg}) moyenne géométrique ; (✕_{med}) médiane ; (◀—▶) minimum-maximum ; (nd) non déterminé ; (bact.) bactérie ; (Clos. perfringens) *Clostridium perfringens*.

(1) Allemagne, Angleterre, Pays-Bas, et Danemark.

Tableau V : Niveaux de contamination aérienne par les micro-organismes fongiques dans l'environnement fermier évalués par méthode de culture et/ou comptage.

EXPLOITATION AGRICOLE		TYPE	METHODES D'ECHANTILLONNAGE	CONCENTRATIONS (UFC ou spore/m ³)						REFERENCES			
				10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶		10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
Élevage	USA	Total spore	Filtre/ milieu nd		◀	–	▶						[324]
		Total cultivable	Filtre/ milieu nd			◀	–	–	–	–	▶		[324]
Laitières (ferme moderne et conventionnelle)	Pologne	Total cultivable	Mas-100/ Martin agar ¹			✕ _{ma}							[312]
Laitières	USA	Total spore	Filtre ² /poste fixe		◀	–	▶						[315]
		Total spore	Filtre ² / individuel		◀	–	▶						[315]
Élevage et céréalières	Norvège	Total spore	Filtre/ milieu nd			✕ _{mg}							[220]
Élevage (dont laitières)	Europe ¹	Total cultivable	Filtre/Sabouraud-Agar			✕ _{mg}							[284]
Élevage et céréalières	Norvège	Total spore	nd				◀	–	▶				[286]
Laitières	Finlande	Total cultivable	Andersen			◀	–	▶					[306]
Laitières	Finlande	Total spores	Filtre/ épifluorescence					◀	–	▶			[316]
Laitières	Finlande	Total cultivable	Impacteur/nd	◀	–	–	–	–	–	▶			[316]
Laitières associées avec écuries et porcheries	Pologne	Total cultivable	nd		◀	–	▶						[287]
Élevage	Canada	Total cultivable	Andersen/nd						✕ _{med}				[326]
Laitières	USA	Total cultivable	Impinger			✕ _{mg}							[327]

Adapté d'Eduard et mis à jour 04/2009.

Abréviations : (✕_{ma}) moyenne arithmétique ; (✕_{mg}) moyenne géométrique ; (✕_{med}) médiane ; (◀▶) minimum-maximum ; (nd) non déterminé.

(1) Allemagne, Angleterre, Pays-Bas, et Danemark.

Les composés microbiologiques

Les endotoxines sont constituées par un complexe macromoléculaire de lipopolysaccharides (LPS). La partie purifiée lipidique du lipopolysaccharide (lipide A) est la partie toxinique responsable de l'activité biologique [329]. Dans la littérature ces deux termes, endotoxine et LPS, sont souvent considérés (à tort) comme synonymes. L'

Annexe II (p238) présente en détail la structure de ce composant de la paroi des bactéries Gram négatif [330]. Dans l'environnement domestique, les concentrations aériennes varient sur une gamme de 1 à 30 ng/m³. À proximité des installations d'élevage intensif, les concentrations d'endotoxines sont plus élevées que pour les zones urbaines [331]. Elles présentent cependant une importante variabilité spatiale. Dans l'environnement fermier d'élevage bovin, les concentrations sont augmentées d'un facteur 10 à 1000 avec des moyennes variant sur une gamme de 10 ng à un µg/m³ [164, 239, 284, 292, 332].

Les β(1-3)glucans ont pour origine le compost et les substrats alimentaires utilisés en agriculture d'élevage. Ce sont des polymères de glucose produits par les micro-organismes fongiques, des plantes et quelques bactéries. Il existe un récepteur cellulaire transmembranaire spécifique (Dectin-1) exprimé à la surface des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques [258]. Ces molécules sont capables d'activer les leucocytes et d'induire une inflammation des voies aériennes dans un modèle murin [333]. En médecine du travail, des concentrations élevées ont été associées à des symptômes respiratoires [334]

Les mycotoxines et composés organiques volatiles sont aussi présents dans les fermes. Ce sont des métabolites volatiles et stables produits par les champignons. On peut citer les genres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichotecium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Paelomyces* parmi les champignons décrits comme toxigènes. Il existe cependant des variations de production due aux conditions environnementales et des variations intra-espèces [271]. Certaines de ces espèces sont fréquentes dans l'environnement agricole sur les substrats d'alimentation (notamment le grain). Elles peuvent être mises en suspension dans la poussière organique provenant de la

manipulation de l'alimentation. On retiendra surtout en milieu agricole les toxines suivantes : les aflatoxines, les ochratoxines et les trichotécènes liés aux espèces contaminants les céréales (orge, maïs et blé). Dans le nord de l'Allemagne, les composés organiques volatiles ont été plus élevés dans les fermes et les domiciles correspondants par rapport aux domiciles témoins urbains [335].

Il existe en sus dans cet environnement complexe des allergènes dérivés des animaux et des plantes [336, 337]. Berger rapporte des concentrations : élevées pour l'allergène de bovin ($20 \cdot 10^3 \mu\text{g/g}$, Bos d2), modérées d'allergène de chat ($0.1 \mu\text{g/g}$, Fel d1) et faibles pour les allergènes d'acariens (inf à $0.01 \mu\text{g/g}$) dans la poussière sédimentée des étables laitières. Les concentrations au domicile étaient divisées par un facteur 1000 pour l'allergène de bovin ($2.5 \mu\text{g/g}$) et augmentées pour l'allergène de chat et les allergènes d'acariens (0.4 et $0.1 \mu\text{g/g}$ respectivement). Près des deux tiers des matelas échantillonnés au domicile présentaient des concentrations supérieures au seuil de sensibilisation aux allergènes de bovins contre deux tiers pour l'allergène de chat [292]. Il existe de nombreux autres allergènes au sein de l'environnement fermier, et les travaux de Campbell dans des fermes du nord-est des USA démontrent des quantités importantes d'allergènes d'*Aspergillus fumigatus* et de *Lepidoglyphus destructor* [336].

Les pollens

La dispersion aérienne des grains de pollen d'arbres et d'herbacées anémophiles permet le dépôt des particules polliniques au sein de l'arbre respiratoire humain (Figure 6, p84). La majorité de ces grains de pollen ont une taille comprise entre 10-20 μm et 60 μm [338] mais ce diamètre peut atteindre plusieurs centaines de microns (Figure 8, p105). La paroi externe est constituée d'exine, un polymère très résistant de sporopollénine (une molécule proche des terpènes). C'est un des polymères les plus résistants dans le monde végétal. La paroi interne est composée de l'intine (mélange de cellulose et de pectine). Selon les groupes de végétaux, le cytoplasme des grains de pollen peut contenir des grains d'amidon, des vacuoles et des lipides. Un nombre variable d'ouvertures et de sillons à la surface (amincissement de la paroi qui permettront la germination du grain) ainsi que des ornements de l'exine permettent son identification morphologique (Figure 9, p105).

Les allergènes potentiels peuvent être retrouvés dans différentes structures biologiques du pollen en fonction des espèces [339]. Cependant, la localisation précise des allergènes n'est que partiellement décrite à l'heure actuelle. Les Poacées (*Poaceae* ou autrefois dénommées graminées, *Gramineae*) présentent deux groupes principaux d'allergènes avec un important risque de réactivité croisée (groupe I et V avec respectivement 90-95 % et 68-85 % de réactivité IgE médiée chez les patients allergiques) [340]. Leur nomenclature et leur fonction biochimique est mise à jour par l'Organisation mondiale de la santé et par l'Union internationale des Sociétés d'Immunologie (www.allergen.org ; [73]). Les grains de pollen contiennent aussi des NAD(P)H oxydases et des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires eicosanoïde-like (*pollen-associated lipid mediators* ou PALMs) dont l'effet fonctionnel est proche des leucotriènes [341]. Ces dernières peuvent être émises lors des conditions humides. Ces médiateurs ont été isolés en quantité importante à partir des pollens de bouleau, de graminées et d'armoise [342]. Ces molécules sont reconnues par les lymphocytes T [343] et ont un effet immunitaire propre en modulant la sécrétion cytokinique, et en favorisant la polarisation Th2 [344-346], en réduisant la production IL-12 par les cellules dendritiques et en favorisant un micro-milieu propice à la différenciation

Figure 8 : Schéma simplifié de la structure d'un grain de pollen

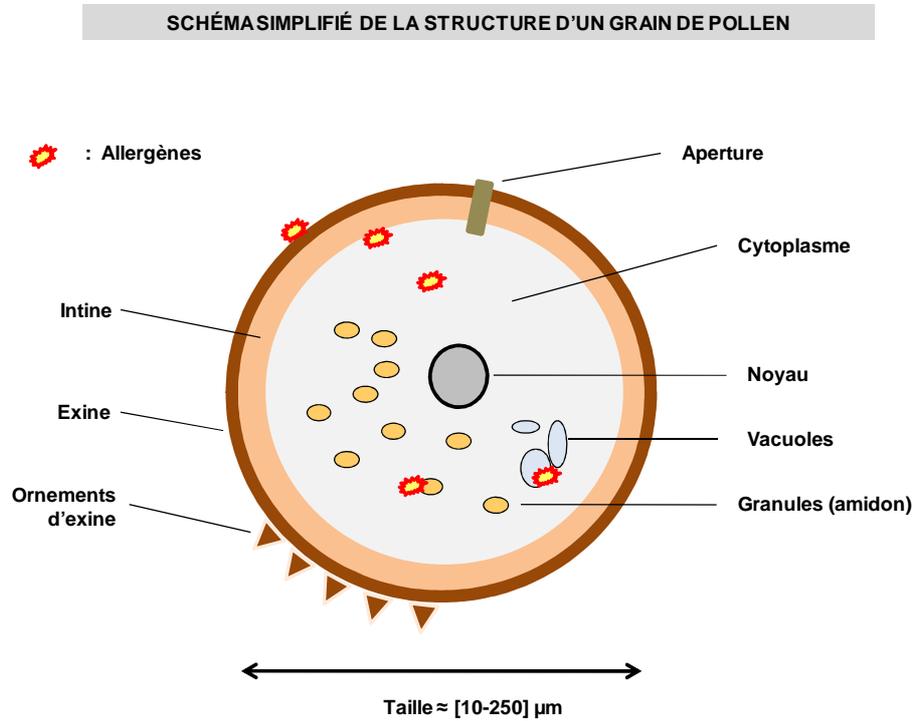
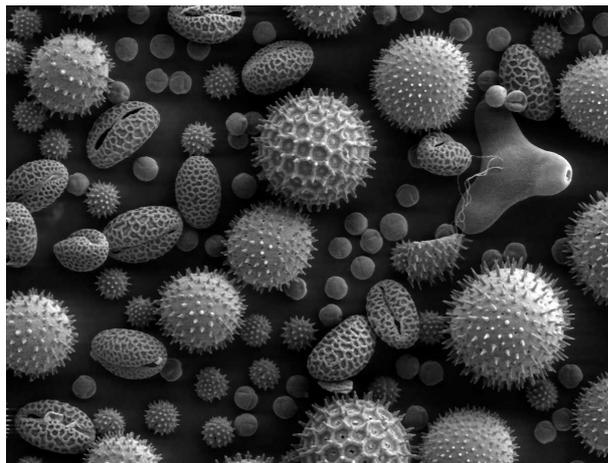


Figure 9 : Image en microscopie électronique de grains de pollen.



(La microscopie électronique permet la mise en évidence à la surface des grains les motifs en reliefs d'exine MEB- grossissement x500 ; source : <http://dreamschooner.wordpress.com>).

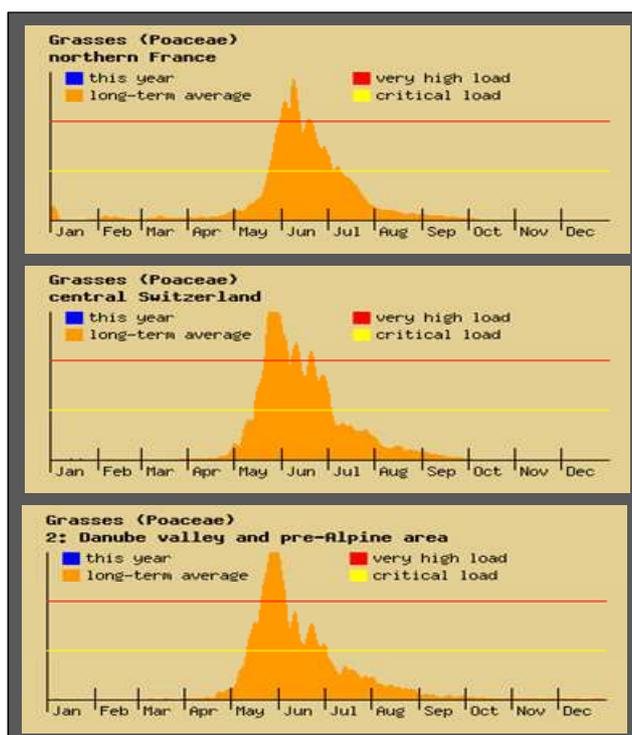
cellulaire Th2 [347-349]. La stimulation des cellules dendritiques par les lipides d'origine pollinique est dépendante, au moins en partie, des récepteurs de surface CD1 [350]. D'autres molécules aux propriétés immunologiques sont présentes au sein des pollens. Rylander souligne que les niveaux de $\beta(1-3)$ glucans inhalés, provenant des grains de pollen, pouvaient dépasser les seuils provoquant une inflammation pulmonaire [351]. En dépit de la taille importante des grains de pollen qui les empêche de pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire, l'exposition aux pollens doit aussi prendre en compte les fragments polliniques et l'ensemble des composés biologiques dérivés en suspension [341].

Leurs concentrations aériennes sont hautement variables dans le milieu extérieur. Ces variations sont liées à leurs capacités aérologiques propres, aux périodes de pollinisation, aux conditions atmosphériques et aux régions étudiées [352]. Les stratégies d'échantillonnage diffèrent en fonction des objectifs de recherche ou de surveillance au long cours. Les principaux dispositifs d'échantillonnage ont été répertoriés par Mullins et Emberlin [338]. On peut citer les pièges passifs (cylindrique ou par sédimentation), les impacteurs (capteurs volumétriques), les capteurs à bras rotatifs et les échantillonneurs par filtration. Les techniques d'analyse sont basées sur l'identification au microscope optique, mais des techniques de dosage des fractions allergéniques par ELISA ou d'identification d'espèces par biologie moléculaire sont possibles [338, 353].

L'exposition aux grains de pollen de graminées a lieu principalement entre le mois de mai et septembre en Europe. La saison d'exposition sera d'autant plus précoce que la latitude est basse (mois de mars pour le sud de l'Italie) [354]. Les concentrations sont suivies en Europe par des réseaux de surveillance nationaux qui fournissent un Bulletin allergopollinique hebdomadaire (en France, cela correspond au Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA), <http://www.pollens.fr/accueil.php>). Ces données nationales européennes sont présentées sur le site www.polleninfo.org [355]. Pour les graminées, la Figure 10 (p107) rapportent les histogrammes hebdomadaires des concentrations moyennes des grains de pollen de graminées dans le

nord-est de la France, le centre de la Suisse et les Préalpes allemandes. D'une façon générale, les pics

Figure 10 : Variation moyenne des concentrations des pollens de graminées dans l'air extérieur dans trois régions Européennes (Nord-est de la France, Centre de la Suisse (Région de Zurich) et les pré-Alpes allemandes).



(Source : <http://www.polleninfo.org/>)

Tableau VI : Potentiel allergisant des pollens.

ARBRES		HERBACEES	
Cyprès	5	Olivier	3
Bouleau	5	Tilleul	3
Aulne	4	Peuplier	2
Frêne	4	Mûrier	2
Chêne	4	Hêtre	2
Noisetier	3	Châtaignier	2
Saule	3	Orme	1
Charme	3	Pin	0
Platane	3		
		Graminées	5
		Ambroisie	5
		Pariétaire	4
		Armoise	4
		Plantain	3
		Chenopode	3
		Oseille	2
		Ortie	1

Potentiel allergisant de 0 = nul à 5 = très fort

(Source : Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA), <http://www.pollens.fr/accueil.php>)

de concentrations sont présents en mai et juin. Les données numériques ne sont pas disponibles pour des raisons de droits d'auteur sur le site, mais les concentrations lors des pics estivaux sont de l'ordre de 500 à 800 grains/m³. D'après Burr et al. , il existe des variations importantes en fonction des pays et des stations ; les comptes totaux de graminées variant de 10² and 10⁴ grains/m³ et le nombre de jours annuels dépassant le seuil de 50 grains/m³ varient de quelques jours à six semaines [356]. Dans ce travail portant sur l'étude ISAAC, il n'a pas été démontré de relation statistique marquée entre exposition aux pollens et les symptômes de rhinite allergique. L'auteur évoque cependant le lien potentiel d'une forte exposition et une protection vis-à-vis de l'allergie pollinique. On doit noter que toutes les espèces n'ont pas le même potentiel allergisant à concentrations identiques. Un tableau comparatif du potentiel allergisant de ces espèces courantes est disponible sur le site du Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA - [357]) et présenté dans le Tableau VI (p107).

Trois études seulement portent sur l'évaluation des quantités de pollens dans les fermes. Elles ont été menées dans des régions extra-européennes : deux en Inde [358, 359] et une au Japon [360]. Il n'existe pas d'étude à notre connaissance sur l'exposition aux pollens dans les fermes d'élevage en Europe, alors même que les études épidémiologiques montrent que la vie dans ces fermes est associée à une diminution de la fréquence du rhume des foins.

It is easy to lie with statistics. It is hard to tell the truth without statistics.

Andrejs Dunkels

LES APPROCHES METHODOLOGIQUES ET STATISTIQUES

Dans l'environnement du travail ou domestique, l'exposition humaine au bioaérosol est variable. Cette variabilité se décompose entre une part liée directement à la méthode de mesure, constituant l'erreur de mesure, et une autre part correspondant à la variabilité de la contamination elle-même. Cette dernière est le résultat de changements aléatoires dans l'émission du contaminant, des facteurs externes et de l'activité humaine. Ainsi, l'ensemble de ces facteurs est indépendant de la procédure de mesure utilisée. La connaissance et la prise en compte de ces différentes sources de variabilité conditionnent la stratégie et le plan d'échantillonnage d'une étude portant sur l'évaluation de l'exposition.

En épidémiologie environnementale, deux stratégies d'analyse de l'exposition ont été décrites et sont présentées à la Figure 11 (p113) :

La mesure individuelle (individual-based strategy) qui est basée sur la réalisation de mesures répétées pour chaque individu. Elle a l'avantage de relier l'exposition à l'échelon individuel, mais en contrepartie il est difficile d'obtenir pour cette exposition un échantillonnage exhaustif. L'efficacité de cette approche est conditionnée par la variabilité de la moyenne des mesures pour un individu. Cette variabilité est appelée variabilité du sujet dont l'équivalent anglais est l'*intra-individual variability* ou *within-subject variance* ou *error variance* [361]. Plus cette variabilité individuelle est importante, plus elle tendra à atténuer l'association statistique entre l'exposition et la présence d'une maladie (*attenuation bias* en anglais) vers zéro dans les modèles de régression et vers 1 dans les modèles d'estimation du risque basé sur les odd-ratios ou les risques relatifs (correspondant à l'expression consacrée anglo-saxonne *towards the null* ou *towards one*, respectivement). L'erreur de mesure individuelle aura d'autant moins d'effet que l'exposition réelle est étendue [362]. L'atténuation ne sera marquée que lorsque la dispersion de l'erreur individuelle est importante comparée à la dispersion de l'exposition réelle. Si la variance intra-individu est élevée, elle réduit la puissance de l'étude pour détecter une association significative

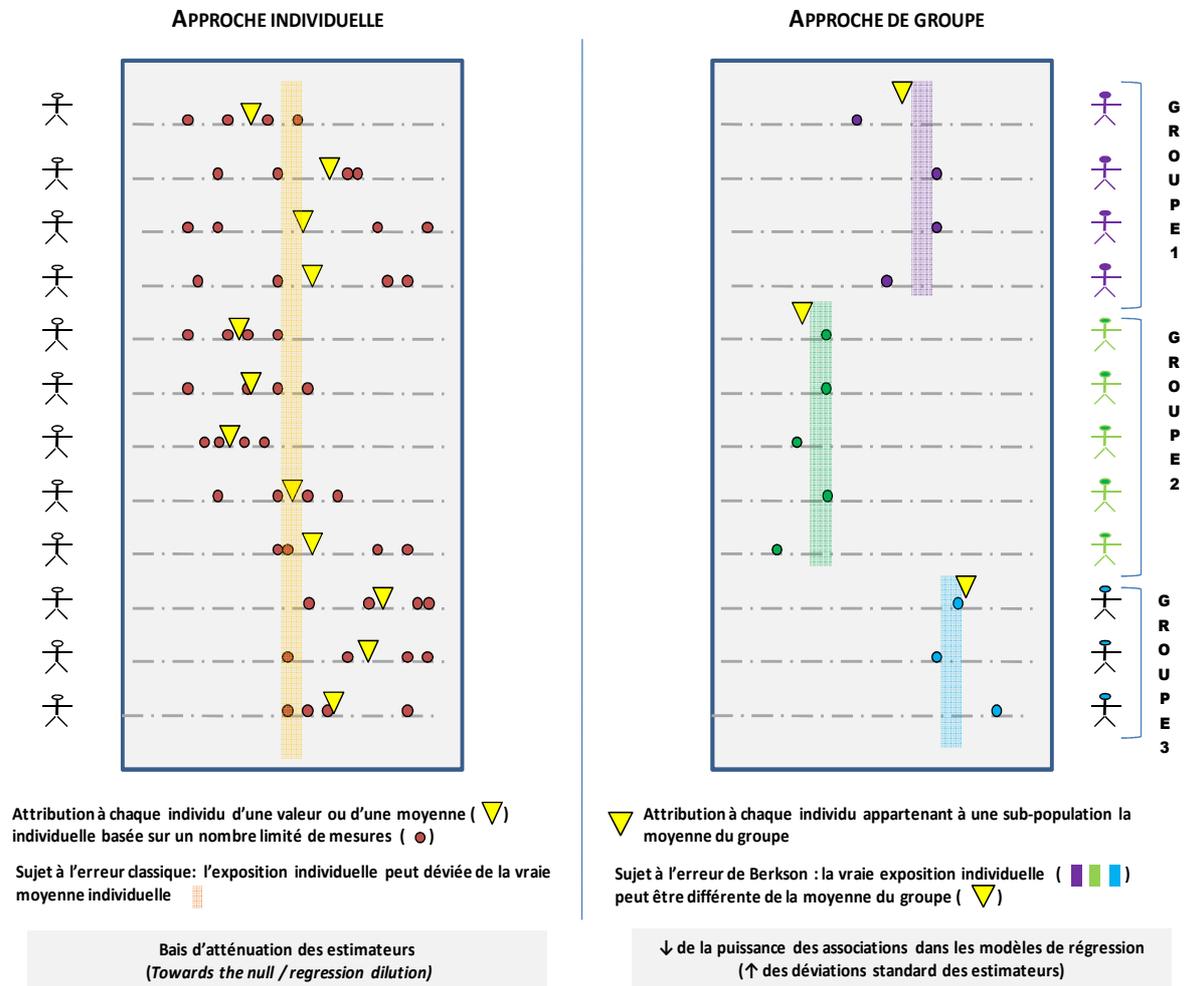
entre l'exposition environnementale et un évènement de santé. Le ratio de la variance intra- sur la variance inter-individu a été proposé pour quantifier cet effet [361]. Dans cette approche, les mesures répétées sont une estimation de l'exposition individuelle et l'erreur de mesure est aussi appelée erreur classique [362].

La mesure de groupe qui correspond à la mesure de l'exposition se fait dans des groupes partageant une exposition identique ; p.ex. l'exposition à une substance toxique à différents postes de travail. On attribue alors à l'individu la moyenne des mesures effectuées du groupe auquel il appartient. Dans les modèles de régression, cette stratégie évite le biais d'atténuation mais augmente la déviation standard de l'estimateur. Il est donc possible de conclure à tort à l'absence d'association entre l'exposition et une variable continue de santé [363]. Dans cette stratégie, il est recommandé d'avoir une mesure de l'ensemble des individus constituant le groupe pour avoir la meilleure estimation moyenne et de pouvoir disposer de plusieurs groupes avec un contraste important d'exposition [364]. Dans cette approche, la vraie exposition individuelle n'est finalement pas connue, mais on émet l'hypothèse qu'elle varie de façon aléatoire autour de la mesure moyenne du groupe. Cette erreur de mesure est dénommée l'erreur type de Berkson (*Berkson type error*)[362]. Elle ne conduit pas à un biais dans l'estimation du coefficient de régression mais à une perte de puissance de la capacité à isoler un effet significatif. Elle ne conduira pas à conclure à tort à la présence d'une association significative [362].

Plusieurs remarques complémentaires doivent être effectuées :

L'absence de lien dans la relation entre un évènement de santé et une exposition environnementale doit être regardée avec précaution si la mesure de l'exposition est sujette à une erreur de mesure. La réduction artificielle de la puissance de l'étude par l'erreur de mesure conduit en effet à exclure une association sous-jacente qui est en réalité plus probable. Inversement, la présence d'une association significative ou de faible amplitude en présence d'une erreur de mesure ne doit pas être discréditée car en l'absence de l'erreur, cette association aurait été plus importante.

Figure 11 : Comparaison des approches individuelles et de groupe dans l'évaluation d'une exposition en épidémiologie environnementale.



Il existe des méthodes de correction de l'erreur de mesure dans les modèles de régression. Elles ne sont possibles que si l'on dispose d'études spécifiques basées sur des prélèvements répétés portant sur cette erreur ou d'études de validation (utilisation de prélèvements répétées en parallèle avec une mesure dite *gold-standart*). Mais Armstrong souligne que cette correction peut être inefficace ou amener à augmenter le biais sur l'association réelle [362].

Pour W. Eduard, la stratégie la plus efficace dans l'évaluation d'une exposition chronique est la modélisation basée sur différents déterminants de l'exposition [239]. Il propose une stratégie d'échantillonnage basée sur les tâches de travail les plus homogènes. L'étude des niveaux d'exposition agricole doit se faire en tenant compte de la session de travail avec une mesure du bioaérosol ambiant et une mesure après l'affouragement du bétail (distribution du foin), particulièrement quand le foin est moisi [365]. Dans le rapport des bioaérosols en milieu du travail, il est admis que six à dix mesures permettent d'estimer une moyenne et un écart type [241]. En deçà, il existe une importante incertitude dans l'évaluation de l'exposition respiratoire [366]. L'ACGIH propose pour l'estimation des intervalles de confiance d'une moyenne d'utiliser au moins six échantillons, et onze échantillons pour l'estimation de la variance d'une série de données [241, 367].

Il existe différentes possibilités de décrire mathématiquement les paramètres environnementaux. La moyenne arithmétique constitue probablement le paramètre de position le plus utilisé. Elle est égale à la somme des valeurs observées divisée par le nombre d'observations. Elle doit être associée à un paramètre de dispersion, l'écart type. Elle dépend de valeurs extrêmes souvent hors norme. Cette situation peut être rencontrée dans la mesure du bioaérosol où certaines mesures élevées peuvent être la conséquence d'une contamination reflétant une situation ponctuelle, mais pas l'exposition au long terme.

D'autre part, ces mesures environnementales ne suivent pas une loi de distribution gaussienne. Il existe en effet un nombre important de valeurs basses ou moyennes et un nombre faible de valeurs extrêmes dépassant d'un facteur trois les

valeurs les plus basses. La distribution des valeurs est alors étirée vers la droite. Dans ce contexte, une transformation logarithmique des données peut permettre d'obtenir une distribution ayant une symétrie acceptable (attention : les valeurs nulles doivent être remplacées par une valeur arbitraire, par exemple la valeur correspondant à la moitié de la limite de détection de la technique). L'exponentielle de la moyenne de ces valeurs log-transformées correspond à un deuxième paramètre descriptif des données : la moyenne géométrique qui reflète une mesure de la tendance centrale des données. Cette étape de *log-transformation* peut-être nécessaire avant l'application d'un modèle de régression linéaire pour faciliter l'obtention d'une distribution normale des résidus. Dans ce cas, l'exponentielle des coefficients estimés par le modèle correspond au ratio des moyennes géométriques.

In the end, our society will be defined not only by what we create, but by what we refuse to destroy.

John Sawhill.

ÉTUDE

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de caractériser le bioaérosol des étables et les principaux paramètres environnementaux influençant les niveaux de contamination dans l'environnement fermier.

La **première partie** a porté sur la validation de la mesure des micro-organismes bactériens et fongiques présents dans l'air intérieur des étables et a pour objectifs de :

- décrire les variations quantitatives des micro-organismes fongiques et des pollens dans le bioaérosol en fonction du temps dans l'environnement intérieur des étables.
- mesurer la variabilité des concentrations fongiques et bactériennes et à l'intégrer dans une démarche d'épidémiologie environnementale.

Cette première partie sera présentée comme un ensemble d'études préliminaires sur la stratégie d'échantillonnage et la variation de la composition du bioaérosol.

La **deuxième partie** du travail a consisté en une étude environnementale centrée sur la caractérisation de l'exposition aérienne aux composés bactériens, fongiques et polliniques du bioaérosol des familles participantes à l'étude de cohorte multicentrique PASTURE (PROTECTION AGAINST ALLERGY: STUDY IN RURAL ENVIRONMENTS, [368]). Cette étude environnementale nichée a été dénommée PASTURE microbiologie (PASTURE_{microbio}). Sa réalisation a eu lieu dans trois régions européennes de l'arc alpin. L'évaluation du bioaérosol a été réalisée dans les étables, dans les logements des enfants issus de familles de fermiers et dans les logements d'enfants ruraux non exposés à la ferme. L'objectif de ce travail est de caractériser l'exposition dans l'enfance des sujets de la cohorte PASTURE afin d'intégrer les données microbiologiques environnementales dans l'évaluation du risque de survenue de pathologies allergiques dans cette population.

MATERIELS ET METHODES

LES ETUDES PILOTES

La validation de la mesure

Étude de laboratoire

Protocole

Le procédé d'échantillonnage environnemental choisi est une technique de prélèvement sur filtre couplée à une analyse des micro-organismes cultivables à partir d'une solution de rinçage.

Afin d'estimer le poids de la procédure d'analyse de laboratoire et du comptage des colonies sur boîte de culture dans la variabilité des résultats, une étude sur la reproductibilité de la mesure a été réalisée en analysant cinq *replicas* pompés simultanément et côte à côte dans une même étable en-dehors d'une session de travail (définie comme la distribution d'aliments aux bétails). Chaque échantillon a été attribué à un technicien, qui a réalisé sept cultures. Les échantillons ont été obtenus par pompage pendant 20 min à l'aide d'une pompe GilAir 3® utilisant une cassette Plastique Millipore (37 mm de diamètre) avec un filtre de Téflon® percé de pores de 0.45 µm de diamètre (Sensidyne, Clearwater, Etats-Unis). Le débit a été fixé à 3 l/min. Le volume total d'air échantillonné est égal à 60 l.

Dans le laboratoire, les filtres ont été rincés avec 10 ml d'une solution d'eau stérile à 0.1 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne), et brassés durant 10 min dans un sachet plastique stérile au moyen d'un appareil de type "stomacher" (AES Laboratoire, Combourg, France). Cent microlitres de cette solution de rinçage ont été platés après une dilution au 10^{ème} et au 100^{ème} sur un milieu de Müller-Hinton (MH, Becton Dickinson, Cockeysville, Etats-Unis). Les colonies bactériennes thermotolérantes ont été comptées après 48 heures d'incubation aérobie à 30°C. En

parallèle, cent microlitres de la solution initiale diluée au 10^{ème} ont été cultivés sur milieu dichloran-glycérol (DG18, Oxoid Ltd, Basingstoke, Angleterre) additionné de 0,5 % de chloramphénicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Les colonies fongiques ont été comptées après trois jours d'incubation aérobie à 30°C. Le compte des micro-organismes fongiques a été divisé en deux ensembles: (i) *Eurotium* spp. (identifiés par leurs couleurs et leurs caractéristiques morphologiques) et (ii) les autres espèces fongiques. Le comptage des colonies a été effectué par trois lecteurs indépendants. L'ensemble des résultats a été exprimé en Unités de Formant Colonies (UFC) comptées sur le milieu et ensuite converties en fonction des dilutions en UFC/m³.

Une seconde étude a porté sur le niveau de recueil des micro-organismes par la méthode de lavage du filtre. Ainsi, quatre lavages successifs de cinq filtres échantillonnés dans une étable en dehors d'une session de travail ont été réalisés. Après un premier rinçage effectué suivant le protocole ci-dessus, trois autres rinçages successifs ont été réalisés chacun avec 10 ml d'une solution d'eau stérile à 0.1 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) suivi d'un brassage dans un sachet plastique stérile durant 10 min à l'aide d'un appareil de type "stomacher" (AES Laboratoire, Combourg, France). Après chaque rinçage, la solution obtenue a été cultivée suivant le protocole ci-dessus. Le rapport entre le nombre de colonies obtenues avec le premier lavage et l'ensemble des colonies obtenues par les quatre rinçages a été calculé.

Analyse statistique

L'effet de l'analyse de laboratoire et l'effet du comptage des colonies obtenues sur milieu de culture ont été évalués par une analyse de variance (ANOVA).

Études de terrain

Pour compléter ces analyses préliminaires, deux études de terrain ont été réalisées pour étudier la variabilité de la mesure des micro-organismes bactériens et fongiques présents dans l'air intérieur des étables. La première s'est attachée à décrire les variations en fonction du temps des concentrations – ou cinétique des concentrations – des micro-organismes fongiques et des pollens dans le bioaérosol au sein de l'environnement intérieur des étables. La seconde a estimé la variabilité de la mesure du bioaérosol afin de l'intégrer dans une démarche d'épidémiologie environnementale.

L'étude de la variation des concentrations en fonction du temps

Population étudiée

L'étude de la cinétique des concentrations du bioaérosol a été conduite dans 9 fermes de la région du Jura français. Chacune de ces fermes a été échantillonnée à deux reprises pendant l'hiver 2004-2005. Les données des caractéristiques de ces fermes et des pratiques agricoles ont été enregistrées pendant le travail de terrain en utilisant un questionnaire complété par l'exploitant agricole.

Stratégie et méthodes de prélèvements

Les mesures ont été effectuées à cinq temps successifs (Figure 12, p125) :

- ✓ Temps 1 (T1) : avant la session de travail durant laquelle la distribution de l'alimentation au bétail est effectuée.
- ✓ Temps 2 (T2) : 5 minutes après avoir commencé la distribution de l'alimentation.
- ✓ Temps 3 (T3), temps 4 (T4) et temps 5 (T5) respectivement cinq minutes, trente minutes et cinquante-cinq minutes après la fin de la distribution de l'alimentation.

La distribution de l'alimentation ou période de travail a été définie comme la période pendant laquelle la distribution du fourrage aux animaux dans l'étable a eu lieu (foin, regain, ensilage(s), herbe fraîche, granulés et/ou farine(s)).

La collection des particules du bioaérosol a été réalisée par impaction active sur une membrane de polypropylène transparente contenue dans une cassette démontable Millipore (37 mm), durant 5 min et à l'aide d'une pompe GilAir3® avec un débit de 3 l/min (Sensidyne, Clearwater, Etats-Unis). Lors de la préparation des cassettes au laboratoire, chaque membrane polypropylène a été recouverte d'une solution de vaseline/toluène pour le recueil des particules. Sur le terrain, le dispositif de prélèvement a été placé au centre de chaque étable et fixé sur un trépied à une hauteur de 75 cm.

Au laboratoire, la membrane de polypropylène a été transférée et fixée sur une plaque en verre, puis colorée avec de la fuschine pour le décompte des particules. L'examen au microscope a été fait par lecture directe au grossissement (x 400), en couvrant 11 champs adjacents (CA) de 0,48 mm de diamètre. La lecture s'est faite du centre (CA1) à la périphérie (CA10 et CA11). Pour estimer le compte de particules (CP) de la zone centrale de la membrane (soit 5,28 mm²) comme présenté sur la Figure 13 (p126) , la formule suivante a été employée: $CP = 1.5 * (CA1 + 4 (CA2+CA3) + 8 (CA4+CA5) + 12 (CA6+CA7) + 16 (CA8+CA9) + 20 (CA10+CA11))$.

Paramètres étudiés

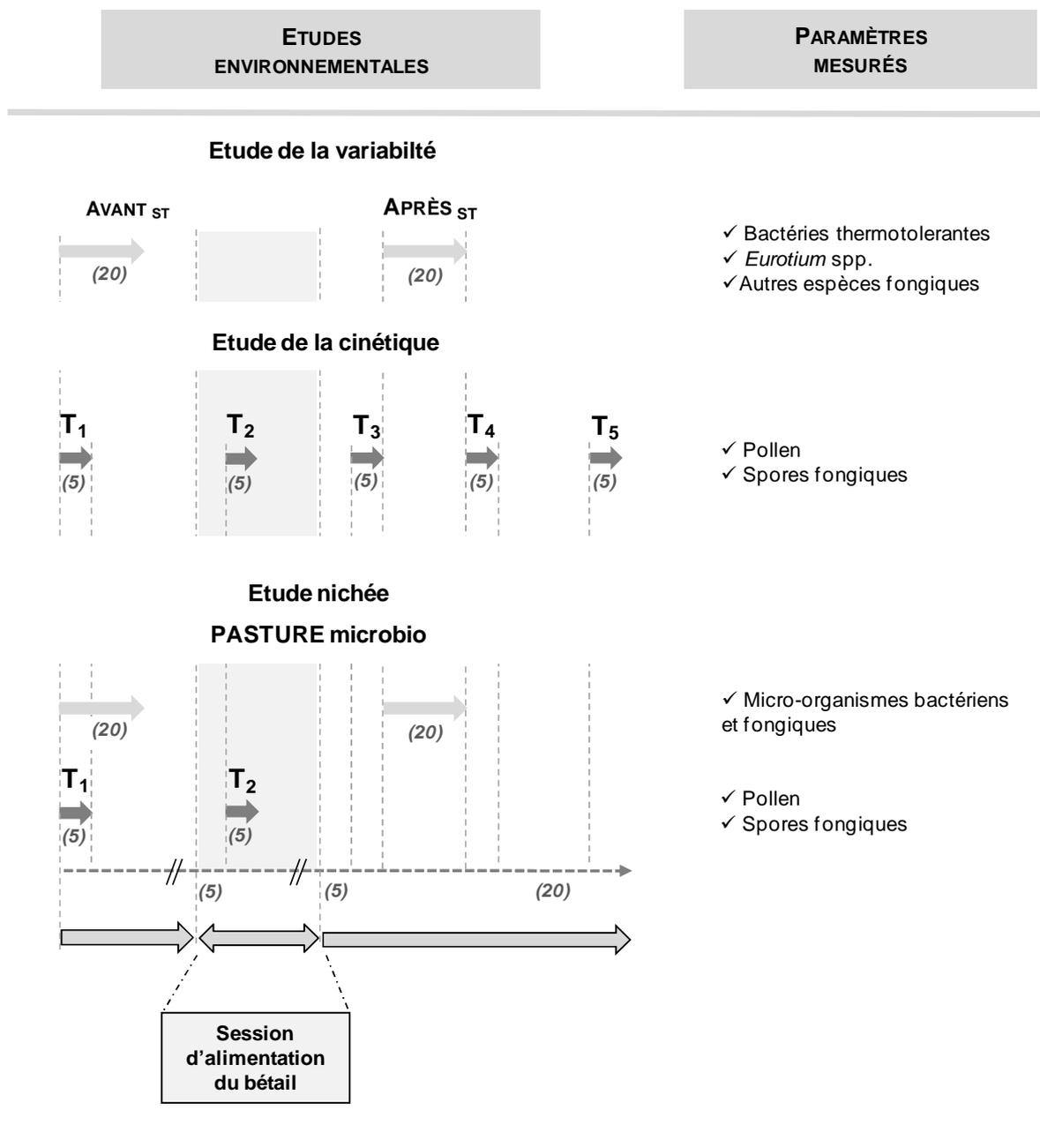
L'examen microscopique des membranes a permis le comptage de plusieurs paramètres selon les manuels de référence [369]:

- ✓ Le nombre de grains de pollen (intacts et pliés) par m³.
- ✓ Le nombre total de spores fongiques et par espèces (spores/m³). Les spores fongiques rondes ou ovoïdes et de taille inférieure à 5 µm de diamètre ont été rassemblées sous la catégorie *Penicillium* spp./*Aspergillus* spp. ou petite spores. Notons dès à présent un point important : la catégorie *Penicillium* spp./*Aspergillus* spp. comprend d'autres spores de petites tailles notamment de l'ordre des mucorales. Nous retiendrons cette appellation par convention pour la simplification de la présentation.
- ✓ Les fragments de végétaux et d'hyphes fongiques (éléments/m³).

Analyse statistique

Nous avons comparé les concentrations polliniques et les comptes des spores fongiques par un test de Wilcoxon apparié (T_{WILC}). Les représentations graphiques ont été basées sur les moyennes géométriques et leur intervalle de confiance 95 %.

Figure 12 : Stratégie et paramètres mesurés dans les études environnementales.



- ➡ : Echantillonnage avec une membrane polypropylène.
- ➡ : Echantillonnage avec un filtre Téflon®
- (AVANT_{ST}, avant session d'alimentation ; APRÈS_{ST}, après session d'alimentation).
- () : temps en minutes.

Figure 13 : Schéma du comptage des particules sédimentées sur une membrane polypropylène

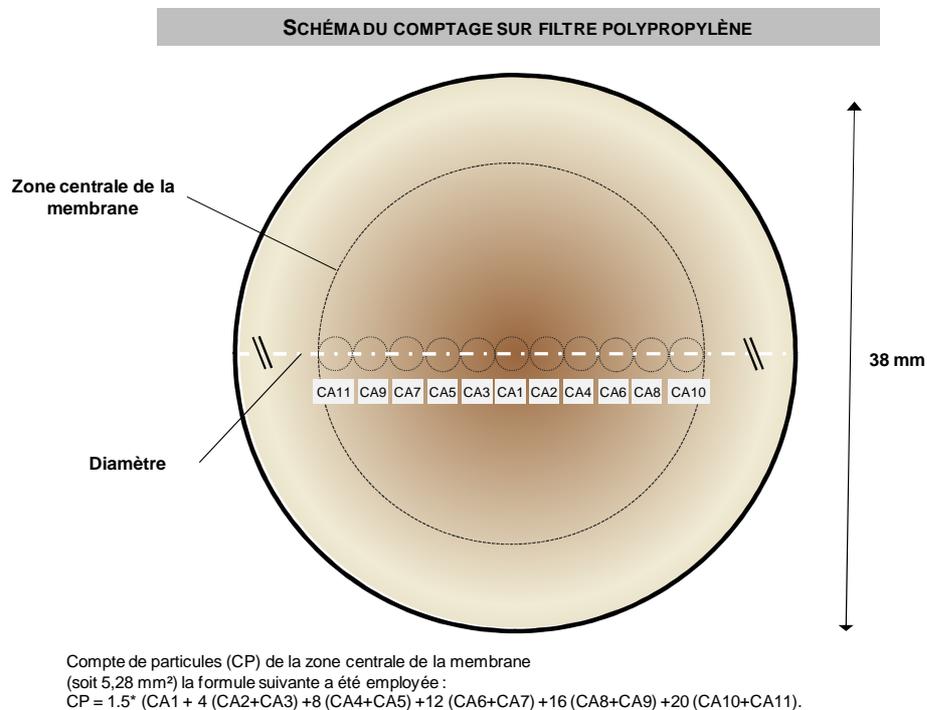
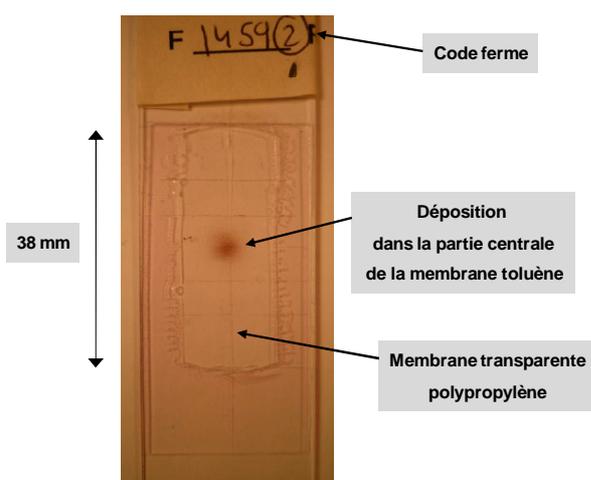


Figure 14 : Membrane polypropylène montée sur lame de verre pour examen au microscope



(ferme française n°1459, prélèvement T2)

L'étude de la variabilité de l'exposition

Population étudiée

L'étude de la variabilité de la contamination du bioaérosol a été réalisée à partir d'échantillons provenant de 26 fermes de trois pays (France, Suisse et Allemagne) pendant la saison d'hiver (décembre 2004 - avril 2005).

Dix fermes françaises étaient des fermes dites « **traditionnelles** » du Jura français (JT) et définies par la présence d'une étable avec un volume intérieur limité où le bétail est entravé, par un système de traite avec un pipeline et par l'absence d'utilisation d'ensilage conformément à l'Appellation d'Origine Contrôlée du fromage Comté. Dix autres fermes françaises étaient des fermes dites « **modernes** » situées dans le Jura (JM). Leurs caractéristiques étaient les suivantes: une étable large, une stabulation libre, une salle de traite indépendante, et l'utilisation habituelle du foin et de l'ensilage (herbe ou maïs) comme fourrage (Figure 15, p129). Les huit fermes allemandes et suisses étaient des fermes modernes dites « **alpines** » (AM) situées dans la région de St-Gall dans le Nord-est de la Suisse (n=3, sélectionnées par l'Institut de Médecine Sociale et Préventive, IMSP, Bâle, Suisse) et dans l'Oberbayern, région alpine du Sud de l'Allemagne (n=5, choisies par l'hôpital d'enfants de l'Université de Munich, Allemagne). Ces exploitations agricoles partagent des pratiques agricoles semblables telles qu'une salle de traite indépendante et l'utilisation de quantités importantes d'ensilage d'herbe pour nourrir le bétail.

Questionnaire

Les données des caractéristiques des fermes et des pratiques agricoles ont été enregistrées pendant le travail de terrain en utilisant un questionnaire normalisé. Les variables descriptives ont porté sur les caractéristiques des fermes (année de construction et de rénovation, nombre de vaches, volume intérieur, présence/absence de ventilation mécanique, méthodes (mécanique ou manuelle) et durée du nettoyage de l'étable) et sur les tâches professionnelles effectuées les jours de prélèvements (durée de la session d'alimentation, type et quantité d'alimentation distribuée, méthodes de

distribution (à la main, avec une grue mécanique ou depuis une trappe dans le plafond de l'étable).

Stratégie et méthodes de prélèvements

Dans chaque ferme, les échantillons du bioaérosol ont été collectés au cours de trois périodes de deux jours également réparties pendant la saison d'hiver. Le bétail a été alimenté quatre fois durant chaque période de deux jours, ce qui correspond à la session d'alimentation (ou session de travail, notée ST) du matin et du soir de chaque jour (Figure 12, p125).

Deux échantillons ont été prélevés encadrant chaque session de travail :

- ✓ le premier avant la distribution de fourrage au bétail dans une ambiance dite de repos (aucune tâche de travail n'ayant eu lieu dans les heures précédant le prélèvement). On notera Avant_{ST} ce prélèvement avant session de travail.
- ✓ le second dix minutes après la fin de la session d'alimentation (noté Après_{ST}) afin d'obtenir une meilleure homogénéisation des concentrations du bioaérosol. Par conséquent, un total de 24 échantillons a été recueilli dans chaque ferme (12 Avant_{ST} et 12 Après_{ST}).

Ces échantillons ont été obtenus par un pompage de 20 minutes à l'aide d'une pompe GilAir 3® (débit=3 l/min) utilisant la cassette démontable Millipore (37 millimètres) munie d'un filtre de Téflon® (diamètre des pores 0.45 µm, Sensidyne, Clearwater, États-Unis). L'ensemble des cassettes stériles munies d'un filtre a été préparé au laboratoire. Pour les échantillonnages en Suisse et en Allemagne, les cassettes ont été envoyées en utilisant un transport express international dans les centres collaborateurs. La campagne de prélèvements a été menée par des techniciens de terrain en collaboration avec les agriculteurs. Des échantillons dits « blancs » ont été aléatoirement ajoutés et analysés pour contrôler une éventuelle contamination indépendante de la réalisation des prélèvements de terrain.

Figure 15 : Étables de fermes modernes et traditionnelles.

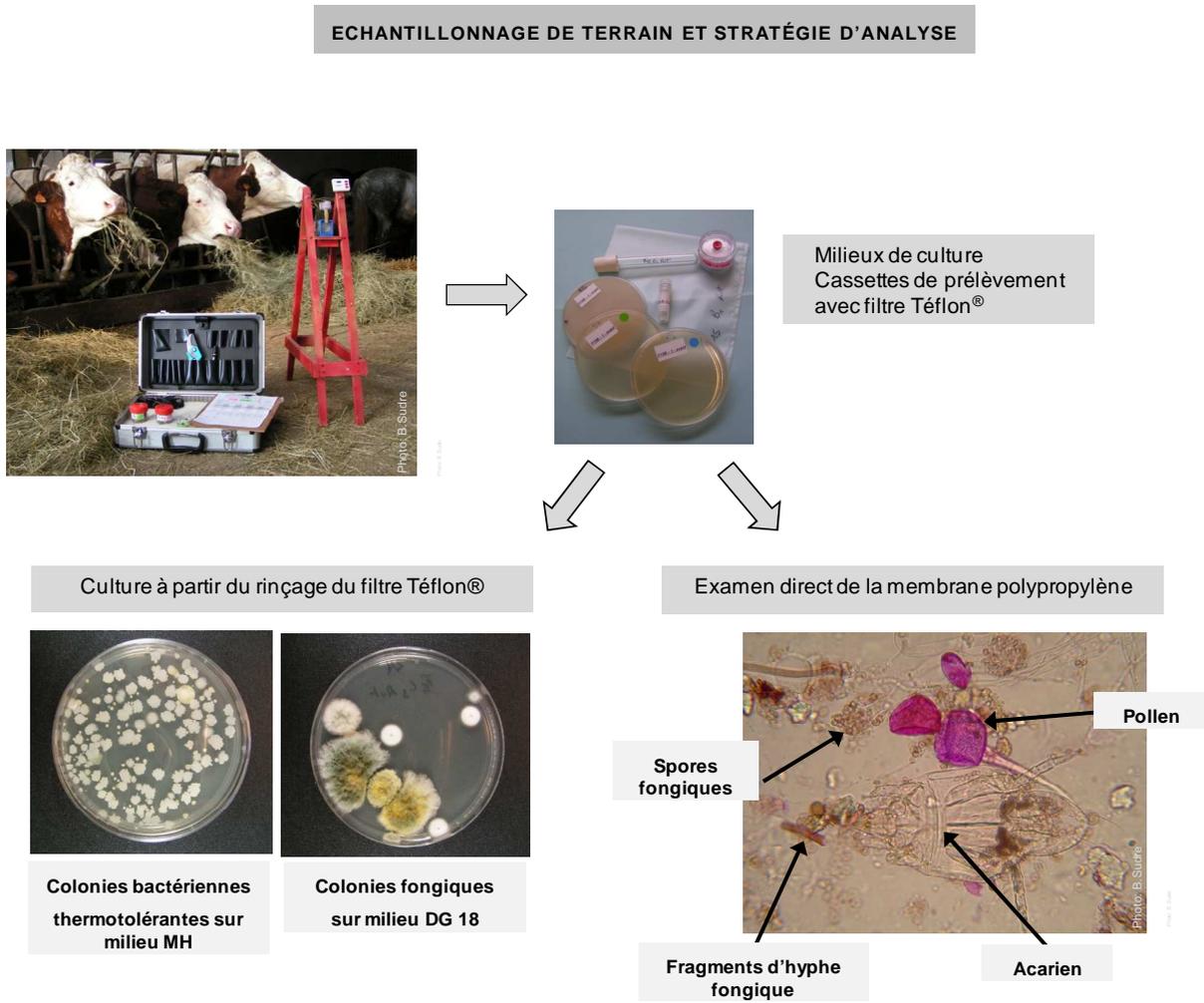


Ferme française « moderne »
situées dans Jura (JM) avec
une étable large,
une stabulation libre,
une salle de traite indépendante,
et utilisant du foin et de l'ensilage (d'herbe
ou de maïs) comme fourrage.



Ferme française « traditionnelle »
du Jura français (JT) avec
une étable où le bétail est entravé,
un volume d'intérieur restreint,
un système de traite par pipeline,
et l'absence d'utilisation d'ensilage,
conformément à l'Appellation d'Origine
Contrôlée du fromage Comté.

Figure 16 : Échantillonnage de terrain et stratégie d'analyse.



Le calibrage mensuel du débit des pompes a été réalisé au laboratoire avec le système de calibrage de diagnostic de Gilibrator-2® (Sensidyne, Clearwater, Etats-Unis). Une variation du débit inférieure à 5 % a été admise.

Les mesures dans les étables ont été obtenues à partir d'un poste d'échantillonnage fixe situé sur un trépied à 75 cm au-dessus du sol, posé au centre du bâtiment et placé de manière identique pour chacun des prélèvements de la période d'étude (Figure 16, p130).

Les cassettes ont été renvoyées par le biais d'un transport express international pour les centres suisse et allemand. Un intervalle fixe de 72 heures (+/- 12 heures) entre la collection de terrain et l'analyse microbiologique a été respecté indépendamment du lieu de prélèvement. L'analyse de l'ensemble des échantillons de terrain a été réalisée au sein du Laboratoire de parasitologie et mycologie du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le paragraphe intitulé étude de laboratoire (ci-dessus).

Paramètres étudiés

Les trois paramètres microbiologiques obtenus par culture étaient les suivants:

- ✓ le nombre de colonies bactériennes aérobies thermotolérantes en UFC/m³ (après 48 h d'incubation aérobie à 30°C),
- ✓ le nombre de colonies *Eurotium* spp. en UFC/m³ (après trois jours d'incubation aérobie à 30 °C),
- ✓ et le nombre de colonies des autres espèces fongiques en UFC/m³ (après trois jours d'incubation aérobie à 30 °C).

Analyse statistique

L'analyse statistique a porté sur deux approches complémentaires ; l'une basée sur les mesures individuelles répétées dans une même exploitation agricole, et l'autre fondée sur la définition de groupe d'exposition homogène.

Tout d'abord, les variances intra-fermes et inter-fermes et leur ratio (λ = variance intra-ferme / variance inter-ferme) ont été calculées pour les 12 mesures effectuées avant la session de travail et les 12 après la session de travail.

Ensuite, le coefficient de corrélation d'intra-classe (ICC), défini comme la corrélation entre les mesures à l'intérieur d'un groupe donné, a été estimé en utilisant le logiciel STATA 10.5E (Stata Corporation, College Station, TX, Etats-Unis) avec le programme gllamm (*generalized linear latent and mixed model*) proposé par les utilisateurs [370]. Cette corrélation mesure la « ressemblance » des données relatives au même sujet statistique [371]. Dans notre étude, la ferme est considérée comme un niveau hiérarchique et l'ICC correspond à la corrélation des mesures issues de la même unité, à savoir la ferme. Selon Snijders et Bosker, le nombre de mesures nécessaires pour réaliser une fiabilité au-dessus de 0.80 (*reliability* en anglais est définie comme la corrélation des mesures répétées indépendantes ou parfois appelées précision) est obtenu par la formule suivante: $n=0.80*(1-ICC)/(ICC*(1-0.80))$ [371, 372].

Dans l'approche basée sur groupe, c'est-à-dire le type de ferme (JT, JM et AM), le nombre d'échantillons nécessaires pour estimer la concentration microbienne du bioaérosol avant et après la session d'alimentation a été calculé. La stratégie a été la suivante :

- Les valeurs moyennes de référence des concentrations en micro-organismes bactériens et fongiques cultivables de chaque type de ferme ont été estimées (ou valeur de référence). Nous posons ici comme hypothèse que ces valeurs correspondent à la moyenne arithmétique calculée en utilisant l'ensemble des valeurs pour un type de ferme donné [n=96 (JT), n=120 (JM), et n=96 (AM)] à un temps donné (une valeur moyenne avant travail et une valeur moyenne après travail). Elles sont susceptibles de représenter une évaluation acceptable des valeurs de l'exposition au long cours.

- Ces valeurs « de référence » calculées ont été ensuite employées pour évaluer une procédure de simulation. Son objectif était de tester si un ensemble de deux, quatre ou huit mesures pourrait être suffisant pour estimer la contamination microbienne du bioaérosol dans chaque type de ferme.
- Pour chaque simulation nous avons effectué un tirage aléatoire de deux cents lots, faits de deux, quatre ou huit mesures choisies au sein de fermes distinctes. Une seule mesure par ferme a été incluse dans chaque lot de deux, quatre et huit mesures. Ces 200 valeurs moyennes issues du tirage au sort ont été comparées à la valeur de référence respective. Le pourcentage des valeurs moyennes issues du tirage compris entre la moitié et le double de la valeur de référence a été colligé.

Les associations entre les caractéristiques des fermes et les trois paramètres microbiologiques après log-transformation ont été estimées utilisant un modèle multivarié de régression. Comme d'usage pour les mesures environnementales, les concentrations microbiennes en dessous du seuil de détection ont été remplacées par une valeur fixe correspondant à la moitié de la limite de détection (332 UFC/m³) [373].

Les échantillons correspondants à une saturation de la dilution la plus élevée ont été considérés comme valeurs extrêmes ; moins de 2 % du total des échantillons. Ces échantillons correspondant à une contamination élevée de l'environnement, mais dont la valeur numérique n'a pas pu être obtenue avec les dilutions utilisées. Afin de pouvoir utiliser cette information, nous les avons remplacés par une valeur numérique fixe correspondant à deux fois la moyenne arithmétique des échantillons ayant nécessité une dilution.

Les variables explicatives continues ont été divisées en tertile (pour la quantité d'ensilage, quantité de foin et la durée de l'alimentation du bétail) ou en quartile (pour le volume intérieur de l'étable). La contribution de chaque variable explicative a été calculée dans une analyse bivariée, puis multivariée avec un modèle mutuellement ajusté aux facteurs significatifs avec une valeur de $p \leq 0.15$ dans l'analyse bivariée. Nous

avons employé un modèle mixte avec un lien gaussien et une évaluation robuste du coefficient de l'erreur type [370]. Ce modèle multi-niveau utilise une structure hiérarchisée avec des effets aléatoires pour la variable ferme et la période de prélèvements. Ce modèle prend bien en considération la non-indépendance des mesures échantillonnées au sein de la même ferme et de la même période. L'adéquation au modèle a été examinée avec l'exploration graphique des résidus et la signification statistique a été placée à un niveau conventionnel de 5 % . L'association entre les variables explicatives et les paramètres microbiologiques ont été exprimés en rapport de moyenne géométrique et avec un intervalle de confiance 95 % (Ratio des moyennes géométriques et IC_{95%}).

Population étudiée

Cette étude environnementale PASTURE_{MICROBIO} a porté sur un sous-échantillon de familles participant à l'étude multicentrique PASTURE que nous allons d'abord brièvement présenter.

L'étude de cohorte PASTURE

Le projet PASTURE se propose de tester les facteurs potentiels de risque et de protection reliés au milieu fermier vis-à-vis des maladies atopiques dans une étude européenne multicentrique de cohorte de naissance d'enfants issus ou non de l'environnement fermier [368]. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'influence de l'exposition aux agents microbiologiques, les dérivés microbiens notamment, sur le développement des maladies allergiques. Le résultat principal attendu est le développement de stratégies potentielles de prévention des maladies allergiques chez les sujets génétiquement susceptibles aux stimulations microbiennes environnementales.

Cette étude a pris place dans cinq pays européens (Allemagne, Suisse, France, Autriche et Finlande). Le recrutement des familles a eu lieu au cours du troisième trimestre de grossesse de mères résidant en zones rurales. Parmi ces mères, celles vivant à la ferme ont été affectées au groupe exposé « fermier ». Un second groupe apparié sur la région de résidence et la période de naissance de l'enfant a été constitué par des femmes enceintes vivant en zone rurale mais n'ayant pas de contact avec la ferme. Ce groupe constitue un groupe de référence non exposé. Les deux groupes ont formé à l'issue de la période d'inclusion une cohorte de naissance de 1163 enfants (avec un taux de suivi de 91.8 % à un an).

Un questionnaire extensif a été proposé aux parents. Il porte à la fois sur les maladies allergiques des parents et leurs enfants et aussi sur l'exposition du père et de la mère pendant sa grossesse (modes de vie et facteurs nutritionnels). Un carnet de

bord des activités de l'enfant est régulièrement rempli par les familles durant le suivi de la cohorte. Ce suivi est aussi basé sur des paramètres biologiques individuels comme le dosage des cytokines et des IgE aux allergènes communs (chez les parents, au sang du cordon à la naissance et pour l'enfant à plusieurs temps de l'étude). Ces paramètres biologiques ont été complétés par un génotypage du polymorphisme des gènes codant pour les récepteurs *Toll-like*. Une évaluation environnementale a été réalisée à partir d'une série de prélèvements environnementaux (poussières sédimentées à l'étable et échantillons de lait) pour le dosage de dérivés microbiens (endotoxines bactériennes et peptidoglycanes).

Cette étude multicentrique a bénéficié d'un accord des autorités d'éthique de chacun des pays participants et d'un support de financement de l'union européenne (Contract number: QLK4-CT-2001-00250, *Fifth Framework Programme Thematic Programme « Quality of Life and Management of Living Resources »*, durée : 46 mois, Contribution comission euorpéenne 2 000 000 €, <http://cordis.europa.eu/life/>).

C'est au sein de cette étude internationale que l'étude nichée PASTURE_{microbio} a été réalisée et elle a pour objectif de compléter les connaissances sur l'exposition des participants aux micro-organismes environnementaux.

L'étude PASTURE microbiologie

Les 110 premières familles recrutées lors de l'étude PASTURE et exposées à la ferme dans trois pays en France, en Allemagne et en Suisse ont été incluses dans l'étude PASTURE_{microbio}. Ces inclusions ont été faites sous la coordination commune du Dr Erika von Mutius, pédiatre et pneumologue de l'hôpital pour enfants de Munich (coordinatrice générale du projet PASTURE et du centre d'étude en Allemagne), du Pr Charlotte Braun-Fahrländer, épidémiologiste de l'Institut de médecine sociale et préventive de Bâle (coordinatrice du centre d'étude du projet PASTURE en Suisse). En France, le centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Besançon est le promoteur de cette étude. L'équipe de recherche Santé, Environnement Rural en Franche Comté, le Centre de Recherche Clinique et Biologique du CHU, le Réseau d'Allergologie de Franche-Comté et la Mutualité Sociale Agricole participent à ce projet scientifique coordonnés par les Professeurs Jean Charles Dalphin, pneumologue, et Dominique-Angèle Vuitton, immunologiste (coordinateurs du centre d'étude du projet PASTURE en France) et du Professeur Renaud Piarroux, pédiatre et parasitologue (coordinateur de l'étude Pasture microbiologie).

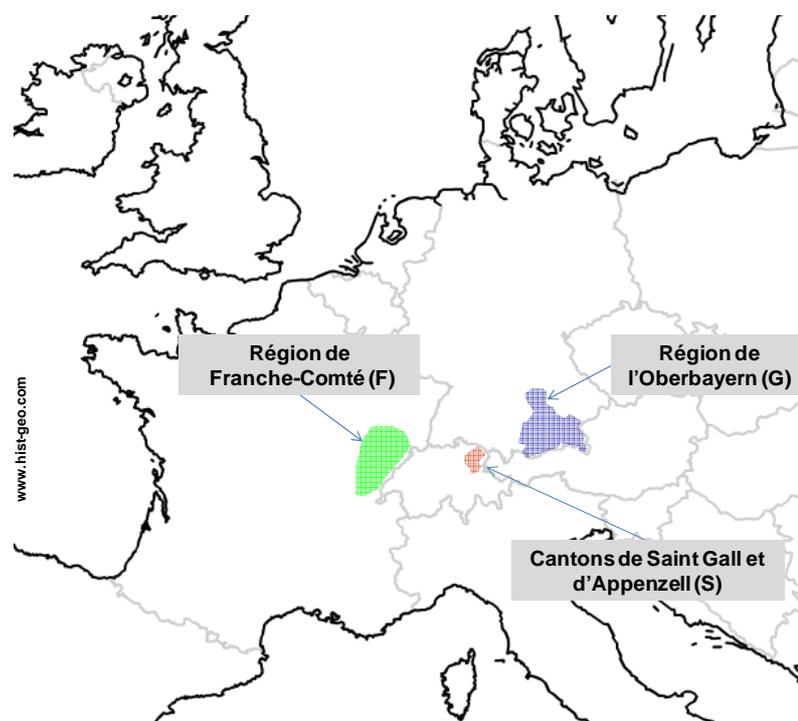
Quatre-vingt-dix-huit familles ont accepté de participer : 17 dans région de St-Gall (Suisse), 32 dans la région de Franche-Comté (France), et 49 dans la région de l'Oberbayern (Allemagne) (Figure 17, p139).

Cette étude environnementale a eu lieu lors de trois campagnes de prélèvements de terrain : les saisons d'hiver 2004 et 2005 et d'été 2004. Les fermes ont été visitées à deux reprises, l'une pendant la saison d'hiver et l'autre lors de la saison estivale. En hiver, 77 fermes ont été visitées entre janvier et mars 2004 et 21 entre janvier et avril 2005. En été, seules les fermes ayant recours à la distribution de fourrage et donc où le bétail se trouvait effectivement à l'étable ont été visitées pour un échantillonnage estival des étables.

De la même manière, les 110 premières familles rurales sans contact avec la ferme (groupe de référence) ont été incluses dans l'étude PASTURE_{microbio}. Finalement,

74 d'entre elles ont accepté de participer et ont bénéficié d'une visite pour les prélèvements environnementaux entre janvier et avril 2004 (12 en Suisse, 26 en France, 36 en Allemagne).

Figure 17 : Carte des zones géographiques de l'étude PASTURE_{microbio}.



Légende : (F) France, (G) Allemagne et (S) Suisse. (Fonds de carte disponible sur <http://www.hist-geo.com/Fonds-de-cartes.php>)

Méthodes de prélèvement et de culture

Les mesures environnementales ont été effectuées dans les étables et les logements des familles du groupe fermier et dans les logements du groupe non-exposé.

Dans les étables, les prélèvements du bioaérosol ont été réalisés suivant la Figure 12(p125) et comprennent:

- ✓ deux prélèvements sur membrane polypropylène pour le recueil et l'identification des grains de pollen et des spores fongiques. Ils correspondent à un temps de pompage de 5 min : le premier dans l'ambiance de repos des étables (T1) et le second 5 minutes après le début de la session de distribution (T2). Le protocole d'analyse et de lecture a été effectué de la même façon que dans l'étude pilote cinétique. Une évaluation de la taille des grains de pollen a été réalisée à partir d'un tirage aléatoire de 8 échantillons (4 à T1 et 4 à T2). La mesure des particules polliniques au micromètre correspond à la mesure systématique de la plus grande dimension observable des particules polliniques.
- ✓ deux prélèvements sur filtre Téflon® pour le recueil et l'identification des micro-organismes cultivables. Ils ont été échantillonnés suivant le même protocole de terrain que pour l'étude pilote variabilité des mesures avec un échantillonnage de 20 minutes avant la session d'alimentation (Avant s_T) et un second 10 minutes après la fin de la session d'alimentation (Après s_T). Quatre milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement des micro-organismes du bioaérosol:
 - le dichloran-glycérol (DG 18, Oxoid Ltd, Basingstoke, Angleterre) avec 0,5 % de chloramphénicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) à 30 °C pour l'isolement des micro-organismes fongiques mésophiles,
 - le malt-agar à 3 % (AES, Bruz, France) avec adjonction de sel à 10 % et 0,5 % chloramphénicol pour l'isolement d'espèces fongiques osmophiles,
 - le milieu Difco (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France) à 30 °C pour les actinomycètes mésophiles,

- le milieu R8 selon Amner et al. à 52 °C pour détecter les actinomycètes thermophiles,
- et le milieu Müller-Hinton (MH, Becton Dickinson, Cockeysville, Etats-Unis) pour l'isolement des colonies bactériennes aérobies thermotolérantes après 48 heures d'incubation à 30 °C.

Les micro-organismes fongiques ont été identifiés par observation macroscopique et microscopique. Les actinomycètes ont été classifiés sur leurs caractères macroscopiques et microscopiques, et sur leur capacité à hydrolyser la caséine et leur température de croissance. Le nombre de colonies sur chaque milieu a été compté après 7 jours d'incubation (sauf pour le milieu MH compté à 48 h). Les résultats ont été exprimés en UFC par milieux de culture puis convertis en UFC/m³.

Les cinq phénotypes bactériens les plus fréquents ont été isolés du milieu MH suivant leurs caractéristiques macroscopiques et leur coloration de Gram et conservés à -80°C dans le milieu cœur-cerveille glycérolé. Ces phénotypes ont été identifiés par biologie moléculaire à partir d'un sous-échantillon aléatoire des prélèvements réalisés avant la session d'alimentation (Avant_{ST}, n=33) et après la distribution (Après_{ST} n=30).

L'ADN bactérien des phénotypes a été extrait comme décrit par Drancourt et al. et 100 µl du surnageant de l'extraction ont été utilisés [274]. Un fragment de 1500 paires de base des gènes codant pour l'ARNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces universelles : P8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et P1525 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [374]. L'amplification d'ADN a été réalisée avec un mélange réactionnel contenant 0,5 µM des amorces P8 et P1525, 200 µM de dNTP, 1 mM de MgCl₂, 1X de tampon de redTaq, 0.01 U de redTaq et 1 µl d'échantillon d'ADN. Le mélange a été soumis au programme de PCR comme rapporté par Paster et al. [375]. Le rôle de cette étape est la synthèse de nouveaux fragments d'ADN à partir du brin matrice bactérien dont les extrémités sont spécifiquement reconnues par les amorces. Ensuite, les produits d'amplification de chaque phénotype ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (à 1,5 %) pendant 60 min à 80 V. Les bandes d'ADN ont été visualisées par transillumination sous rayons ultraviolets pour contrôler la qualité de l'amplification. Un mélange contenant l'amorce anti-sens interne au fragment P-519

(5' - GCA C de GTA TTA CCG CGG CTG CTG - 3'), l'ADN polymérase, la pyrophosphatase, le tampon, les dNTPs et des terminateurs fluorescents a été utilisé pour le séquençage d'un fragment de 497 pb. Ce mélange a été soumis à 35 cycles de dénaturation de 20 sec à 96°C, d'hybridation de l'amorce de 20 sec à 50°C et d'élongation de 2 minutes à 60 °C. Le séquençage a été réalisé avec le Ceq8000 (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System®, Beckman Instruments) et comparé à la base de données Genbank du site du « *National Center for Biotechnology Information* » (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) avec le logiciel BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). L'identification moléculaire au genre a été définie par une similitude d'au moins 97 % [275, 376].

Dans les logements des familles d'agriculteurs et non-exposés, les prélèvements du bioaérosol ont été effectués dans la chambre de l'enfant avant les échantillonnages dans l'étable en utilisant la méthode de filtration sur filtre Téflon®. Le temps d'échantillonnage de la pompe GilAir 3® a été de 90 min avec un débit de 3l/min. Les analyses des micro-organismes cultivables ont été effectuées pour les micro-organismes fongiques, bactériens et les actinomycètes comme décrit pour l'étable.

Paramètres microbiologiques étudiés

Les paramètres biologiques étudiés dans l'étude PASTURE_{microbio} dans les étables ont été les suivants:

- ✓ Par culture:
 - le nombre total de colonies bactériennes aérobies thermotolérantes (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies fongiques et par espèces (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies de levures, séparé en levures blanches et en levures rouges (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies d'actinomycètes et par espèces (UFC/m³).
- ✓ Par culture et identification moléculaire:
 - le nombre total des bactéries thermotolérantes et celui des cinq phénotypes bactériens les plus fréquents (UFC/m³).
- ✓ Par examen direct:
 - le nombre total de grains de pollen (intacts et pliés) exprimé en grains de pollen/m³,
 - le nombre de spores fongiques totales et par espèces exprimé en spores/m³. Les spores fongiques rondes ou ovoïdes et de tailles inférieures à 5 µm de diamètre ont été rassemblées par convention sous la catégorie *Penicillium* spp./*Aspergillus* spp..

Les prélèvements complémentaires dans les logements ont permis de connaître :

- ✓ Par culture:
 - le nombre total de colonies bactériennes aérobies thermotolérantes (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies fongiques et par espèces (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies de levures, séparées en levures blanches et en levures rouges (UFC/m³),
 - le nombre total de colonies d'actinomycètes et par espèces (UFC/m³).

Questionnaires

Les données concernant les symptômes reliés aux maladies allergiques des familles participantes à l'étude PASTURE_{microbio} ont été extraites du questionnaire initial de l'étude général PASTURE (questionnaires « initial père » et « grossesse-enfant »). Les questions étaient les suivantes : « avez-vous déjà présenté des sifflements respiratoires ? », « avez-vous déjà présenté de l'asthme ? », « avez-vous déjà eu une rhinite allergique ? », « avez-vous eu, au cours des 12 derniers mois, le nez qui coule ou bouché en-dehors d'une rhinopharyngite ? », « avez-vous eu, au cours des 12 derniers mois, les yeux qui piquent, pleurent ou brûlent en-dehors d'une rhinopharyngite? ». Les prévalences de ces symptômes ont été calculées en Suisse, en Allemagne et en France pour l'étude PASTURE et pour la population de PASTURE_{microbio}. La présence/absence de sensibilisation aux graminées des deux parents a été extrait de la base de données PASTURE de l'Université d'Ulm (Allemagne). La fréquence de la présence dans l'étable de la mère et des éventuels enfants a été recueillie en fonction des tâches agricoles.

Un questionnaire spécifique de l'étude PASTURE_{microbio} portant sur les pratiques agricoles, les caractéristiques des fermes et les habitudes de travail des exploitants agricoles a été proposé lors de la visite pour les prélèvements environnementaux. Ce questionnaire a été rempli lors d'un entretien d'une heure trente avec l'exploitant agricole. Il a porté sur une description précise des bâtiments de l'exploitation agricole (dimension, type et réalisation d'un plan), le nombre et le type d'animaux présents, l'ensemble des composés constituant l'alimentation du bétail (foin et regain avec leurs conditions de récolte, ensilage de maïs ou d'herbe, utilisation de farine et/ou de compléments alimentaires), le mode et les temps de distribution de l'alimentation, le mode de traite du bétail et une description précise des différentes tâches effectuées dans l'étable.

Un questionnaire complémentaire sur les logements a été rempli par les familles du groupe « fermier » et par celles du groupe rural non exposé. Ce questionnaire a permis de colliger les caractéristiques de la chambre de l'enfant, le nombre d'heures d'aération par jour et les activités réalisées avant la session d'échantillonnage, les antécédents de travaux récents et la présence de traces visibles de moisissures sur les

murs. La saisie des données de l'étude PASTURE_{microbio} a été effectuée en double saisie avec le logiciel EpiData® software (Conté de Funen, Denmark & Brixton Health, UK) suivant un masque de saisie fournit par l'Institut de Médecine Préventive de Bâle.

Analyse statistique

Les données de santé

Les pourcentages des différentes variables de santé issues des questionnaires ont été calculés pour les groupes fermiers et ruraux de l'étude PASTURE (Suisse, Allemagne et France) et pour la population participante à l'étude PASTURE_{microbio} (sifflement dans les 12 derniers mois, asthme, rhinite allergique, symptômes de rhinite allergique dans les 12 derniers mois et symptômes de conjonctivite allergique dans les 12 derniers mois). La présence/absence de sensibilisation aux graminées des deux parents (seuil IgE > 0,20 UI/L) a été calculée pour les deux groupes [186, 377]. L'ensemble des comparaisons entre groupes a été effectué à l'aide du test du χ^2 .

L'étude des logements

Les comparaisons des paramètres microbiologiques de l'environnement intérieur entre les logements fermiers et ruraux ont été effectuées par un test non-paramétrique de Mann-Whitney. Durant le contrôle de qualité de la base de données, il est apparu des chiffres anormalement élevés de levures rouges dans les prélèvements d'air durant la période du 30 septembre au 21 octobre 2004 (10^3 à 10^4 fois les valeurs moyennes de l'ensemble des domiciles hors cette période). Ces valeurs extrêmes ont été relevées à la fin de la période estivale d'échantillonnage des domiciles en France. Ne pouvant exclure une contamination du matériel, ces données ont été exclues de l'analyse (n=26).

L'étude des étables

Les comparaisons avant et après la session de travail ont été réalisées par l'intermédiaire d'un test apparié de Wilcoxon [séparément en été (n=63) et en hiver (n=97)].

Les concentrations du nombre total de micro-organismes fongiques, du nombre total d'actinomycètes et du nombre total de grains de pollen ont été choisies pour construire une modélisation linéaire statistique multivariée. Ces variables ont d'abord été testées pour leur normalité (Skewness test and Kurtosis test). Si les conditions de normalité n'étaient pas remplies et dans le but de normaliser leurs distributions, une transformation logarithmique leur a été appliquée. Les concentrations microbiennes en dessous de la limite de la détection ont été remplacées par la valeur fixée à la moitié de la limite de détection (332 UFC/m³) pour les prélèvements effectués dans l'étable.

Les caractéristiques des fermes et les pratiques agricoles issues du questionnaire ont été utilisées comme variables explicatives lors de la modélisation. Les variables explicatives continues ont été dichotomisées en variables catégorielles basées sur leur distribution : en tertile pour la quantité d'ensilage, de foin et la durée d'alimentation utilisée lors de la session de travail et en quartile pour le volume intérieur de l'étable.

Pour le nombre total de micro-organismes fongiques et le nombre total d'actinomycètes après session de travail en hiver, la contribution de chaque variable explicative a été calculée dans une analyse bivariée. Après contrôle de la colinéarité des variables explicatives, celles dont la valeur de p était ≤ 0.25 ont été retenues dans un modèle multivarié mutuellement ajusté. Deux variables supplémentaires considérées comme des facteurs d'ajustement ont été ajoutées au modèle (variable pays et la quantité de foin distribuée par jour). Les résultats de la modélisation ont été présentés en ratio de moyenne géométrique.

Pour le nombre total de grains de pollen, la modélisation a porté sur les mesures au temps T1 et T2 effectuées en hiver dans la même exploitation agricole. Pour tenir compte de la répétition et donc de la non-indépendance de ces mesures au sein d'une même ferme, un modèle hiérarchique à un niveau « ferme » à été utilisé issu du package gllamm du logiciel STATA [370]. Les variables explicatives sont identiques à celles utilisées lors de la modélisation des concentrations des micro-organismes cultivables (cf. paragraphe précédent). Les variables présentant une p-value ≤ 0.25 en analyse bivariée ont été incluses dans le modèle multivarié mutuellement ajusté. Pour évaluer les facteurs pouvant être associés avec l'augmentation des pollens entre T1 et T2, une analyse séparée a été réalisée avec comme variable à expliquer la différence des concentrations (T2-T1). La modélisation a été basée sur la même procédure que pour les micro-organismes.

RESULTATS

LES ETUDES PILOTES

Évaluation au laboratoire

L'évaluation des *replicas* a mis en évidence une variation inter-lecteur du dénombrement des colonies inférieure à 5 %. Aucune différence statistiquement significative entre les lecteurs n'a été mise en évidence pour les trois paramètres microbiologiques étudiés (total des colonies de bactéries aérobies thermotolérantes, d'*Eurotium* spp. et des autres colonies fongiques). Pour les deux paramètres fongiques, il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les différents techniciens.

Néanmoins, pour les bactéries aérobies thermotolérantes, une différence significative a été retrouvée correspondant à un technicien parmi les cinq. Pour ce paramètre et ce technicien, l'analyse de laboratoire a conduit à un nombre plus faible de colonies ($p=0.03$) avec un rapport de 0.70 comparé à la moyenne globale de l'ensemble des techniciens. Ce résultat a conduit à la mise en place d'un protocole de laboratoire et de procédure de contrôle pour diminuer la part de variabilité liée à la technique de traitement des échantillons de terrain.

La capacité de recueil des micro-organismes sur filtre a été considérée comme correcte. En effet, le premier lavage du filtre a permis un recueil de plus de 90 % du total des colonies obtenues par l'ensemble des rinçages successifs, et ce, pour chacun des trois paramètres (total des colonies de bactéries aérobies thermotolérantes, d'*Eurotium* spp. et des autres colonies fongiques).

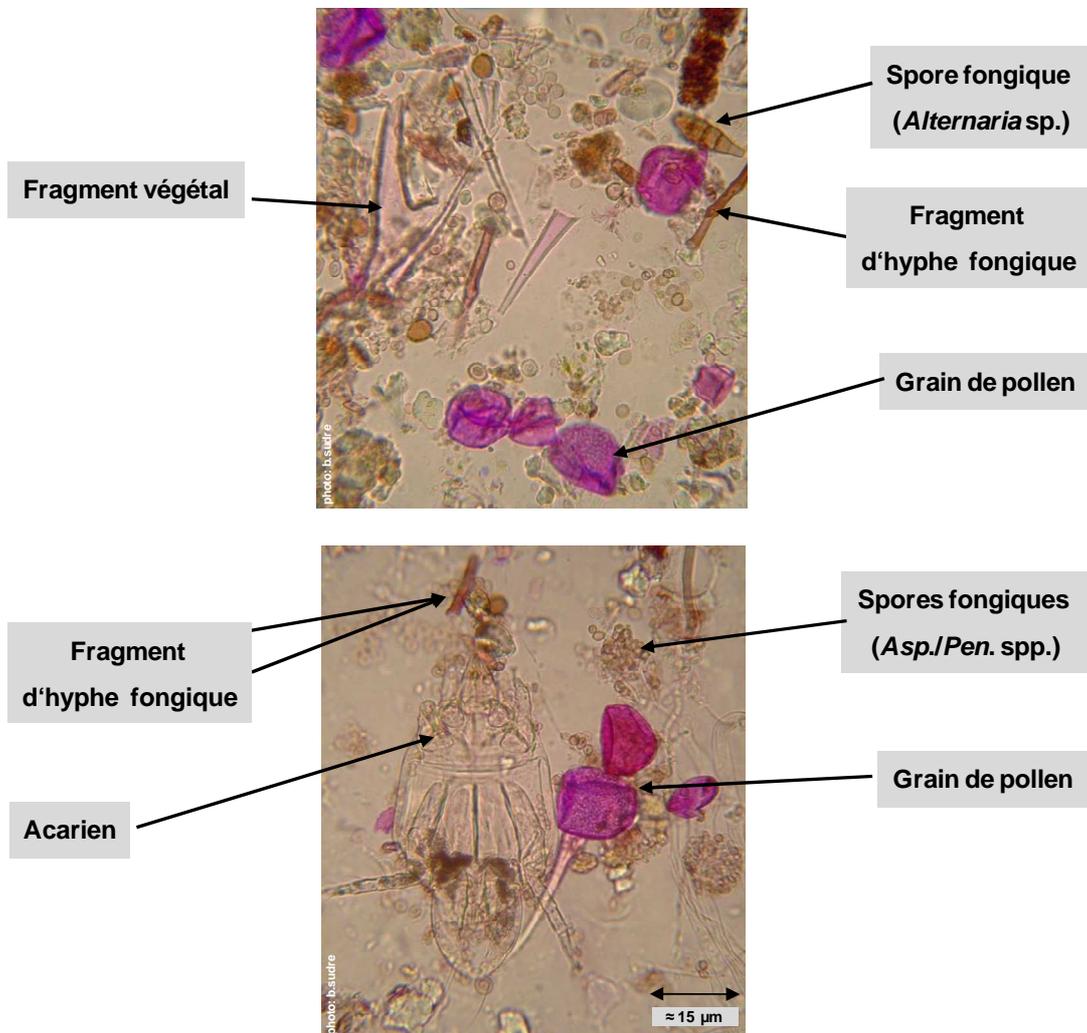
Étude de la cinétique d'exposition

Tout d'abord, pour illustrer la complexité du bioaérosol dans le contexte de l'élevage, une série de photographies est présentée page 150. Ces illustrations correspondent à l'examen direct d'une membrane polypropylène sous microscope (x 400). On retrouve l'ensemble des paramètres étudiés : des pollens et des spores fongiques en nombre important, mais aussi des fragments de végétaux, d'hyphes fongiques et parfois des acariens.

Les caractéristiques des fermes

L'étude de la cinétique des concentrations polliniques du bioaérosol a été réalisée dans 9 fermes françaises (5 fermes modernes et 4 fermes traditionnelles) à deux reprises durant la saison d'hivernage du bétail. Le nombre médian de bovins était de 66 (min= 39, max=140) et leur alimentation basée principalement sur le foin avec une quantité médiane journalière de 600 kg (min=350 kg, max=1100 kg). Du regain a été distribué dans trois fermes en plus du foin pour une quantité médiane de 100 kg. Une seule ferme a utilisé de façon régulière de l'ensilage de maïs pendant la période d'étude ($\approx 1 \text{ m}^3$ par session d'alimentation). Les modes de distribution étaient les suivants : manuel (n=3), depuis une trappe au plafond (n=4) et avec une griffe mécanique puis manuel (n=2). Le temps d'alimentation moyen était proche entre les différentes exploitations de l'ordre de 20 minutes environ. Les volumes intérieurs étaient compris entre 322 et 6500 m^3 avec un volume médian de 1200 m^3 .

Figure 18 : Photographies d'une membrane polypropylène.



(Grossissement x400, coloration toluène-fuschine).

Les pollens

Lors de l'examen direct, plus de 95 % des grains de pollen et des grains pliés examinés avaient une morphologie compatible avec la famille des *Poaceae*. Les 5 % restant appartenaient aux familles suivantes : *Apiaceae*, *Pinaceae*, *Betulaceae* et *Asteraceae*.

La mesure systématique au micromètre de la plus grande dimension observable des particules polliniques à partir d'un tirage aléatoire de 8 échantillons (4 à T1 et 4 à T2) a retrouvé une répartition des fréquences suivantes : 25 % pour les fragments de pollen d'une taille inférieure à 15 µm, de 60 % pour ceux ayant un diamètre compris entre 15 et 25 µm, et de 15 % pour ceux de taille supérieure à 25 µm.

Les médianes, minimum et maximum en fonction des temps d'échantillonnage sont reportées dans le Tableau VII (p154). Il existe une forte augmentation des concentrations polliniques dans le bioaérosol lors de la distribution d'alimentation (Temps T2). La source principale est constituée par le foin distribué aux animaux. On peut, en effet, exclure l'adjonction des pollens de l'environnement extérieur durant la période hivernale de prélèvement comme illustrée par la courbe d'enregistrement pollinique des réseaux nationaux (Figure 10, p107). L'augmentation des valeurs médianes entre T1 et T2 est de l'ordre d'un facteur 15. Ensuite, la décroissance des concentrations aériennes permet un retour au niveau initial à partir du temps T4, soit 30 min après la fin de la session de travail (Figure 19, p155). Il existe une différence significative en T1 vs. T2 (T_{WILC} , $p \leq 0.01$), proche de la significativité pour T1 vs. T3 (T_{WILC} , $p \leq 0.08$) et non significative pour T1 vs. T4 et T5.

Les spores

L'examen des membranes a permis l'identification de 11 paramètres fongiques (Tableau VII, p154). Parmi ces paramètres, les petites spores (inférieures à 5 µm, dénommées par convention *Aspergillus/Penicillium* spp.) et *Cladosporium* spp. constituent la majeure partie de la composition du bioaérosol. En effet, ces deux

catégories représentent 75 % du comptage total du temps T1, 95 % du temps T2, 90 % du temps T3 et T4 et 85 % du temps T5. Leurs médianes varient entre 10^6 et 10^7 spores/m³. Cependant, l'augmentation pour *Aspergillus/Penicillium* spp. lors de la distribution de l'alimentation est plus marquée et significative au temps T2 (T1 vs. T2 : T_{WILC} , $p \leq 0.01$) et au temps T3 (T1 vs. T3: T_{WILC} , $p \leq 0.02$) que pour les spores de *Cladosporium* spp. Pour ces dernières, l'augmentation est plus limitée et uniquement significative pour la comparaison T1 vs. T2 (T_{WILC} , $p = 0.05$). À l'examen attentif des médianes des concentrations de spores de *Cladosporium* spp. et de la Figure 19 (p155), les valeurs après travail (T3, T4 et T5) restent tout de même à un niveau supérieur à T1 mais ces différences ne sont pas statistiquement différentes.

Les concentrations des spores d'*Alternaria* spp. et d'*Ustilago* spp. sont moins importantes que pour *Aspergillus/Penicillium* spp. et *Cladosporium* spp.. Elles sont comprises entre 10^5 et 10^6 spores/m³. Même si ces concentrations sont élevées, leur part relative dans la contamination totale du bioaérosol reste limitée. De 12 % pour T1, cette part relative diminue à 6 % pour T2, 7 % pour T3, 8 % pour T4 et revient proche de T1 à 11 % à T5. La session de travail correspond à un changement qualitatif du bioaérosol avec une diminution des spores d'*Alternaria* spp. et d'*Ustilago* spp. au profit des spores d'*Aspergillus/Penicillium* spp. et de *Cladosporium* spp. On notera néanmoins qu'aucune différence entre T1 et les différents temps d'échantillonnage n'a été retrouvée significative. Pour *Ustilago* spp., les comparaisons étaient significatives pour T1 vs. T2 (T_{WILC} , $p \leq 0.01$) et pour T1 vs. T3 (T_{WILC} , $p = 0.05$). Ce profil d'augmentation des concentrations d'*Ustilago* spp. lors du travail est bien illustré par la Figure 19 (p155).

Les spores d'*Epicoccum* spp. ont un profil d'augmentation identique lors de la session d'alimentation, mais les comparaisons aux différents temps sont non significatives. Pour les spores de *Coprinus* spp., *Dreschlera* spp., *Pithomyces* spp. et *Torula* spp. leurs concentrations ont été inférieures ou égales à 10^4 spores/m³ pour l'ensemble des mesures : soit un pourcentage relatif inférieur à 2 % pour l'ensemble des temps d'échantillonnage.

Les autres particules

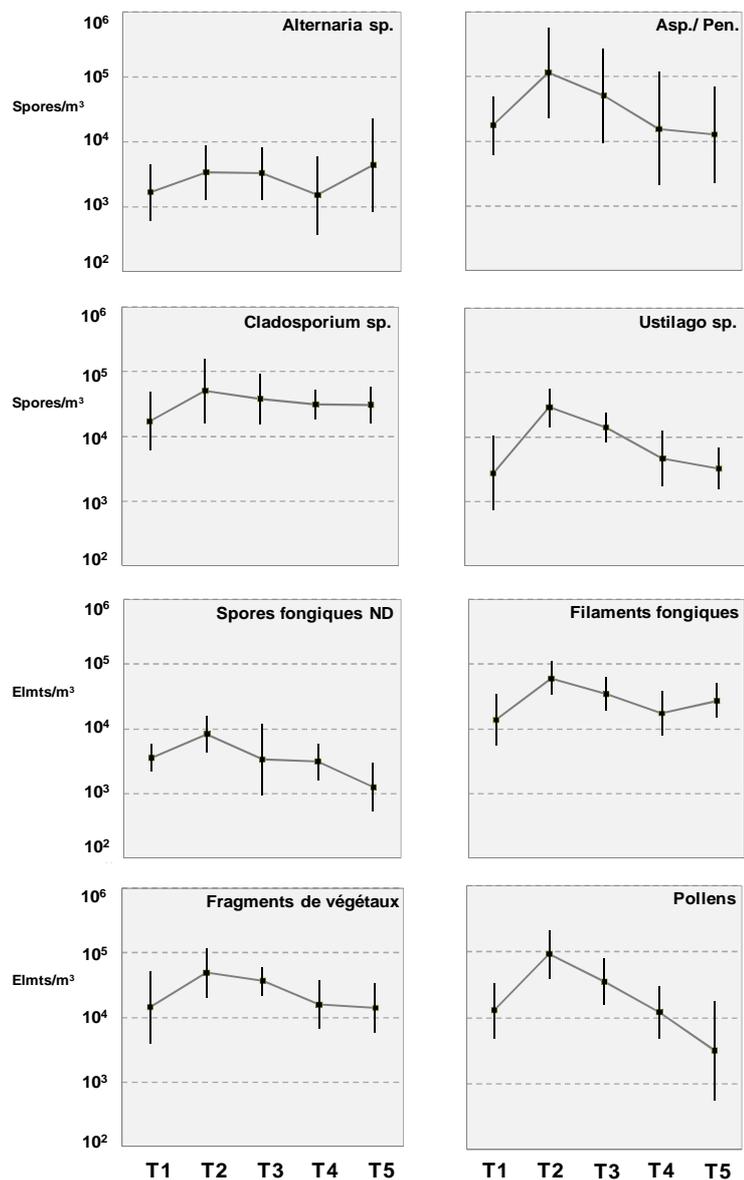
Lors du comptage des spores fongiques et des grains de pollen, les fragments d'hyphes fongiques et les résidus de végétaux ont été comptés. Ces éléments suivent un profil de cinétique comparable. Ils sont nettement augmentés par la distribution d'alimentation avec une augmentation des médianes d'un facteur 4 environ (10^6 éléments/m³). La comparaison T1 vs. T2 est significative pour ces deux comptes particuliers (T_{WILC} , $p=0.01$). Néanmoins, le profil de sédimentation après session de travail apparait différent, avec une persistance des fragments fongiques dans le bioaérosol qui contraste avec une sédimentation plus rapide des fragments de végétaux et un retour au niveau T1 pour les temps T4 et T5. Nous avons noté la présence d'acariens dans une dizaine de prélèvements examinés.

Tableau VII : Concentration du bioaérosol ($10^3 \times \text{éléments/m}^3$) en fonction des temps d'échantillonnage de l'étude pilote de la cinétique.

	T1			T2			T3			T4			T5		
	Médiane	Min	Max	Médiane	Min	Max	Médiane	Min	Max	Médiane	Min	Max	Médiane	Min	Max
<i>Alternaria</i> spp.	22	1	97	37	0	190	29	0	129	12	0	124	29	0	404
<i>Aspergillus</i> <i>/ Penicillium</i> spp.	263	0	556	1 520	22	24 991	734	8	7 166	122	2	4 294	209	4	3 463
<i>Cladosporium</i> spp.	203	19	683	447	40	3 208	466	92	2 455	307	78	790	301	69	908
<i>Coprinus</i> spp.	4	0	30	4	0	48	6	0	28	1	0	8	0	0	9
<i>Dreschlera</i> spp.	0	0	8	9	3	30	6	0	29	1	0	17	3	0	47
<i>Epicoccum</i> spp.	4	0	83	19	0	56	9	0	63	8	0	36	2	0	15
<i>Pithomyces</i> spp.	0	0	8	0	0	63	0	0	2	0	0	8	0	0	0
<i>Torula</i> spp.	0	0	0	4	0	32	0	0	144	0	0	24	0	0	30
<i>Ustilago</i> spp.	21	0	351	357	45	761	137	40	298	47	8	563	24	9	154
Spores non identifiées	27	17	101	70	31	283	38	2	249	27	10	151	13	3	54
Total des spores	642	300	1 672	3 225	1 178	26 007	1 758	296	7 389	565	290	5 296	820	261	3 875
Filaments fongiques	164	19	872	583	144	1 605	542	138	876	240	17	447	334	83	837
Fragments végétales	165	0	475	680	43	1 190	380	178	857	135	55	517	95	0	390
Grains de pollen	104	24	1 305	1 787	154	2 791	432	69	1 383	170	18	557	76	1	331

Légende: (T1) avant de commencer la distribution de l'alimentation (ou session de travail) ; (T2) 5 minutes après avoir commencé la distribution de l'alimentation ; (T3), (T4) et (T5) respectivement cinq minutes, trente minutes et cinquante-cinq minutes après la fin de la distribution de l'alimentation (n=18).

Figure 19 : Évolution des moyennes géométriques (et IC_{95%}) des différents composants du bioaérosol en fonction des temps d'échantillonnage (étude pilote de la cinétique).



Légende: (T1) avant de commencer la distribution de l'alimentation (ou session de travail) ; (T2) 5 minutes après avoir commencé la distribution de l'alimentation ; (T3), (T4) et (T5) respectivement cinq minutes, trente minutes et cinquante-cinq minutes après la fin de la distribution de l'alimentation (n=18).

Étude de la variabilité

Caractéristiques et variation de la contamination

Les caractéristiques des fermes de l'étude pilote portant sur la variabilité sont reportées dans le Tableau IX (p158). Dans ces fermes, la taille des troupeaux des fermes modernes est plus importante que dans les fermes traditionnelles. Le foin est la principale source d'alimentation dans l'ensemble des exploitations agricoles. Toutefois, l'ensilage d'herbe et de maïs est utilisé dans l'ensemble des fermes alpines à l'opposé des fermes traditionnelles françaises (l'usage de l'ensilage de maïs n'est pas autorisé dans la zone de production de l'AOC Comté).

Un total de 624 échantillons a été récolté sur l'ensemble de la période d'étude. Une synthèse de l'analyse de ces échantillons est présentée dans le Tableau VIII (p157). Les valeurs manquantes pour les fermes suisses et allemandes sont dues à une erreur dans l'adressage postal, et pour les fermes françaises à une erreur de manipulation au laboratoire. L'analyse régulière des échantillons de laboratoire dits « blanc » n'a pas révélé de contamination externe.

Les mesures répétées dans chaque ferme ont démontré une variabilité importante au sein de chaque ferme. La moyenne géométrique et IC_{95%} pour les paramètres microbiologiques cultivables sont reportés dans la Figure 20 (p159) dans chaque ferme étudiée (G : ferme allemande et S : ferme Suisse).

Tableau VIII : Tableau de synthèse des échantillons disponibles de l'étude pilote de la variabilité pour les trois paramètres microbiologiques en fonction du type de ferme.

Échantillons	Bactéries thermotolérantes		<i>Eurotium spp.</i>		Autres espèces fongiques	
	Session d'alimentation		Session d'alimentation		Session d'alimentation	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹
Valeurs manquantes						
Jura traditionnelle	0	0	1	3	1	3
Jura moderne	0	1	0	0	0	0
Alpine moderne	2	3	2	2	2	2
Total	2 (< 1 %)	4 (< 1 %)	3 (< 1 %)	5 (< 1 %)	3 (< 1 %)	5 (< 1 %)
En-dessous de la limite de détection ²						
Jura traditionnelle	0	0	9	6	9	21
Jura moderne	0	0	21	7	27	15
Alpine moderne	2	1	73	52	32	29
Total	2 (< 1 %)	1 (< 1 %)	103 (16 %)	65 (10 %)	68 (10 %)	65 (10 %)
Avec une saturation pour la dilution la plus élevée						
Jura traditionnelle	1	11	0	10	0	0
Jura moderne	4	6	0	0	0	0
Alpine moderne	0	0	0	0	0	0
Total	5 (< 1 %)	17 (< 2.7 %)	0	10 (1.6 %)	0	0

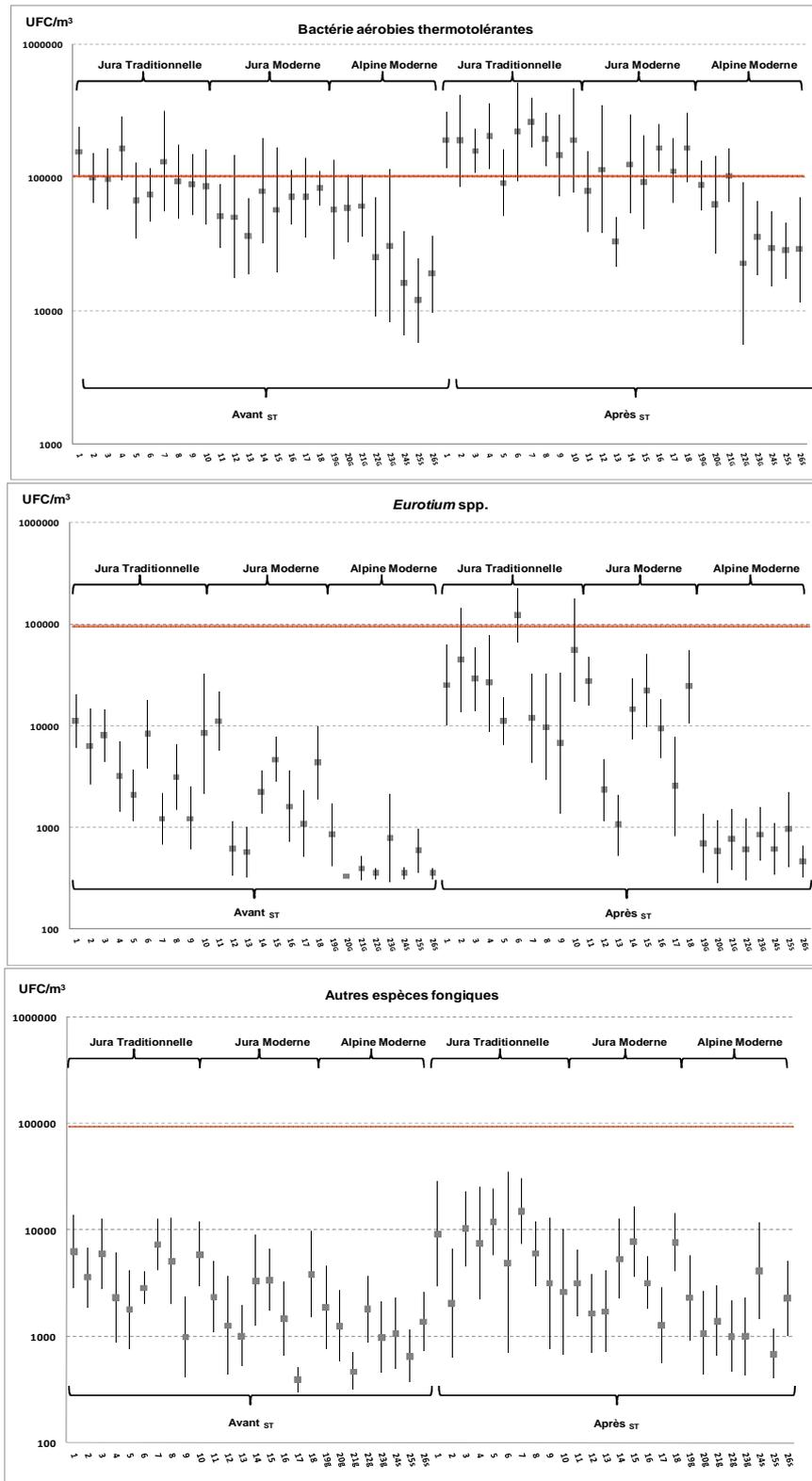
Légende: (1) % du total (n=624); (2) ces valeurs en dessous de la limite de détection ont été remplacées par la moitié du seuil de détection (soit 332 UFC/m3) avant la transformation logarithmique pour la modélisation.

Tableau IX : Caractéristiques et pratiques agricoles de l'étude pilote sur la variabilité en fonction du type de ferme.

Caractéristiques des fermes et pratiques agricoles	JT Jura traditionnelle (n=10)	JM Jura moderne (n=8)	AM Alpine moderne (n=8)
	Médiane (min-max)	Médiane (min-max)	Médiane (min-max)
Date de construction	1966 (1800-1978)	1987 (1972-2004)	1989 (1903-1999)
Altitude de la ferme	774 (350-950)	575 (400-1100)	680 (402-880)
Nombre de vaches	45 (25-80)	68 (45-180)	45 (15-117)
Temps d'alimentation (min)	30 (10-180)	38 (10-140)	20 (10-180)
Foin (en kg/jour) ¹	269 (50-581)	405 (260-650)	155 (78-351)
Ensilage (en kg/jour) ¹	0	0 (0-600)	1430 (105-4330)
Type d'ensilage	Aucun	Maïs et/ou herbe n=3	Herbe n=8
Farine (en kg/jour) ¹	42 (0-150)	115 (0-480)	78 (0-630)
Volume de l'étable (m ³)	744 (322-2160)	4471 (2516-8750)	2651 (357-10350)
Temps de nettoyage de l'étable (min)	20 (10-30)	13 (5-30)	10 (5-20)

Légende: (1) Médiane sur l'ensemble des distributions d'alimentation lors des échantillonnages de terrain.

Figure 20 : Moyennes géométriques (et IC_{95%}) par ferme de l'étude pilote de la variabilité.



Légende: Le numéro en abscisse correspond aux fermes étudiées (S : Suisse ; G : Allemagne).

Effet de la distribution d'alimentation et du type de ferme

D'une façon générale, le graphique précédent met en évidence un effet de l'alimentation du bétail sur le niveau de contamination du bioaérosol. Il existe une augmentation significative des micro-organismes après la session de travail : $GMR_{bact.} = 1.7$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium} = 3.3$ ($p < 0.001$), $GMR_{autres\ sp.\ fongiques} = 1.6$ ($p < 0.001$). Le type de ferme est un second paramètre influençant les concentrations. Ces dernières sont plus élevées dans les fermes traditionnelles en comparaison avec les fermes AM : $GMR_{bact.} = 3.8$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium\ spp.} = 17.1$ ($p < 0.001$), $GMR_{autres\ sp.\ fongiques} = 3.6$ ($p < 0.02$). Cette différence est moins prononcée en comparaison avec les fermes modernes (JM) de la même région : $GMR_{bact.} = 2.2$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium\ spp.} = 7.0$ ($p < 0.001$), $GMR_{autres\ sp.\ fongiques} = 1.8$ ($p < 0.02$).

Étude de la variabilité intra- et inter-fermes

Les ratios (λ) des variances intra-ferme et inter-ferme ont été calculés pour les trois paramètres d'intérêt avant et après la session de travail. Les valeurs de ces ratios étaient de $\lambda_{bact.} = 4.1$, $\lambda_{Eurotium\ spp.} = 0.8$ et $\lambda_{autres\ sp.\ fongiques} = 2.7$ avant travail et de $\lambda_{bact.} = 2.8$, $\lambda_{Eurotium\ spp.} = 0.7$ et $\lambda_{autres\ sp.\ fongiques} = 3.8$ après travail. Ainsi selon Snijders et Bosker, le nombre de mesures requises dans des conditions de repos (avant session de travail) pour réaliser une fiabilité > 0.80 était donc de 17 (ICC=0.19), de 3 (ICC=0.54) et de 15 (ICC=0.26) respectivement pour les bactéries aérobies thermotolérantes, *Eurotium* spp. et les autres espèces fongiques. Après session d'alimentation, le nombre de mesures nécessaires était de 12 échantillons pour les bactéries aérobies thermotolérantes (ICC=0.25), de 3 échantillons pour *Eurotium* spp. (ICC=0.60) et de 16 pour les autres espèces fongiques (ICC=0.20).

Les résultats de l'approche basée sur la définition de groupes homogènes d'exposition sont présentés dans le Tableau X (p162). Le groupe est défini suivant une stratification effectuée en fonction du type de ferme et de la session de travail. Le tirage de huit mesures a permis dans la majorité des cas d'obtenir un pourcentage supérieur à 75 % des valeurs comprises entre la moitié et le double de la valeur de référence. La

performance du tirage au sort étant moins probante pour *Eurotium* spp. dans les fermes alpines modernes (AM). Ceci peut-être expliqué à la fois par une grande dispersion des valeurs par fermes et, mais aussi par un nombre important de valeurs à la limite du seuil de détection [73 et 52 avant et après session d'alimentation respectivement, cf. Tableau VIII, p157].

Facteurs associés à la contamination du bioaérosol

L'analyse multivariée a permis de mettre en évidence des associations significatives entre les caractéristiques des fermes et les paramètres microbiologiques étudiés (Tableau XI, p163).

Pour les bactéries aérobies thermotolérantes, les variables explicatives significatives étaient : le type de ferme, la période de prélèvement et la quantité de foin distribuée au bétail ainsi qu'une réduction des concentrations bactériennes en fonction de l'accroissement des quartiles du volume de l'étable.

Pour *Eurotium* spp., il existe une association significative entre les types de fermes et la session d'échantillonnage. Notons que pour ce dernier paramètre, il existe une diminution des quantités en fonction de la rénovation de la ferme. Les fermes non rénovées ou rénovées avant 1977 présentent des concentrations plus élevées que celles ayant bénéficié d'une rénovation postérieure à 1994. Un temps de distribution médian est associé avec des concentrations plus importantes d'*Eurotium* spp..

Pour les autres espèces fongiques, le type de ferme et l'effet de la distribution d'alimentation sont à nouveau des facteurs significatifs. Il existe une diminution des concentrations dans les fermes ayant bénéficié d'une rénovation récente. De plus, la distribution d'une quantité médiane d'ensilage est significativement associée à une concentration plus élevée des autres espèces fongiques.

Tableau X : Moyennes arithmétiques, coefficients de variation et résultats du tirage au sort pour les trois paramètres microbiologiques de l'étude pilote de la variabilité en fonction du type de ferme et du temps d'échantillonnage.

Temps d'échantillonnage et type de ferme	n	Moy. arithm.		Sd /m ²	Pourcentage de valeurs obtenues entre la moitié et le double des valeurs de références		
		UFC * 10 ³ /m ³	IC _{95%} ¹		Lot du tirage aléatoire		
					n=2	n=4	n=8
Avant ST							
Bactéries thermotolérantes							
Jura traditionnelle	120	144.5	(119.4 -169.6)	0.96	73	77	88
Jura moderne	96	124.6	(81.4 -167.8)	1.71	67	72	89
Alpine moderne	94	62.1	(46 -78.2)	1.27	63	74	88
Eurotium spp.							
Jura traditionnelle	119	10.1	(7.1 -13.1)	1.64	43	55	78
Jura moderne	96	5.7	(3.5 -7.8)	1.89	37	56	61
Alpine moderne	94	1	(0.4 -1.7)	3.11	18	32	32
Autres espèces fongiques							
Jura traditionnelle	119	8	(5.5 -10.4)	1.69	41	66	76
Jura moderne	96	4.8	(3 -6.6)	1.88	37	53	62
Alpine moderne	94	2.3	(1.5 -3)	1.55	40	56	76
Après ST							
Bactéries thermotolérantes							
Jura traditionnelle	120	351.7	(258.5-444.9)	1.47	80	90	99
Jura moderne	95	223.8	(151.7-295.9)	1.58	60	77	91
Alpine moderne	93	82.1	(59.5-104.6)	1.33	55	74	83
Eurotium spp.							
Jura traditionnelle	117	69.5	(51.8-87.2)	1.39	39	59	80
Jura moderne	96	21.7	(15.6-27.8)	1.38	55	64	79
Alpine moderne	94	1.4	(0.9-1.9)	1.79	38	48	66
Autres espèces fongiques							
Jura traditionnelle	117	22.1	(14.3-30)	1.95	23	45	58
Jura moderne	96	6.3	(4.9-7.7)	1.09	61	76	90
Alpine moderne	94	3.8	(2.4-5.3)	1.81	47	60	66

Légende : (1) Intervalle de confiance 95 % ; (2) déviation standard/moyenne arithmétique (ou coefficient de variation).

Tableau XI : Résultats de l'analyse multivariée de l'étude pilote de la variabilité.

Caractéristiques des fermes et pratiques agricoles		Bactéries thermotolérantes				Eurotium spp.				Autres espèces fongiques			
		n ¹	Modèle multivarié ²			n ¹	Modèle multivarié ²			n ¹	Modèle multivarié ²		
		GMR ³	IC _{95%}	Valeur de p	GMR ³	IC _{95%}	Valeur de p	GMR ³	IC _{95%}	Valeur de p			
Type de ferme	AM	187	1			188	1			188	1		
	JM	191	1.27	0.46 - 3.50	0.63	192	26.67	5.64 - 126.1	0.0001	192	2.34	0.81 - 6.75	0.11
	JT	240	2.43	0.92 - 6.44	0.07	236	41.11	8.57 - 197.2	0.0001	236	6.18	2.11 - 18.06	0.001
Échantillonnage	Avant ST	310	1			309	1			309	1		
	Après ST	308	1.66	1.40 - 1.96	0.0001	307	3.28	2.74 - 3.92	0.0001	307	1.63	1.33 - 1.99	0.0001
Année de construction	1 ^{re} (1800-1972)	214	1			210	1			210	1		
	2 ^{ème} (1973-1985)	213	1.03	0.68 - 1.56	0.87	214	0.67	0.32 - 1.38	0.28	214	0.70	0.43 - 1.16	0.17
	3 ^{ème} (1986-2004)	191	1.58	0.70 - 3.55	0.26	192	1.26	0.29 - 5.35	0.75	192	1.60	0.60 - 4.29	0.34
Année de rénovation	1 ^{er} (1970-1977)	262	1			258	1			258	1		
	2 ^{ème} (1978-1993)	166	1.25	0.81 - 1.95	0.30	166	0.55	0.25 - 1.18	0.12	166	0.75	0.44 - 1.28	0.30
	3 ^{ème} (1994-2004)	190	1.56	0.76 - 3.17	0.21	192	0.16	0.04 - 0.54	0.003	192	0.43	0.18 - 1.00	0.05
Temps d'alimentation (min) (tertile)	1 ^{er} (10-20)	236	1			238	1			238	1		
	2 ^{ème} (21-45)	240	0.98	0.56 - 1.72	0.95	236	0.36	0.14 - 0.93	0.03	236	0.77	0.40 - 1.47	0.44
	3 ^{ème} (46-240)	142	1.24	0.80 - 1.92	0.33	142	0.83	0.40 - 1.73	0.62	142	1.06	0.63 - 1.75	0.81
Quantité de foin⁴ (tertile)	1 ^{er} (25-87)	211	1			209				209			
	2 ^{ème} (88-163)	216	1.88	1.22 - 2.91	0.004	215				215			
	3 ^{ème} (164-325)	191	1.21	0.76 - 1.94	0.41	192				192			
Quantité d'ensilage⁴ (tertile)	1 ^{er} (0)	359	1			356	1			356	1		
	2 ^{ème} (52-110)	70	1.11	0.60 - 2.08	0.72	70	0.87	0.30 - 2.48	0.79	70	2.40	1.16 - 4.94	0.01
	3 ^{ème} (111-2164)	189	0.57	0.23 - 1.42	0.23	190	2.09	0.59 - 7.36	0.25	190	1.20	0.50 - 2.84	0.67
Volume de l'étable (m³) (quartile)	1 ^{er} (322-680)	168	1			165	1			165	1		
	2 ^{ème} (681-1872)	140	0.40	0.23 - 0.69	0.001	139	1.79	0.80 - 3.99	0.15	139	0.88	0.51 - 1.54	0.67
	3 ^{ème} (1873-4725)	166	0.48	0.26 - 0.91	0.02	168	0.97	0.32 - 2.85	0.95	168	0.93	0.44 - 1.96	0.85
	4 ^{ème} (4726-10350)	144	0.30	0.13 - 0.67	0.004	144	2.16	0.55 - 8.51	0.26	144	1.40	0.54 - 3.61	0.47

Légende: (1) nombre d'échantillons ; (2) modèle mutuellement ajusté ; (3) ratio des moyennes géométriques ; (4) en kg par jour.

Les données de santé

Les fréquences des paramètres sanitaires portant sur les symptômes d'allergie entre le groupe fermier et non-fermier de l'étude PASTURE ont été calculées à partir de l'ensemble de la population participante dans les trois pays où l'étude PASTURE a pris place (n=699 fermiers et ruraux au total) et dans la sous-population de l'étude PASTURE_{microbio} (n=186 au total). Le Tableau XII (p165) présente de façon parallèle les résultats en fonction du statut des parents des enfants dans les deux études. D'une façon générale, les maladies allergiques présentent une fréquence plus faible chez les parents du groupe fermier en comparaison avec le groupe non fermier.

La consommation active de tabac était comparable dans les deux groupes : chez les mères pendant la grossesse (non fermier 16.7 % versus fermier 18.5 % , $p_{khi^2}=0.62$) et chez les pères durant la même période (49 % versus 46 % , $p_{khi^2}=0.56$).

Chez les mères, ces différences sont significatives pour la rhinite et les symptômes associés ainsi que pour la sensibilisation aux graminées. Les résultats montrent la même tendance pour la population des mères de l'étude nichée même si la différence pour la sensibilisation est non statistiquement significative. Cette absence de significativité est à rapprocher du nombre restreint de sujets inclus dans le test. En effet, l'amplitude de la différence est voisine dans les deux populations étudiées.

Chez les pères, cette tendance à la diminution des symptômes liés à la rhinite allergique se confirme. A nouveau, les fréquences sont significativement plus basses chez les pères fermiers participant à la cohorte PASTURE. Ces différences restent marquées chez les participants de l'étude nichée, mais non significatives pour des raisons identiques à celles évoquées ci-dessus (non significatives pour la sensibilisation et les symptômes de rhinite des 12 derniers mois). Notons une fréquence augmentée d'asthme chez les pères fermiers par rapport aux non-fermiers qui peut être reliée à une fluctuation d'échantillonnage.

Tableau XII : Fréquence des maladies allergiques et de la sensibilisation aux graminées chez les parents des enfants des études PASTURE et PASTURE_{microbio}.

	PASTURE (Suisse, Allemagne et France)				P ¹	PASTURE Microbiologie				P ¹
	Ruraux		Fermiers			Ruraux		Fermiers		
	%	n/total	%	n/total		%	n/total	%	n/total	
Mère										
Sifflement dans les 12 derniers mois	19.9	77/386	17.2	54/313		21.2	17/80	16.9	18/106	
Asthme	11.6	45/386	9.2	29/313		8.7	7/80	8.4	9/106	
Rhinite allergique	31	120/386	20.1	63/313	**	35	28/80	18.8	20/106	*
Symptômes de rhinite allergique dans les 12 derniers mois	45.3	175/386	31.6	99/313	**	55	44/80	27.3	29/106	**
Symptômes de conjonctivite allergique dans les 12 derniers mois	31	120/386	14.7	46/312	**	32.5	26/80	15	16/106	**
Sensibilisation aux graminées (seuil IgE > 0.20 UI/L)	31.4	110/350	24	70/291	*	29.6	21/71	22.3	21/94	
Père										
Sifflement dans les 12 derniers mois	18.4	66/358	14.5	44/303		18.8	15/79	16.9	18/106	
Asthme	8.3	30/358	5.9	18/303		6.3	5/79	9.4	10/106	
Rhinite allergique	31.5	113/358	14.1	43/303	**	27.8	22/79	13.2	14/106	*
Symptômes de rhinite allergique dans les 12 derniers mois	40.6	145/357	30.3	92/303	**	45.5	36/79	36.7	39/106	
Symptômes de conjonctivite allergique dans les 12 derniers mois	33.8	121/357	17.4	53/303	**	32,9	26/79	19.8	21/106	*
Sensibilisation aux graminées (seuil IgE > 0,20 UI/L)	40.7	125/307	31.9	83/260	*	44,2	31/70	33.3	29/87	

Légende: (1) Valeur de p du test du χ^2 (* : p ≤ 0.05, ** : p ≤ 0.01).

Les caractéristiques des fermes

Les caractéristiques des fermes des trois pays de l'étude PASTURE_{microbio} issues du questionnaire de terrain sont rapportées dans le Tableau XIII (p167). Plusieurs caractéristiques et pratiques agricoles diffèrent en fonction du pays.

En Allemagne, le type de fermes entravées est nettement prédominant au regard des fermes suisses et françaises. En France, les exploitations agricoles sont de plus grandes tailles. En effet, elles présentent un volume intérieur médian et un nombre de vaches plus élevés. Notons par ailleurs que ces fermes utilisent majoritairement du foin comme source d'alimentation du bétail. Cette particularité marque une différence nette entre les fermes françaises et allemandes où un usage mixte d'ensilage et de foin est courant. Dans ces dernières, la distribution d'herbe fraîche au bétail est un substrat alimentaire possible, mais peu utilisé en Suisse et en France.

Les échantillons disponibles de l'étude environnementale PASTURE_{microbio} sont reportés au sein du Tableau XIV (p168). En hiver, 98 fermes ont été échantillonnées. Pour une exploitation agricole, il n'y a pas eu de session de travail et donc pas d'échantillonnage pendant le travail (à T2 pour l'examen direct et après _{ST} pour la culture). Pour l'examen direct, cinq échantillons avant _{ST} (n=93) et huit échantillons après _{ST} (n=89) n'ont pas été prélevés sur le terrain pour des raisons techniques.

En été, 104 logements de fermiers ont pu être mesurés en raison du recrutement progressif (« au fil de l'eau ») des familles participantes à la cohorte en fonction des dates de naissance des enfants. Pour 99 d'entre eux, un prélèvement de la ferme a été associé et seulement 67 avaient effectivement une activité d'alimentation dans l'étable autorisant un prélèvement à T2 et après _{ST}. En effet, lors de la période d'été certains agriculteurs ne rentrent plus les animaux à la ferme et vont sur le lieu de pâturage pour effectuer la traite en utilisant une salle de traite mobile.

Tableau XIII : Caractéristiques des fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

Caractéristiques des fermes et des pratiques agricoles	Pays			Valeur de p ¹	PASTURE Microbiologie
	Suisse	France	Allemagne		Total
					n=106
Type de ferme (n)	17	32	57		
Entravée/Stabulation libre	9/6	18/16	40/14	0.11	67/36
Altitude de la ferme ² (m)	600 (400-770)	542 (200-1050)	680 (530-950)	< 0.01	650 (200-1050)
Nombre de bovins ²	33 (0-61)	63 (0-200)	45 (0-270)	< 0.02	45 (0-270)
Volume de l'étable ² (m ³)	630 (112-1915)	1810 (440-18900)	810 (72-90010)	< 0.01	990 (72-18900)
Présence d'un système de ventilation				0.3	
Oui / non	2/15	6/26	16/41		24/82
Mode de distribution de l'alimentation				0.03	
Manuellement / trappe au plafond	16/0	25/6	40/17		81/23
Foin ² (en kg/jour)	396 (0-832)	675 (0-4000)	135 (0-420)	< 0.01	280 (0-4000)
Méthodes de récolte (n)				< 0.01	
En vrac seulement	8	4	25		37
En vrac et en balles	2	24	10		36
En balle seulement	6	7	23		36
Alimentation principale du bétail (n)				< 0.01	
Foin seul	10	24	2		36
Foin et ensilage	5	10	52		67
Ensilage ² (en kg/jour)	0 (0-725)	0 (0-5700)	900 (0-6750)	< 0.01	160 (0-6750)
Distribution d'herbe fraîche				< 0.01	
Oui / non	1/16	1/30	13/34		15/80

Légende : (1) Valeur de p du test du χ^2 pour les variables dichotomiques et du test de rang de Kruskal-Wallis pour les variables continues, (2) médiane (minimum-maximum).

Tableau XIV : Échantillons disponibles de l'étude PASTURE_{microbio} en fonction du lieu de prélèvements et de la saison.

Échantillons	Culture filtre Téflon®		Examen direct (ED)	Couple culture -ED
	Ruraux	Fermiers	Fermiers	
	n	n	n	
Été				
Logement	67	104	.	.
Étable au repos	.	99	55	54
Étable session de travail ¹	.	67	51	
Hiver				
Logement	74	98	.	.
Étable au repos	.	98	93	93
Étable session de travail ¹	.	97	89	

Légende : (1) dix minutes après la fin de l'alimentation au bétail pour les filtres Téflon® et T2 pour les membranes polypropylènes soit cinq minutes après le début du travail.

La contamination microbiologique du bioaérosol des logements et des fermes

Pour l'exposé des résultats, les tableaux des comparaisons des logements entre fermiers et ruraux présentent à la fois les comparaisons en fréquence d'isolement et en quantité moyenne. La prise en compte de ces deux paramètres permet de juger de leur importance relative au sein du bioaérosol.

Les logements fermiers et ruraux

Pendant la saison d'été

Sur les chambres d'enfants échantillonnées en été pour l'étude des micro-organismes cultivables, 67 appartiennent au groupe rural et 104 au groupe fermier (Tableau XV, p172). L'ensemble des micro-organismes fongiques est plus fréquent dans les domiciles fermiers. Ces différences de fréquences sont significatives pour trois paramètres : *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger* et *Cladosporium* spp..

Les moyennes arithmétiques de ces trois paramètres et d'*Aspergillus fumigatus* sont de l'ordre de 10^3 UFC/m³ soulignant leur importance quantitative au sein du bioaérosol du domicile. Notons des concentrations moyennes plus élevées et significatives chez les fermiers pour *Aspergillus glaucus* et *Cladosporium* spp., mais une tendance inverse et significative a été observée pour *Aspergillus niger*. La somme des rangs des domiciles non-fermiers étant plus élevée chez les fermiers, on peut en déduire que la contamination est significativement plus importante dans les chambres d'enfants non-fermiers.

Pour les levures, la comparaison des levures rouges a été restreinte à un sous-groupe (cf. section matériel et méthode). Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les chambres d'enfants de fermiers et de ruraux. Les valeurs élevées pour les levures blanches sont attribuables à 4 logements (deux allemands, un suisse et un français effectués dans la deuxième quinzaine d'août 2004) dont les contaminations excédaient 10^5 UFC/m³.

Pour les actinomycètes, les fréquences d'isolement sont restées faibles (inférieures à 6 %) des prélèvements. Mais la fréquence pour l'ensemble des espèces mésophiles et thermophiles est significativement plus élevée dans les chambres

d'enfants fermiers en été. De la même façon, la contamination moyenne d'actinomycètes dans leur ensemble est plus importante chez les fermiers.

Une analyse restreinte à la comparaison entre domicile ruraux et domicile fermier dont l'exploitant agricole effectuait une distribution d'alimentation à l'étable du bétail pendant la saison d'été n'a pas mis en évidence de différences significatives supplémentaires. Deux paramètres sont plus importants en fréquence et en quantité dans les logements fermiers : *Aspergillus glaucus* et *Cladosporium* spp.. Pour *Aspergillus niger*, les domiciles ruraux gardent une contamination significativement plus fréquente et une quantité plus importante en comparaison aux domiciles fermiers.

Pendant la saison d'hiver

La tendance observée en été relative à des fréquences plus élevées d'isolement des micro-organismes fongiques dans les chambres des enfants fermiers se confirme pendant la saison d'hiver.

Ces différences sont statistiquement significatives pour *Aspergillus glaucus* et *Cladosporium* spp.. comme pendant la saison estivale. On remarque cependant que les valeurs pour *Aspergillus Glaucus* sont similaires pour les deux saisons. Les fréquences d'isolement de *Cladosporium* spp.. sont fortement abaissées en hiver à la fois chez les domiciles fermiers et non-fermiers. Cette diminution peut être reliée à la baisse de la contamination d'origine extérieure pour cette espèce connue comme étant faible en période hivernale. Deux autres paramètres supplémentaires sont significatifs : *Absidia* spp. et *Penicillium* spp.. L'ensemble de ces quatre paramètres identifiés comme ayant des fréquences plus élevées présente aussi des concentrations moyennes plus élevées. Les différences dans les distributions des quatre paramètres par les tests de rang sont significatives.

Pour les levures, les contaminations observées durant la saison d'hiver sont quantitativement basses et peu fréquentes (fréquence de positivité inférieure à 6 % des prélèvements). En tenant compte des levures dans leur ensemble, nous notons cependant une différence significative entre la contamination par les levures entre les chambres des enfants ruraux et les fermiers.

Pour les actinomycètes, leur fréquence d'isolement augmente pendant la saison d'hiver dans les chambres des domiciles fermiers (un domicile sur quatre). La différence des fréquences entre ruraux et fermiers reste significative en hiver pour les

actinomycètes mésophiles. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une différence significative pour les actinomycètes thermophiles malgré la nette augmentation du pourcentage isolé dans les domiciles fermiers en hiver (de 3 % en été à 11.2 % en hiver). Par ailleurs, la contamination quantitative du bioaérosol par les actinomycètes présente un accroissement dans les logements fermiers, et en particulier elle reste significative pour les actinomycètes mésophiles lors de la période hivernale.

Tableau XV : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes identifiés par culture pendant la saison d'été dans les logements ruraux et fermiers de l'étude PASTURE_{microbio}.

	Logement en été					
	Échantillons positifs		Valeur de p ¹	Moyenne Arithm. (sd)		Valeur de p ²
	n [%]	n [%]		Ruraux	Fermiers	
	n _{total} =67	n _{total} =104	n _{total} =67	n _{total} =104		
Micro-organismes fongiques						
<i>Wallemia sebi</i>	3 [4. 5]	6 [5. 7]	0. 71	6. 6 (31)	10 (43)	0. 7
<i>Absidia</i> spp.	1 [1. 4]	6 [5. 7]	0. 16	2. 2 (18)	13 (59)	0. 16
<i>Aspergillus glaucus</i>	18 [26. 9]	46 [44. 2]	0. 02	102 (266)	176 (405)	0. 02
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20 [29. 8]	32 [30. 7]	0. 89	77 (155)	102 (232)	0. 77
<i>Aspergillus niger</i>	41 [61. 2]	46 [44. 2]	0. 03	411 (599)	283 (748)	0. 01
<i>Aspergillus versicolor</i>	5 [7. 5]	9 [8. 6]	0. 78	18 (71)	26 (108)	0. 77
<i>Aspergillus nidulans</i>	2 [3. 0]	3 [2. 9]	0. 97	18 (128)	4. 3 (25)	0. 95
<i>Cladosporium</i> spp.	31 [46. 3]	66 [63. 5]	0. 02	367 (929)	491 (744)	0. 04
<i>Penicillium</i> spp.	30 [44. 8]	43 [41. 3]	0. 65	157 (235)	204 (463)	0. 73
Sous-total	66 [98. 5]	97 [93. 3]	0. 11	1206 (1212)	1379 (1196)	0. 24
Levures						
<i>Levures rouges</i> ³	13 [24.1]	28[30.1]	0. 38	307 (1070)	234 (611)	0. 47
<i>Levures blanches</i>	7 [10. 4]	14 [13. 5]	0. 55	5297 (2.8 10 ⁴)	1208 (1.2 10 ⁴)	0. 67
Sous-total ³	18 [33.0]	34 [37.6]	0. 62	6879 (3.1 10 ⁴)	1574 (1.2 10 ⁴)	0. 99
Actinomycètes						
<i>Saccharomonospora viridis</i>	0	1 [1]	0. 99	0	2. 8 (29)	0. 42
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	4 [6. 0]	16 [2. 9]	0. 28	15 (69)	61 (176)	0. 06
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	0	3 [2. 9]	0. 28	0	7. 1 (48)	0. 16
Sous-total	4 [6. 0]	18 [17. 3]	0. 03	15 (69)	71 (199)	0. 02
Total général ³	67 [100]	99 [95. 2]	0. 07	8000 (3.1 10 ⁴)	3014 (1.2 10 ⁴)	0. 68

Légende : (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang non-apparié de Mann et Withney. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05) ; (3) n_{total} fermier =91 et n_{total} ruraux = 54 pour les levures rouges (exclusion des prélèvements contaminés, cf. section matériels et méthodes).

Tableau XVI : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes identifiés par culture pendant la saison d'hiver dans les logements ruraux et fermiers de l'étude PASTURE_{microbio}.

	Logement en hiver					
	Échantillons positifs		Valeur de p ¹	Moyenne Arithm. (sd)		Valeur de p ²
	n [%]	n [%]		Ruraux	Fermiers	
	Ruraux	Fermiers	Ruraux	Fermiers		
n _{total} =74	n _{total} =98	n _{total} =74	n _{total} =98			
Micro-organismes fongiques						
<i>Wallemia sebi</i>	1 [1. 3]	5 [5. 1]	0.23	8 (69)	33 (186)	0.18
<i>Absidia</i> spp.	4 [5. 4]	18 [18. 3]	0.01	36 (194)	53 (140)	0.01
<i>Aspergillus glaucus</i>	12 [16. 2]	36 [36. 7]	0.003	40 (110)	290 (764)	0.001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30 [40. 5]	41 [41. 8]	0.08	515 (1494)	581 (3618)	0.68
<i>Aspergillus niger</i>	4 [5. 4]	10 [10. 2]	0.39	35 (199)	33 (161)	0.29
<i>Aspergillus versicolor</i>	1 [1. 3]	7 [7. 4]	0.14	4 (34)	184 (1500)	0.07
<i>Aspergillus nidulans</i>	2 [2. 7]	4 [4. 1]	0.7	4 (24)	8 (39)	0.61
<i>Cladosporium</i> spp.	2 [2. 7]	21 [21. 4]	< 0.001	4 (24)	909 (6054)	< 0.001
<i>Penicillium</i> spp.	19 [25. 6]	42 [42. 8]	0.02	82 (185)	246 (913)	0.03
Sous-total	52 [70]	90 [91. 8]	< 0.001	743 (1546)	2385 (7142)	< 0.001
Levures						
<i>Levures rouges</i>	1 [1. 3]	5 [5. 1]	0.23	2 (17)	26 (171)	0.18
<i>Levures blanches</i>	1 [1. 3]	6 [6. 2]	0.24	2 (11)	157 (1420)	0.11
Sous-total	2 [2. 7]	11 [11. 2]	0.04	3 (182)	183 (1428)	0.03
Actinomycètes						
<i>Saccharomonospora viridis</i>	1 [1. 3]	5 [5. 1]	0.23	2 (17)	10 (48)	0.18
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	6 [8. 1]	18 [18. 3]	0.05	22 (80)	217 (1441)	0.05
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	3 [4. 0]	11 [11. 2]	0.10	6 (29)	41 (144)	0.07
Sous-total	9 [12. 1]	25 [25. 5]	0.03	30 (95)	270 (1501)	0.02
Total général	54 [72. 9]	98 [92. 6]	< 0.001	776 (1559)	2838 (7368)	< 0.001

Légende : (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang non-apparié de Mann et Withney. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05).

La contamination microbiologique des fermes

L'étude du bioaérosol des exploitations agricoles en été est basée sur des prélèvements de l'étable avant et après session de travail pour l'isolement des micro-organismes cultivables (filtre téflon®) et sur l'examen direct des membranes polypropylènes avant session de travail (T1) et pendant session de travail (T2).

Pendant la saison d'été

Identification par culture

Les comparaisons effectuées entre les deux sessions d'échantillonnages portent sur les exploitations agricoles ayant effectué une distribution d'alimentation en été (n=67).

Les espèces fongiques et les actinomycètes

La grande majorité des prélèvements a permis l'isolement d'au moins un micro-organisme (98.4 % avant travail et 100 % après travail). Les trois micro-organismes fongiques les plus fréquents avant session de travail sont *Aspergillus glaucus* (58.7 %), *Cladosporium* spp. (42 %) et *Penicillium* spp. (28 %). Il existe une tendance globale à l'augmentation des fréquences d'isolement après travail. Seulement deux paramètres sont significativement plus fréquents après travail : *Wallemia sebi* dont l'augmentation correspond à un quasi-doublement de sa fréquence d'isolement entre avant et après travail ($p=0.02$) et *Aspergillus glaucus* isolé dans presque 9 prélèvements après travail sur 10 ($p < 0.01$). Du point de vue quantitatif, le total de micro-organismes fongiques augmente significativement après travail. L'augmentation des moyennes arithmétiques totales de micro-organismes fongiques est de l'ordre d'un facteur dix (de 10^5 avant travail à 10^6 UFC/m³ après travail). La session de travail augmente de façon significative les concentrations de *Wallemia sebi*, *Absidia* spp. et *Aspergillus glaucus*.

Pour les levures, les fréquences d'isolement sont similaires avant et après travail (un prélèvement sur quatre). À noter que les concentrations observées correspondent à

des contaminations importantes du bioaérosol (de 10^4 à 10^5 UFC/m³) non modifiées de façon significative par la session d'alimentation du bétail.

Pour les actinomycètes, la moitié des prélèvements avant travail a mis en évidence au moins un actinomycète. Cette fréquence d'isolement est significativement accrue après travail approchant les trois quarts des échantillons. La majeure partie des isolats sont les actinomycètes mésophiles, qui sont significativement plus fréquemment retrouvés après travail ($p=0.03$). Pour ce paramètre, les concentrations sont de l'ordre de 10^4 UFC/m³ avant travail et de 10^5 UFC/m³ après travail. Pour les actinomycètes thermophiles, leur fréquence d'isolement augmente de 50 % après le travail ($p=0.15$) et leurs concentrations sont identiques avant et après travail, soit de 10^4 UFC/m³.

D'une façon globale, les concentrations moyennes totales des micro-organismes cultivables avant et après travail sont de l'ordre de 10^6 UFC/m³. Le test de rang montre une différence significative ($p < 0.001$) dans la distribution des valeurs avec une augmentation après travail (médiane de $2.0 \cdot 10^5$ UFC/m³ avant travail et de $2.7 \cdot 10^5$ UFC/m³ après travail).

Le comptage par examen direct

Les spores fongiques

Le nombre d'échantillons positifs pour les spores fongiques croît significativement à T2 soit 92.2 % ($p=0.02$). Cette fréquence d'isolement est compatible avec celle obtenue par culture après session de travail (98.4 %). Les spores les plus fréquemment isolées sont celles de *Cladosporium* spp. avec au moins 60 % des membranes positives à l'examen et celles des petites spores (par convention appelée *Aspergillus/Penicillium* spp.). Pour ces dernières, la fréquence est significativement augmentée par le travail (de 35.3 % à T1 à 60.8 % à T2). *Ustilago* sp. constitue le second paramètre significativement augmenté en fréquence par le travail.

Du point de vue quantitatif, l'ensemble des concentrations augmente à T2. Les résultats indiquent que les spores *Aspergillus/Penicillium* spp. constituent une part majeure du bioaérosol avec un accroissement significatif d'un facteur dix à T2 ($p=0.002$) et une concentration aérienne estimée à 10^6 spores/m³. Les spores de *Cladosporium* spp. augmentent lors du travail avec une concentration moyenne de 10^5 spores/m³ mais dont la différence entre T1 et T2 reste non significative. Pour *Alternaria* spp., l'effet

du travail est significatif sur les distributions ($p=0.009$) et entraîne une augmentation d'un facteur cinq des moyennes arithmétiques avec une concentration de l'ordre de 10^4 spores/m³.

Les pollens

Les différences en fréquence et en quantité du comptage des pollens ne sont pas significatives entre T1 et T2 dans l'environnement intérieur des étables. Les moyennes arithmétiques sont de l'ordre de 10^3 éléments/m³.

Tableau XVII : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes isolés par culture pendant la saison d'été dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

	Étable en été (n _{total} =63) - Isolement par culture (Filtre Téflon®)					
	Avant _{ST}	Après _{ST}	p ¹	Avant _{ST}	Après _{ST}	p ²
	n [%]	n [%]		Moy. Arith. (sd)	Moy. Arith. (sd)	
Micro-organismes fongiques						
<i>Wallemia sebi</i>	12[19.0]	23[36.5]	0.02	2393 (16713)	2751 (6585)	0.003
<i>Absidia</i> spp.	14[22.2]	17[27.0]	0.53	2515 (16746)	13385 (71312)	0.03
<i>Aspergillus glaucus</i>	37[58.7]	55[87.3]	< 0.001	49579 (252776)	45447 (197448)	< 0.001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20[31.7]	22[34.9]	0.7	5080 (26891)	24315 (167745)	0.8
<i>Aspergillus niger</i>	25[39.7]	30[47.6]	0.36	1328 (3358)	11710 (75571)	0.93
<i>Aspergillus versicolor</i>	8[12.7]	10[15.9]	0.61	158 (488)	295 (945)	0.73
<i>Aspergillus nidulans</i>	6[9.5]	5[7.9]	1	2203 (16723)	158 (929)	0.46
<i>Cladosporium</i> spp.	42[66.6]	42[66.6]	1	1792 (2446)	2677 (3537)	0.13
<i>Penicillium</i> spp.	28[44.4]	28[44.4]	1	772 (2141)	15936 (117003)	0.38
Sous-total	61[96.8]	62[98.4]	0.55	73810 (339286)	119657 (396004)	< 0.001
Levures						
<i>Levures rouges</i>	27[42.8]	24[38.1]	0.58	33439 (133487)	32515 (120197)	0.71
<i>Levures blanches</i>	18[27.6]	25[39.7]	0.18	73693 (408082)	8895 (43170)	0.66
Sous-total	38[60.3]	35[55.6]	0.58	107132 (423656)	42095 (125581)	0.89
Actinomycètes						
<i>Saccharomonospora viridis</i>	9[14.3]	8[12.7]	0.79	506 (2019)	242 (956)	0.29
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	30[47.6]	42[66.7]	0.03	7135 (23403)	18645 (77896)	0.23
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	13[20.6]	20[31.7]	0.15	2371 (10414)	2909 (16768)	0.57
Sous-total	33[52.4]	46[73.0]	0.01	10023 (33627)	21869 (93270)	0.13
Total général	62[98.4]	63[100]	0.31	190965 (714633)	183622 (482024)	< 0.001

Légende : Avant_{ST}, avant session de travail ; Après_{ST}, après session de travail ; (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang apparié de Wilcoxon. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05).

Tableau XVIII : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes et des pollens identifiés par examen direct pendant la saison d'été dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

	Étable en été (n _{total} =51) - Examen direct					
	Échantillons positifs		p ¹	Moyenne Arithm. (sd)		p ²
	n [%]	n [%]		T1	T2	
	T1	T2		T1	T2	
<i>Alternaria</i> spp.	10[19.6]	17[33.3]	0.11	458 (1922)	2894 (13939)	0.009
<i>Aspergillus/Penicillium</i> spp.	18[35.3]	31[60.8]	0.01	15045 (62197)	146182 (605600)	0.002
<i>Cladosporium</i> spp.	33[64.7]	34[66.7]	0.83	3825 (8594)	10678 (36803)	0.54
<i>Coprinus</i> spp.	3[5.9]	6[11.8]	0.29	41 (200)	182 (551)	0.28
<i>Dreschlera</i> spp.	1[2.0]	2[3.9]	0.55	15 (112)	41 (280)	0.56
<i>Epicoccum</i> spp.	8[15.7]	12[23.5]	0.31	162 (522)	470 (1853)	0.57
<i>Pithomyces</i> spp.	1[2.0]	1[2.0]	1	.	.	.
<i>Torula</i> spp.	2[3.9]	1[2.0]	0.55	125 (704)	423 (3024)	0.57
<i>Ustilago</i> spp.	6[11.8]	14[27.4]	0.04	1347 (9180)	1637 (4087)	0.07
Total spores non identifiées	12[23.5]	18[35.3]	0.19	1994 (11256)	5445 (33706)	0.1
Total des spores	39[76.5]	47[92.2]	0.02	23033 (81266)	167964 (626019)	0.004
Total grains de pollen	18[35.3]	18[35.3]	1	854 (3473)	2725 (7756)	0.35

Légende : T1, avant session de travail ; T2, pendant session de travail ; (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang apparié de Wilcoxon. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05).

Pendant la saison d'hiver

Identification par culture

Les espèces fongiques et les actinomycètes

La quasi-totalité des prélèvements effectués en hiver dans l'environnement intérieur de la ferme démontre la présence d'au moins un micro-organisme fongique au sein du bioaérosol (94.8 % avant travail et 100 % après travail, Tableau XIX, p182). La concentration totale des micro-organismes fongiques est de l'ordre de 10^5 UFC/³ avant distribution de fourrage. La session de travail entraîne une augmentation significative de l'ensemble des colonies fongiques d'un facteur dix.

Six paramètres sont présents dans plus de 40 % des échantillons après travail : par ordre croissant, *Absidia* spp. (40.6 %), *Penicillium* spp. (41.7 %), *Cladosporium* spp. (49 %), *Wallemia sebi* (50 %), *Aspergillus fumigatus* (55.2 %) et *Aspergillus glaucus* (90.6 %). Parmi ceux-ci, seuls quatre présentent une fréquence d'isolement significativement augmentée après travail : *Wallemia sebi* ($p=0.04$), *Absidia* spp. ($p=0.06$), *Aspergillus glaucus* ($p < 0.001$) et *Cladosporium* spp. ($p=0.01$). Ces micro-organismes représentent des contaminants habituels de l'atmosphère intérieure des fermes. Du point de vue quantitatif, les moyennes arithmétiques de ces quatre paramètres augmentent après session de travail, au minimum d'un facteur quatre environ. Ces résultats confirment ceux retrouvés dans l'étude de la cinétique où *Aspergillus/Penicillium* spp. et *Cladosporium* spp. étaient prépondérants au sein du bioaérosol.

Pour les levures, il n'y a pas d'effet significatif de la distribution de fourrage sur la fréquence d'isolement et sur les concentrations étudiées (de 10^3 à 10^4 UFC/m³).

Pour les actinomycètes, le profil de contamination est nettement différent de celui retrouvé dans les étables en été. Les fréquences augmentent dans leur ensemble par rapport à la période estivale et, l'effet du travail est identifiable et significatif pour les actinomycètes thermophiles et mésophiles. Après travail, la moitié des prélèvements est positive pour les actinomycètes thermophiles et plus des deux tiers pour *Saccharomonospora viridis* ou les actinomycètes mésophiles. Quantitativement, l'effet de la distribution du fourrage est significatif avec des concentrations moyennes de 10^4 à 10^5 UFC/m³ mesurées après travail pour ces trois paramètres.

Identification par culture et biologie moléculaire des espèces bactériennes

D'une façon globale, la moyenne géométrique pour l'ensemble des bactéries aérobies thermotolérantes est de $2.8 \cdot 10^4$ UFC/m³ avant travail (n=70) et de $3.6 \cdot 10^4$ UFC/m³ après travail (n=70). Cette augmentation après travail d'un facteur 1.3 est non significative (T_{WILC} , p=0.28). Le ratio des bactéries à coloration Gram positif/Gram négatif était de 4.5 Avant_{ST} et de 6.5 Après_{ST}. Pour approfondir la connaissance de la composition bactérienne du bioaérosol, nous présentons les résultats de l'identification par biologie moléculaire des phénotypes bactériens les plus fréquents. Ce travail a été effectué sur sous-échantillon aléatoire des prélèvements réalisés avant la session d'alimentation (Avant_{ST}, n=33) et après la distribution (Après_{ST} n=30).

Les résultats de l'identification au niveau du genre sont rapportés au sein du Tableau XX (p183) et classés par ordre décroissant de fréquence d'isolement. Les trois genres les plus fréquents correspondent aux genres à Gram positif suivant *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Bacillus*. Ensemble, ils représentent plus de 70 % des isollements et un poids quantitatif moyen de l'ordre de 10^4 UFC/m³ (Tableau XX, p183). L'examen attentif du tableau indique qu'il existe un grand nombre de genres bactériens différents isolés, de façon ponctuelle, dans le bioaérosol démontrant nettement la diversité bactérienne du milieu agricole fermier. Notons néanmoins que ces isollements, certes peu fréquents, peuvent correspondre à des concentrations aériennes majeures au sein du bioaérosol. À ce titre, nous pouvons citer les genres bactériens de bacilles à Gram négatif *Acinetobacter* et *Xanthomonas* avant session de travail et *Pseudomonas* avec des concentrations mesurées de l'ordre de 10^5 UFC/m³.

Tableau XIX : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes isolés par culture pendant la saison d'hiver dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

	Étable en hiver (n _{total} =97) – Isolement par culture (Filtre Téflon®)					
	Avant ST	Après ST	p ¹	Avant ST	Après ST	p ²
	n [%]	n [%]		Moy. Arith. (sd)	Moy. Arith. (sd)	
Micro-organismes fongiques						
<i>Wallemia sebi</i>	35[36.4]	49[51]	0.04	7057 (47801)	57110 (296873)	< 0.001
<i>Absidia</i> spp.	27[28.1]	39[40.6]	0.06	924 (2009)	3244 (14751)	0.01
<i>Aspergillus glaucus</i>	65[67.7]	87[90.6]	< 0.001	10137 (26758)	50464 (147870)	< 0.001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	45 [46.8]	53[55.2]	0.24	3956 (14026)	5852 (25613)	0.12
<i>Aspergillus niger</i>	18[18.7]	21[21.9]	0.59	472 (2314)	2046 (10534)	0.1
<i>Aspergillus versicolor</i>	10[10.4]	14[14.6]	0.38	616 (2644)	2882 (16378)	0.18
<i>Aspergillus nidulans</i>	13[13.5]	21[21.8]	0.13	206 (912)	1683 (9076)	0.01
<i>Cladosporium</i> spp.	31[32.3]	47[49.0]	0.01	1019 (3302)	4682 (15554)	< 0.001
<i>Penicillium</i> spp.	38[39.6]	40[41.7]	0.76	1629 (538)	2272 (13540)	0.84
Sous-total	92[94.8]	96[100]	0.02	27073 (64505)	130903 (429892)	< 0.001
Levures						
<i>Levures rouges</i>	11[11.4]	16[16.7]	0.29	266 (1168)	10617 (8477)	0.27
<i>Levures blanches</i>	32[33.3]	26[27.1]	0.34	4189 (24486)	1225 (5171)	0.7
Sous-total	37[38.5]	33[37.5]	0.54	4456 (2492)	11842 (8623)	0.87
Actinomycètes						
<i>Saccharomonospora viridis</i>	28[28.1]	36[71.9]	0.16	664 (1671)	2402 (7301)	0.02
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	52[53.1]	70[71.1]	0.007	11849 (43827)	29578 (107456)	< 0.001
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	30[30.2]	50[51]	0.003	2163 (8275)	7564 (23502)	< 0.001
Sous-total	67[68.7]	77[79.2]	0.10	14902 (49663)	39600 (13161)	< 0.001
Total général	94[97.9]	97[100]	0.15	46432 (91597)	182346 (479292)	< 0.001

Légende : Avant ST, avant session de travail ; Après ST, après session de travail ; (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang apparié de Wilcoxon. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05).

Tableau XX : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes bactériens isolés par culture pendant la saison d'hiver dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

Avant ST				
Genre bactérien	Type et Coloration de Gram	Fréquence d'isolement		Moy. Géom. (UFC/ m ³)
		n	%	
<i>Staphylococcus</i> *	Cocci +	40	46.5	5 993
<i>Corynebacterium</i> *	Bacille +	14	16.3	4 274
<i>Bacillus</i> *	Bacille +	13	15.1	3 850
<i>Acinetobacter</i>	Bacille -	3	3.5	19 068
<i>Aerococcus</i>	Cocci +	3	3.5	8 366
<i>Kocuria</i>	Cocci +	3	3.5	2 976
<i>Pseudomonas</i>	Bacille -	2	2.3	4 969
<i>Arthrobacter</i>	Bacille +	1	1.2	1 992
<i>Facklamia</i>	Cocci +	1	1.2	664
<i>Macrococcus</i>	Cocci +	1	1.2	5 312
<i>Micrococcus</i>	Cocci +	1	1.2	2 656
<i>Nesterenkonia</i>	Bacille +	1	1.2	664
<i>Ralstonia</i>	Bacille -	1	1.2	3 984
<i>Sphingomonas</i>	Bacille -	1	1.2	8 632
<i>Xanthomonas</i>	Bacille -	1	1.2	28 552
Somme des 3 genres les plus fréquents(*)		67	77.9	5 125

Après ST				
Genre bactérien	Type et Coloration de Gram	Fréquence d'isolement		Moy. Géom. (UFC/ m ³)
		n	%	
<i>Staphylococcus</i> *	Cocci +	44	47.8	9 558
<i>Bacillus</i> *	Bacille +	17	18.5	2 310
<i>Corynebacterium</i> *	Bacille +	5	5.4	4 031
<i>Kocuria</i>	Cocci +	5	5.4	11 431
<i>Brachybacterium</i>	Cocci -	4	4.3	6 721
<i>Pantoea</i>	Bacille -	4	4.3	3 715
<i>Acinetobacter</i>	Bacille -	2	2.2	1 992
<i>Brevibacterium</i>	Cocci +	2	2.2	22 202
<i>Curtobacterium</i>	Bacille +	2	2.2	20 892
<i>Microbacterium</i>	Bacille +	2	2.2	18 781
<i>Aerococcus</i>	Cocci +	1	1.1	17 264
<i>Cellulosimicrobium</i>	Bacille +	1	1.1	26 560
<i>Paenibacillus</i>	Bacille +/-	1	1.1	4 648
<i>Pseudomonas</i>	Bacille -	1	1.1	39 176
<i>Rhodococcus</i>	Bacille +/-	1	1.1	664
Somme des 3 genres les plus fréquents (*)		66	71.7	6 210

Le comptage par examen direct

Les spores fongiques

Le Tableau XXI (p185) rassemble les résultats de l'examen direct des membranes examinées en hiver avant et après session de travail (n=98). La fréquence de positivité à T1 de l'ensemble des spores augmente en comparaison avec les prélèvements d'été avec plus de neuf prélèvements sur dix positifs pour une espèce au moins en hiver. Avant travail, deux espèces augmentent nettement par rapport à l'été : *Alternaria* sp. et des petites spores (*Aspergillus/Penicillium* spp.). On peut les considérer comme des contaminants importants du milieu fermier lors de l'hivernage, de la même manière que *Cladosporium* sp. retrouvé dans plus de 60 % des prélèvements d'été et d'hiver. D'une façon générale, l'ensemble des fréquences d'isolement pendant le travail (T2) sont significativement augmentée par rapport à avant travail excepté pour *Alternaria* sp. et *Pithomyces* sp..

L'examen des données quantitatives globales démontre un effet du travail d'un facteur 10 ; identique à l'amplitude identifiée par les méthodes de culture fongique. Notons qu'à nouveau *Aspergillus/Penicillium* spp. et *Cladosporium* spp. restent quantitativement les paramètres les plus importants du bioaérosol comme démontré en été après travail et dans l'étude pilote sur la cinétique. *Ustilago* sp. et les autres spores fongiques non identifiées présentent des moyennes arithmétiques de l'ordre de 10^5 UFC/m³.

Les pollens

Pour les pollens, la session de travail augmente significativement à la fois le nombre de prélèvements positifs, mais aussi et d'une façon marquée la quantité mesurée. Cette augmentation est de la même amplitude que pour les paramètres fongiques, d'un ordre de dix, pour une moyenne arithmétique après travail de $15 \cdot 10^3$ éléments /m³.

Tableau XXI : Fréquence d'isolement et concentration moyenne des micro-organismes et des pollens identifiés par examen direct pendant la saison d'hiver dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.

Étable en hiver (n _{total} =89) - Examen direct						
	Échantillons positifs		p ¹	Moyenne Arithm. (sd)		p ²
	n [%]	n [%]		T1	T2	
<i>Alternaria</i> spp.	37[41.6]	44[50.6]	0.29	634 (1408)	3107 (11037)	0.02
<i>Aspergillus/Penicillium</i> spp.	63[73.0]	79[88.8]	0.008	22012 (64843)	205174 (516986)	< 0.001
<i>Cladosporium</i> spp.	69[77.5]	79[88.8]	0.04	6501 (9209)	55877 (267766)	< 0.001
<i>Coprinus</i> spp.	5[15.7]	26[29.2]	< 0.001	123 (639)	567 (1221)	< 0.001
<i>Dreschlera</i> spp.	6[6.7]	18[20.2]	0.008	130 (738)	312 (877)	0.01
<i>Epicoccum</i> spp.	5[15.7]	36[40.4]	< 0.001	214 (725)	695 (1322)	< 0.001
<i>Pithomyces</i> spp.	2[2.2]	7[7.9]	0,16	2 (14)	65 (275)	0.08
<i>Torula</i> spp.	2[2.2]	14[15.7]	0.002	143 (1068)	960 (3098)	0.002
<i>Ustilago</i> spp.	38[42.7]	66[74.2]	< 0.001	2375 (9952)	15553 (3855)	< 0.001
Total spores non identifiées	40[44.9]	59[96.6]	< 0.001	2410 (7007)	56201 (250270)	< 0.001
Total des spores	82[92.1]	86[96.6]	0.19	34567 (75461)	338631 (752263)	< 0.001
Total grains de pollen	56[62.9]	77[86.5]	< 0.001	1692 (3331)	15461 (35804)	< 0.001

Légende : T1, avant session de travail ; T2, pendant session de travail ; (1) test du khi² ou test exact de Fisher si n < 5 ; (2) test non-paramétrique de rang apparié de Wilcoxon. Les valeurs de p en gras sont inférieures au seuil de significativité (p≤0.05).

Comparaison entre les fermes et les logements

Le Tableau XXII (p187) expose les rapports des fréquences d'isolement et des moyennes arithmétiques entre les prélèvements de l'étable avant et après travail et la chambre du domicile fermier selon la saison. L'objectif de ce tableau est de décrire les contrastes de la composition du bioaérosol entre les chambres des enfants fermiers et les mesures avant et après session de travail.

Nous avons choisi de présenter les rapports de fréquence entre les mesures effectuées dans l'environnement fermier et les logements. Ainsi, plus le rapport des fréquences est haut, plus la différence entre le prélèvement de l'étable et la chambre est élevée. Cette situation peut être retrouvée pour des micro-organismes spécifiques de l'étable et rarement isolés dans les logements. D'une façon inverse, plus ce rapport est bas, moins la différence entre l'étable et la chambre est marquée. Un ratio faible traduit un profil identique entre domicile et étable. Deux cas peuvent alors être évoqués : (1) soit le micro-organisme étudié est ubiquiste, donc non spécifique de l'environnement fermier agricole et retrouvé à la fois dans l'étable et la chambre (contamination aérienne environnementale), (2) soit le micro-organisme étudié est spécifique de l'environnement fermier agricole et est transféré dans la chambre par le biais des activités et des vêtements lors du retour au domicile après avoir été présent à l'étable.

Pour les micro-organismes fongiques, *Wallemia sebi* est spécifique de l'étable et les différences entre concentrations des étables sont supérieures à 100 indifféremment de la saison. *Absidia* sp. présente un profil similaire. Pour *Aspergillus glaucus*, *Cladosporium* sp. et *Penicillium* sp. les ratios de fréquence sont bas. Pour ces trois paramètres, ces résultats pourraient correspondre à une contamination « de fond » des chambres par transfert depuis l'étable. **Pour les levures**, les différences entre fréquence d'isolement et concentration sont plus marquées en hiver indépendamment de la session de travail. **Pour les actinomycètes**, les domiciles présentent des fréquences faibles d'isolement et des concentrations basses par rapport à l'étable. En hiver, un abaissement des ratios d'isolement est en faveur d'une contamination hivernale plus fréquente des domiciles. Les ratios quantitatifs des niveaux de contaminations sont cependant marqués pour les deux saisons démontrant l'importance quantitative de la contamination par les actinomycètes de l'environnement de l'étable.

Tableau XXII : Rapport des moyennes arithmétiques entre les prélèvements de l'étable avant et après travail et de la chambre du domicile fermier selon la saison de prélèvements.

	Eté				Hiver			
	Rapport Avant _{ST} / chambre		Rapport Après _{ST} / chambre		Rapport Avant _{ST} / chambre		Rapport Après _{ST} / chambre	
	n=86		n=63		n=97		n=96	
	Freq. ¹	Moy. Arith. ²						
Micro-organismes fongiques								
<i>Wallemia sebi</i>	3.7	■■■	4.6	■■■	7.2	■■■	9.8	■■■■
<i>Absidia</i> spp.	2.8	■■■	4.3	■■■	1.6	■■	2.2	■■
<i>Aspergillus glaucus</i>	1.5	■■■	1.6	■■■	1.8	■■	2.4	■■■
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.2	■■	1.5	■■■	1.1	■	1.3	■■
<i>Aspergillus niger</i>	1.1	■■	1.5	■■	1.8	■■	2.1	■■
<i>Aspergillus versicolor</i>	1.0	■	2.8	■■	1.4	■	2.3	■■
<i>Aspergillus nidulans</i>	2.3	■■■	2.0	■■	3.5	■■	5.3	■■■
<i>Cladosporium</i> spp.	1.0	■	1.0	■	1.5	■	2.2	■
<i>Penicillium</i> spp.	1.2	■	1.2	■■	0.9	■	1.0	■
Sous-total	1.1	68	1.1	85	1.0	11	1.1	54
Levures								
<i>Levures rouges</i>	1.2	■	1.2	■■	2.2	■■	3.2	■■■
<i>Levures blanches</i>	2.4	■■	3.5	■	5.3	■■	4.3	■
Sous-total	1.5	38	1.5	8	3.4	24	3.0	64
Actinomycètes								
<i>Saccharomonospora viridis</i>	15.0	■■■	8.0	■■	5.6	■■	7.2	■■■
<i>Actinomycètes mésophiles</i>	3.0	■■■	2.8	■■■	2.9	■■	3.8	■■■
<i>Actinomycètes thermophiles</i>	6.0	■■■	10.5	■■■	2.7	■■	4.5	■■■
Sous-total	3.0	148	2.8	209	2.7	53	3.0	144
Total général	1.0	54	1.1	43	1.1	15	1.1	63

Légende : (1) Rapport des fréquences d'isolement par culture ; (2) Rapport des concentrations par culture ; (■) de 1 à 10 ; (■■) de 10 à 100 ; (■■■) 100 à 1000 ; (■■■■) plus de 1000.

Synthèse des niveaux de contaminations en fonction de la saison et de la session de travail

Pour compléter la présentation des résultats de la contamination du bioaérosol des étables, la Figure 21 (p189) restitue les moyennes géométriques (et IC_{95%}) des concentrations du total des micro-organismes fongiques, des levures, des actinomycètes isolés par culture et des spores fongiques et des pollens identifiés par examen direct. Cette figure sépare les moyennes géométriques en fonction de la saison et de la session de prélèvements. La représentation graphique est basée sur l'ensemble des prélèvements disponibles lors des échantillonnages de terrain.

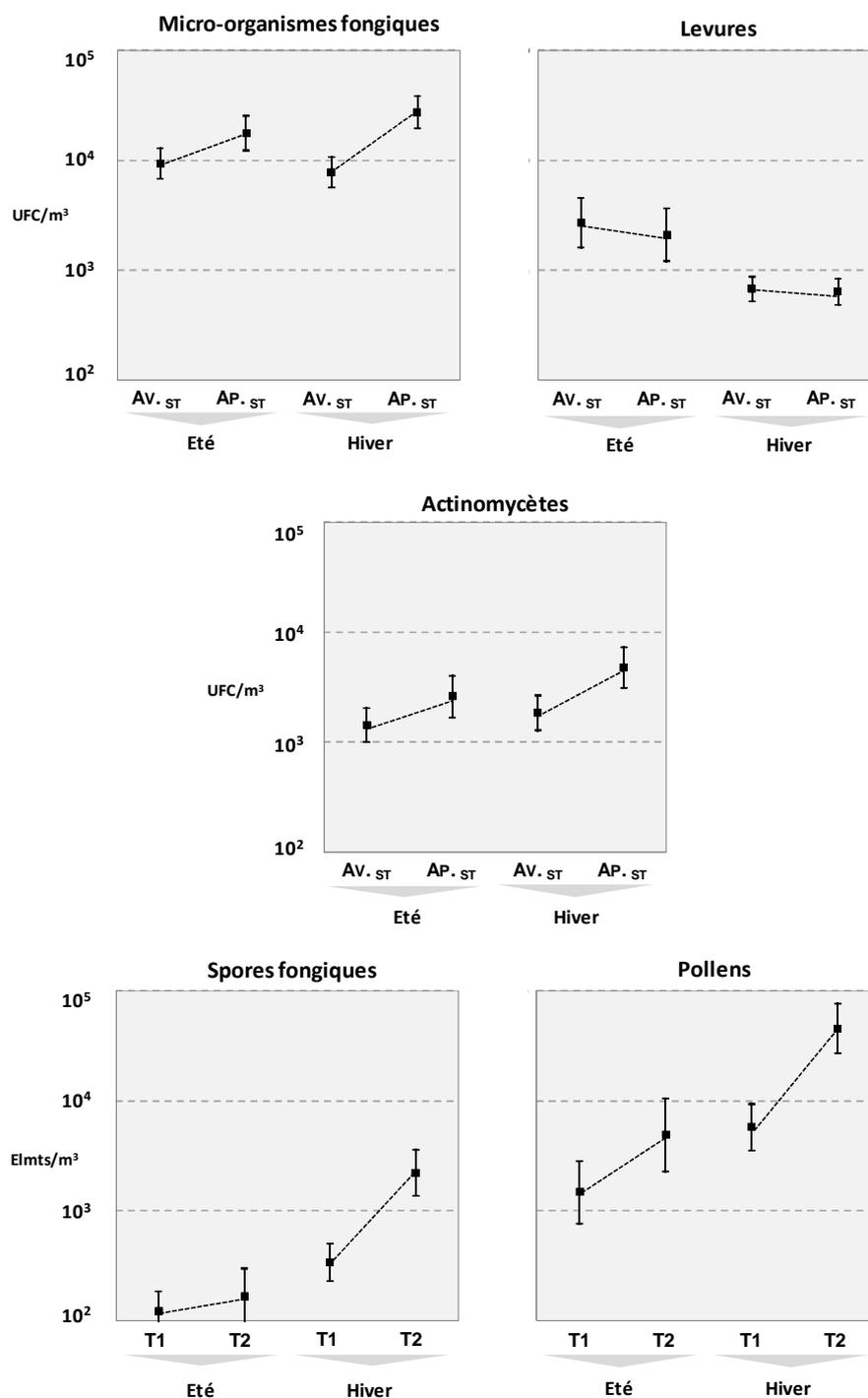
Les deux paramètres fongiques obtenus par culture ou par examen direct montrent un profil similaire avec une augmentation pendant (T2 pour les spores) ou après le travail (culture) indépendamment de la saison.

Pour les levures, les concentrations obtenues en été sont significativement supérieures à celles de la saison d'hiver. La session de travail n'a pas d'effet sur les concentrations du bioaérosol.

Concernant les actinomycètes, leur profil est proche de celui des micro-organismes fongiques avec une augmentation liée au travail. Cependant, les concentrations sont plus basses en hiver de l'ordre de 10⁴ UFC/m³ (soit diminuées d'un facteur dix par rapport au total des micro-organismes fongiques).

Pour les pollens enfin, il existe une gradation des concentrations en fonction de la saison et de la distribution d'alimentation au bétail. D'un niveau compatible avec les concentrations extérieures de pollens en saison de pollinisation avant travail en été, les concentrations mesurées augmentent nettement en été après travail, elles sont encore plus élevées en hiver avant travail et s'accroissent encore lors de la distribution de fourrage comme l'indiquent les concentrations mesurées à T2 durant l'hiver.

Figure 21 : Moyennes géométriques (et IC_{95%}) des concentrations des micro-organismes fongiques, des levures, des actinomycètes isolées par culture et des spores fongiques et des grains de pollen identifiés par examen direct en fonction de la saison et de la session de prélèvements dans les fermes de l'étude PASTURE_{microbio}.



Légende : Av. ST, avant session de travail ; Ap. ST, après session de travail ; T1, avant session de travail ; T2, pendant session de travail.

Étude des facteurs associés à la contamination microbiologique du bioaérosol des fermes

Les micro-organismes fongiques après session de travail en hiver

Dans le but de modéliser les facteurs associés avec la session de travail, l'analyse a été réalisée uniquement pour les échantillons prélevés après session de travail.

Les résultats sont rapportés au sein du Tableau XXIII (p191). Les concentrations fongiques sont variables en fonction des caractéristiques des fermes. En effet, l'analyse bivariée met en évidence une diminution de ventilation de l'étable (fermeture des portes) et la distribution de l'alimentation par le plafond (Figure 7, p93) comme des facteurs associés à une augmentation marquée des concentrations. De plus, l'architecture de la ferme semble influencer les concentrations mesurées qui diminuent avec l'utilisation d'une stabulation libre pour le bétail et avec l'accroissement du volume intérieur. Ces fermes dites en stabulation libre correspondent en général à des volumes élevés et, en hiver, à des ouvertures pour la ventilation plus importantes. Ces deux paramètres pouvant expliquer la diminution de la contamination observée. L'utilisation d'ensilage ou d'herbe fraîche diminue les contaminations fongiques. Il est intéressant de noter une relation dose-effet pour l'utilisation d'ensilage.

Le modèle multivarié identifie comme seul facteur significatif l'augmentation de la quantité d'ensilage avec des valeurs des ratios des moyennes géométriques stables après ajustement.

Tableau XXIII : Associations bivariées et multivariées entre les caractéristiques des fermes et la concentration totale des micro-organismes fongiques dans l'air de l'étable en hiver après session de travail.

Variables explicatives	Associations bivariées			Modèle multivarié	
<i>Caractéristiques des fermes et pratiques agricoles</i>	Moy. Géométrique (UFC/m ³ x 10 ³)	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p
Pays					
Suisse	31.7	1		1	
France	29.6	0.97 (0.63-1.50)	0.89	0.95 (0.58-1.55)	0.95
Allemagne	24.9	0.90 (0.60-1.35)	0.61	1.21 (0.65-2.25)	0.55
Type d'étable					
Entravée	35.2	1			
Stabulation libre	16.6	0.72 (0.53-0.99)	0.04	0.76 (0.51-1.14)	0.18
Volume de l'étable (m³)²					
1 ^{re} (70-710)	40.7	1		1	
2 ^{ème} (750-1470)	17.5	0.69 (0.49-0.98)	0.04	0.93 (0.60-1.45)	0.75
3 ^{ème} (1471-18900)	29.8	0.87 (0.61-1.25)	0.45	1.50 (0.86-2.61)	0.15
Ouverture des porte(s) et des fenêtre(s)					
Ouverte (s)	13.6	1		1	
Fermée(s)	30.7	1.43 (0.92-2.21)	0.11	0.99 (0.61-1.63)	0.98
Distribution de l'alimentation					
Manuellement et/ou avec un wagon	21.4	1		1	
Depuis une trappe dans le plafond	69.5	1.67 (1.17-2.38)	0.01	1.42 (0.93-2.16)	0.10
Méthode de récolte du foin					
En vrac	22.0	1		-	-
En vrac et en balles	33.2	1.20 (0.83-1.72)	0.33	-	-
En balles seulement	27.9	1.11 (0.77-1.60)	0.58	-	-
Foin (en kg/jour)³					
1 ^{re} (0-119)	26.9	1		1	
2 ^{ème} (120-280)	29.9	1.05 (0.68-1.60)	0.83	1.25 (0.77-2.02)	0.36
3 ^{ème} (281-584)	26.6	1 (0.64-1.54)	0.98	0.94 (0.56-1.59)	0.82
4 ^{ème} (585-4000)	27.0	1 (0.65-1.55)	1.00	0.64 (0.33-1.24)	0.19
Ensilage d'herbe et/ou de maïs (kg/jour)³					
1 ^{re} (0)	42.1	1		1	
2 ^{ème} (26-160)	36.9	0.94 (0.53-1.69)	0.85	0.77 (0.37-1.60)	0.48
3 ^{ème} (180-990)	23.5	0.78 (0.53-1.13)	0.18	0.56 (0.32-0.98)	0.04
4 ^{ème} (1000-6750)	14.6	0.63 (0.43-0.92)	0.02	0.40 (0.21-0.75)	0.005
Distribution d'herbe fraîche					
Non	33.3	1		1	
Oui	11.7	0.64 (0.43-0.94)	0.03	0.77 (0.49-1.21)	0.25

Légende: (1) Intervalle de confiance 95 %, (2) en tertile de la distribution, (3) en quartile de la distribution. La modélisation multivariée est basée sur un modèle mutuellement ajusté aux facteurs présentés dans le tableau (n=89).

Les actinomycètes après session de travail en hiver

L'étude des concentrations des actinomycètes a porté uniquement sur les prélèvements effectués après session de travail (Tableau XXIV, p193).

L'analyse bivariée montre des similitudes avec l'analyse statistique réalisée pour les micro-organismes fongiques : la diminution de la ventilation de l'étable (fermeture des portes) et la distribution de l'alimentation par le plafond sont associées à une augmentation des concentrations des micro-organismes dans l'air. La distribution d'ensilage et d'herbe fraîche tend à diminuer graduellement les concentrations dans l'air. Il existe cependant une différence marquée avec les micro-organismes fongiques vis-à-vis de la distribution de foin. La distribution d'une grande quantité de foin (soit environ plus de 600 kg) est associée avec une augmentation des concentrations d'actinomycètes dans l'air.

Dans l'analyse multivariée, les distributions d'ensilage et d'herbe restent significativement associées avec une baisse des concentrations sans modification importante de l'amplitude de l'association. On note une accentuation de l'effet de la distribution du foin, mais l'association est non significative. Par contre, notons avec intérêt qu'il existe un effet proche de la significativité statistique liée au pays (en Allemagne) avec un ratio de moyenne géométrique augmenté en comparaison avec la concentration des fermes suisses utilisées comme référence dans le modèle.

Tableau XXIV : Associations bivariées et multivariées entre les caractéristiques des fermes et la concentration totale d'actinomycètes dans l'air de l'étable en hiver après session de travail.

Variables explicatives	Associations bivariées			Modèle multivarié	
	Moy. Géométrique (UFC/m ³)	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p
Pays					
Suisse	4350	1		1	
France	6509	1.19 (0.68-2.07)	0.53	1.05 (0.53-2.07)	0.90
Allemagne	4026	0.97 (0.58-1.62)	0.90	2.07 (0.99-4.34)	0.05
Type d'étable					
Entravée	4990	1		-	-
Stabulation libre	4319	0.94 (0.62-1.42)	0.76	-	-
Volume de l'étable (m³)²					
1 ^{re} (70-710)	5096	1		-	-
2 ^{ème} (750-1470)	3775	0.88 (0.56-1.38)	0.57	-	-
3 ^{ème} (1471-18900)	5734	1.05 (0.66-1.67)	0.83	-	-
Ouverture des porte(s) et des fenêtre(s)					
Ouverte (s)	2470	1			
Fermée(s)	5227	1.38 (0.79-2.44)	0.26	-	-
Distribution de l'alimentation					
Manuellement et/ou avec un wagon	3704	1		1	
Depuis une trappe dans le plafond	11688	1.65 (1.03-2.63)	0.04	1.34 (0.79-2.29)	0.27
Méthode de récolte du foin					
En vrac	6065	1		1	
En vrac et en balles	3036	0.74 (0.47-1.18)	0.20	0.74 (0.46-1.19)	0.21
En balles seulement	6204	1.01 (0.63-1.61)	0.97	1.18 (0.65-2.14)	0.58
Foin (en kg/jour)³					
1 ^{re} (0-119)	3100	1		1	
2 ^{ème} (120-280)	4623	1.19 (0.70-2.02)	0.52	1.45 (0.80-2.62)	0.22
3 ^{ème} (281-584)	3457	1.05 (0.61-1.80)	0.86	1.30 (0.68-2.48)	0.42
4 ^{ème} (585-4000)	10083	1.67 (0.97-2.87)	0.06	1.93 (0.87-4.28)	0.10
Ensilage d'herbe et/ou de maïs (kg/jour)³					
1 ^{re} (0)	8713	1		1	
2 ^{ème} (26-160)	5089	0.79 (0.38-1.66)	0.53	0.86 (0.36-2.09)	0.74
3 ^{ème} (180-990)	3191	0.65 (0.40-1.04)	0.07	0.59 (0.31-1.13)	0.11
4 ^{ème} (1000-6750)	2336	0.56 (0.35-0.91)	0.02	0.45 (0.23-0.90)	0.02
Distribution d'herbe fraîche					
Non	5879	1		1	
Oui	1555	0.56 (0.34-0.93)	0.03	0.59 (0.33-1.05)	0.08

Légende: (1) Intervalle de confiance 95 % , (2) en tertile de la distribution, (3) en quartile de la distribution. La modélisation multivariée est basée sur un modèle mutuellement ajusté aux facteurs présentés dans le tableau (n=88).

Les pollens en hiver

L'analyse des associations entre les concentrations polliniques et les caractéristiques de la ferme a été réalisée en tenant compte des mesures effectuées au temps T1 et au temps T2. Les quantités de substrats utilisées n'ont pas été incluses dans le modèle car elles ne peuvent être associées par définition qu'avec le temps T2. En revanche, les caractéristiques générales de la ferme qui peuvent avoir un effet à la fois sur les concentrations avant le travail et pendant le travail ont été utilisées.

Le Tableau XXV (p195) présente les résultats de l'analyse bivariée pour les facteurs dont la significativité était inférieure ou égale à 0.25 et donc retenus pour l'analyse multivariée. La session de travail, l'absence de système de ventilation et l'utilisation de foin en vrac et pressé en balle ronde sont les facteurs significativement associés avec une augmentation des concentrations polliniques mesurées. Il existe un effet lié au pays, avec des concentrations plus élevées en France. La distribution d'ensilage comme substrat additionnel, en lieu et place du foin, tend à diminuer les concentrations des pollens. Les résultats de l'analyse multivariée confirment l'effet de la session de travail et du pays sans modification de l'amplitude des effets. L'absence de système de ventilation reste associée avec des concentrations plus élevées dans l'environnement intérieur des étables. Les caractéristiques architecturales – les stabulations libres – sont significativement associées à une diminution des concentrations.

Une seconde analyse a été effectuée pour évaluer les facteurs pouvant être associés à l'augmentation des pollens entre T1 et T2. L'augmentation est plus importante (et proche de la significativité dans les fermes françaises) avec les fermes allemandes comme groupe de référence (adj. GMR 5.66, IC_{95%} 0.90-35.5, p=0.06), pour l'utilisation de foin seul par rapport à l'utilisation de foin et d'ensilage pendant la session d'alimentation (adj. GMR 4.78, IC_{95%} 0.87-26.2), pour l'utilisation de foin en vrac comparée au conditionnement en balles pressées (adj. GMR 3.44, IC_{95%} 0.99-11.9, p=0.05). Cet accroissement est plus limité dans les étables de type stabulation libre par rapport aux étables où le bétail est entravé (adj. GMR 0.13, IC_{95%} 0.03-0.62, p=0.01). Des quantités élevées de foin distribuées ne sont pas associées à un accroissement de la différence entre T1 et T2.

Tableau XXV : Associations bivariées et multivariées entre les caractéristiques des fermes et les concentrations polliniques de l'étable en hiver.

Variables explicatives	Associations bivariées			Modèle multivarié	
<i>Caractéristiques des fermes et pratiques agricoles</i>	Moy. Géométrique (UFC/m ³)	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p	Ratio des moy. géométriques (IC _{95%}) ¹	Valeur de p
Session ²					
T1	345	1		1	
T2	2214	6.50 (3.71-11.40)	< 0.001	5.87 (3.36-10.26)	<0.001
Pays					
Allemagne	992	1		1	
France	7534	4.79 (2.37-9.68)	< 0.001	4.73 (1.83-12.20)	0.001
Suisse	1079	0.77 (0.33-1.81)	0.55	0.75 (0.28-1.99)	0.56
Type d'étable					
Entravée	2499	1		1	
Stabulation libre	1278	0.65 (0.31-1.34)	0.23	0.30 (0.14-0.66)	0.003
Volume de l'étable (m³) ³					
1re (70-710)	1305	1		1	
2ème (750-1470)	2312	1.28 (0.58-2.83)	0.53	0.99 (0.49-2.02)	0.98
3ème (1471-18900)	2690	1.96 (0.86-4.48)	0.11	1.41 (0.56-3.52)	0.46
Système de ventilation					
Oui	915	1		1	
Non	2503	2.04 (0.92-4.51)	0.07	3.17 (1.53-6.56)	0.002
Méthode de récolte du foin					
En vrac	1377	1		1	
En vrac et en balles	2457	2.16 (1.07-4.35)	0.03	1.18 (0.63-2.20)	0.60
Alimentation					
Foin exclusivement	5413	1		1	
Foin et ensilage	1063	0.35 (0.18-0.70)	0.003	0.82 (0.35-1.93)	0.64

Légende: (1) Intervalle de confiance 95 % , (2) T1, avant session de travail et T2, pendant session de travail, (2) en tertile de la distribution. La modélisation multivariée est basée sur un modèle mutuellement ajusté aux facteurs présentés dans le tableau (n=89).

La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.

Louis Pasteur.

DISCUSSION

Les résultats des travaux présentés dans ce manuscrit permettent de cerner les caractéristiques du bioaérosol de l'environnement des participants fermiers et ruraux étudiés dans la cohorte de naissance PASTURE. Nous discuterons tout d'abord les données de santé portant sur les maladies allergiques, puis dans un second temps les résultats microbiologiques, et enfin nous porterons une attention particulière sur les liens possibles entre les composés du bioaérosols et la protection des maladies allergiques.

- Existe-t'il une différence de prévalence des maladies allergiques entre les populations dans l'étude PASTURE_{microbio}?

Le Tableau XII (p165) permet de donner des éléments de réponse. En effet au sein de l'étude de cohorte PASTURE restreinte aux trois pays où a eu lieu l'étude PASTURE_{microbio}, la fréquence des maladies allergiques est plus faible chez les adultes fermiers par rapport aux adultes ruraux étudiés. Et plus précisément, cette tendance est comparable pour la sous-population de l'étude de PASTURE_{microbio}.

Notons cependant que pour l'asthme, en dépit des fréquences abaissées chez les mères du groupe fermier, aucune de ces différences n'a été retrouvée significative dans la cohorte PASTURE. Au contraire, l'asthme est plus fréquent chez les fermiers de PASTURE_{microbio} en comparaison avec les adultes ruraux masculins (9.4 % vs. 6.3 %). Cette différence pourrait être reliée à une fluctuation d'échantillonnage, car la fréquence est inversée et abaissée chez les fermiers pour l'analyse des trois pays réunis issus de l'étude principale de cohorte PASTURE (8.3 % vs. 5.9 %).

De façon identique à la littérature – revue dans le Tableau III (p73) – la protection du milieu fermier est moins marquée vis-à-vis de l'asthme que pour les symptômes de rhinite allergique. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. La première est que la protection du milieu fermier n'agirait que partiellement sur l'asthme. La seconde est qu'il pourrait exister une fréquence accrue dans la population étudiée de maladies respiratoires professionnelles, notifiées à tort comme asthme dans le questionnaire. Dans ce cas, à une protection potentiellement existante de l'asthme par le milieu fermier viendrait s'ajouter dans cette population des cas de maladies respiratoires professionnelles pouvant présenter des similitudes cliniques comme, par exemple, la maladie du poumon de fermier ou la bronchite chronique obstructive. Enfin, nous ne pouvons pas exclure l'existence dans la population étudiée de variations phénotypiques de l'asthme. Ces variations peuvent aussi expliquer l'inconstance des résultats des études observationnelles portant sur la protection du milieu fermier sur l'asthme citées dans la revue de littérature.

En outre, la protection du milieu fermier vis-à-vis de la rhinite allergique est significative et retrouvée pour les deux sexes. Cet effet « protecteur » est en accord avec les résultats des études épidémiologiques transversales réalisées en Europe (Tableau III, p73). On peut toutefois pondérer la portée de ces résultats issus d'une enquête basée sur des questionnaires sans diagnostic initial médical, donc sujet à un biais déclaratif. Il peut exister dans ce type d'enquête un sous-rapportage des symptômes de rhinite allergique chez les sujets fermiers pour lesquels les épisodes de rhinites peuvent ne pas relever du domaine de la pathologie médicale à proprement parlé.

Nonobstant ce possible biais, créant de façon artificielle une fréquence abaissée de la rhinite allergique chez les fermiers, la recherche d'une sensibilisation aux graminées basée sur des critères objectifs de mesure de la quantité d'immunoglobulines (IgE) sériques dirigées contre les allergènes de graminées vient compléter l'évaluation de la fréquence des maladies atopiques. Il existe bien au sein de notre étude une fréquence significativement plus faible de sensibilisation aux graminées chez les sujets fermiers des deux sexes par rapport groupe contrôle rural. L'ensemble de ces résultats nous oriente vers la conclusion qu'il existe une diminution des maladies atopiques chez les parents fermiers de la cohorte de naissance par rapport aux sujets contrôles ruraux.

À l'heure actuelle, l'effet potentiel de la protection des maladies allergiques chez les enfants, en particulier pour les pneumallergènes, ne pourra être formellement établi qu'à l'issue de l'étude de la marche atopique. Cette évaluation aura lieu à l'âge de sept ans au terme du suivi des enfants de la cohorte de naissance. Des résultats préliminaires publiés sont cependant disponibles. Nous pouvons déjà citer les premiers résultats des analyses réalisées :

- Le profil de sensibilisation au sang du cordon est différent entre les enfants fermiers et non fermiers. La contact maternel avec le foin augmente l'effet protecteur sur les niveaux d' IgE au sang du cordon pour les pollens de graminées [186].
- Il existe une association inverse entre la quantité d'IgE total au sang du cordon et les niveaux IFN- γ . Les données suggèrent, d'autre part, que la capacité à produire des IgE est reliée à une suppression de la voie Th1 plus qu'une augmentation des cellules effectrices de la voie Th2 [58].

- Le profil cytokinique au sang du cordon est différent entre les enfants fermiers et non fermiers. Les niveaux de TNF- α et d'IFN- γ sont plus élevés chez les enfants fermiers alors que les niveaux d'IL-10, IL-12 et d'IL-5 ne sont pas différents entre les deux groupes. De plus, les niveaux TNF- α et d'IFN- γ étaient associés à l'exposition maternelle à la ferme, aux animaux de la ferme, à la grange à foin et à la consommation de produits laitiers pendant la grossesse [378].

Il est néanmoins nécessaire d'attendre la poursuite de l'étude PASTURE pour connaître la valeur prédictive de la sensibilisation à la naissance sur la survenue des maladies allergiques et pour mieux décrire l'évolution de la sensibilisation dans les 7 premières années de vie entre enfants fermiers et ruraux participants à la cohorte.

- Quels sont les avantages et les limites des techniques d'échantillonnage et d'analyse utilisées dans les études pilotes et l'étude PASTURE_{microbio}?

La structure prospective de cette cohorte de naissance offre la possibilité de réaliser des prélèvements de l'environnement des enfants avant l'âge de deux ans ; période pendant laquelle la fréquentation du milieu fermier a été associée à une protection optimale vis-à-vis des maladies allergiques [177, 181, 182]. C'est dans ce cadre prospectif qu'a été réalisée l'étude PASTURE_{microbio}. Elle a pour but de caractériser la composition du bioaérosol afin de mieux connaître l'exposition par voie respiratoire des enfants dans leur enfance ; non seulement à leur domicile mais aussi à l'étable. Pour ce travail, deux approches ont été utilisées : l'une est basée sur l'identification des composants cultivables du bioaérosol déposés sur un filtre et la seconde sur l'examen direct des particules déposées sur une membrane transparente. L'utilisation de plusieurs conditions de culture et de techniques d'échantillonnage différentes – la culture pour la fraction cultivable et l'examen direct pour la fraction cultivable et non cultivable – a permis d'obtenir des résultats complémentaires et cohérents sur la composition du bioaérosol.

Les contaminations aériennes bactériologiques du milieu fermier ont été mesurées en hiver entre 10^3 à 10^4 UFC/m³ dans l'étude préliminaire portant sur la variabilité et à 10^4 UFC/m³ dans l'étude PASTURE_{microbio}. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature rapportés dans la Tableau IV (p100). Les concentrations pour les micro-organismes fongiques rapportées en milieu fermier sont en général de l'ordre de 10^3 UFC/m³ et proche des données issues des travaux antérieurs. Notons néanmoins qu'il existe en fonction des études des variations importantes pour les spores fongiques (Tableau V, p101). Mais ces comparaisons avec les données de la littérature doivent être interprétées en tenant compte des techniques de prélèvement et des conditions de culture utilisées. En conséquence, la double approche quantitative et qualitative – basée sur la fréquence d'isolement – est logiquement recommandée pour ce type d'étude environnementale. De plus, nos résultats offrent la possibilité d'effectuer des comparaisons entre les prélèvements réalisés au domicile et dans le milieu agricole.

Un des avantages des techniques de culture est l'utilisation de températures d'incubation et de différents milieux de culture pour l'isolement de micro-organismes spécifiques, et ce, pour un coût raisonnable. Mais les isollements et les valeurs observées décrivent un profil d'espèces, constituant la flore cultivable du bioaérosol, plus qu'une mesure précise et exhaustive de l'ensemble des composants du bioaérosol [258]. En effet, la concentration mesurée est dépendante des techniques d'échantillonnage et d'analyse au laboratoire. Il existe donc un écart avec les quantités réelles au sein du bioaérosol. La technique basée sur l'identification de la fraction cultivable dans l'étude PASTURE_{microbio} a permis d'associer à la culture une méthode d'analyse par biologie moléculaire afin d'identifier les principaux genres bactériens présents. Cette démarche n'a été effectuée que sur une fraction des prélèvements au regard des coûts humain et financier mis en œuvre. Nous pouvons raisonnablement estimer qu'à l'avenir cette démarche d'identification par biologie moléculaire sera couramment utilisée.

Il existe plusieurs limites au regard des stratégies de mesures choisies :

- ✓ La première concerne les prélèvements dans les logements. De façon à pouvoir effectuer les comparaisons entre le milieu agricole fermier et les logements, ces derniers ont été étudiés en utilisant la même technique d'échantillonnage sur filtre. Dans cet environnement cité comme faiblement contaminé dans la littérature, nous avons choisi d'augmenter à une heure et demie le temps de pompage. Mais, il est plausible qu'une fraction bactérienne cultivable ait été soumise à un phénomène de dessiccation lors du passage de l'air au travers du filtre. Cette diminution est envisageable pour les logements fermiers et non fermiers sans erreur différentielle entre les deux catégories. On mesure bien ici d'une part la difficulté des études environnementales microbiologiques et, d'autre part, la nécessité d'un choix raisonné des techniques d'échantillonnage de terrain et d'analyse, en particulier lors d'études portant sur des environnements aux concentrations contrastées.
- ✓ La seconde est constituée par l'utilisation de milieux de culture sélectifs pour l'isolement d'espèces microbiologiques données. Cette approche à l'avantage de favoriser l'isolement des micro-organismes d'intérêt, mais présente des contre-parties :

- la nécessité d'utiliser un nombre important de milieux de culture de façon à couvrir l'ensemble des micro-organismes d'intérêt
- et la présence d'un biais de sélection des micro-organismes difficilement cultivables ou non cultivables. Ces derniers constituent une fraction microbiologique notable du bioaérosol.

A titre d'exemple, nous pouvons citer *Coxiella burnetti*, isolé de la poussière sédimentée de l'environnement fermier [379], responsable d'épidémies sporadiques de fièvre Q en Europe [380-383] et dont des études de séroprévalence ont souligné sa fréquence chez l'enfant [384]. Pour pallier à cette limite technique, l'analyse quantitative en biologie moléculaire présente un grand intérêt. Mais en amont de sa mise en œuvre, il est nécessaire de connaître l'ensemble micro-organismes présents et d'intérêt en réalisant un inventaire (ou *screening*) et dans un second temps de concevoir une sonde d'hybridation spécifique par micro-organisme. Cette étape préliminaire de *screening* des micro-organismes non cultivables pourrait être envisagée avec une technique de clonage direct à partir de la poussière recueillie. Cette démarche analytique n'a pas été menée au regard de son coût financier. Elle devra être intégrée dans les travaux portant sur la caractérisation exhaustive des composants microbiologiques du bioaérosol dans l'avenir.

- ✓ Enfin, notre travail n'a pas porté sur l'ensemble des composés microbiologiques des étables. En effet, un certain nombre d'affections humaines et vétérinaires d'origine bactérienne, parasitaire et virale ont pour réservoir des animaux d'élevages et peut être présent dans l'environnement agricole européen. Citons, les protozoaires responsables de la cryptosporidiose dont les réservoirs en milieu fermier sont reconnus (réservoirs : veaux, agneaux et chevreaux) et de la toxoplasmose (réservoir : félinés). On notera ici que la contamination humaine est essentiellement féco-orale. Ce dernier point renforce indirectement l'importance de la prise en compte en parallèle des autres voies d'exposition possible, notamment manu porté, à d'autres agents infectieux du milieu fermier. Pour illustrer ces aspects, Ege et al. ont publié au sein de l'étude princeps PASTURE que l'immunité maternelle à *Toxoplasma gondii* et vis-à-vis de la rubéole pouvait

avoir un impact sur la sensibilisation du fœtus [385]. Mais l'effet protecteur du contact fermier pendant la grossesse, sur la sensibilisation aux aéroallergènes, n'était que partiellement expliqué dans les analyses multivariées par la sérologie positive à *T. gondii*. Ce dernier point assoit l'hypothèse de l'intervention de facteurs additionnels de protection présents dans le milieu fermier.

En tenant compte de ces limites, nous soulignons ici que la stratégie d'échantillonnage basée sur le pompage d'une fraction du bioaérosol est pratique et d'une utilisation simple sur le terrain. Elle offre la possibilité de coupler à l'analyse de la fraction cultivable, associée ou non à une identification par biologie moléculaire, avec un examen direct des particules sur membranes. De plus, la fiabilité des pompes utilisées lors de contrôles a été satisfaisante et l'envoi dans un délai court des échantillons par voie postale permet la possibilité d'études multicentriques.

- Quelles sont les principales caractéristiques du bioaérosol des chambres d'enfants de l'étude PASTURE_{microbio}?

La caractérisation de la contamination du bioaérosol et du profil de l'exposition par voies respiratoires des enfants en milieu fermier comprend deux compartiments. Le premier est constitué par le domicile où l'enfant a une présence et une activité régulière. Le second est l'exploitation agricole dans laquelle la présence de l'enfant est moins fréquente, mais peut conduire à une exposition majeure à l'environnement microbien en fonction de la saison et des sessions d'alimentation du bétail. L'étude de la contamination des logements dans l'étude PASTURE_{microbio} a permis de comparer les chambres d'enfants issus de familles fermières à une population rurale de référence.

L'étude des profils de contamination de la chambre a permis de mettre en évidence des différences en fonction des saisons. En été, les contaminations totales des micro-organismes fongiques et des levures sont similaires entre logements fermiers et ruraux. Notons néanmoins une fréquence d'isolement plus élevée et des quantités plus importantes pour *Aspergillus glaucus* et pour *Cladosporium* sp. dans les chambres d'enfants des logements fermiers ; ces deux espèces étant fréquemment isolées dans les étables. À l'opposé, *Aspergillus niger* est significativement plus fréquent dans les logements ruraux et présent en plus grande quantité en comparaison avec les logements fermiers. Ces résultats doivent être confirmés dans des études ultérieures et posent la question de l'origine de la contamination des domiciles ruraux. Cette contamination fréquente par *Aspergillus niger* a déjà été identifiée en Finlande dans la poussière de logement urbain [386]. À la vue de ces résultats microbiologiques estivaux dans leur ensemble, il apparaît que le contraste entre logements ruraux et fermiers en été est finalement limité.

Néanmoins, ces profils de contamination sont nettement modifiés durant la saison d'hiver. D'une part, les contaminations moyennes dans les chambres des enfants fermiers pour les micro-organismes fongiques, les levures et les actinomycètes sont augmentées d'un facteur 10 par rapport aux chambres des enfants ruraux. Mais d'autre part, nos résultats permettent de définir des espèces retrouvées significativement plus fréquemment et en plus grande quantité dans les logements fermiers : *Absidia* spp.,

Aspergillus glaucus et pour *Cladosporium* spp., les actinomycètes mésophiles et dans une moindre mesure *Penicillium* spp.. Ces micro-organismes sont fréquemment isolés dans le milieu agricole. En effet, les actinomycètes ont été isolés dans la poussière sédimentée de logements en Finlande (36 % de prélèvements positifs par culture et 81 % par biologie moléculaire) et avec une variation saisonnière : augmentée en automne et au printemps [387, 388]. Lis et al. ont démontré que la contamination bactérienne dans les domiciles urbains est moins importante que dans les domiciles fermiers. Il suggère la possibilité d'un transfert des micro-organismes de l'environnement agricole au domicile par les vêtements des fermiers [304]. Ce transfert a aussi été cité pour les bactéries de l'étable [305] et en Finlande pour les spores d'actinomycètes en Finlande. Il est donc légitime de poser à notre tour l'hypothèse d'un transfert de l'étable au logement soit par proximité entre les logements et la ferme, soit par le transfert sur les vêtements des agriculteurs de l'étable au logement.

Ces espèces marquent bien un contraste d'exposition microbiologique pour les enfants issus d'un habitat fermier. Pour des raisons logistiques liées aux nombres de pompes disponibles dans les différents centres de l'étude, il n'a pas été possible de réaliser des prélèvements sur membranes dans les logements. Ces prélèvements complémentaires auraient pu permettre de confirmer les tendances mises en évidence sur la fraction cultivable.

Notons que pour les chambres, les résultats bactériologiques ont fait l'objet d'une étude connexe non présentée dans ce travail de thèse. Cette étude pilote a porté sur 13 prélèvements d'air issus de logements de fermiers de l'étude PASTURE_{microbio} [389]. Dans les chambres, les concentrations bactériennes étaient comprises entre 10² et 10⁴ UFC/m³, plus élevées dans les chambres proches des étables. Les cocci à Gram positif étaient largement prédominants (80 %) par rapport aux bacilles à Gram positif (4 %), aux bacilles à Gram négatif (8 %), et non coloré (8 %). Les trois genres les plus fréquents étaient *Staphylococcus*, *Kocuria* (dont *K. carniphila*) et *Bacillus* (dont *B. licheniformis*). Parmi les *Staphylococcus* sp., l'espèce la plus représentée était *Staphylococcus warneri*. Le genre *Staphylococcus* était présent en quantité importante dans l'étable suggérant la possibilité d'un transfert au domicile. Cette hypothèse de transfert de la flore bactérienne de l'étable à la chambre de l'enfant au sein de la poussière du matelas a été évoquée en 2008 par Korthals et al. pour les espèces et genre suivant : *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Corynebacterium mucifaciens*,

Staphylococcus epidermidis, *Acinetobacter lwoffii*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium linens* and *Arthrobacter* spp. [305]. Dans une seconde étude, l'auteur a démontré la contamination de la poussière sédimentée de l'étable par *Listeria* spp. par méthode de culture (28 % des échantillons positifs) et de la poussière du matelas des domiciles correspondants (8 % des échantillons positifs) [390].

Schématiquement, il est possible de réaliser une gradation par ordre décroissant de la contamination du bioaérosol : en hiver, l'étable après/avant travail, puis en été, l'étable après/avant travail, et enfin indépendamment de la saison dans les chambres des enfants fermiers puis dans les chambres des enfants ruraux. La contamination des chambres d'enfants, fermiers et ruraux, correspond à des niveaux nettement plus faibles que ceux observés dans l'étable. Cependant, au sein de ces logements, nous avons pu identifier un profil distinct de contamination entre les chambres d'enfants fermiers et ruraux.

Enfin, la charge microbiologique globale est supérieure dans les chambres des enfants fermiers à celle des logements ruraux. Nous pouvons en conclure d'une part qu'il existe une exposition différentielle entre les logements fermiers et ruraux et d'autre part que l'exposition qui en découle doit être appréciée au regard du temps passé par l'enfant dans son domicile, particulièrement en hiver. En conséquence, il est essentiel de tenir compte de cette exposition microbiologique au domicile et de ses conséquences possibles sur le système immunitaire. Il sera indispensable en épidémiologie, lors de la modélisation de l'exposition ou le calcul d'un score d'exposition individuelle, d'effectuer une pondération en fonction du temps passé par l'enfant au domicile, et ce, afin d'ajuster d'une façon optimale l'estimation de l'exposition aux micro-organismes environnementaux.

- Quelles sont les principales caractéristiques du bioaérosol des étables des enfants de l'étude PASTURE_{microbio}?

L'étude du bioaérosol des étables démontre une singulière complexité en comparaison aux échantillons issus des logements.

En été tout d'abord, il est essentiel de séparer les exploitations agricoles en fonction des travaux effectués. En effet, environ un tiers des exploitations agricoles étudiées n'ont pas effectué de distributions de foin et de substrats alimentaires à l'étable. En revanche, pour les exploitations agricoles où la distribution d'alimentation a été effectuée (n=63), l'échantillonnage a permis le recueil de deux prélèvements l'un avant et l'autre après session de travail. Les concentrations alors mesurées dans l'étable étaient en général de 10 à 100 fois plus importantes que celles des logements fermiers correspondants à la même saison (Tableau XXII, p187). Les espèces significativement augmentées en fréquence en été après travail étaient *Wallemia sebi*, *Aspergillus glaucus* et les actinomycètes mésophiles. Rappelons dès à présent que *Aspergillus glaucus* a été isolé plus fréquemment dans les chambres des enfants fermiers par rapport aux chambres d'enfants ruraux, et ce, aux deux saisons. L'examen direct des membranes met en évidence un effet significatif du travail pour *Aspergillus/Penicillium* sp. et *Alternaria* sp..

En été, l'effet du travail est finalement peu marqué pour les paramètres étudiés. Plusieurs explications complémentaires peuvent être avancées : (i) la présence d'un bruit de fond microbiologique important dû à une contamination environnementale naturelle fongique estivale qui masque partiellement un effet travail lors de la saison d'été, (ii) l'effet d'une ventilation des exploitations agricoles très efficace en été – les portes et les fenêtres sont en général ouvertes en été dans les bâtiments agricoles – et (iii) les quantités distribuées moindres à cette saison en comparaison à la saison d'hivernage du fait du pâturage estival des animaux (données quantitatives confirmées issues du questionnaire et non présentées).

En hiver, la majorité des prélèvements avant travail et après travail présentent une contamination fongique, et plus des deux tiers une contamination par des

actinomycètes. Ces chiffres très élevés illustrent bien la diversité de la charge microbiologique de l'environnement intérieur des exploitations agricoles. Les concentrations fongiques avant travail sont comprises entre 10^3 et 10^4 UFC/m³ et augmentées d'un facteur 10 par la distribution de fourrage. *Wallemia sebi*, *Absidia* spp., *Aspergillus glaucus*, et *Cladosporium* spp. sont les espèces dont les augmentations par la session d'alimentation sont les plus marquées. Ces espèces fongiques sont par ailleurs décrites comme des contaminants du fourrage [313, 316, 318, 319]. Les micro-organismes du groupe *Aspergillus glaucus* ont été identifiés comme une flore dominante du foin et *Cladosporium* spp. et *Penicillium* spp. comme des genres fréquents dans le grain [295]. L'étude des spores fongiques met en évidence une tendance similaire avec une augmentation significative pour l'ensemble des paramètres pendant la session de travail (T2).

Pour les actinomycètes, les quantités observées après travail sont de l'ordre de 10^3 à 10^4 UFC/m³. Ces micro-organismes sont aussi reconnus comme des contaminants du foin et du grain [295, 297, 319], pouvant expliquer leur augmentation après la manipulation de fourrage comme pour les contaminants fongiques [296].

Les quantités de bactéries totales ne sont pas influencées par la distribution de foin avec une contamination de l'ordre de 10^3 UFC/m³. Les trois espèces les plus fréquemment isolées sont des genres bactériens ubiquitaires (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, et *Bacillus*). Cette dernière caractéristique environnementale pourrait expliquer l'absence d'effet lié à la distribution de fourrage. Cette contamination serait alors plutôt à relier d'une façon globale à l'environnement de l'étable et elle pourrait avoir pour source les animaux, le fumier et les litières. Mais d'autres études bactériennes doivent être associées pour compléter ce premier travail. En particulier, elles pourront utiliser un plus grand nombre de milieux de culture et associer de la biologie moléculaire pour l'estimation qualitative et quantitative des bactéries présentes indépendamment d'une étape de culture.

À côté de ses composantes biologiques, les hyphes fongiques et les pollens de graminées ont été identifiés en quantité importante. Pour les hyphes fongiques, l'exposition des enfants fréquentant le milieu fermier est élevée et peut être prolongée au moins durant l'heure qui suit la fin de la session de distribution de l'alimentation comme démontré dans l'étude pilote cinétique. L'aérosolisation de ses fragments peut conduire à une exposition importante aux allergènes fongiques. Il a en effet été

également démontré que les hyphes fongiques sont des sources majeures d'allergènes [391]. Pour les pollens, le profil d'exposition est différent : après un pic important des concentrations mesurées, la décroissance est rapide pour retrouver son niveau initial trente minutes environ après la fin du travail (Figure 19, p155).

À la vue des résultats obtenus dans l'étude de la cinétique et dans l'étude princeps PASTURE_{microbio}, il est possible d'affirmer que les enfants fermiers sont exposés à un bioaérosol dont la contamination microbienne bactérienne et fongique est majeure et dont la biodiversité est extrêmement élevée. L'évaluation de l'exposition doit intégrer la présence des enfants dans la chambre, mais aussi leur présence avant la session de travail, et pendant la session de travail, et ce, au moins durant les 30 minutes après la fin du travail dans l'étable.

Plusieurs facteurs étaient associés à la contamination microbienne du bioaérosol. Dans l'étude pilote variabilité, la session de travail a été associée à une augmentation des trois paramètres étudiés (bactéries thermotolérantes, *Eurotium* spp. et les autres micro-organismes fongiques). Des facteurs spécifiques ont également pu être identifiés : (i) une décroissance de la concentration bactérienne en fonction du volume de l'étable et (ii) une augmentation pour *Eurotium* spp. et les autres micro-organismes fongiques dans les fermes françaises et au sein des fermes les plus anciennes. Dans l'étude PASTURE_{microbio}, la distribution d'alimentation est le facteur majeur d'augmentation des niveaux de contamination du bioaérosol (Figure 21, p189). L'analyse multivariée des concentrations fongiques après session de travail a aussi mis en évidence une décroissance des concentrations avec l'augmentation de la quantité d'ensilage distribuée lors de la session d'alimentation (notons par ailleurs que cette tendance avait déjà été identifiée dans l'étude pilote sur la variabilité). Pour les actinomycètes, deux facteurs additionnels ont été identifiés dans l'étude PASTURE_{microbio} : un effet pays, avec des concentrations significativement plus élevées en Allemagne, et une diminution des concentrations dans les fermes utilisant de l'herbe fraîche. Ces paramètres sont donc des variables d'intérêt à recueillir dans les questionnaires portant sur l'évaluation de l'exposition par voie respiratoire dans l'environnement fermier.

- Comment intégrer ces résultats dans une démarche épidémiologique d'évaluation d'une exposition environnementale?

Dans l'étude PASTURE_{microbio}, une première stratégie d'analyse des différents prélèvements du bioaérosol est représentée par les comparaisons en fonction du lieu et de la saison. Cette approche individuelle a permis la comparaison des chambres d'enfants entre les participants fermiers et ruraux. Dans un second temps, ces données individuelles ont été utilisées pour la recherche des facteurs associés à la contamination par les micro-organismes fongiques et les actinomycètes du bioaérosol (Tableau XXIII, p191 et Tableau XXIV, p193). Mais cette dernière approche est sujette au biais d'atténuation (p111) du fait de la variabilité de la mesure identifiée par l'étude pilote variabilité (Figure 20, p159). Les facteurs identifiés comme significatifs, en dépit de ce biais, peuvent être utilisés comme une mesure indirecte de la composition du bioaérosol. À l'issue de l'étude de cohorte, l'association de ces facteurs avec le statut clinique des enfants donnera des arguments susceptibles de guider la recherche de composants environnementaux associés à la protection des maladies allergiques.

Une seconde approche peut néanmoins être proposée dans l'évaluation des relations entre l'exposition au bioaérosol et les maladies allergiques, comme une alternative à la stratégie de la mesure individuelle. Cette démarche est fondée sur une stratégie d'exposition basée sur le groupe. Ainsi, comme il a été montré par l'étude pilote sur la variabilité et par les résultats de l'étude PASTURE_{microbio}, plusieurs paramètres majeurs sont associés avec des niveaux différents de contamination du bioaérosol. L'attribution aux sujets de la moyenne du groupe – définie par ces facteurs – ne serait pas soumise à un biais d'atténuation. Cette démarche a déjà été utilisée dans l'évaluation des expositions environnementales pour des postes professionnels en médecine du travail (Cf. p111).

En pratique, l'exposition moyenne dans cette seconde approche peut être estimée dans les chambres pour les enfants ruraux et fermiers. L'exposition à un nombre très élevé de micro-organismes est possible pour les enfants fréquentant l'étable, mais cette exposition dépend de la saison, de la session de travail et dans une moindre mesure du pays. En conséquence, trois facteurs peuvent être retenus pour construire des groupes

d'exposition homogène à l'étable : la saison, la session de travail et le pays. Au sein de chacun des groupes – pays 1-été-avant travail, pays 1-été-après travail, pays 1-hiver-avant travail, etc. – la moyenne de l'ensemble des individus pour chaque groupe peut être calculée. Ces valeurs nécessitent bien sûr d'être pondérées en fonction d'une estimation de la fréquentation de l'étable pendant la première année de vie pour le calcul de l'exposition (données issues du questionnaire général PASTURE). À l'issue de cette étape, et en ajoutant l'exposition au domicile, chacun des participants ruraux et fermiers présentera une estimation de son exposition au bioaérosol. Ces valeurs pourront dans l'avenir être utilisées dans le calcul des associations avec les maladies allergiques. Plusieurs paramètres microbiologiques pourront être testés séparément ou en commun, par exemple le total des micro-organismes fongiques, des actinomycètes ou des pollens.

Une troisième alternative de recherche pourrait concerner l'utilisation de la biodiversité des espèces contenues dans le bioaérosol. Mais, la stratégie d'analyse basée sur un score de biodiversité reste à construire. Cette approche est appuyée par les résultats d'Ege et al. qui ont démontré que chaque espèce animale de l'environnement à laquelle la mère a été exposée durant la grossesse augmentait l'expression des gènes des récepteurs de l'immunité innée chez l'enfant [97]. On peut poser l'hypothèse que chaque espèce animale possède sa propre flore bactérienne. L'augmentation du nombre d'espèce animale différente conduit à une augmentation de la diversité de l'exposition bactérienne, et probablement à une stimulation du système immunitaire. Cependant, du fait de la structure transversale de l'étude de Ege, ces résultats nécessitent d'être confirmés dans une étude prospective de cohorte.

Du point de vue environnemental, la stratégie d'échantillonnage de notre étude est basée sur des mesures ponctuelles (de 20 min dans l'étable et de 90 min dans les logements) et répétées en fonction de la saison. Nous avons souligné ci-dessus que cette démarche permet d'approcher l'exposition individuelle et un profil de contamination au long court d'un sujet. Pourtant, nous nous devons de discuter l'intérêt d'une stratégie alternative d'échantillonnage. Nombre d'études ont utilisé le recueil de poussières sédimentées dans l'étable, la maison et/ou le matelas pour mesurer l'exposition aux endotoxines bactériennes [97, 228, 392-394], aux $\beta(1-3)$ glucans et aux polysaccharides extracellulaires fongiques [97, 216, 219, 395] ou à l'acide muramique [218, 228, 394]. Cette stratégie d'échantillonnage nécessite cependant une standardisation en amont.

L'utilisation d'un support inerte, exposé pendant une période définie sur le lieu d'échantillonnage, permettrait le recueil de la fraction sédimentée du bioaérosol sur une période étendue et fixe. Elle offre une représentativité temporelle supérieure à une poussière sédimentée reflétant un temps de déposition non déterminé. Cette approche vient récemment d'être validée pour les supports électrostatiques inertes dans le cadre de l'échantillonnage des endotoxines [249]. Elle permet des comparaisons entre échantillons, mais n'autorise pas l'estimation des concentrations du bioaérosol, singulièrement lors des pics de contamination observés au sein du bioaérosol après session de travail (Figure 21, p189).

Au-delà des stratégies d'analyses et des approches épidémiologiques qui feront l'objet de discussion et d'adaptation aux objectifs de recherche, nos résultats ont mis en évidence un contraste entre l'environnement des logements ruraux et fermiers. Ces derniers présentent une contamination microbiologique remarquable portée par une importante diversité microbienne au domicile. À cela s'ajoute, l'exposition des enfants dans le milieu agricole à l'intérieur de l'étable où la charge microbiologique globale peut conduire à une exposition microbienne majeure.

- Quels sont les liens potentiels entre exposition microbienne dans l'environnement fermier et protection vis-à-vis des maladies allergiques?

Le contact avec les micro-organismes de l'environnement participe à la construction du système immunitaire [103] et l'hypothèse hygiéniste propose que cette interaction puisse protéger de la survenue des maladies allergiques. Sous cette hypothèse, les risques de maladies allergiques peuvent être diminués par les infections humaines (apparentes ou inapparentes) liées aux virus ou aux bactéries et par les expositions microbiennes non invasives. Par ailleurs, l'ensemble de ces expositions microbiennes (invasives ou non) pourrait influencer la réponse immunitaire innée ou acquise [106]. C'est dans ce cadre que se sont inscrites les recherches portant sur l'environnement fermier. Celles-ci ont démontré, par la constance de leurs résultats, un effet protecteur de l'environnement fermier. En conséquence, une meilleure connaissance de l'environnement microbiologique et des modalités d'exposition est devenue une question d'intérêt dans le domaine de la recherche en épidémiologie environnementale.

- ✓ Les éléments de l'implication potentielle des facteurs environnementaux microbiens dans la protection des maladies allergiques.

Plusieurs aspects issus de la littérature soutiennent l'implication potentielle des facteurs environnementaux microbiens dans la protection des maladies allergiques :

- I. Le premier est l'**implication des gènes liés à la barrière épithéliale** cutanée et/ou pulmonaire avec l'asthme. Cet élément illustre l'importance des interactions entre les stimulations environnementales issues du bioaérosol et ces interfaces épithéliales [79].
- II. Le second élément est constitué par les **gènes codant pour les récepteurs de la reconnaissance des structures microbiennes spécifiques**. Plusieurs interactions gène-environnement portant sur le milieu fermier et les maladies atopiques ont été identifiées. Nous pouvons citer le gène du *neuropeptide S*

receptor 1 (NPSR1) dans la population de l'étude PARSIFAL [98], et les gènes codant pour les récepteurs cellulaires de surface (TLR2, TLR4 et CD14) de l'immunité innée dans les études ALEX et PARSIFAL [96, 97]. Pour mémoire, la fonctionnalité de ces récepteurs est présentée dans le Tableau I (p44). Ces gènes codent pour les récepteurs de structures microbiennes conservées au cours de l'évolution ; notamment bactériennes comme le peptidoglycane et les endotoxines mais aussi fongiques comme les $\beta(1-3)$ glucans et les polysaccharides extracellulaires. Il a été démontré qu'il existe une amplification de l'expression des gènes des récepteurs de l'immunité innée anti-infectieuse chez les enfants fermiers [222].

III. Un troisième élément est **constitué par la relation dose-effet avec la fréquentation de l'environnement fermier**. Elle a été rapportée dans plusieurs études transversales [187-189] et ce, même chez des enfants non fermiers, mais ayant un contact régulier avec la ferme [182, 190]. L'identification d'un effet de **protection graduelle du contact précoce** avec les animaux sur la sensibilisation atopique est un argument supplémentaire. Celui-ci a été confirmé : pour l'exposition pendant la grossesse (aOR 0.36, IC_{95%} 0.25-0.51), pour l'exposition pendant la première année de vie (aOR 0.54, IC_{95%} 0.32-0.92), après la première année de vie (aOR 0.77, IC_{95%} 0.49-1.22) et enfin pour une exposition actuelle (aOR 0.71, IC_{95%} 0.43-1.20) [97]. Dans cette même étude, le contact de la mère en période prénatale avec les animaux de la ferme et l'étable a été relié avec une modification de l'expression des gènes de l'immunité innée (TLR2, TLR4 et CD14) chez la descendance suggérant l'intervention de mécanismes épigénétiques précoces. Ce facteur de proximité avec les animaux a aussi été associé à une diminution de la sensibilisation aux allergènes saisonniers au sang du cordon (aOR 0.38, IC_{95%} 0.21-0.70) dans l'étude de cohorte de naissance PASTURE [186].

IV. Pour le milieu fermier, plusieurs études ont démontré que le **contact avec les animaux de la ferme et l'étable est un facteur épidémiologique récurrent et d'amplitude notable** de la protection des maladies allergiques (cf. paragraphe sur les études des maladies allergiques en milieu fermier). Notons que ce contact avec les animaux de la ferme conduit implicitement à la fréquentation de l'étable. Parmi ces études, le contact fréquent avec l'étable, la grange ou la distribution de foins ont été associés à une diminution des symptômes de rhino-conjonctivite allergique

des 12 derniers mois ($p=0.007$) [97]. Une autre étude environnementale supporte le rôle potentiel des micro-organismes fongiques. Cette étude a porté sur un échantillon randomisé de fermiers et leurs épouses du sud-est de la Norvège et elle a permis d'identifier une association significative inverse entre la prévalence de l'asthme atopique (mais pas avec l'asthme non atopique) et la quantité d'endotoxines mais aussi avec l'exposition aux spores fongiques [220].

V. L'importance du **contact avec la flore environnementale bactérienne** comme un facteur potentiel des maladies allergiques. Une revue de littérature de Herten de 2006 a permis de rassembler les éléments en faveur de cette hypothèse. Les auteurs soulignent l'importance du mode vie traditionnel et de la ruralité, dont le régime alimentaire est associé à des aliments fermentés [396]. Ils démontrent une association temporelle entre le pourcentage de routes asphaltées en Finlande – considéré comme un marqueur indirect de l'urbanisation – et donc de la perte du contact microbien lié à la ruralité pour les auteurs – et l'augmentation de la prévalence d'asthme chez une population d'appelés au service militaire. Dans l'intervalle de temps étudié 1960-2000, la population des fermiers en Finlande a chuté de 20 % dans les années 70 à moins de 5 % en 2000. Nous pouvons toutefois émettre des réserves sur l'existence d'autres facteurs de confusion pour cette association. Mais pour ces auteurs, l'augmentation de l'urbanisation est un marqueur de la perte de contact de la population générale avec les micro-organismes environnementaux du sol pouvant favoriser la survenue des maladies atopiques. Ainsi, les micro-organismes du sol les plus fréquents sont les micro-organismes fongiques et les bactéries appartenant au phylum des *Actinobacteria* comme les actinomycètes (dont les *streptomyces* sp.) et les bactéries Gram positif (*Acinetobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Lactobacilli* sp., ...).

Des travaux de la même équipe ont suggéré le rôle potentiel des pathogènes humains et des contaminants bactériens de l'eau de boisson comme pouvant participer à la protection des maladies allergiques. L'étude comparative des populations finnoises et russes de Carélie a permis de démontrer que la séropositivité à *H.pylori* expliquait une part de la protection de l'atopie [397]. Un second travail portant sur les enfants de cette même étude princeps – *Kalerian Allergy Study* – a porté sur la fréquence de sensibilisation aux allergènes communs et la contamination de l'eau de boisson des écoles russes et finnoises. Les enfants

russe présentait des pourcentages de positivité aux aéroallergènes significativement plus faibles que les enfants finnois issus de la région voisine. Les écoles russes utilisaient pour leur alimentation en eau potable l'eau non traitée de surface des lacs voisins. La contamination bactériologique de l'eau des écoles russes était significativement plus importante que pour les écoles finnoises. Le compte cellulaire des échantillons (bactéries viables et non viables, algues et protozoaires) était significativement inversement associé à l'atopie, après ajustement sur le statut fermier des parents, et ce, de façon dose dépendante. Les auteurs suggèrent que cette contamination microbiologique soit un marqueur de contact des bactéries environnementales, dont les *Actinobacteria*, et pourrait avoir un rôle dans la modulation du système immunitaire. Par ailleurs, l'étude de la poussière sédimentée des maisons d'un sous-échantillon des participants a montré une contamination bactérienne plus importante dans les maisons russes, essentiellement des bactéries Gram positif (comme dans l'étude pilote des logements de PASTURE_{microbio}) en comparaison avec les logements finnois [394]. Cette contamination de la poussière sédimentée par les bactéries Gram positif a aussi été retrouvée dans une autre étude finlandaise [398].

L'ensemble de ces éléments démontre l'intérêt d'une meilleure connaissance des micro-organismes fongiques et bactériens dans l'environnement fermier. L'étude PASTURE_{microbio} offre la possibilité de déterminer ces niveaux de contamination et la composition microbiologique du bioaérosol dans les chambres des enfants et les fermes. D'après le questionnaire général de l'étude PASTURE, l'activité des femmes à la ferme pendant leur grossesse au sein de l'exploitation agricole était importante. Pour la population de l'étude PASTURE_{microbio}, les fréquences de présence à l'étable des mères des familles fermières pendant la grossesse étaient les suivantes : 41 % travaillant à plein temps, 23 % à mi-temps et 36 % ayant une fréquentation moins importante qu'une activité à mi-temps. Après la naissance, l'exposition des enfants en bas âge à la ferme est substantielle. En effet, 57 % des enfants fermiers sont habituellement présents lors de la distribution de foin et/ou d'ensilage dans la population de l'étude PASTURE_{microbio} avec une durée moyenne de présence de 23 minutes. Ces données démontrent bien qu'en dépit d'un temps restreint de présence dans la ferme, ces enfants peuvent être exposés par voie respiratoire, notamment mais pas exclusivement, à des quantités majeures de micro-organismes. Certains micro-organismes fongiques et bactériens présents au sein de ce bioaérosol agricole peuvent présenter des diamètres inférieurs à 10 µm et

atteindre le compartiment alvéolaire de l'arbre pulmonaire conduisant à une possible interaction avec l'épithélium et les cellules dendritiques (d'après la Figure 6, p84 et annexe IV, p240). Ces dernières, considérées comme des cellules sentinelles par certains auteurs, participent au déclenchement de la réponse immunitaire adaptative [399].

- ✓ Micro-organismes fongiques et protection vis-à-vis des maladies allergiques : un facteur environnemental sous-estimé?

Pour l'étable, la composition microbiologique est pour une large part d'origine fongique. Nous pouvons citer en été : par culture *Aspergillus* spp. (dont principalement *glaucus* et *fumigatus*), *Penicillium* spp. et *Absidia* spp. et par examen direct *Alternaria* spp., les petites spores (par convention *Aspergillus/Penicillium* spp. et certaines mucorales) et *Cladosporium* spp.. En hiver, ce profil de contamination se modifie partiellement. Ainsi *Aspergillus* spp. (dont principalement *A. glaucus* et *A. fumigatus*) est toujours présent en culture mais *Wallemia sebi* devient une espèce dominante dans le bioaérosol. Pour l'examen direct en hiver, *Aspergillus/Penicillium* spp. et *Cladosporium* spp. , et *Ustilago* spp. sont les espèces fongiques les plus importantes, mais soulignons qu'une part importante des spores recueillies n'a pu être identifiée.

Une revue de la littérature des effets sur la santé de l'exposition aux moisissures souligne les relations entre moisissures et l'asthme [400]. *Alternaria alternata* a été reliée à la présence, la persistance et la sévérité de l'asthme [401]. Nous avons bien observé dans l'environnement des quantités importantes d'*Alternaria* spp. en été particulièrement. Cependant dans l'étude PASTURE_{microbio}, la fréquence de sensibilisation à *Alternaria* spp. est significativement plus faible chez les pères fermiers comparés aux sujets ruraux (0 % vs. 7.1 %, $p_{\text{test exact de Fisher}}=0.01$). Il est surprenant d'observer, alors que l'exposition aux composés fongiques est fréquente en milieu fermier, des prévalences de sensibilisation plus basses chez les agriculteurs en comparaison avec leurs contrôles. Ces résultats n'ont à l'heure actuelle pas d'explication évidente et pourraient être rapprochés d'un effet *bystander* discuté ci-dessous pour les pollens. D'autre part, Eduard et al. ont identifié la quantité totale de spores fongiques comme un facteur protecteur après ajustement (sur l'âge, les antécédents familiaux

d'asthme et le type de ferme) de l'asthme allergique dans une étude transversale portant sur une population de fermiers norvégiens [402]. Notons que cette protection n'a pas été mise en évidence chez les fermiers présentant de l'asthme non atopique. Cette étude datant de 2004 est la première à rapporter un effet protecteur des spores fongiques, mais la discrimination en termes d'espèce n'a cependant pas été réalisée.

Pour les levures, 50 % et 30 % des prélèvements se sont avérés positifs en été et en hiver respectivement. Ce travail confirme l'importance des levures comme un contaminant estival au sein du bioaérosol des fermes. Des travaux supplémentaires sont indispensables pour améliorer la discrimination en termes d'espèces.

L'exposition aux moisissures peut aussi jouer un rôle dans la modulation de l'immunité chez l'homme. Ainsi, *Aspergillus umbrosus*, *Eurotium amstelodami*, *Absidia corymbifera* – et certains actinomycètes – ont été proposés comme des agents étiologiques des pneumopathies d'hypersensibilité, dont la maladie du poumon de fermier [314, 403]. La source principale d'exposition réside dans la manipulation de foin, de céréales, de pailles ou de substances végétales moisies [313, 318, 404]. La physiopathologie de cette affection est basée sur une réaction initiale de type III puis de type IV à médiation cellulaire (cytotoxicité et réaction granulomateuse) que nous pourrions schématiquement situer à l'opposé de la réaction atopique IgE dépendante. Les conséquences infra-cliniques de l'exposition en milieu fermier aux moisissures et les liens potentiels avec modulation immunitaire des maladies allergiques restent encore à déterminer. L'utilisation d'un modèle murin peut apporter des éléments d'explication, mais d'ores et déjà l'étude des récepteurs de l'immunité innée permet de désigner des pistes de recherche. La reconnaissance des structures fongiques par l'immunité innée est connue pour les récepteurs TLR2, TLR4 mais aussi pour le récepteur aux β -glucans Dectin-1 exprimé sur les cellules dendritiques, mastocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles [405, 406]. Pour ce dernier, la réponse cellulaire induite est dépendante de l'activation de la voie du TLR2 suggérant que les β -glucans agiraient comme une co-stimulation [252, 407]. Brown a synthétisé dans une revue la littérature la réponse cellulaire aux β -glucans proposé Annexe II (p237).

La stimulation par les β -glucans entraîne la production d'IL-12 et IFN- γ favorisant une réponse Th1 favorable à aux activités cellulaires antifongiques. Par ailleurs, la stimulation des cellules dendritiques induit la sécrétion d'IL-2 et d'IL-10 limitant les phénomènes inflammatoires et pouvant indirectement favoriser la

persistance des micro-organismes fongiques. De par leur capacité à activer la voie Th1, les micro-organismes fongiques sont des candidats potentiels à la protection contre des maladies allergiques dans le milieu fermier. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer une interaction gène-environnement pour les récepteurs de l'immunité innée dévolus à la reconnaissance des micro-organismes fongiques comme illustré pour les récepteurs aux endotoxines bactériennes [408].

- ✓ Micro-organismes bactériens et protection vis-à-vis des maladies allergiques : un défi face à la complexité de l'environnement?

Pour les bactéries, trois genres bactériens à coloration Gram positif dominant la flore du bioaérosol : *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Bacillus* avec des concentrations supérieures à 10^3 UFC/m³ après un isolement sur milieu MH. Mais il existe une large biodiversité bactérienne environnementale et la poursuite de l'évaluation de l'exposition nécessite donc un niveau de discrimination plus élevé. Des recherches complémentaires sur un nombre étendu de prélèvements et l'utilisation de techniques d'identification directe par la biologie moléculaire doivent être proposées.

Comme nous l'avons déjà démontré, la fréquentation de l'environnement fermier correspond à une forte exposition aux micro-organismes fongiques et bactériens dans l'étable et dans une moindre mesure au domicile. Dans ce contexte, des études sur un modèle murin ont cherché à étudier les propriétés de la poussière sédimentée issue du bioaérosol. Ainsi, **la poussière sédimentée de la maison** (recueillies dans des chambres avec et sans animaux domestiques) a démontré des propriétés immunostimulatrices dépendantes de la voie des *Toll-like receptors* (2,4 et 9) des cellules dendritiques au sein d'un modèle murin [409]. Cela a été confirmé en 2007 par Batzer et al., qui souligne l'importance des TLR (2,4 et 9) dans la signalisation de la réponse immune à la stimulation des cellules dendritiques par les extraits de poussières sédimentées du logement [410]. Mais, les conséquences de la stimulation des voies des récepteurs Toll sur les maladies allergiques sont complexes. En effet, il a été suggéré dans des modèles *in vivo* et *in vitro* que les ligands des récepteurs Toll (peptidoglycane pour le TLR-2 et oligodéoxynucléotide DNA pour le TLR9) pouvaient à la fois prévenir ou précipiter le phénotype asthmatique [411]. De la même manière, les extraits de poussières sédimentées de maison ont démontré à la fois des propriétés adjuvantes sur l'orientation Th2 et tolérogène dans un modèle murin d'exposition par voie nasale [412].

Pour **la poussière sédimentée de l'étable**, une étude du groupe de travail ALEX a analysé les effets sur l'immunité au moyen d'un modèle murin utilisé dans l'étude de l'asthme. Les souris ont été exposées aux extraits de poussières sédimentées d'étable

(n=30, provenant de fermes d'Allemagne, de Suisse et d'Autriche). Cette étude présente plusieurs résultats d'importance. L'inhalation d'extraits de poussières d'étables lors de la sensibilisation à l'ovalbumine a inhibé le développement de l'hyperréactivité bronchique, de l'éosinophilie dans les voies aériennes, de la production des immunoglobulines IgG et IgE spécifiques de l'ovalbumine et de l'IL 5 par les splénocytes. Les auteurs rapportent que l'activité observée n'est pas seule dépendante du LPS mais qu'il existe très probablement d'autres substances dans la poussière capable d'interagir avec l'immunité cellulaire [413]. Une seconde étude a cherché à évaluer l'effet des extraits de poussières sédimentées recueillies dans les étables sur les cellules dendritiques murines. Dans ce travail, l'exposition prolongée aux extraits de poussières d'étables réduit la capacité d'induction d'atopie des cellules dendritiques. Par ailleurs, les résultats illustrent le rôle de la sécrétion autocrine d'IL-10 dans ce mécanisme de régulation des cellules dendritiques par les extraits de poussières d'étables [414].

En 2007, la même équipe de recherche a démontré que **deux espèces bactériennes *Acinetobacter lwoffii*** (Gram négatif, voie d'activation par les TLR2, TLR4, NOD1 et NOD2) et ***Lactococcus lactis*** (Gram positif, voie d'activation par le TLR2) étaient capable de réduire la réaction allergique dans un modèle murin. Elles peuvent induire une maturation des cellules dendritiques vers la sécrétion d'IL-12 et favoriser l'expression des marqueurs d'orientation des cellules T vers une polarisation de type Th1 [415]. L'effet a été obtenu pour des doses plus faibles d'*A. lwoffii* que de *L. lactis*. En 2008, Vogel a étudié les propriétés des spores de *Bacillus licheniformis*. Notons que cette bactérie a été fréquemment isolée de la poussière des étables en fin de saison et reliée à l'utilisation de foin [416] et a été isolée dans l'étude de Vogel et al. dans la poussière d'étable (n=36) et de matelas (n=61) provenant de 24 fermes traditionnelles bavaroises. *In vitro*, les spores de *B. licheniformis* (mais pas la forme végétative) ont entraîné une activation de la sécrétion de cytokines de profil Th1 et, *in vivo*, une activation immunitaire entraînant un afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau des tissus pulmonaires chez les souris, reproduisant un modèle murin d'asthme. Les auteurs concluent que les spores *Bacillus* peuvent contribuer à l'effet protecteur du milieu fermier, et ce, peut-être de façon synergique avec d'autres bactéries de l'environnement fermier. Cette revue des travaux portant sur l'évaluation des effets immunologiques des composés bactériens ou leurs dérivés est dans la ligne de l'article de Vermaelen et Pauwels sur l'état de connaissances des cellules dendritiques pulmonaires [399]. Une présentation schématique du concept figure en Annexe IV (p

240). Les auteurs proposent que la présence des *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs ou profil de reconnaissance des structures microbiennes spécifiques) peut avoir un rôle clé sur la maturation des cellules dendritiques et sur l'orientation Th1 ou Th2 des cellules en aval de la cascade de régulation. Une étude approfondie de l'environnement bactérien des étables est maintenant une étape incontournable dans la compréhension et dans la sélection de micro-organismes potentiellement candidat à la protection contre les maladies allergiques.

Mais ces résultats sur les composants viables de la poussière sédimentée issus du bioaérosol n'excluent pas la possibilité d'une activation du système immunitaire par d'autres composants dérivés de ces micro-organismes. Nous ne reviendrons pas sur les endotoxines déjà traitées dans la partie introductive de ce travail de thèse, mais il est nécessaire de porter attention **aux motifs répétés d'ADN CpG**. Ces motifs sont des ligands du récepteur TLR9 [417] qui ont été identifiés comme protégeant de la transmission de l'asthme de la mère à la descendance dans un modèle murin. Il existe des quantités importantes d'ADN bactérien dans l'environnement fermier et cela pourrait constituer une autre voie d'immunomodulation favorable à la protection vis-à-vis des maladies allergiques [418]. Un schéma des mécanismes de régulation du système immunitaire inné et adaptatif est présenté dans l'Annexe VI (p 242) [419]. Ces composés issus de poussières d'étables potentialisent l'effet des endotoxines sur la production d'Il-10 et d'Il-12p40 dans un modèle *in vitro* d'activation des cellules mononuclées périphériques humaines [418]. Mais comme le notait D. Vercelli, devant les échecs des premiers essais thérapeutiques [420], des études complémentaires fondamentales et cliniques sont encore nécessaires pour pouvoir utiliser cette approche en thérapeutique [421].

Dans notre travail, la contamination de l'environnement des étables par les **actinomycètes mésophiles** est élevée en été, en particulier après la session de travail (de l'ordre de 10^5 UFC/m³). En hiver, il existe une double contamination par les actinomycètes mésophiles et thermophiles influencée par la distribution de foin. De ce fait, les enfants fréquentant l'étable sont très exposés à ces agents microbiens. Cette exposition est spécifique du milieu fermier et n'est pas retrouvée chez les enfants ruraux. Elle constitue un **paramètre environnemental discriminant** dans le profil d'exposition entre enfants ruraux et fermiers. Cette contamination bactérienne majeure par les actinomycètes n'a pas fait l'objet, à notre connaissance, de travaux similaires *in*

vitro et *in vivo* portant sur la modulation de la réponse immunitaire dans le cadre de la protection des maladies allergiques. Des voies de recherches seraient donc à promouvoir dans ce domaine.

Tenant compte que chez les enfants atopiques, la sécrétion retardée dans le temps d'IFN- γ favorise l'expression du phénotype Th2 et d'une sensibilisation IgE médiée [131, 132], nous pouvons poser l'hypothèse que la stimulation immunitaire par l'ensemble des composés microbiens de l'environnement fermier puisse entraîner un basculement vers la voie Th1 et diminuer la prévalence des maladies allergiques. Cette hypothèse est étayée par les résultats récents de Schaub et al. qui ont démontré que les cellules T régulatrices étaient plus nombreuses dans le sang du cordon des mères vivant à la ferme (avec une expression plus importante de FOXP3) [231]. Dans cette étude, la suppression des cellules effectrices Th2 était plus efficace pour les mères vivant à la ferme. L'hypothèse d'une **modification épigénétique** de la méthylation – ou l'accessibilité à la transcription, pour approfondir sur point voir la revue de la littérature de *Nature reviews Immunology* par Wilson et al [422]– du gène FOXP3 est plausible. Elle est basée sur deux événements successifs d'abord une interaction « gène(s)-environnement microbien fermier » chez la mère induisant une modification de la réponse immune, puis une seconde interaction materno-fœtale conditionnant l'orientation du système immunitaire du nouveau-né potentiellement présente jusqu'à l'âge scolaire de l'enfant [97]. Holt dans son éditorial de 2008 dans *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* présente le débat sur la capacité des allergènes à marquer la mémoire immunitaire en période prénatale et/ou postnatale, soulignant par ailleurs que l'étude de cohorte PASTURE est une étude pouvant apporter des premiers éléments de réponse [59].

- Quels sont les liens potentiels entre expositions aux pollens dans l'environnement fermier et la protection vis-à-vis des maladies allergiques ?

L'environnement fermier est défini par une exposition aux pollens de *Poaceae* avec deux caractéristiques majeures : (i) la possibilité d'une **exposition répétée** aux pollens à l'étable en hiver même en dehors de la distribution de fourrage et (ii) la présence de **pics de concentrations** en été et en hiver après session d'alimentation dans les étables. Ces pics dépassent largement les valeurs moyennes observées lors de la saison pollinique estivale (Figure 10, p107 et Figure 21, p189). Ils sont transitoires et le retour au niveau de base s'effectue en général dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt du travail (Figure 20, p159). Nous pouvons conclure que les enfants fréquentant l'étable et les parents fermiers y travaillant bénéficient d'une exposition perannuelle en comparaison avec les familles rurales.

Comme pour les variables microbiologiques discutées ci-dessus, un certain nombre de facteurs sont significativement associés aux concentrations mesurées. Nous retenons en premier lieu la distribution de fourrage avec une augmentation des concentrations, majorée en l'absence de ventilation de l'étable et pendant la saison d'hiver. Il existe un effet lié au pays avec des concentrations plus élevées dans les fermes françaises, où l'utilisation de foin séché comme fourrage est fréquente. Les valeurs mesurées dans les étables entravées, généralement anciennes et parfois confinées, sont plus importantes que dans les exploitations agricoles dites modernes avec une stabulation libre du bétail aux volumes importants.

Il est légitime de poser la question de l'effet de cette exposition pollinique sur la diminution observée dans le milieu fermier à la fois de la sensibilisation aux *Poaceae* mais aussi de la prévalence des symptômes de rhinite pollinique. Le cadre conceptuel de cette protection pourrait se rapprocher de la désensibilisation par voie orale pour laquelle **l'administration répétée d'un allergène** conduit à la désensibilisation du patient. Bien que les mécanismes de désensibilisation ne soient pas totalement élucidés, ils seraient en relation avec une activation des cellules Treg qui diminuerait la réponse inflammatoire tardive [423]. Le nombre de cellules Treg (Foxp3+CD3+CD25+) est plus élevé dans la muqueuse nasale après désensibilisation par voie injectable pour les pollens de graminées [424]. Il existe par ailleurs une induction d'une réponse IgG allergène

spécifique probablement contrôlée par la sécrétion d'IL-10 [425-428] , d'IFN- γ et/ou d'IL-12 [429, 430]. Une présentation schématique des mécanismes de régulation des cellules Treg est présentée en Annexe V (p 241) [3].

Dans la marche atopique classique, la rhino-conjonctivite allergique aux pollens apparait en général après le troisième anniversaire, soit après au moins deux saisons d'exposition aux pneumallergènes polliniques [70]. Dans l'environnement fermier, ce schéma d'exposition est différent avec une **exposition perannuelle**, accompagnée ou non d'expositions ponctuelles à des quantités extrêmement importantes de pollens de graminées intacts ou fragmentés. Ceci pourrait induire un mécanisme d'induction de tolérance, comme cela a été proposé avec l'allergène du chat pour lequel une exposition continue et importante dans l'enfance diminuait le risque de sensibilisation au chat [431, 432]. Un modèle murin a permis de démontrer que l'inhalation discontinue provoquait une sensibilisation alors que l'inhalation chronique induisait une tolérance. De plus, l'induction d'une tolérance à l'ovalbumine par une exposition respiratoire répétée a été possible au sein d'un modèle murin [433]. Cette tolérance a été caractérisée par une diminution de la production d'IgE et d'IgG1 spécifiques de l'ovalbumine et de l'éosinophilie des voies respiratoires. D'une façon surprenante, cette induction de tolérance a entraîné une suppression de l'éosinophilie respiratoire aux acariens. Cet effet dit **bystander effect** pourrait être attribué selon les auteurs à la sécrétion d'IL-10 (Figure 3, p60). Les résultats obtenus avec ce modèle de laboratoire pourraient expliquer pourquoi la protection de l'environnement fermier protègerait aussi de la sensibilisation vis-à-vis d'autres allergènes environnementaux. Cependant, ce cadre conceptuel ne doit pas masquer le rôle majeur et peut-être synergique de la co-stimulation par les micro-organismes de l'environnement fermier sur le système immunitaire.

Par ailleurs, les conséquences immunologiques de l'exposition aux pollens de Poacées dans le milieu fermier restent à approfondir. En effet, les pollens recueillis par les systèmes de surveillance nationaux sont des grains en majorité intacts dont les capacités aérologiques sont conservées. Dans le bioaérosol fermier, une fraction importante de ces grains issus du foin sont pliés ou fragmentés modifiant leurs diamètres aérodynamiques et leurs contenus. Ainsi, le dépôt de la **fraction inhalée** pourrait s'effectuer plus profondément dans l'arbre respiratoire. De plus, une interrogation demeure sur la possibilité d'une exposition plus importante des allergènes

pour les pollens fragmentés en comparaison aux pollens intacts. Il est aussi décrit que les grains de pollen contiennent des NAD(P)H oxydases et des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires *eicosanoïd-like* dont l'effet fonctionnel est proche des leucotriènes [341]. La stimulation des cellules dendritiques par les lipides d'origine pollinique est dépendante, au moins en partie, des récepteurs de surface CD1 [350]. Ces molécules sont reconnues par les lymphocytes T [343] et ont un effet immunitaire propre en favorisant la polarisation Th2 [344-346], en réduisant la production IL-12 par les cellules dendritiques et en favorisant un microenvironnement propice à la différenciation cellulaire Th2 [347-349]. Il n'existe cependant pas de travaux portant sur la conservation de ces molécules dans le fourrage au sein des grains de pollen. Est-il possible que l'exposition aux graminées à l'étable n'inclue pas une réaction immunitaire induite par ces composés ayant disparu lors de la conservation du foin ? Quels en sont alors les conséquences sur la sensibilisation aux graminées, sur l'activation du CD1 et sur l'induction ou non d'une tolérance lors de l'exposition pendant de la distribution de fourrage à l'étable ?

Enfin, cette exposition pollinique comporte une caractéristique originale supplémentaire. Comme nous l'avons souligné précédemment, cette exposition pollinique est accompagnée d'une exposition importante et diversifiée aux composés microbiologiques présentes dans le bioaérosol. Une question captivante de recherche émerge alors : **quels sont les liens entre cette co-exposition et la protection des maladies allergiques observées en milieu fermier ?** Nous pouvons formuler des hypothèses basées sur la littérature. Il est admis que les oligonucléotides bactériens d'ADN, constitués de motifs répétés de séquences non méthylées de cytosine et de guanosine, sont des composés stimulant l'immunité innée via le récepteur Toll 9 (Tableau I, p44). D'autres séquences d'ADN ont montré des propriétés immunostimulatrices prometteuses (les oligonucléotides antisens, et les *small interfering RNA* (siRNA)) [434]. Ces composés peuvent diminuer la réponse Th2 par l'induction d'IFN- γ ou d'IL-10 [435]. Ils ont d'ailleurs été proposés comme adjuvant à l'immunothérapie [434, 436, 437]. Compte tenu de la charge microbienne élevée du milieu fermier, une exposition combinée de ces composés avec les pollens est plausible et la question de son rôle dans la protection des maladies allergiques nécessite des investigations futures en épidémiologie environnementale.

La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance.

Claude Bernard

CONCLUSION

À l'issue de ce travail, il apparaît que l'environnement fermier fournit une situation d'exposition singulière. Cet environnement constitue une niche épidémiologique, au sens écologique du terme, au sein des changements globaux de mode de vie et de consommation des sociétés occidentalisées. Le bioaérosol des fermes rassemblant à la fois des quantités majeures de contaminants bactériens, d'actinomycètes, de micro-organismes fongiques, de levures et de fragments de végétaux et de pollens de graminées, de parasites et probablement de virus, se distingue de celui des résidents ruraux et urbains. Il est vraisemblablement associé à un mode de consommation différent : une utilisation plus fréquente des légumes et des fruits issus du potager, la consommation de produits laitiers au lait cru et un recours raisonné au praticien. Comment alors faire la distinction entre tous ces facteurs dans les études épidémiologiques portant sur la protection des maladies allergiques ?

Cette question est un véritable défi puisque nombre de ces expositions sont conjuguées et, par définition, difficiles à discriminer dans les modélisations statistiques. Les études fondamentales portant sur l'un ou l'autre de ces contaminants ont déjà débuté apportant des premiers, mais encore fragmentaires, éléments de réponse au regard de la complexité de la régulation du système immunitaire inné et adaptatif. Ces travaux sont encore insuffisants et n'ont pas porté sur les conséquences de l'exposition aux actinomycètes et aux pollens. La complémentarité et la transversalité de ces approches, concrétisée dans le va-et-vient entre épidémiologie environnementale et les disciplines fondamentales, fera croître nos connaissances et, peut-être nous rapprochera d'une stratégie de prévention des maladies allergiques basées sur l'hypothèse hygiéniste au sens large.

Il est légitime de poser l'hypothèse de l'influence de cet environnement sur la polarisation initiale de la réponse immune des lymphocytes fœtaux et ensuite de l'enfant dans sa première année de vie. En effet, cette période de la vie fœtale au premier anniversaire représente une fenêtre de temps pendant laquelle le fœtus perçoit des signaux de l'environnement via la mère et où peuvent être mis en place des mécanismes

épigénétiques de régulation du système immunitaire. Quelle belle démonstration biologique que celle de la préparation par l'organisme de la mère de la descendance au contexte environnemental de la naissance ! N'y aurait-il pas là matière à étudier l'immunité des veaux à l'étable dans une école vétérinaire ?

Mais il existe encore des obstacles sur le chemin de la résolution de ces questions scientifiques. Ne faut-il pas aborder l'environnement fermier comme un environnement complexe, où l'ensemble des paramètres apporte d'une façon synergique une protection et une modulation du système immunitaire ? Sous cette hypothèse, la recherche d'un facteur microbien unique à la protection est-elle réellement possible, voire plausible ? Parmi ces obstacles, citons aussi le caractère polygénique des maladies atopiques et en particulier de l'asthme. Mais les progrès technologiques colossaux en génétique durant ces dix dernières années permettent déjà de surmonter les difficultés liées à l'hétérogénéité génétique des populations étudiées. Ceci commence à être démontré par les études sur les maladies atopiques portant sur les interactions gène-environnement.

Enfin, les maladies allergiques sont-elles le tribut de la modernisation de nos sociétés ? Elles constituent peut-être les prémices d'une adaptation immunologique de l'homme à un nouvel environnement caractérisé d'une façon globale par un contact microbien environnemental plus « distant » et moins varié qu'auparavant, mais où l'exposition aux molécules chimiques d'origine anthropique est en perpétuelle augmentation et certainement source, dans l'avenir, de nouvelles voies de recherche en épidémiologie environnementale.

Annexes

Liste des annexes

Annexe I : Diversité des cellules CD4+.

Annexe II : Structure membranaire d'une bactérie Gram négatif.

Annexe III : Réponse cellulaire médiée par le récepteur Dectin-1 pour les β -glucans fongiques.

Annexe IV : Réponse des cellules dendritiques pulmonaires aux stimuli aériens inhalés.

Annexe V : Rôle potentiel des cellules T régulatrices et des cytokines dans l'immunothérapie allergène-spécifique.

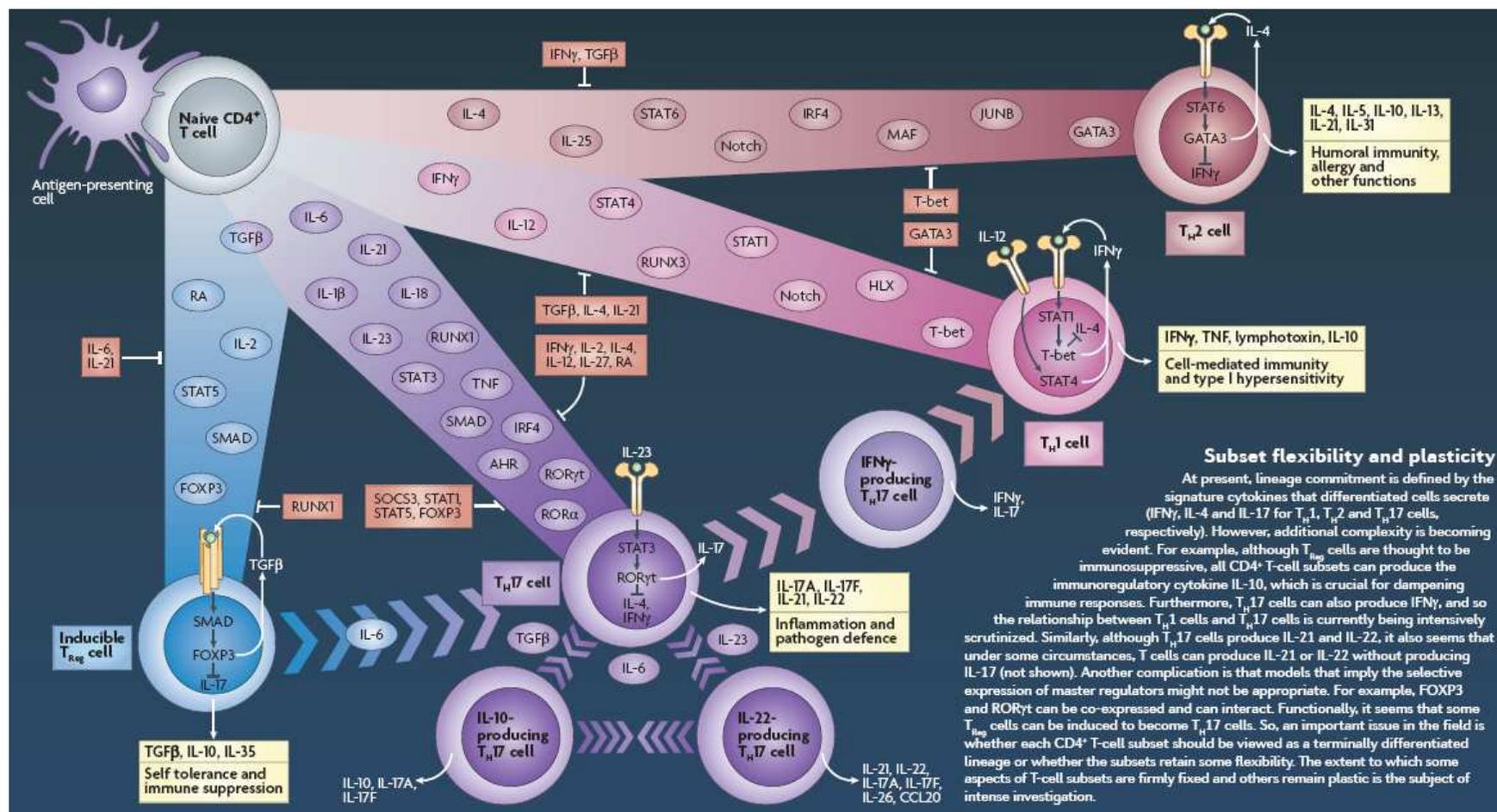
Annexe VI : Mécanismes de régulation du système immunitaire inné et adaptatif par les CpG oligodéoxynucléotides (CpG ODNs).

Annexe VII : Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. Eur Respir J 2007; 29: 706–712

Annexe VIII : High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? Allergy 2009; 64: 1068–1073.

Annexe IX : Evaluation of bioaerosol variability in indoor farming environments. En review. Occupational and Environmental Medicine Aout 2009.

Annexe I : Diversité des cellules CD4+.

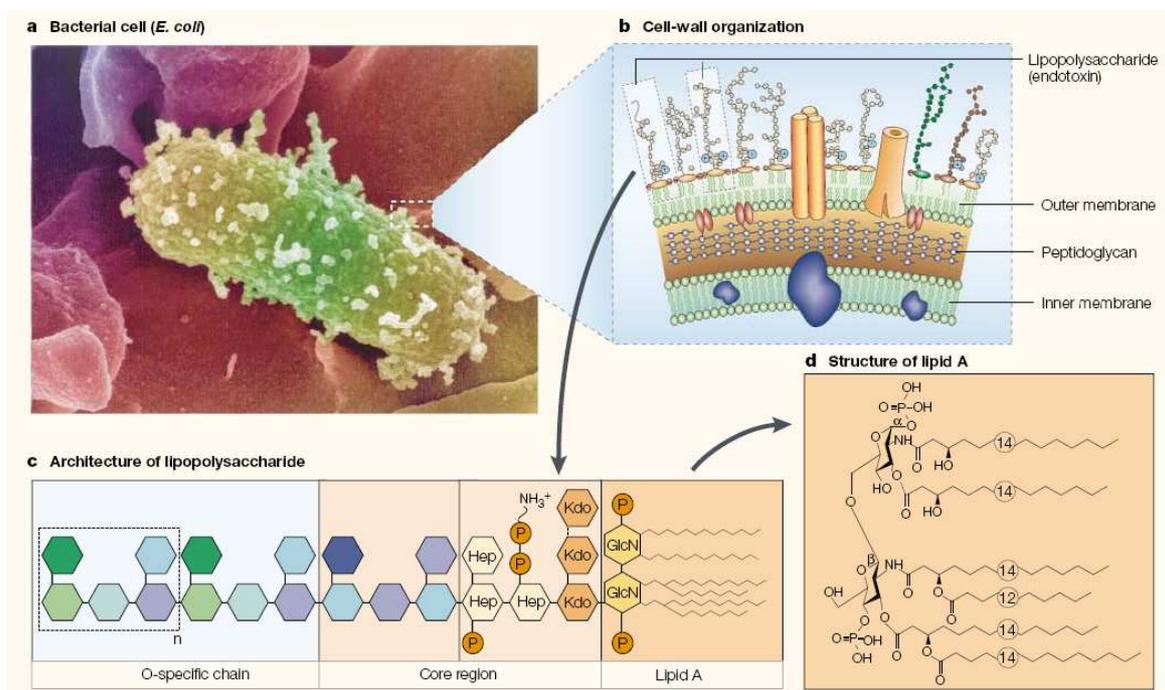


Extrait du poster sur les sous-populations lymphocytaires issues des lymphocytes T CD4⁺, leurs voies de signalisations, les cytokines et les facteurs de transcriptions associés à leurs différenciations.

D'après CD4⁺ T-cell diversity O'Shea, A Laurence et A. Adamson. Nat Rev Immunol, Fev 2009 Vol 9 No 2. (<http://www.nature.com/nri/posters/cd4t-celldiversity/index.html>). [145]

Annexe II : Structure membranaire d'une bactérie Gram négatif.

Structure membranaire d'une bactérie Gram négatif.



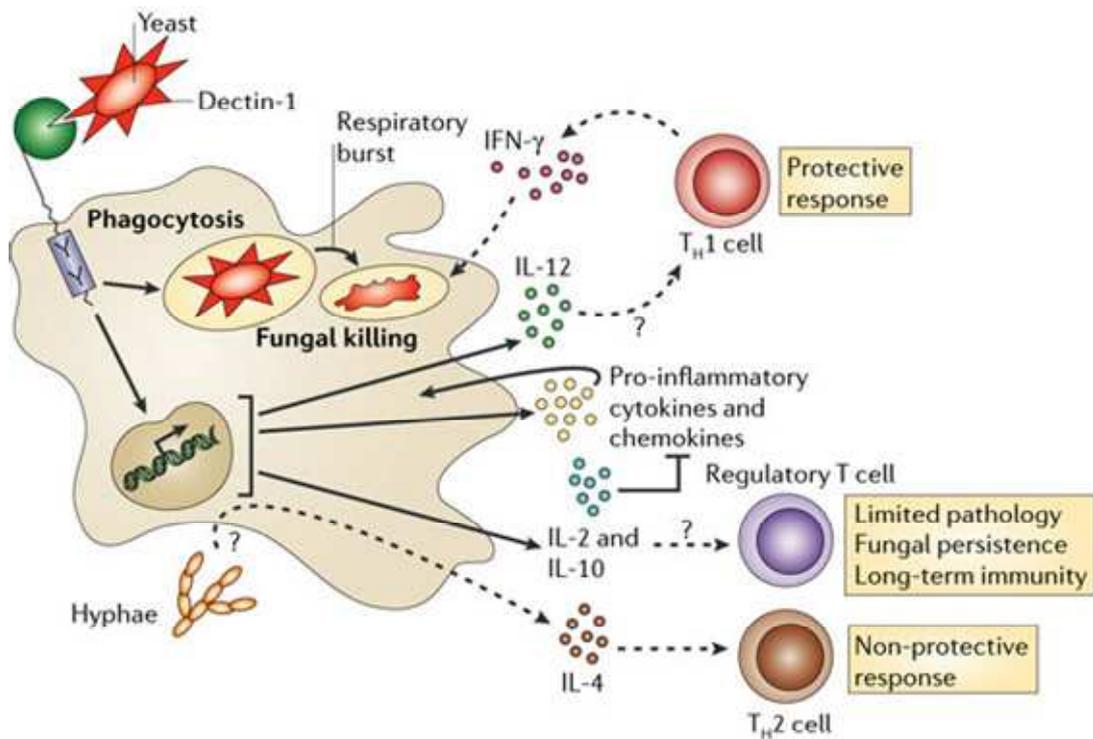
Légende : Photographie en microscopie électronique d'*Escherichia coli* (a), représentation schématique du lipopolysaccharide (LPS ; endotoxine) dans la paroi cellulaire bactérienne (b) et l'architecture des LPS (c) et structure primaire du centre toxique des LPS, le composant du lipide A (d).

D'après Beutler, B. and E.T. Rietschel, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(2): p. 169-76. [330]

Annexe III : Réponse cellulaire médiée par le récepteur Dectin-1 pour les β -glucans fongiques.

Réponse cellulaire médiée par le récepteur

Dectin-1 pour les β -glucans fongiques

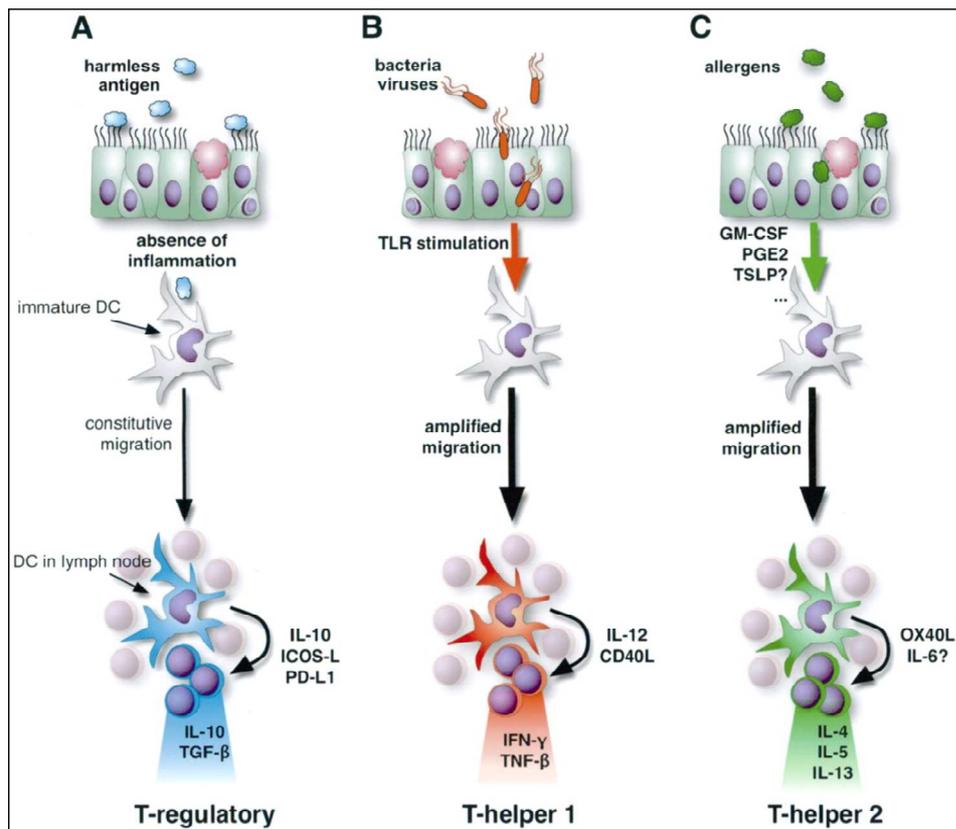


Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

D'après Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor *Nat Rev Immunol* 6: 33–43, [407].

Annexe IV : Réponse des cellules dendritiques pulmonaires aux stimuli aériens inhalés.

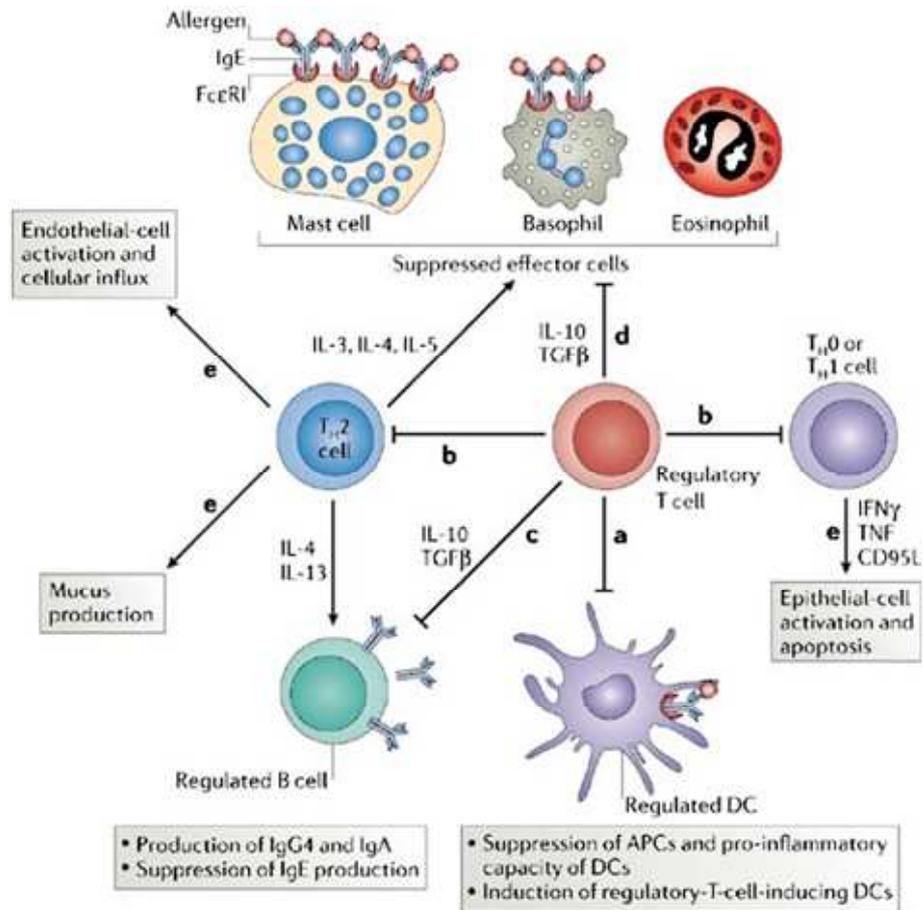
Réponse des cellules dendritiques pulmonaires aux stimuli aériens inhalés



D'après Vermaelen, K. and R. Pauwels, Pulmonary dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(5): p. 530-51. [399]

Annexe V : Rôle potentiel des cellules T régulatrices et des cytokines dans l'immunothérapie allergène-spécifique.

Rôle potentiel des cellules T régulatrices et des cytokines dans l'immunothérapie allergène spécifique



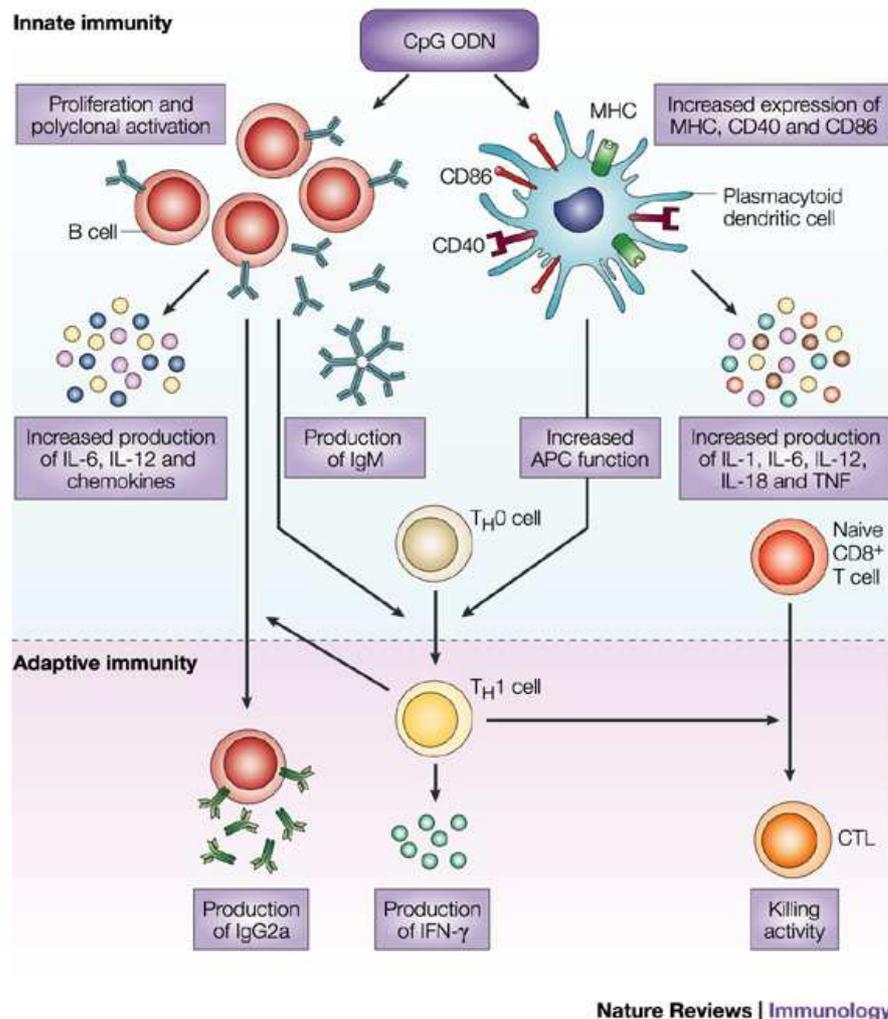
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Légende : Les cellules de Treg et les cytokines de normalisation - l'interleukin-10 (IL-10) et le TGF β - pourraient contribuer à la commande des immuno-réactions allergènes induites de cinq manières : **suppression des cellules présentatrice d'antigène (APCs)** qui soutiennent la génération des lymphocyte Th2 et Th1 (a) ; **suppression directe des cellules Th2 et Th1** (b) ; **suppression de la production d'IgE allergène spécifique**, et **induction de la production d'IgG4 et/ou d'IgA allergène-spécifique** (c) ; et **suppression des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles** (d). En outre, il a été observé une **inhibition indirecte des phénomènes de Th2 associés** (tels que la production de mucus, l'activation des cellules endothéliales et l'afflux cellulaire) et des phénomènes de Th1 associés (tels que l'activation et l'apoptose des cellules épithéliale) (e). CD95L, CD95 ligand; DC, dendritic cell; Fc ϵ RI, high affinity receptor for IgE; IFN γ , interferon- γ ; TNF, tumour-necrosis factor.

D'après Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nat Rev Immunol, 2006. 6(10): p. 761-71.[3].

Annexe VI : Mécanismes de régulation du système immunitaire inné et adaptatif par les CpG oligodéoxynucléotides (CpG ODNs).

Mécanismes de régulation du système immunitaire inné et adaptatif par les CpG ODNs.



Légende : Les oligodéoxynucléotides CpG activent directement les cellules B humaines et les cellules dendritiques, créant un milieu riche en cytokines pro-inflammatoires de type Th1. Cette réaction immunitaire innée forme une base sur laquelle l'immunité adaptative antigène-spécifique est ajoutée. En particulier, en améliorant la fonction des cellules présentant l'antigène, les CpG ODNs facilitent la génération de l'immunité humorale et cellulaire dite vaccin-spécifique. CTL, lymphocyte cytotoxique T ; IFN- γ , interféron- γ ; IL, interleukine ; TNF, *Tumor necrosis factor*.

D'après Klinman, D.M., Immunotherapeutic uses of CpG oligodéoxynucléotides. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(4): p. 249-58, [419].

Annexe VII : Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. Eur Respir J 2007; 29: 706-712



Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis

C-M. Fenoglio^{*,#}, G. Reboux^{#,†}, B. Sudre^{#,†}, M. Mercier^{*,#}, S. Rousset^{#,†},
J-F. Cordier⁺, R. Piarroux^{#,†} and J-C. Dalphin^{#,§}

ABSTRACT: Serum precipitins have a controversial diagnostic value in hypersensitivity pneumonitis (HP). The present authors' objective was to assess their diagnostic value by developing scores from a panel of specific antigens tested by two techniques (electrosyneresis and double diffusion) to discriminate active HP from other interstitial lung diseases.

Consecutive patients presenting with a condition for which HP was considered in the differential diagnosis were included in the study. All patients underwent the same standardised diagnostic procedure, including precipitin tests performed in routine conditions. Clinical manifestations, bronchoalveolar lavage and high-resolution computed tomography defined the presence or absence of HP. Receiver-operating characteristic curves and logistic regression were used to develop the serological scores.

A total of 122 patients (including 31 cases of HP) were included in the study. Five antigens from the panel were selected for the serological scores (*Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Saccharopolyspora rectivirgula* and mesophilic *Streptomyces* sp.). Electrosyneresis was more discriminative than the double-diffusion technique. Predictive negative values varied 81–88% and predictive positive values varied 71–75% for prevalence of HP 20–35%.

In conclusion, serological scores using a panel of relevant antigens may guide both biological and clinical practice in areas of high prevalence of hypersensitivity pneumonitis.

KEYWORDS: Diagnosis, hypersensitivity pneumonitis, precipitins, prospective study, serology

Interstitial lung diseases (ILDs) represent a large group of diseases that includes hypersensitivity pneumonitis (HP). HP, also called extrinsic allergic alveolitis, is a syndrome that results from an immunologically induced inflammation of the lung parenchyma in response to inhalation of a large variety of antigens to which subjects have been previously sensitised. Despite its apparently low prevalence, the impact of HP in individuals of all ages throughout the world continues to be a major concern [1]. The most common forms are farmers' lung (FL) and bird breeders'/fanciers' lung (BBL). Their prevalence rates and distribution vary widely among countries and geographical locations due to local customs and occupational and climatic conditions [2]. Differential diagnosis between HP and other ILDs is difficult and relies on an array of signs or criteria [1, 3–5]. Although nonconsensual, these diagnostic indicators generally include the following: 1) clinical symptoms and signs developed in an appropriate environment; 2) the presence of precipitating antibodies against offending antigens;

3) consistent chest radiograph or high-resolution computed tomography (HRCT); 4) bronchoalveolar lavage (BAL) lymphocytosis; 5) decreased carbon monoxide diffusion capacity; and/or 6) a granulomatous reaction on lung biopsies; and/or 7) a positive inhalation challenge. Among the above-mentioned indicators, the diagnostic value of serum precipitins has long been controversial [6], particularly because of their lack of sensitivity and, especially, of specificity [7]. These limitations may be due to the use of poorly purified antigens, the lack of the specific inciting antigen in the test panel, inappropriate techniques [8] or, in epidemiological studies, the use of inappropriate control groups [5, 9, 10]. Despite the pitfalls presented above, a recent multicentre study by LACASSE *et al.* [4] identified serum precipitins as a significant predictor of HP, regardless of exposure (odds ratio 5.3 (95% confidence interval (CI) 2.7–10.4)). However, the choice of antigens tested and the use and interpretation of tests were left to each investigating centre according to their usual local practice; thus, the diagnostic value of precipitins could not be

AFFILIATIONS

^{*}Dept of Biostatistics, University of Franche-Comte, and

[#]SERF (Santé et Environnement Rural, University of Franche-Comté) Group

[†]Dept of Mycology and

[§]Dept of Respiratory Diseases, CHU Besançon, Besançon

⁺GERM'O'P, Dept of Respiratory Diseases, Hôpital Louis Pradel, Lyon, France.

CORRESPONDENCE

G. Reboux

Dept of Mycology

Jean Minjot University Hospital

Boulevard Fleming

25030 Besançon Cedex

France

Fax: 33 381668914

E-mail: Gabriel.reboux@ufc-chu.univ-fcomte.fr

Received:

January 04 2006

Accepted after revision:

December 12 2006

STATEMENT OF INTEREST

None declared.

European Respiratory Journal

Print ISSN 0903-1936

Online ISSN 1399-3003

assessed reliably. With the objective of developing serological scores to discriminate active HP from other ILDs, the present authors conducted a prospective cohort study of patients presenting in their department with a suspected diagnosis of HP. Subjects were tested by two serological techniques (electrosyneresis and double diffusion) for a panel of seven antigens. The choice of both immunological methods and the antigenic panel was based on previous studies aimed at identifying the best immunological set for diagnosing HP in the present study's region [11, 12].

METHODS

Patients

From January 1, 1999, consecutive patients were recruited aged ≥ 18 yrs presenting in the Dept of Respiratory Diseases (University Hospital of Besançon, Besançon, France) with a pulmonary syndrome for which HP was considered in a differential diagnosis (patients diagnosed in 1999 were also included in the study by LACASSE *et al.* [4]). The proportion of HP and other ILDs was unspecified *a priori*.

All patients underwent the same standardised procedure (discussed later). Only HP cases presumably due to moulds (fungi and thermophilic actinomycetes) were included, since BBL, chemical HP and hot-tub lung are due to antigens of a nature different from those of other HP caused by microorganisms.

Diagnostic criteria

Since patients were to be classified as either HP or non-HP (other ILD), and in the absence of a recognised gold standard, the following diagnostic criteria were used for HP according to those of a previous HP study [4]. 1) Compatible clinical manifestations; 2) BAL lymphocytosis ($\geq 30\%$ for non- and ex-smokers and $\geq 20\%$ for current smokers); and 3) bilateral ground glass or poorly defined centrilobular nodular opacities. When the association of BAL and HRCT did not yield a reliable diagnosis of HP, the presence of a positive specific provocation test [13], an improvement after avoidance of supposed antigens, or suggestive features on transbronchial biopsies was required. Patients underwent surgical lung biopsy when the previously described diagnostic procedure failed to yield a diagnosis. Classical histopathological descriptions were used [14]. Patients considered to have residual HP (a chronic and inactive form in which BAL lymphocytosis has disappeared) were classified in the non-HP group. When HP was diagnosed, the patient's exposure to antigenic sources of HP was then specifically considered in order to determine the nature of HP, *e.g.* FL, other mould-induced occupational HP, home HP caused by moulds, *etc.*

When a complete diagnostic procedure set did not lead to a reliable classification (for example, difficulties in interpreting HRCT), cases were reassessed by an independent ILD expert (J-F. Cordier), who considered, in particular, BAL and HRCT data but also data on clinical history, physical examination, spirometry and diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (or the results of a 6-min walk test) to reach a diagnosis. If diagnosis remained inconclusive, patients were excluded.

Precipitins tests

The choice of antigenic panel was based on the recognised causes of FL and HP due to moulds at an international [15, 16] and local level [11]. The antigenic panel tested included *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, mesophilic *Streptomyces* sp. and hay extract. Antigen extracts were produced and tested as described in a previous article [11]. The immunological methods used were agar gel double diffusion and electrosyneresis on cellulose acetate, which, as shown by a recent study, are more relevant than ELISA and immunoblots in discriminating FL from healthy exposed dairy farmers in the present study's region [12]. Briefly, electrosyneresis was carried out as follows. Cellulose acetate sheets (Sartorius, Göttingen, Germany) were placed in the electrophoresis vat filled with buffered Tris glycine solution at pH 8.8; 15 μ L of each serum was placed on three spots on the anode side and a 15- μ L line of antigen was placed on the cathode side. A current (110 V) was then applied for 75 min and the sheets were stained with Coomassie blue. Serological tests were performed and interpreted (by counting the number of arcs) under routine conditions by four different experienced technicians and a supervisor blinded to the patients' diagnoses and exposure.

Statistical analysis

Characteristics of HP and non-HP patients were compared using the two-tailed Fisher's exact test for dichotomous variables and the unpaired t-test for continuous variables.

The serological results for each antigen were interpreted as a number (x_a) of precipitating arcs (discrete quantitative variable). They were used, either as discrete (x_a) or dichotomous variables (x_d), to develop serological scores. The selection of antigens for multivariate analysis was based on receiver-operating characteristic (ROC) curves to each antigen [17]. Efficiency was used to determine the positivity threshold of each antigen. Serological scores were then constructed for electrosyneresis and double diffusion using multivariate logistic regression (full model) and stepwise logistic regression (predictive model). Coefficients (β) were estimated with their 95% CIs by multivariate analysis. Scores (S_a and S_d) with antigenic results as discrete or as dichotomous variables (X_d : positive or negative) were expressed respectively, as follows.

$$S_a = \beta_0 + \sum \beta_a X_a, \text{ with } X_a = \text{number of precipitating arcs for each antigen tested} \quad (1)$$

$$S_d = \beta_0 + \sum \beta_d X_d, \text{ with } X_d = 0 \text{ (negative) or } 1 \text{ (positive) for each antigen tested} \quad (2)$$

The stability of the models was studied using the bootstrap method [18]. In total, 1,000 random bootstrapped samples (size=study sample size) were generated, and a robust calculation of 95% CIs and coefficient of variation (CV) of estimated parameters (β) was obtained.

ROC curves were constructed and areas under the curves (AUC) were compared for electrosyneresis and double diffusion in order to determine the best immunological method.

Thresholds of serological score positivity for different HP prevalence were determined on ROC curves [17], and their associated predictive values were calculated. The serological

score results, expressed as either positive or negative, were then studied in association with patients' exposure and smoking status.

Estimated accuracy of serological scores

With the hypothesis of sensitivity (Se) and specificity (Sp) values between 70–90% and an HP expected prevalence of 35% (in the present authors' centre), 120 patients needed to be included in the study in order to obtain an accuracy of ~10% for Se and Sp.

RESULTS

Patients

Between January 1999 and April 2005, 162 patients were enrolled in the present study. Of these, 40 were excluded for the following reasons: BBL (n=3), hot-tub lung (n=2); unavailable or uninterpretable BAL (n=3); serological results unavailable (n=30) and indeterminate diagnosis (n=2). The independent investigator reassessed eight cases, three of which were classified in the HP group and four in the non-HP group; one was inconclusive. Thus, 122 patients were included, comprising 31 HP (22 FL, three HP due to nonprofessional farming activities (sheep and horses), two home HP due to moulds, one HP due to nonprofessional sawing (mould from sawdust), one cheese-workers' lung, and two HP with no identified exposure) and 91 non-HP ILDs (41 idiopathic interstitial pneumonia (33 idiopathic pulmonary fibrosis, three cryptogenic organising pneumonia, two acute interstitial pneumonia, two respiratory bronchiolitis ILD, one desquamative interstitial pneumonia), 18 sarcoidosis, seven drug-induced interstitial pneumonia, four pneumoconiosis, four eosinophilic interstitial pneumonia, three collagen vascular disease, three left heart failure, two histiocytosis, two neoplastic interstitial pneumonia, two infectious interstitial pneumonia, two residual form of HP and three undetermined ILD).

	HP %	Non-HP %	p-value
Patients n	31	91	
Age yrs	52.7 ± 14.3	62.4 ± 15.4	0.003 [#]
Sex			
Male	19 ± 61.3	54 ± 59.3	1.0 [†]
Female	12 ± 38.7	37 ± 40.7	
Exposure to mould and actinomycetes			
Yes	29 ± 93.5	19 ± 21.1	<0.0001 [†]
No	2 ± 6.5	71 ± 78.9	
Tobacco exposure			
Nonsmoker	27 ± 87.1	47 ± 52.8	0.0006 [†]
Smoker	4 ± 12.9	42 ± 47.2	
Current smoker	0 ± 0.0	9 ± 10.1	
Ex-smoker	4 ± 12.9	33 ± 37.1	

Data are presented as mean ± SD, unless otherwise stated. HP: hypersensitivity pneumonitis. [#]: Unpaired t-test; [†]: Fisher's exact test.

Patients from the HP group were significantly younger, less frequently smokers and more frequently exposed than the patients from the non-HP group (table 1).

Selection of candidate antigens for serological scores

ROC curves for *A. fumigatus* and hay extract were respectively nondiscriminative (AUC values 0.54–0.55) and uninterpretable. Therefore, threshold values for these antigens were not determined and they were not used in multivariate analysis to develop serological scores. Positivity thresholds for each antigen for the two immunological methods are indicated in table 2.

Development of serological scores

ROC curves associated with electrosyneresis scores were more discriminative than those associated with double diffusion, regardless of the type of variables (fig. 1). Similarly, full models appeared to be more relevant than predictive models. Only results concerning electrosyneresis with the full model are presented. Estimated coefficients used to calculate serological scores and their CIs are indicated in table 3. Coefficients of variation from bootstrap re-sampling showed a moderate stability of estimated parameters (table 3).

Performances of serological scores

The positivity thresholds of serological scores according to different prevalence rates (20, 25 and 35%) of HP and their diagnostic values for electrosyneresis are presented in table 4. Performances of scores with discrete variables were equivalent to those with dichotomous variables for negative predictive

Antigens	Cut-off
Double diffusion	
<i>Absidia corymbifera</i>	1
<i>Eurotium amstelodami</i>	1
<i>Wallemia sebi</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ND
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	1
<i>Streptomyces mesophilic</i>	1
Mouldy hay extract	ND
Electrosyneresis	
<i>A. corymbifera</i>	1
<i>E. amstelodami</i>	2
<i>W. sebi</i>	2
<i>A. fumigatus</i>	ND
<i>S. rectivirgula</i>	1
<i>Streptomyces mesophilic</i>	2
Mouldy hay extract	ND

ND: nondiscriminative antigen. To transform serological results from number of arcs (discrete variable) to positive or negative (dichotomous variable) using this table, serological results must be coded as 0 (negative) if the number of arcs is below the cut-off value, and as 1 (positive) if the number of arcs is equal to or above the cut-off value.

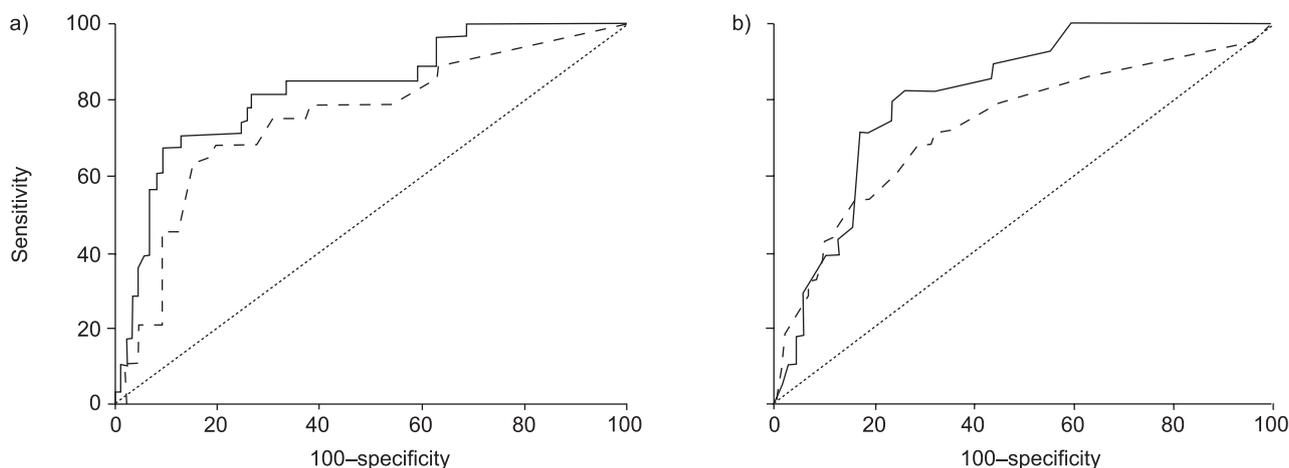


FIGURE 1. Receiver-operating characteristic (ROC) curve for electrosyneresis and double-diffusion showing a) discrete variables, full model ($p=0.247$; area under the curve (AUC) with electrosyneresis (A_e)=0.830; AUC with double diffusion (A_d)=0.751) and b) dichotomous variables, full model ($p=0.260$; $A_e=0.814$; $A_d=0.730$). The AUC is equivalent to the probability that a patient drawn randomly from the HP group has a greater score value than a patient from the non-HP group. p : Probability of the hypothesis that the difference between the two AUCs compared is 0. —: electrosyneresis; - - -: double diffusion.

values (NPV; 81%–88%) but better in terms of positive predictive values (PPV). In full models, PPV varied 71–75% with discrete variables and 57–64% with dichotomous variables. If serological tests were considered as positive when at least one of two scores was positive, S_p did not change but S_e was higher. For a HP prevalence of 35%, S_e was 76% (95% CI 0.60–0.92), S_p 82% (95% CI 0.74–0.90), PPV 69.5 and NPV 86.4.

After adjustment by disease group, a positive serological result, with discrete variables, was positively associated with exposure ($p=0.032$). However, 20% of subjects with precipitins had no identified exposure and 25% of subjects without precipitins had exposure. The presence of precipitins tended to

be negatively associated with tobacco consumption ($p=0.08$; table 5).

Eventually, eight false positives (8.8%) and 11 false negatives (33.3%) were obtained. The false positives were as follows. Three idiopathic pulmonary fibrosis (nonexposed), one eosinophilic interstitial pneumonia (exposed farmer), one silicosis (exposed), one left heart failure (nonexposed) and two residual FL (both exposed farmers). The false negatives comprised eight FL, one home HP due to moulds in the walls, one HP due to nonprofessional farming activities (horses) and one HP without identified exposure. The home HP subject was tested for the antigens corresponding to the actual exposure, identified

TABLE 3 Estimated parameters of serological scores with electrosyneresis for full logistic models

Antigens	Coefficient β	95% CI	p-value	95% CI [#]	CV [#] %
Discrete variables					
Intercept	-2.45				
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	0.61	0.04–1.19	0.04	-0.17–1.39	65
<i>Wallemia sebi</i>	0.33	-0.02–0.68	0.06	-0.20–0.86	83
<i>Absidia corymbifera</i>	0.32	-0.26–0.90	0.28	-0.57–1.21	141
<i>Eurotium amstelodami</i>	0.16	-0.26–0.58	0.47	-0.45–0.76	197
<i>Streptomyces mesophilic</i>	0.14	-0.37–0.64	0.60	-0.62–0.89	282
Dichotomous variables					
Intercept	-2.44				
<i>Eurotium amstelodami</i>	1.04	-0.05–2.12	0.06	-0.33–2.40	67
<i>Absidia corymbifera</i>	0.97	-0.04–1.97	0.06	-0.22–2.15	62
<i>Wallemia sebi</i>	0.72	-0.34–1.78	0.18	-0.75–2.20	104
<i>Streptomyces rectivirgula</i>	0.61	-0.38–1.61	0.23	-0.63–1.86	104
<i>Streptomyces mesophilic</i>	0.55	-0.58–1.68	0.34	-1.16–2.26	159

CI: confidence interval; CV: coefficient of variation $\% = \beta/S_{\beta} \times 100$, with S_{β} =standard error. [#]: 95% CI and CV calculated with bootstrap. To interpret this table a patient with, for example, *S. rectivirgula*=2 arcs, *W. sebi*=0 arcs, *A. corymbifera*=1 arc, *E. amstelodami*=3 arcs and *S. mesophilic*=0 arcs, has the following score with discrete variables: $S_n = -2.45 + 0.61 \times 2 + 0.33 \times 0 + 0.32 \times 1 + 0.16 \times 3 + 0.14 \times 0 = -0.43$, and the following score with dichotomous variables: $S_d = -2.44 + 0.61 \times 1 + 0.72 \times 0 + 0.97 \times 1 + 1.04 \times 1 + 0.55 \times 0 = 0.18$. To transform a discrete variable into a dichotomous variable, see table 2.

TABLE 4 Cut-off values (determined with the optimal criterion method[#]) and performances of serological scores with electrosyneresis

Variable	Prevalence %	Positive serology	Se	Sp	PPV	NPV
Discrete	20	>-0.35	49	95	71	88
	25	>-0.44	55	93	72	86
	35 [†]	>-0.53	61	89	75	81
Dichotomous	20	ND				
	25	>-0.76	60	85	57	86
	35 [†]	>-0.78	66	80	64	81

Se: sensitivity (probability of a positive test outcome in a hypersensitivity pneumonitis (HP) individual); Sp: specificity (probability of a negative test outcome in a non-HP individual); PPV: positive predictive value (probability of having HP when serological score is above the cut-off value); NPV: negative predictive value (probability of having HP when serological score is equal to or below the cut-off value); ND: nondiscriminative. [#]: $S = ((1-P)/P)((CFP-CTN)/(CFN-CTP))$, where S is the slope of the receiver-operating characteristic curve at the optimal operating point, in which "optimal" is in terms of minimising costs (C). "Costs" can be identified here as patient morbidity, where CFP, CFN, CTN and CTP represent the costs of false-positive, false-negative, true-negative and true-positive results, respectively. Here, it was assumed that CFP=CFN and CTP=CTN. Therefore, here $S = ((1-P)/P)$, where P denotes the prevalence in the target population. [†]: prevalence in study population. To use this table for a given patient from, for example, a department of respiratory disease where the prevalence of HP is nearly 35%, with a serological score of -0.43 (>-0.53) with discrete variables and 0.18 (>-0.78) with dichotomous variables, both serological scores indicate a diagnosis in favour of HP. To calculate scores, see table 3.

by microbiological sampling in the subject's home. This additional investigation showed at least two arcs of precipitation with electrosyneresis for *Fusarium verticilloides*, *Cladosporium* sp. and *Trichoderma* sp. The same investigations were carried out for the nonprofessional farming HP female and *Saccharomonospora viridis* was identified as the probable responsible antigen (four arcs of precipitation). Six out of the eight false-negative FL results had at least two arcs for hay extracts and a significant number of arcs with electrosyneresis for at least one of the present study's panel of antigens (without reaching a positive score), and the presence of 1–3 arcs of precipitation for at least two of the following antigens that were not in the present study's panel: *Aspergillus nidulans*, *Streptomyces griseoflavus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *S. viridis*, *Rhodotorula rubra*, *Fusarium solani* and *Penicillium* sp.

TABLE 5 Serological results of patients with electrosyneresis[#] according to exposure and tobacco consumption

	Positive serology	Negative serology	p-value	p-value [†]
Patients n	26	87		
Exposure				
Yes	21 (80.8)	22 (25.6)	<0.0001	0.032
No	5 (19.2)	64 (74.4)		
Tobacco				
Smoker	3 (11.5)	40 (47.0)	0.001	0.08
Nonsmoker	23 (88.5)	45 (53.0)		

Data are presented as n (%), unless otherwise indicated. [#]: Full model with discrete variables (see table 3), with cut-off associated with a prevalence rate of 35% (table 4); [†]: Cochran–Mantel–Haenszel adjusted to Chi-squared (adjusted by disease group).

DISCUSSION

In the absence of standardised and validated diagnostic criteria, diagnosis of HP is difficult [1]. Several proposals for diagnostic criteria have been published [19–22] but their diagnostic accuracy has not been tested. Among these criteria, serology has long been considered to be either a minor criterion or a simple marker of exposure [23–26]. However, with typical FL patients, the use of antigens isolated from patients' environments has led to convincing results [11, 27]. In addition, a recent study by LACASSE *et al.* [4] identified serum precipitins as a significant predictive factor of HP, regardless of exposure. However, the diversity of antigens and immunological techniques used in this multicentre study did not allow evaluation of the real diagnostic value of precipitins. The HP cohort in the study of LACASSE *et al.* [4] consisted mainly of BBL disease and subjects were generally tested by ELISA. In the present study, which concerns HP due to moulds, the sera of patients were tested by electrosyneresis and double diffusion using a panel of antigens that included *A. corymbifera*, *E. amstelodami*, *W. sebi*, three antigens responsible for FL in the region of the present study and rarely considered in other studies. The use of local antigens limits the feasibility of a multicentre study, and it is for this reason that the number of cases in the present study is limited.

The results of the present study showed that it is possible to use a serological score in the diagnosis of HP caused by moulds for patients suffering from an ILD, when an appropriate panel of antigens is used. The results also showed electrosyneresis to be more appropriate than double diffusion for differential diagnosis of HP. However, the sensitivity of the serological test was somewhat disappointing, since about one-third of HP had negative results. However, in eight of the 11 false-negative results for the present study's serological score, the responsibility of antigens not included in the tested panel was either suggested or demonstrated by further antigenic testing. The lack of sensitivity in scores can therefore be explained by the limited panel tested with respect to the great

diversity of antigens that cause HP. The use of a larger panel of antigens would improve the sensitivity of the methodological approach.

The most discriminative antigens within the tested panel were *S. rectivirgula*, *A. corymbifera*, *E. amstelodami* and *W. sebi*; the first is recognised as the major aetiological antigen of FL [27] and is responsible for other professional HP due to actinomycetes. The three others are likely to be aetiological factors of FL in Eastern France [11]; however, *A. corymbifera* and *W. sebi* have also been shown to be aetiological agents in FL in Scandinavia [28, 29]. Conversely, the present study, as well as the Scandinavian studies [28, 29], have not demonstrated the ability of *A. fumigatus* to discriminate between HP and non-HP. This antigen has been evoked as an aetiological factor of HP for more than four decades [30] but its actual responsibility in HP is probably rare.

One concern of the present authors is the applicability of the results of the current study. Both the panel of antigens used and the score are not strictly applicable worldwide, mainly because the current ILD cohort includes a high proportion of HP cases that do not represent the usual aetiologies of HP. However, the approach used, which consisted of developing a serological score through use of a combination of local and international antigens, can be applied worldwide. In addition, it would be useful to test the current panel in other parts of the world. Indeed, this panel probably allows detection of immunological responses induced by a larger number of fungal species and thermophilic actinomycetes, given the known cross-reactivity between different fungal species. In this respect, the present study partially answers the need to develop panels of standardised antigens, highlighted in the recent recommendations of the National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases workshop [1].

Conclusion

Serological tests using a panel of relevant antigens and performed by electrosyneresis help to diagnose mould-induced hypersensitivity pneumonitis by providing precise estimates of the probability of active disease in a region where hypersensitivity pneumonitis, especially farmers' lung, is frequent.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Y. Lacasse for his comments on the study protocol, N. Richardson-Peuteuil for proofreading and G. Rival for his assistance in collecting data.

REFERENCES

- 1 Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, *et al.* Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 792–798.
- 2 Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin CI, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J Suppl* 2001; 32: 81s–92s.
- 3 Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. In: Schwarz MI, King Jr TE, eds. *Interstitial Lung Disease*. Hamilton BC, Decker Inc., 1998; pp. 393–422.
- 4 Lacasse Y, Selman M, Costabel U, *et al.* Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 952–958.
- 5 Respiratory health hazards in agriculture. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S1–S76.
- 6 Burrell P, Rylander R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Respir Dis* 1981; 62: 332–343.
- 7 Mohr LC. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10: 401–411.
- 8 Reboux G, Dalphin JC. Hypersensitivity pneumonitis: a technical note on precipitins. *Rev Mal Respir* 2003; 20: 140–143.
- 9 Krasnick J, Meuwissin HJ, Nakao MA, Yelandi A, Patterson R. Hypersensitivity pneumonitis: problems in diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1027–1030.
- 10 Aberer W, Woltsche M, Woltsche-Kahr I, Kranke B. IgG antibodies typical for extrinsic allergic alveolitis—an inter-laboratory quality assessment. *Eur J Med Res* 2001; 6: 498–504.
- 11 Reboux G, Piarroux R, Mauny F, *et al.* Role of moulds in farmer's lung disease in eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1534–1539.
- 12 Reboux G, Piarroux R, Bardonnnet K, Dalphin JC. Comparison of four serological techniques in immunological diagnosis of farmer's lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: A747.
- 13 Edwards JH, Davies BH. Inhalation challenge and skin testing in farmer's lung. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 58–64.
- 14 Coleman A, Colby TV. Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 514–518.
- 15 Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Laceley ME, Skinner FA. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 1963; 2: 607–611.
- 16 Kurup VP, Mäntyjärvi RA, Terho EO, Ojanen TH, Kalbfleisch JH. Circulating IgG antibodies against fungal and actinomycete antigens in the sera of farmer's lung patients from different countries. *Mycopathologia* 1987; 98: 91–99.
- 17 Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 45: 23–41.
- 18 Carpenter J, Bithell J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med* 2000; 19: 1141–1164.
- 19 Terho EO. Diagnostic criteria for farmer's lung disease. *Am J Ind Med* 1986; 10: 329.
- 20 Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN, *et al.* Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 839–844.
- 21 Cormier Y, Lacasse Y. Keys to the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis: the role of serum precipitins, lung biopsy, and high resolution computed tomography. *Clin Pulm Med* 1996; 3: 72–77.
- 22 Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1997; 111: 534–536.
- 23 Fink JN, Barboriak JJ, Sosman AJ, Bukosky RJ, Arkins JA. Antibodies against pigeon serum proteins in pigeon breeders. *Lab Clin Med* 1968; 71: 20–24.

- 24** Roberts RC, Wenzel FJ, Emanuel DA. Precipitating antibodies in a midwest dairy farming population towards the antigens associated with farmer's lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 62: 518–524.
- 25** McSharry C, Banham SW, Lynch PP, Boyd G. Antibody measurement in extrinsic allergic alveolitis. *Eur J Respir Dis* 1984; 65: 259–269.
- 26** Dalphin JC, Toson B, Monnet E, *et al.* Farmer's lung precipitins in Doubs (a department of France): prevalence and diagnostic value. *Allergy* 1994; 49: 774–750.
- 27** Pepys J, Jenkins PA. Precipitin (FLH) test in farmer's lung. *Thorax* 1965; 20: 21–35.
- 28** Erkinjuntti-Pekkanen R, Reiman M, Kokkarinen JJ, Tukiainen HO, Terho EO. IgG antibodies, chronic bronchitis, and pulmonary function values in farmer's lung patients and matched controls. *Allergy* 1999; 54: 1181–1187.
- 29** Lappalainen S, Pasanen AL, Reiman M, Kalliokoski P. Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81: 585–592.
- 30** Pepys J, Riddell RW, Citron KM, Cayton YM. Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with farmer's lung, aspergillosis, asthma, and sarcoidosis. *Thorax* 1962; 17: 366–374.

Annexe VIII : High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy* 2009; 64: 1068–1073.

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. Reboux¹, 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 departement
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. Kauppila, A. Nevalainen, A. Hyvärinen, T. P. Tuomainen, A. Karvonen, M. Roponen, S. Remes, J. Pekkanen (Finland); D. A. Vuitton, J. C. Dalphin, M. L. Dalphin, S. Rousset (France); M. J. Ege, G. Büchele, S. Schmid, S. Illi, N. Korherr, J. Genuneit, R. Peter, Serdar Sel, N. Blümer, 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

(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 fuch sine 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.

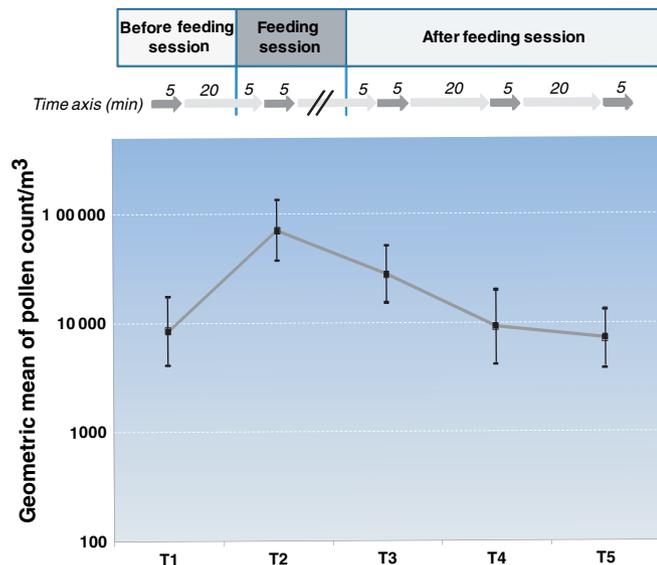


Figure 1. Indoor pollen counts/m³ in winter before, during and after the feeding session in nine French cowsheds (geometric means and 95% confidence intervals, n = 18 per time point). Measurements were taken during 5 min intervals each. (T1) 25 min before the start of the feeding session, (T2) 5 min after the start of the feeding session, (T3) 5 min, (T4) 30 min and (T5) 55 min after the end of the feeding session.

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. fD1 and rD1 were used as primers for 16S rDNA PCR (15). DNA amplification was performed with 0.5 μ M of primers fD1 and rD1, 200 μ M of dNTP, 1 mM of MgCl₂, 1 \times 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

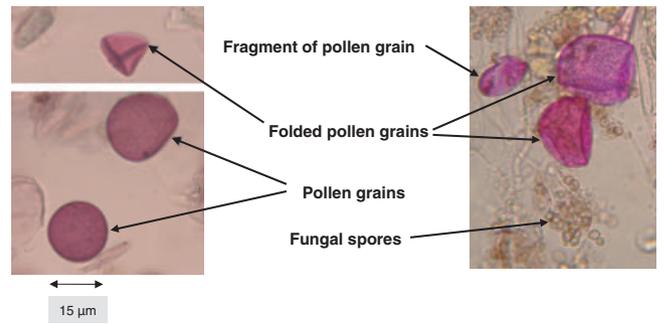


Figure 2. Microscopic examination of a pollen sampling membrane. Microscopic examination of pollen slide preparation at magnification $\times 400$.

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

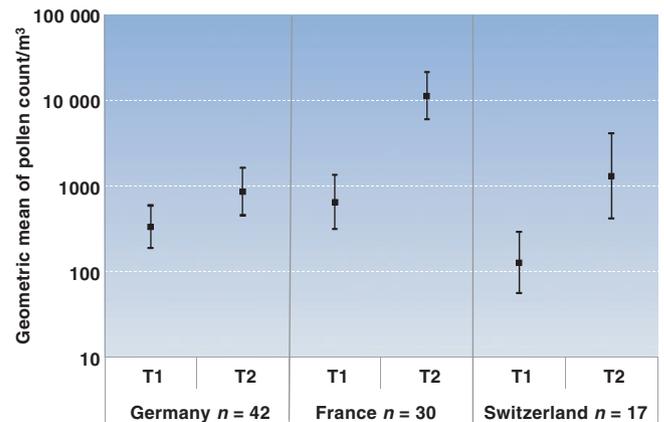


Figure 3. Country-specific indoor pollen counts/m³ in winter before (T1) and during (T2) feeding session (geometric means and 95% CI); $n = 89$ cowsheds. (T1) 25 min before the start of the feeding session and (T2) 5 min after the start of the feeding session.

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 (30.8–50.1)	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 (1524–2850)	594 (392–899)	0.002
Ventilation system	Yes	23	28	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 (694–1305)	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.

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)	<i>P</i> -value	GMR (95% CI)	<i>P</i> -value
Time point*	T1	345	1	1	
	T2	2214	6.50 (3.71–11.40)	5.87 (3.36–10.26)	<0.001
Country	Germany	992	1	1	
	France	7534	4.79 (2.37–9.68)	4.73 (1.83–12.20)	0.001
	Switzerland	1079	0.77 (0.33–1.81)	0.75 (0.28–1.99)	0.563
Type of cowshed	Tie-stalls	2499	1	1	
	Loose housing systems	1278	0.65 (0.31–1.34)	0.30 (0.14–0.66)	0.003
Cowshed volume (m ³)	1st tertile (70–710)	1305	1	1	
	2nd tertile (750–1470)	2312	1.28 (0.58–2.83)	0.99 (0.49–2.02)	0.982
	3rd tertile (1471–18 900)	2690	1.96 (0.86–4.48)	1.41 (0.56–3.52)	0.463
Ventilation system	Yes	915	1	1	
	No	2503	2.04 (0.92–4.51)	3.17 (1.53–6.56)	0.002
Hay storage system	Loose hay only	1377	1	1	
	Balles with/without loose hay	2457	2.16 (1.07–4.35)	1.18 (0.63–2.20)	0.601
Fodder type	Hay only	5413	1	1	
	Hay and silage	1063	0.35 (0.18–0.70)	0.82 (0.35–1.93)	0.647

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 lwoffii* (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, Bjorksten 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, Pelletier 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, Korthals 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.

Annexe IX : Evaluation of bioaerosol variability in indoor farming environments. En review. Occupational and Environmental Medicine Aout 2009.

Title:

Evaluation of bioaerosol variability in indoor farming environments.

Authors**Corresponding author**

Bertrand Sudre, MD, Msc

E-mail: bsudre@chu-besancon.fr

Postal/mail address: Department of Parasitology, Faculty of Medecine and Pharmacy. Chrono-environnement UMR CNRS 6249, Franche-Comté University

Les Hauts de Chazal, 19 Rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France.

Phone: ++33 381 668 068 / Fax: ++33 381 668 910

Authors

Name: **Gabriel Reboux, PHD**

E-mail: gabriel.reboux@ufc-chu.univ-fcomte.fr

Postal/mail address: Department of Parasitology, Faculty of Medecine and Pharmacy. Chrono-environnement UMR CNRS 6249, Franche-Comté University

Les Hauts de Chazal, 19 Rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France.

Phone: ++33 381 669 165

Name: **Sandrine Roussel, PHD**

E-mail: sandrine.roussel@univ-fcomte.fr

Postal/mail address: Department of Parasitology, Faculty of Medecine and Pharmacy. Chrono-environnement UMR CNRS 6249, Franche-Comté University

Les Hauts de Chazal, 19 Rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France.

Phone: ++33 363 082 239

Name: **Marco Waser, PHD**

Institute of Social and Preventive Medicine

Medical Faculty of the University of Basel

Postal/mail address: Steinengraben 49, CH-4051 Basel

E-mail: Marco.Waser@unibas.ch

Phone: ++ 41 61 270 22 28

Name: **Gisela Büchele, MPH**

E-mail: gisela.buechele@uni-ulm.de

Postal mail address: Institut of Epidemiology, University of Ulm, Helmholtzstr. 22, 89081 Ulm, Germany

Phone: ++ 49 731 503 10 72

Name: **Charlotte Braun-Farlander, MD, PHD**

Institute of Social and Preventive Medicine
Medical Faculty of the University of Basel
Postal/mail address: Steinengraben 49, CH-4051 Basel
Phone: ++ 41 61 270 22 20
E-mail: c.braun@unibas.ch

Name: **Erika Von Mutius, MD, PHD**

E-mail: Erika.Von.Mutius@med.uni-muenchen.de

Postal mail address: University Children's Hospital Lindwurmstr. 4 D 80337 Munich. Germany
Phone: ++ 49 89 5160 2709

Name: **Mallory Vacheyrou**

E-mail: mallory.vacheyrou@univ-fcomte.fr

Postal/mail address: Department of Parasitology, Faculty of Medecine and Pharmacy. Chrono-
environnement UMR CNRS 6249, Franche-Comté University

Les Hauts de Chazal, 19 Rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France.

Phone: ++33 363 082 234

Corresponding Author and Reprints:

Name: **Renaud Piarroux, MD, PHD**

E-mail: renaud.piarroux@ap-hm.fr

Postal/mail address: Laboratoire de Parasitologie Mycologie. Centre Hospitalo-Universitaire de la
Timone. 264 rue Saint Pierre. 13285 Marseille cedex 05.

Chrono-environnement UMR CNRS 6249, Franche-Comté University

Les Hauts de Chazal, 19 Rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France.

Phone: ++33 381 668 068 / Fax: ++33 381 668 910

Keywords: bioaerosol, farming exposure, variability, fungi, bacteria

Word count: 3810

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Occupational and Environmental Medicine and any other BMJ PGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://oem.bmj.com/ifora/licence.pdf>).

Abstract: (194 words)

Bioaerosol assessment is affected by variability from air quality in occupational settings such as farming environments. This leads to difficulties in exposure estimation. In order to assess this variability, repeated air samples on filters have been analyzed at dairy farms in the Northern Alps area. Factors associated with indoor bioaerosol exposure were also checked using regression analyses focusing on thermotolerant bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species.

Due to the variability between the samples harvested within each farm, at least eight measurements per group were required to provide reliable information about microbiological exposure to thermotolerant bacteria and *Eurotium* spp.

The main factor associated with bioaerosol exposure was fodder distribution (adjusted Geometric Mean Ratio (aGMR)_{bacteria} = 1.66 ($p < 10^{-3}$), aGMR_{*Eurotium* spp.} = 3.28 ($p < 10^{-3}$) and aGMR_{others fungi spp.} = 1.63 ($p < 10^{-3}$). Farm types were also associated with *Eurotium* spp. exposure (aGMR_{*Eurotium* spp.} = 26.7 ($p < 10^{-3}$) and 41.1 ($p < 10^{-3}$) respectively for modern and traditional French farms). In addition, the increase of indoor cowshed volume was significantly associated with a decrease in thermotolerant bacteria.

These results indicate that building groups based on farm type and feeding tasks might be a strategy for assessment in environmental large-scale studies.

INTRODUCTION

Exposure to bioaerosols and organic dust is well known in agricultural research to cause adverse effects on respiratory health [1]. On the other hand, several studies on farming have demonstrated lower prevalence of atopic disease within children born on farms and exposed to cowsheds. These children are less often atopic and present lower rates of allergic diseases such as seasonal rhinoconjunctivitis, hay fever and allergic asthma [2-4]. Low prevalences of atopic diseases are associated with regular exposure to cowsheds and livestock during the prenatal periods [5, 6] and early lives of children [7]. It has been hypothesised that this protection might be the result of an immunological pathway under the influence of several microbiological components of bioaerosol, including bacterial and fungal antigens [8]. A better quantitative assessment of exposure to bioaerosol in the setting of a farm remains a focus of current research. However, the composition of bioaerosol in agricultural environments differs according to region, farm layout and agricultural practices [9-11]. In addition, microorganisms in the form of bioaerosols increase drastically during various farm activities, such as handling of feed or storage and removal of manure, resulting in difficulties in reliable exposure assessment. The emission sources are also numerous, and airborne contamination can be highly variable, even when measured after only a short time.

To deal with this variability and to provide an overview of the average exposure of a person working in a cowshed, repeated measurements can be used to improve the exposure estimate [12]. However, in large-scale studies based on individual assessments, repeated measurements for each subject are not always feasible. Moreover, the number of measurement required for each individual depends on the variability over time and differences between individuals. It has been shown that large intra-individual variability attenuates the exposure-response relationship, inducing an “attenuation bias” on the estimates in epidemiological studies [13, 14]. An alternative is to categorize individuals and estimate exposure at the group level. In this setting, the group might be defined on common exposure or working tasks and it is therefore essential to determine whether it is possible to get an acceptable estimate of an exposure at the group level. Some studies have already shown that, despite the low reproducibility of each individual measurement, significant differences between average values calculated in contrasting groups may be found [15]. This approach is often used and has the advantage that attenuation does not occur, but at the expense of a loss of power. This group approach is supported by the large ratio of within-subject to between-subject variance in individual-based strategies and, in large-scale

environmental studies, the major logistical challenge of the fieldwork required for repeated measurements for multiple subjects [16].

The aim of this study was to assess the variability of the microbial composition of bioaerosol collected in farming environments. We performed a set of repeated air samplings (n=24) during winter in the cowsheds of 26 European dairy farms located in the Jura and North Alps areas. We sought to estimate the number of measurements necessary to obtain an acceptable assessment of fungal and bacterial exposure in both unit- and group-based approaches. In addition, to better understand the factors underlying bioaerosol variation, multiple regression analyses were performed to describe the associations between bioaerosol concentration and farm characteristics, as obtained via questionnaire.

METHODS

Population

Samples were collected at 26 dairy farms in three countries (France, Switzerland and Germany) during the winter season (December 2004-April 2005). Eight of the French farms were traditional farms in Jura (JT), defined by the presence of tie-stalls with small indoor volumes, pipeline milking systems and silage use. The other ten farms were modern farms located in Jura (JM), containing large cowsheds with loose housing systems and milking parlors, using hay and silage for foraging. Eight farms in Germany and Switzerland were Alpine modern farms (AM), located in the St. Gallen area in the northeast part of Switzerland (n=3, selected by the Institute of Social and Preventive Medicine, Basel, Switzerland) and in upper Bavaria within the alpine area of Germany (n=5, selected by University Children's Hospital, Munich, Germany). They were located in nearby mountain settings and shared similar agricultural practices, such as milking stations and the use of great quantities of grass silage (Table I). Data related to farm characteristics and agricultural practices were obtained during interviews, using standardised questionnaires.

Table I. Farm characteristics by farm type[Legend: ¹ Median over sampling period]

Farm characteristics and agricultural practices	JT Jura traditional (n=10)	JM Jura modern (n=8)	AM Alpine modern (n=8)
	Median ¹ (min-max)	Median ¹ (min-max)	Median ¹ (min-max)
Date of construction	1966 (1800-1978)	1987 (1972-2004)	1989 (1903-1999)
Farm altitude (m)	774 (350-950)	575 (400-1100)	680 (402-880)
Number of cows	45 (25-80)	68 (45-180)	45 (15-117)
Feeding duration (min)	30 (10-180)	38 (10-140)	20 (10-180)
Hay (kg/day) ¹	269 (50-581)	405 (260-650)	155 (78-351)
Silage (kg/day) ¹	0	0 (0-600)	1430 (105-4330)
Type of silage	None	Maize and/or grass (n=3)	Grass (n=8)
Flour (kg/day) ¹	42 (0-150)	115 (0-480)	78 (0-630)
Cowshed volume (m ³)	744 (322-2160)	4471 (2516-8750)	2651 (357-10350)
Cowshed cleaning duration (min)	20 (10-30)	13 (5-30)	10 (5-20)

Questionnaire

Explanatory variables included farm characteristics (year of construction and renovation, number of cows, indoor volume, presence/absence of mechanic ventilation, method (mechanical/manual) and duration of cowshed cleaning and occupational tasks (fodder weight, feeding duration and methods: by hand, with a crane or from trapdoor in the ceiling). Continuous variables were divided into tertiles (quantity of silage, hay and feeding duration) or quartiles (volume).

Airborne dust samples

Airborne dust samples were collected at each farm during three two-day periods evenly distributed throughout the winter. In each two-day period, livestock were fed four times (corresponding to the morning and evening feeding sessions of each day). Two samples were collected for each feeding session: one before feeding cows and a second ten minutes after the end of the feeding session. Therefore, a total of 24 samples were available for each single farm (12 before feeding and 12 after). Airborne dust samples were collected

for 20 min using a GilAir 3® pump with Millipore cassettes (37 mm) containing a Teflon® filter of 0.45-µm pore diameter (Sensidyne, Clearwater, U.S.A). The pump operated at an airflow of 3 l/min and was fixed on a tripod (75 cm above the floor) located at the same place for each measurement. Monthly calibrations of pump flow were performed with the Gilibrator-2® Diagnosis Calibration System (Sensidyne, Clearwater, U.S.A.), and a flow variation of less than 5% was allowed. All samples were analysed in the lab at a fixed time of 72 hours (\pm 12 hours) after field collection.

In the laboratory, filters were rinsed with 10 ml of 0.1% Tween 80 solution in sterile water (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and shaken for 10 min in a Stomacher (AES Laboratoire, Combourg, France). One hundred microlitres of inoculum was plated after 10-fold and 100-fold dilutions on Müller-Hinton medium (MH, Becton Dickinson, Cockeysville, U.S.A). Thermotolerant aerobic bacteria colonies were counted after one day of culture at 30°C. Another 100 microlitres was plated undiluted and diluted 1:10 on dichloran-glycerol medium (DG18, Oxoid LTD, Basingstoke, England) with 0.5% of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Mould colonies were counted after three days of culturing at 30°C. Because *Eurotium* spp. colonies could be identified easily due to their color and morphological characteristics, the mould count was further divided into two sets: (i) *Eurotium* spp. and (ii) other fungal species. Results were expressed in colony forming unit per cubic meter (CFU/m³).

Quality control

To evaluate the effect of laboratory procedures on the variability of results, several quality control experiments were performed. The reproducibility of measurements was assessed by analysing five replicates collected simultaneously, side by side, in the same cowshed. Each replicate was performed by a separate technician, who performed seven parallel culture analyses. Then, the 35 resulting Petri dishes were counted blindly by three independent readers. The effect of laboratory analysis and the effect of different readers were assessed by analysis of variance. The quality of the recovery of fungi and bacteria from the filters was estimated by performing four successive washings of five filters and calculating the ratio of the number of colonies obtained with the first washing and the total number of colonies. The search for any external contamination was performed by including blank field samples (i.e., sterile filters) within the set of samples analysed in the laboratory during the study period.

Statistical methods

To assess the variability among samples collected within the same farm (farm unit-based approach), the between-unit and within-unit variances were first considered from the

12 measurements performed before feeding cattle and the 12 after feeding. Then, an intra-class correlation coefficient (ICC) was calculated. The ICC is defined as the ratio between between-unit variance and the sum of between-unit and within-unit variance [17]. This estimation is provided by STATA 10 SE (Stata Corporation, College Station, TX, USA) using a GLLAMM (generalised linear latent and mixed model) [18]. Here, the farm number is a latent variable (i.e., the farm unit is the hierarchical level), and the ICC corresponds to the expected correlation among measurements from the same unit (namely, farm). According to Snijders and Bosker, the number of measurements needed to achieve a reliability above 0.80 (defined as the correlation of independent, repeated exposure measurements) was estimated using the following formula: $0.80(1-ICC)/(ICC \times (1-0.80))$ [17, 19].

The number of samples for each type of farm (JT, JM and AM) necessary to approximate the microbial concentration of bioaerosol before and after the feeding session was calculated in the group-based approach. Group was defined by type of farm (JT, JM and AM) and time point of sampling (before and after feeding session). For that purpose, the average values of culturable bacteria and fungi in the air of each type of farm and time point were first estimated. We assumed that the arithmetic mean values calculated using $n=96$ (JT), $n=120$ (JM), and $n=96$ (AM), respectively, would represent an acceptable estimate for the arithmetic average values related to field exposure. These calculated reference values were further used to assess the results of simulations aiming to estimate if a set of two, four, or eight measurements could sufficiently approximate the microbial composition of bioaerosol in each type of farm. Each simulation was performed on a random drawing of 200 sets of samples made of two, four or eight samples taken from distinct farms. No more than one measurement per farm was included in each set of two, four and eight measurements. The resulting 200 theoretical mean values were compared to the respective reference value. Then, the percentage of the drawings giving a mean value more than half and less than double the calculated reference value was reported [20].

Associations between farm characteristics and log-transformed microbiological parameters were estimated using multivariate regression analysis. Microbial concentrations below the limit of detection were assigned values of one half of the detection limit (332 CFU/m^3), as is usually done for environmental endotoxin measurements [21]. Samples that were saturated after the 100-fold dilution were considered outliers (Table II, less than 2% of the overall samples). To consider the high environmental contamination reflected in these samples, they were replaced by a fixed numeric value corresponding to twice the arithmetic mean of samples that required additional dilution. The contribution of each explanatory variable was calculated via a bivariate analysis. Then, multivariate analysis was performed with a model mutually adjusted for significant predictors (those with $p \leq 0.15$ by bivariate

analysis). We used a GLLMM with a Gaussian link and robust estimation of the standard error coefficient [18]. This multilevel model employs a hierarchical structure with random effects for farm and period. This model also takes into account the lack of independence of measurements within particular farms and periods. The adequacy of the model was tested with the residual plot technique, and statistical significance was set at a conventional 5% level. The effects of explanatory variables were expressed in geometric mean ratios (GMRs), with 95% confidence intervals (CI_{95%}).

Table II. Overview of samples with undetectable or saturated microorganisms and missing values

[Legend: ¹ % of total (n=624 for each microbiological category); ² these samples were under the detection limit and were replaced by 332 CFU/m³ before log-transformation for modelling].

Samples	Thermotolerant aerobic bacteria		<i>Eurotium</i> spp.		Other fungal species	
	Feeding session		Feeding session		Feeding session	
	Before	After	Before	After	Before	After
	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹	n (%) ¹
Missing values						
Jura traditional	0	0	1	3	1	3
Jura modern	0	1	0	0	0	0
Alpine modern	2	3	2	2	2	2
Total	2 (<1%)	4 (<1%)	3 (<1%)	5 (<1%)	3 (<1%)	5 (<1%)
With undetectable microorganisms ²						
Jura traditional	0	0	9	6	9	21
Jura modern	0	0	21	7	27	15
Alpine modern	2	1	73	52	32	29
Total	2 (<1%)	1 (<1%)	103 (16%)	65 (10%)	68 (10%)	65 (10%)
With saturation after 100-fold dilution						
Jura traditional	1	11	0	10	0	0
Jura modern	4	6	0	0	0	0
Alpine modern	0	0	0	0	0	0
Total	5 (<1%)	17 (<2.7%)	0	10 (1.6%)	0	0

RESULTS

The farm characteristics and agricultural practices are summarised in Table I. FM farms presented larger herd sizes, and traditional farms were older on average than modern ones. Hay was the most important source of feed in the Jura area, with additional maize/grass silage on modern farms. In contrast, grass and maize silage was always used in Alpine Swiss and German farms, complemented with a smaller amount of hay. Flour was distributed as nutritional additive in larger quantity in modern farms (French, German and Swiss), as compared to traditional French farms.

In total, 624 filters were available for laboratory analysis over the study period. An overview of the number of missing values, saturated samples and samples under the limit of detection is presented in Table II. Twelve repeated measurements, both before and after the feeding sessions provided an estimation of the geometric mean value of culturable bacteria and fungi for each farm. Within each farm, the results of repeated measurements showed high variability. Overall, there was a clear tendency toward an increase of bacterial and fungal geometric means following the feeding session [bivariate $GMR_{bacteria} = 1.7$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium\ spp.} = 3.3$ ($p < 0.001$), $GMR_{other\ fungal\ species} = 1.6$ ($p < 0.001$)]. There was a higher level of microorganisms in JT farms compared to AM farms [bivariate $GMR_{bacteria} = 3.8$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium\ spp.} = 17.1$ ($p < 0.001$), $GMR_{other\ fungal\ species} = 3.6$ ($p = 0.02$)], but a less pronounced increase in FM farms compared to AM farms [bivariate $GMR_{bacteria} = 2.2$ ($p < 0.001$), $GMR_{Eurotium\ spp.} = 7.0$ ($p < 0.001$), $GMR_{other\ fungal\ species} = 1.8$ ($p = 0.02$)]. Details of the bacterial and fungal quantities before and after the feeding sessions on each individual farm are presented in Figure 1.

When considering the log-values obtained before feeding sessions, the ratio of between-unit to within-unit variances was 4.1 for bacteria, 0.8 for *Eurotium* spp. and 2.7 for other fungal species. According to Snijders and Bosker, the number of measurements needed to achieve reliability greater than 0.80 was, therefore, 17 (ICC=0.19), 3 (ICC=0.54) and 15 (ICC=0.26) for bacteria, *Eurotium* spp. and other fungi, respectively. After the feeding sessions, the ratio of between-unit to within-unit variances was 2.8 for bacteria, 0.7 for *Eurotium* and 3.8 for other mould species. The number of measurements needed to obtain reliability greater than 0.80 for these samples was 12 (bacteria, ICC=0.25), 3 (*Eurotium* spp., ICC=0.60) and 16 (other fungi, ICC=0.20).

This high variability could not be explained by a lack of reproducibility for the laboratory procedure. Indeed, for the two fungal parameters, the reproducibility experiments exhibited less than 5% of inter-reader variation and no statistical differences between readers. The only significant difference was found for bacteria, corresponding to one technician in five who found a significantly lower number of colonies (ratio of 0.70, $p=0.03$) compared to the overall mean of the other technicians. Other quality control experiments showed that biological recovery was high following a single washing of the filter (above 90% recovery), and that no external contamination could be detected in the analysis of the blank field samples collected during field work.

Results of the approach based on by farm type and time point are presented in Table III. These results show that, in most cases, a set of eight measurements was enough to reach a high percentage (around 80% or above) of correct estimated mean values (i.e., over half and under two times the reference values). The only percentage below 50% was obtained for the estimation of *Eurotium* levels in modern Alpine farms before feeding, which was probably due to both the large distribution of the measured values and the high number of zero values ($n=52$) (Table I).

Table III. Arithmetic means (CI 95% and coefficient of variation) of air measurements by farm group (in CFU/m³) and percentages of air measurements between half and double the reference value

[Legend: ¹ confidence interval (95%), ² standard deviation/arithmic mean (coefficient of variation)]

Feeding session and farm types	n	Arith. mean * 10 ³	CI 95 % ¹	sd/m ²	Percentage to obtain values between half and double the average reference values		
					Random lots (n=200)		
					2	4	8
Before feeding session							
Thermotolerant aerobic bacteria							
Jura traditional	120	144.5	(119.4 -169.6)	0.96	73	77	88
Jura modern	96	124.6	(81.4 -167.8)	1.71	67	72	89
Alpine modern	94	62.1	(46 -78.2)	1.27	63	74	88
<i>Eurotium</i> spp.							
Jura traditional	119	10.1	(7.1 -13.1)	1.64	43	55	78
Jura modern	96	5.7	(3.5 -7.8)	1.89	37	56	61
Alpine modern	94	1	(0.4 -1.7)	3.11	18	32	32
Other fungal species							
Jura traditional	119	8	(5.5 -10.4)	1.69	41	66	76
Jura modern	96	4.8	(3 -6.6)	1.88	37	53	62
Alpine modern	94	2.3	(1.5 -3)	1.55	40	56	76
After feeding session							
Thermotolerant aerobic bacteria							
Jura traditional	120	351.7	(258.5-444.9)	1.47	80	90	99
Jura modern	95	223.8	(151.7-295.9)	1.58	60	77	91
Alpine modern	93	82.1	(59.5-104.6)	1.33	55	74	83
<i>Eurotium</i> spp.							
Jura traditional	117	69.5	(51.8-87.2)	1.39	39	59	80
Jura modern	96	21.7	(15.6-27.8)	1.38	55	64	79
Alpine modern	94	1.4	(0.9-1.9)	1,79	38	48	66
Other fungal species							
Jura traditional	117	22.1	(14.3-30)	1.95	23	45	58
Jura modern	96	6.3	(4.9-7.7)	1.09	61	76	90
Alpine modern	94	3.8	(2.4-5.3)	1.81	47	60	66

Several factors associated with microbe levels have been identified by multivariate regression analysis. The significant factors are summarised in Figure 2, and the results of the adjusted multivariate model are shown in Table V. For bacteria, the significant explanatory variables were farm type, sampling time and quantity of hay distributed to livestock. A decreasing trend of bacterial concentration was found with increasing cowshed volume. For *Eurotium* spp., farm type and feeding session were the main explanatory variables. A significant decrease in both *Eurotium* spp. and other fungi was found for the group with the most recently renovated cowsheds, without any additional effect of indoor cowshed volume. We noted that the use of silage significantly decreased the airborne concentration of other fungal species, in contrast to the trend for *Eurotium* spp. and bacteria.

Table IV. Geometric mean ratios and 95% confidence intervals of adjusted associations between farm characteristics and thermotolerant aerobic bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species, in CFU/m³. [Legend: ¹ number of samples; ² the multivariate analysis was performed with a full model mutually adjusted for the significant predictors with p ≤ 0.15 by bivariate analysis; ³ GMR: geometric mean ratio ; ⁴ kg per day.]

Farm characteristics	Thermotolerant aerobic bacteria					<i>Eurotium</i> spp.					Other fungal species				
	n ¹	Multivariate model ²				n ¹	Multivariate model ³				n ¹	Multivariate model ³			
		GMR ⁴	CI _{95%}		p value		GMR ⁴	CI _{95%}		p value		GMR ⁴	CI _{95%}		p value
Farm type															
Alpine	187	1				188	1				188	1			
French (modern)	191	1.27	0.46 - 3.50	0.63	192	26.67	5.64 - 126.1	0.0001	192	2.34	0.81 - 6.75	0.11			
French (traditionnal)	240	2.43	0.92 - 6.44	0.07	236	41.11	8.57 - 197.2	0.0001	236	6.18	2.11 - 18.06	0.001			
Sampling session															
Before feeding	310	1			309	1			309	1					
After feeding	308	1.66	1.40 - 1.96	0.0001	307	3.28	2.74 - 3.92	0.0001	307	1.63	1.33 - 1.99	0.0001			
Farm construction (year)															
1st (1800-1972)	214	1			210	1			210	1					
2nd (1973-1985)	213	1.03	0.68 - 1.56	0.87	214	0.67	0.32 - 1.38	0.28	214	0.70	0.43 - 1.16	0.17			
3rd (1986-2004)	191	1.58	0.70 - 3.55	0.26	192	1.26	0.29 - 5.35	0.75	192	1.60	0.60 - 4.29	0.34			
Renovation (year)															
1st (1970-1977)	262	1			258	1			258	1					
2nd (1978-1993)	166	1.25	0.81 - 1.95	0.30	166	0.55	0.25 - 1.18	0.12	166	0.75	0.44 - 1.28	0.30			
3rd (1994-2004)	190	1.56	0.76 - 3.17	0.21	192	0.16	0.04 - 0.54	0.003	192	0.43	0.18 - 1.00	0.05			
Feeding duration (min)															
1st (10-20)	236	1			238	1			238	1					
2nd (21-45)	240	0.98	0.56 - 1.72	0.95	236	0.36	0.14 - 0.93	0.03	236	0.77	0.40 - 1.47	0.44			
3rd (46-240)	142	1.24	0.80 - 1.92	0.33	142	0.83	0.40 - 1.73	0.62	142	1.06	0.63 - 1.75	0.81			
Quantity of hay ⁴															
1st (25-87)	211	1			209				209						
2nd (88-163)	216	1.88	1.22 - 2.91	0.004	215				215						
3rd (164-325)	191	1.21	0.76 - 1.94	0.41	192				192						
Quantity of silage ⁴															
1st (0)	359	1			356	1			356	1					
2nd (52-110)	70	1.11	0.60 - 2.08	0.72	70	0.87	0.30 - 2.48	0.79	70	2.40	1.16 - 4.94	0.01			
3rd (111-2164)	189	0.57	0.23 - 1.42	0.23	190	2.09	0.59 - 7.36	0.25	190	1.20	0.50 - 2.84	0.67			
Volume (m ³)															
1st (322-680)	168	1			165	1			165	1					
2nd (681-1872)	140	0.40	0.23 - 0.69	0.001	139	1.79	0.80 - 3.99	0.15	139	0.88	0.51 - 1.54	0.67			
3rd (1873 -4725)	166	0.48	0.26 - 0.91	0.02	168	0.97	0.32 - 2.85	0.95	168	0.93	0.44 - 1.96	0.85			
4th (4726-10350)	144	0.30	0.13 - 0.67	0.004	144	2.16	0.55 - 8.51	0.26	144	1.40	0.54 - 3.61	0.47			

DISCUSSION

The aim of our study was to assess the variability of the microbial composition of bioaerosols collected at several types of farms and to evaluate some approaches that may help to bypass the problem caused by the low repeatability of airborne dust measurements over time. For the exposure assessment, we focused on three biological markers (total bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species), which are a sub-fraction of the microorganisms found in the air in cowsheds [22]. Here, our objective was not to describe the microbial biodiversity of the indoor farming environment, but merely to highlight variations in some markers of microbial exposure in the cowsheds. We chose these three markers because (i) they were easily identifiable and countable, (ii) they encompass two important types of microbe and (iii) they are usually found in the air in cowsheds [9, 22-24]. We assume that these three microbial parameters act as global indicators of microbiological burden, providing a suitable assessment of the variability in airborne exposure in cowsheds. Our results are in accord with those of previous studies in dairy farming environments [11, 25-27], in which viable components were usually found in stables at levels between 10^5 and 10^6 CFU/m³ for bacteria and 10^3 and 10^5 CFU/m³ for fungal microorganisms.

The study design included a limited number of farms, excluding swine confinement buildings and poultry farms, where the contamination patterns are obviously not similar. Furthermore, our objective was to focus on dairy farming, which has been linked with allergic disease protection [2-4]. An additional study on alpine traditional farms could supplement this work, as the use of hay is commonplace on such farms, and workers are frequently in close proximity to cattle. One might reasonably expect a similar microbiological profile to that of the French traditional farms. Another limitation might be the reduction in viability of microorganisms due to the time elapsed between collection and laboratory analysis of airborne samples. Nevertheless, previous studies have demonstrated only a modest effect of sample storage on the viability of thermophilic bacteria and mould [28, 29], and the time of storage was similar for each of the three centres. It is also unlikely that any major bias occurred due to differences in these centres. In addition, we wish to point out that the airborne concentrations obtained should not be considered as absolute values, but rather as relative levels of exposure. On the technical side of the study, ten percent of the samples collected before and after feeding sessions, (except for *Eurotium* spp. found before feeding) were undetectable. The sampling method was designed to collect large amounts of fungi and bacteria, with the number of saturated samples being less than three percent after feeding sessions for thermotolerant aerobic bacteria and *Eurotium* spp. Finally, the sampling technique provided high recovery from the filters and presented reasonably low laboratory variability in comparison with sample variation. This technique can be performed in the field

and can be used on areas of reasonable sizes when accompanied by efficient logistical services.

Our findings show that the ratio of between-unit to within-unit variance, ranging from 0.7 to 4.1, was far from ideal for producing reliable estimations of microbial exposure. Despite this limitation, our study showed that, in most cases, a set of eight measurements within a farm group was acceptable for estimating the exposure in its cowshed. In addition, these findings highlight some factors that were significantly associated with modification of the exposure to fungi or to bacteria. Feeding distribution considerably influences the microbial concentration of bioaerosol. This effect was found to be statistically significant for the three studied microbiological groups, with the highest magnitude noted for *Eurotium* spp. Our results are consistent with those of other studies that have previously shown that the main environmental source of *Eurotium* spp. is hay [10, 23, 30, 31]. The increase in *Eurotium* levels after feeding sessions might be explained by the effect of hay handling. AM farms usually distribute smaller quantities of hay, which may explain why we found a smaller increase in samples from those farms. Our results also show that the timing of feeding tasks is an essential parameter in environmental studies assessing airborne exposure at cow farms. Farm type is the second most significant factor. After adjustment for the other parameters, JT farms presented the highest geometric mean ratios. This kind of farm likely represents particular conditions of exposure, where the combination of unique architectural characteristics and work practices lead to higher levels of exposure. We cannot attribute the effect to specific parameters, but these results indicate that farm type might be a global indicator of respiratory exposure. An increase in cowshed volume is another factor associated with a reduced amount in air of aerobic thermotolerant bacteria, but not fungi. This might be linked to a global dilution effect that a large indoor volume may have on bacterial air concentration. Interestingly, no effect of mechanical ventilation was noted after bivariate analysis. This finding contrasts with the results previously reported by Lange et al., which demonstrate that the absence of a mechanical ventilation system tends to increase aerobic thermotolerant bacteria levels [25]. However, the absence of ventilation should be interpreted here with caution, especially considering the diversity of ventilation systems in our set of farms.

Several factors modulate airborne exposure to bacterial and fungal microorganisms in a farming environment. Epidemiologic evidence of allergic disease protection has specifically been connected to frequent visitation of cattle sheds in childhood, maternal exposure to animal sheds and several biological proxies reflecting microorganism exposure [7, 32, 33]. When examining our results, it also appears that the microbiological exposure

levels of farmers and their children in cowsheds are cyclic, according to agricultural tasks, and vary with farm characteristics. Moreover, peaks in the indoor exposure pattern approach those found for *Poaceae* pollens in dairy farms of the same area of Europe [34]. Without prejudging the immunological consequences of this co-exposure on allergic disease onset, it raises the idea of performing an epidemiological study of groups sharing similar profiles of exposure.

The use of settled dust in the field of respiratory disease in occupational medicine [35, 36] or allergology [32, 37, 38] is a frequent alternative method of bioaerosol assessment. Dust is generally harvested on dry surfaces after a given period. This proxy reflects a cumulative indication of past airborne bioaerosol compositions. Some discrepancies between floor dust and indoor air samples have been found for fungal cultures derived from American houses [39]. They may be due to the growth of some species in the dust, where others were eliminated. As for airborne samples, there is a need to perform additional studies on viable microorganisms, assessing the proper method for collecting settled dust samples in cowsheds, in order to estimate variability and correlation with airborne samples

In conclusion, this study confirmed that airborne measurements of bacteria and fungi in farm bioaerosol are made difficult by their high variability across time. One solution could be to use a group approach to assess microbiological exposure in large epidemiological studies. This approach is based on the typology of farm characteristics, such as regional profile and feeding session timing, and may help provide an acceptable assessment of bioaerosol exposure with a limited number of samples.

Acknowledgments:

We thank C. Schindler and L. Grize from Institute of Social and Preventive Medicine (Medical Faculty of the University of Basel, CH) and D. Heederick from (Institute of Risk Assessment Sciences, Utrecht, NL) for helpful guidance on statistical analyses. None of the individuals listed above were compensated for their contributions.

Competing interests: None

Funding: None

1. ATS., Respiratory Health Hazards in Agriculture *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(5): p. S1-S76.
2. Naleway, A.L., Asthma and atopy in rural children: is farming protective? *Clin Med Res*, 2004. 2(1): p. 5-12.
3. Tse, K. and A.A. Horner, Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases. *Semin Immunopathol*, 2008. 30(1): p. 53-62.
4. von Mutius, E. and K. Radon, Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2008. 28(3): p. 631-47, ix-x.
5. Douwes, J., et al., Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J*, 2008. 32(3): p. 603-11.
6. Ege, M.J., et al., Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(4): p. 817-23.
7. Riedler, J., et al., Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*, 2001. 358(9288): p. 1129-33.
8. Vuillermin, P.J., et al., Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. *Allergy*, 2009. 64(3): p. 348-53.
9. Radon, K., et al., Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric Environ Med*, 2002. 9(1): p. 41-8.
10. Kotimaa, M.H., L. Oksanen, and P. Koskela, Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand J Work Environ Health*, 1991. 17(2): p. 117-22.

11. Kullman, G.J., et al., Organic dust exposures from work in dairy barns. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1998. 59(6): p. 403-13.
12. Armstrong, B.G., The effects of measurement errors on relative risk regressions. *Am J Epidemiol*, 1990. 132(6): p. 1176-84.
13. Rosner, B. and W.C. Willet, Interval estimates for correlation coefficients corrected for within-person variation: implications for study design and hypothesis testing. *American Journal of Epidemiology*, 1986. 127(2): p. 377-386.
14. Brunekreef, B., D. Noy, and P. Clausing, Variability of exposure measurements in environmental epidemiology. *Am J Epidemiol*, 1987. 125(5): p. 892-8.
15. Kromhout, H. and D. Heederik, Occupational epidemiology in the rubber industry: implications of exposure variability. *Am J Ind Med*, 1995. 27(2): p. 171-85.
16. Tielemans, E., et al., Individual-based and group-based occupational exposure assessment: some equations to evaluate different strategies. *Ann Occup Hyg*, 1998. 42(2): p. 115-9.
17. Snijders, T. and R. Bosker, eds. *Multilevel analysis*. 1999, Sage Publications. 272.
18. Rabe-Hesketh, S. and A. Skrondal, eds. *Multilevel and longitudinal modeling using stata*. ed. Statacorp. 2005, Stata Press: College Station.
19. Hruschka, D.J., B.A. Kohrt, and C.M. Worthman, Estimating between- and within-individual variation in cortisol levels using multilevel models. *Psychoneuroendocrinology*, 2005. 30(7): p. 698-714.
20. Reboux, G., et al., Indoor mold concentration in eastern France. *Indoor Air*. In press.
21. Gehring, U., et al., Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(5): p. 847-54.

22. Eduard, W. and D. Heederik, Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1998. 59(2): p. 113-27.
23. Reboux, G., et al., Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163(7): p. 1534-9.
24. Reboux, G., et al., Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med*, 2006. 13(2): p. 267-73.
25. Lange, L., P. Thorne, and G.J. Kullman, Determinants of culturable bioaerosol concentration in dairy barn. *Ann Agric Environ Med*, 1997. 4: p. 187-194.
26. Omland, O., Exposure and respiratory health in farming in temperate zones--a review of the literature. *Ann Agric Environ Med*, 2002. 9(2): p. 119-36.
27. Duchaine, C., et al., Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1999. 60(1): p. 89-95.
28. Thorne, P.S., et al., Bioaerosol sampling in field studies: can samples be express mailed? *Am Ind Hyg Assoc J*, 1994. 55(11): p. 1072-9.
29. Thorne, P.S., et al., Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Appl Environ Microbiol*, 1992. 58(8): p. 2543-51.
30. Kotimaa, M.H., E.O. Terho, and K. Husman, Airborne moulds and actinomycetes in work environment of farmers. *Eur J Respir Dis Suppl*, 1987. 152: p. 91-100.
31. Gregory, P.H. and M.E. Lacey, Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J Gen Microbiol*, 1963. 30: p. 75-88.
32. Schram-Bijkerk, D., et al., Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. *Clin Exp Allergy*, 2005. 35(10): p. 1272-8.
33. Ege, M.J., et al., Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 122(2): p. 407-12, 412 e1-4.

34. Sudre, B., et al., High levels of grass pollen inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy*, 2009.
35. Douwes, J., et al., Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*, 2003. 47(3): p. 187-200.
36. Schierl, R., et al., Endotoxin concentration in modern animal houses in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med*, 2007. 14(1): p. 129-36.
37. Waser, M., et al., Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. *Clin Exp Allergy*, 2004. 34(3): p. 389-97.
38. Karadag, B., et al., Environmental determinants of atopic eczema phenotypes in relation to asthma and atopic sensitization. *Allergy*, 2007. 62(12): p. 1387-93.
39. Chew, G.L., et al., Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-->3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air*, 2001. 11(3): p. 171-8.

Figure 1. Farm-specific counts for thermotolerant aerobic bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species (in CFU/m³), before and after feeding sessions

[Legend: ■ geometric mean and bar represent the 95% confidence interval; G, German farm and S, Swiss farm.]

Figure 1a. Thermotolerant aerobic bacteria

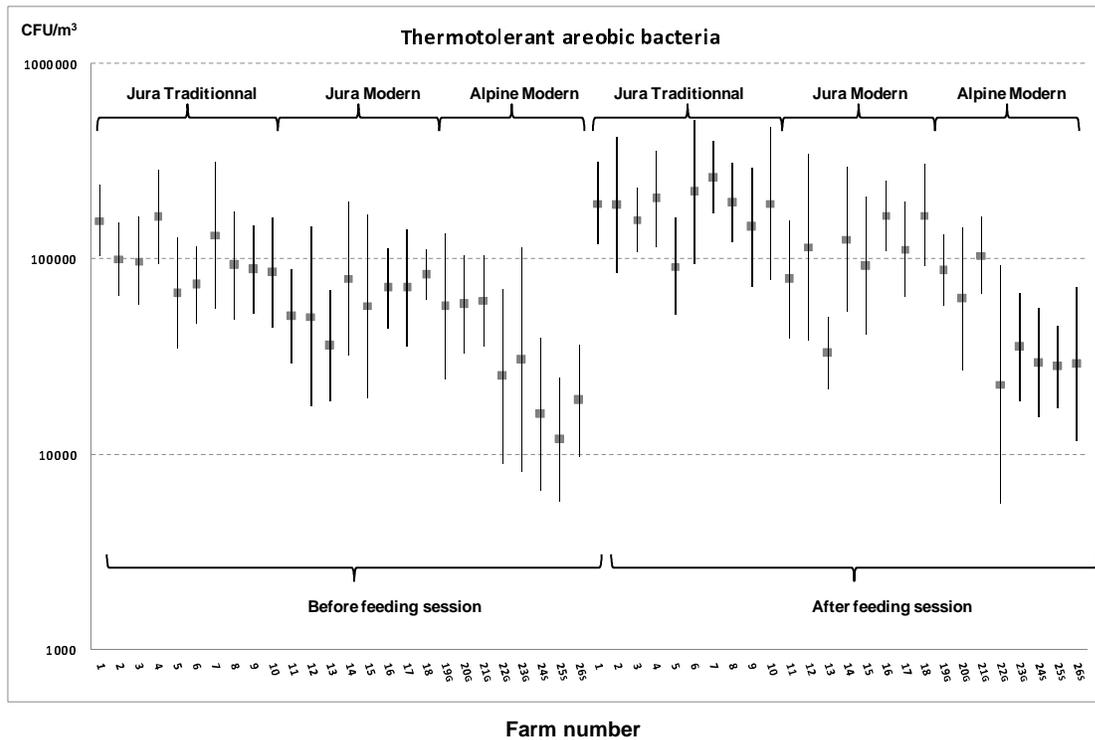


Figure 1b. *Eurotium* spp.

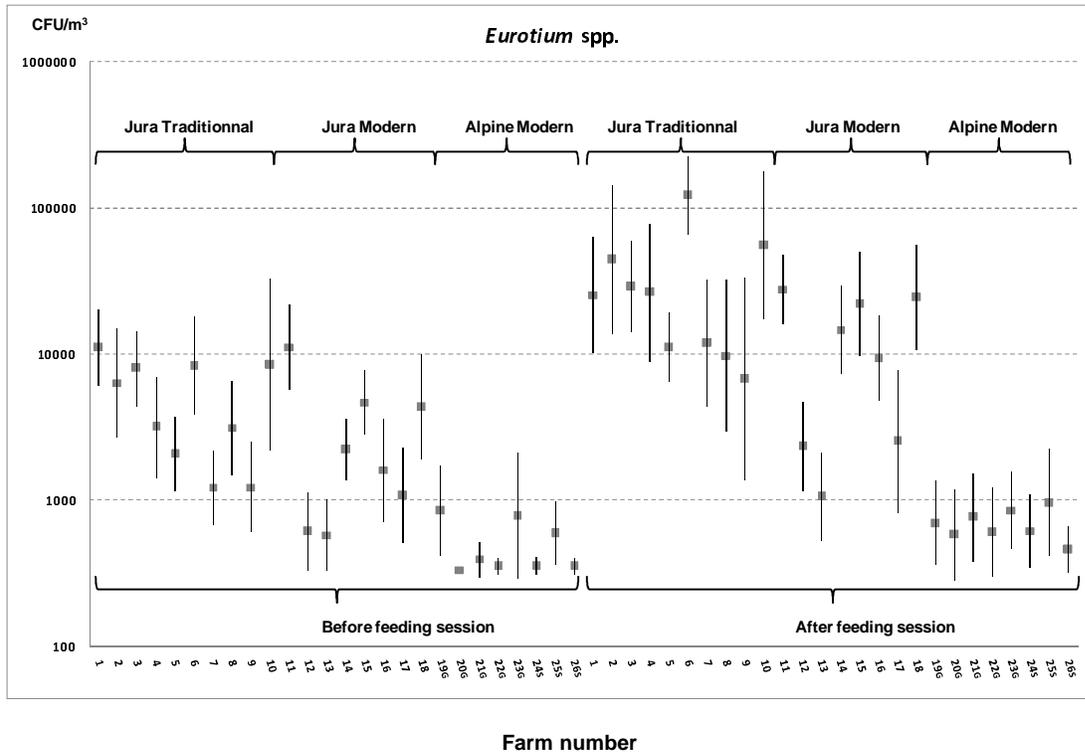


Figure 1c. Other fungal species

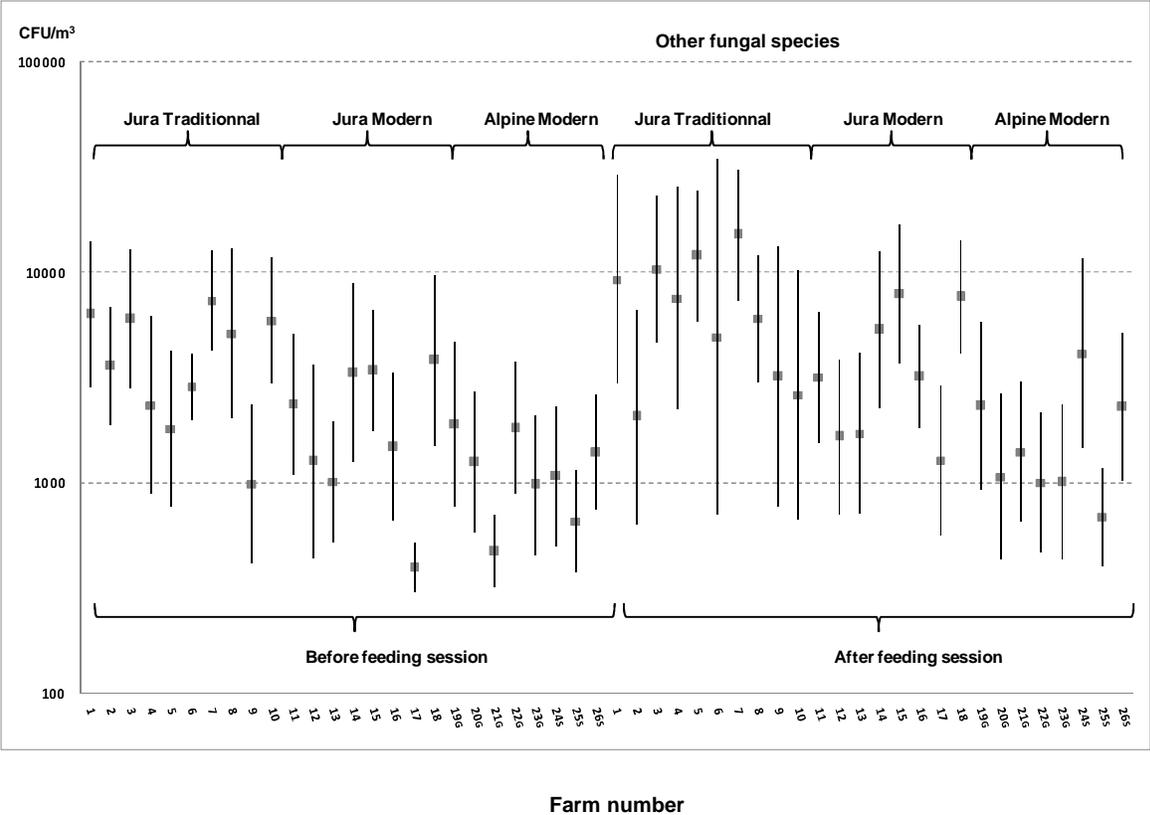


Figure 2. Crude geometric means and 95% confidence intervals of significant predictors in multivariate analyses for thermotolerant aerobic bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species (in CFU/m³)

[Legend: ■ geometric mean with 95% confidence interval; (FM) French modern farm and (FT) French traditional farm]

Figure 2a. Thermotolerant aerobic bacteria

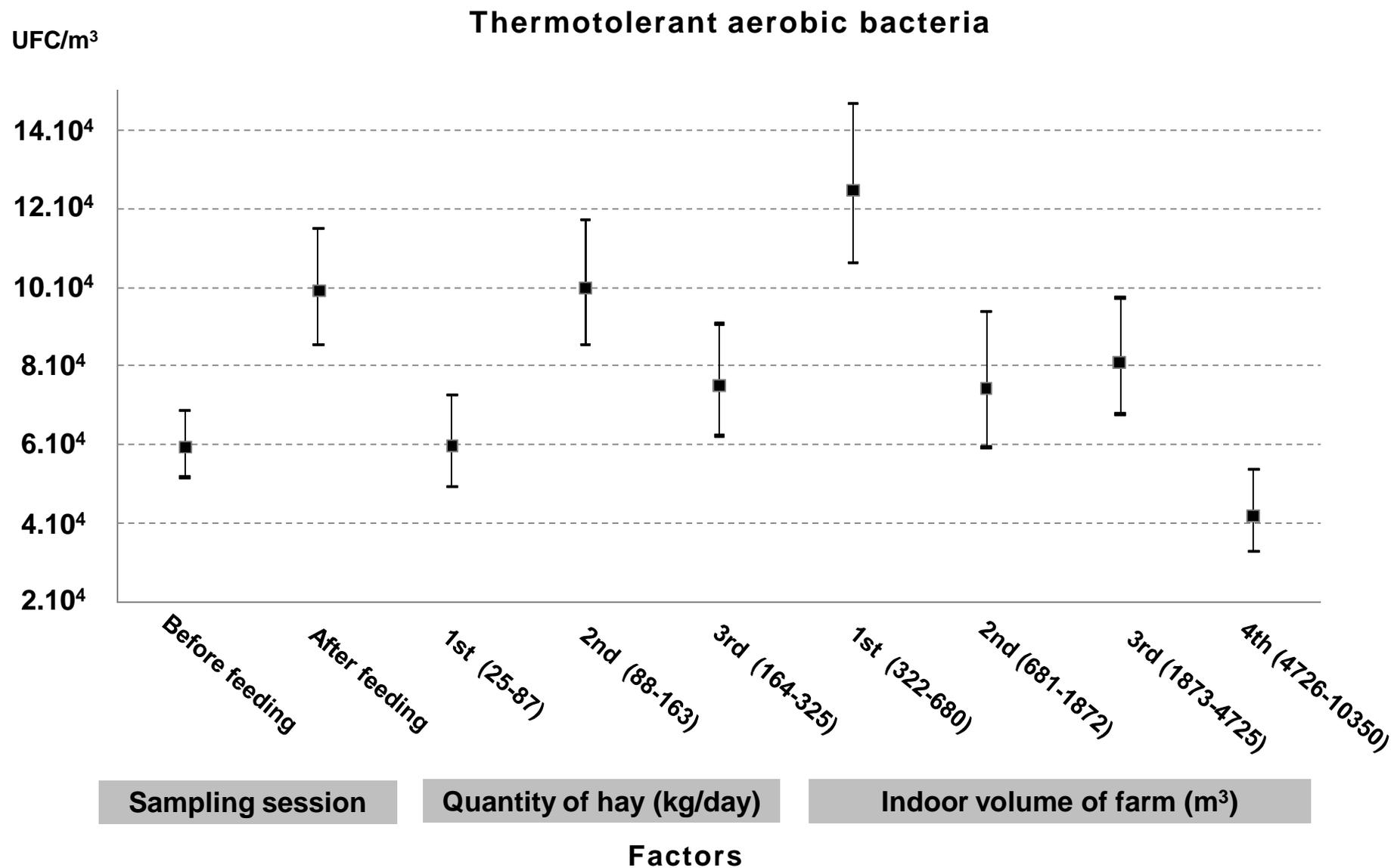


Figure 2. Crude geometric means and 95% confidence intervals of significant predictors in multivariate analyses for thermotolerant aerobic bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species (in CFU/m³)

[Legend: ■ geometric mean with 95% confidence interval; (FM) French modern farm and (FT) French traditional farm]

Figure 2b. *Eurotium* spp.

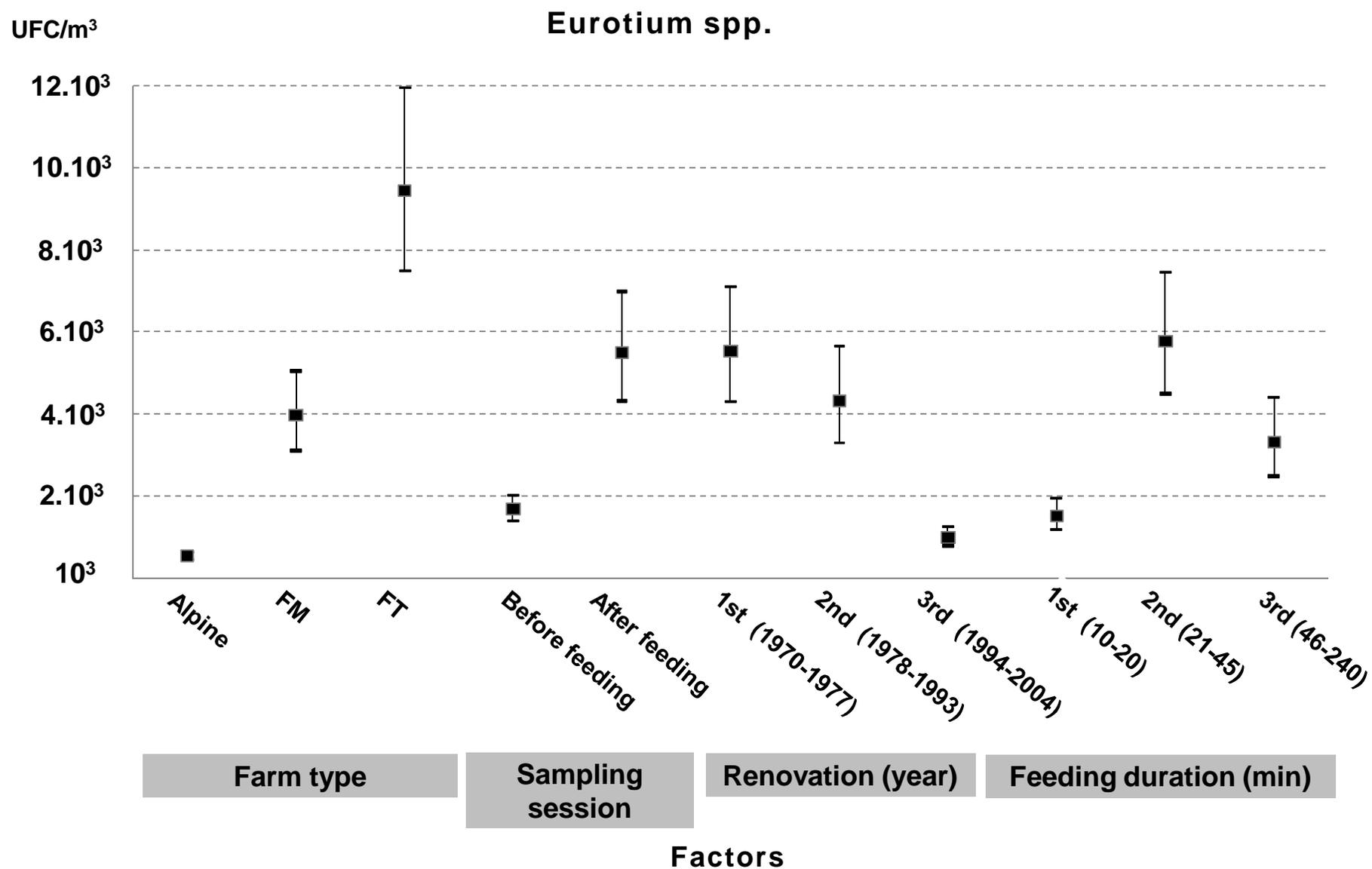
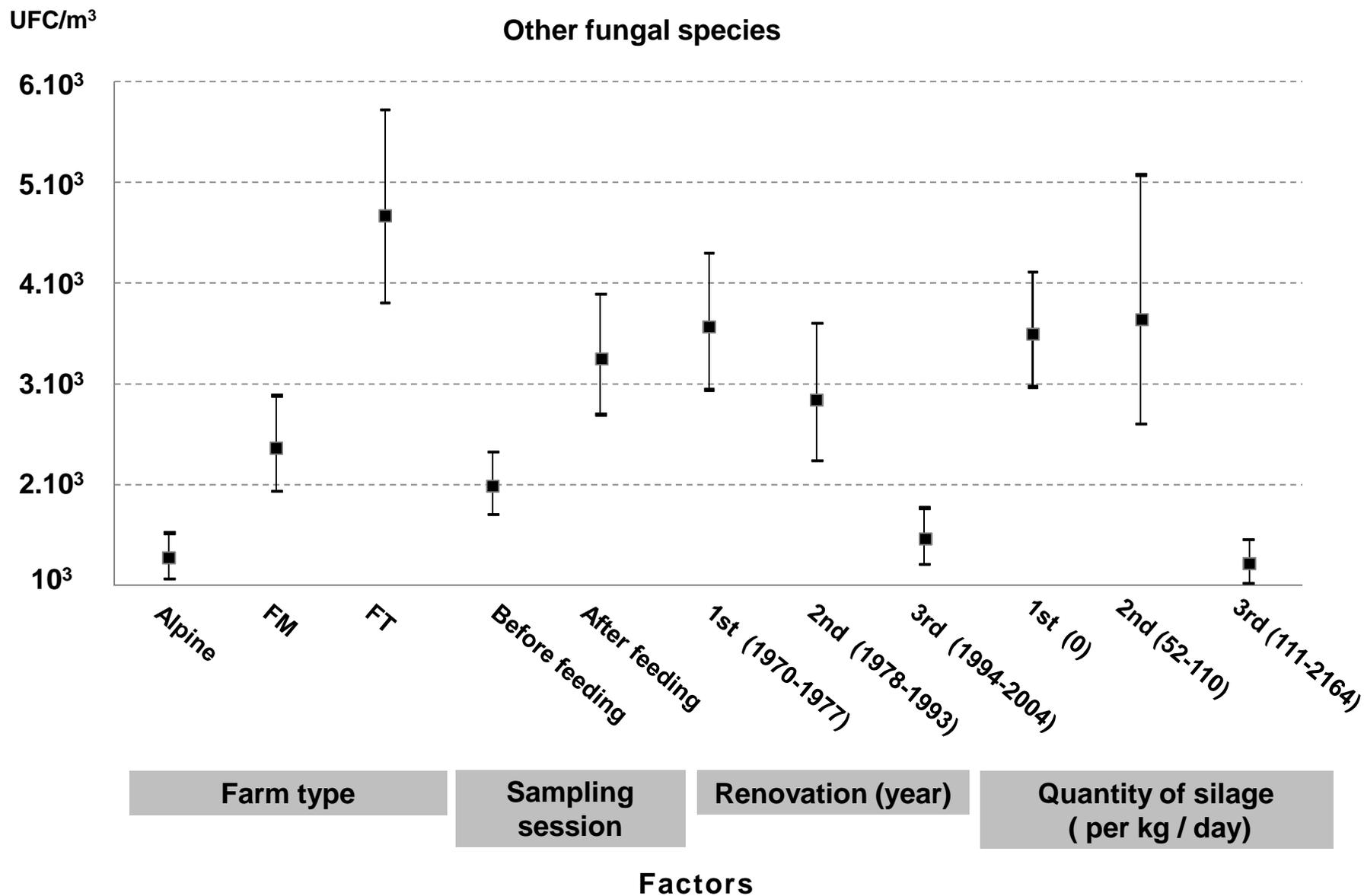


Figure 2. Crude geometric means and 95% confidence intervals of significant predictors in multivariate analyses for thermotolerant aerobic bacteria, *Eurotium* spp. and other fungal species (in CFU/m³)

[Legend: ■ geometric mean with 95% confidence interval; (FM) French modern farm and (FT) French traditional farm]

Figure 2c. Other fungal species



“Les chemins durent en moyenne beaucoup plus longtemps que les empires.”

Le fou d'Edenberg

Samivel

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Johansson, S.G., et al., *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* *Allergy*, 2001. **56**(9): p. 813-24.
2. Gell, P. and R. Coombs, eds. *Clinical aspects of immunology.* 2nd ed. 1968, Blackwell: Oxford.
3. Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.* *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 761-71.
4. Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr., *Asthma.* *N Engl J Med*, 2001. **344**(5): p. 350-62.
5. Kiviloog, J., L. Irnell, and G. Eklund, *The prevalence of bronchial asthma and chronic bronchitis in smokers and non-smokers in a representative local Swedish population.* *Scand J Respir Dis*, 1974. **55**(5): p. 262-76.
6. Haahtela, T., M. Heiskala, and I. Suoniemi, *Allergic disorders and immediate skin test reactivity in Finnish adolescents.* *Allergy*, 1980. **35**(5): p. 433-41.
7. Just, J., et al., [*Air pollution and asthma in children*]. *Arch Pediatr*, 2006. **13**(7): p. 1055-60.
8. Holguin, F., *Traffic, outdoor air pollution, and asthma.* *Immunol Allergy Clin North Am*, 2008. **28**(3): p. 577-88, viii-ix.
9. Bernstein, J.A., et al., *Health effects of air pollution.* *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(5): p. 1116-23.
10. Tarlo, S.M., et al., *Diagnosis and management of work-related asthma: American College Of Chest Physicians Consensus Statement.* *Chest*, 2008. **134**(3 Suppl): p. 1S-41S.
11. Nicholson, P.J., et al., *Evidence based guidelines for the prevention, identification, and management of occupational asthma.* *Occup Environ Med*, 2005. **62**(5): p. 290-9.
12. Martinez, F.D., et al., *Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates.* *N Engl J Med*, 1995. **332**(3): p. 133-8.
13. Limb, S.L., et al., *Adult asthma severity in individuals with a history of childhood asthma.* *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(1): p. 61-6.
14. Szeffler, S.J. and A. Apter, *Advances in pediatric and adult asthma.* *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(3): p. 470-7.
15. Tunin de lara, M. and C. Rahesison, *Facteurs de persistance de l'asthme de l'enfance à l'âge adulte*, in *Allergologie pédiatrique.* 2007, Flammarion Médecine-Sciences: Paris. p. 27-32.
16. Buist, A.S. and W.M. Vollmer, *Reflections on the rise in asthma morbidity and mortality.* *Jama*, 1990. **264**(13): p. 1719-20.
17. Strachan, D.P., *Time trends in asthma and allergy: ten questions, fewer answers.* *Clin Exp Allergy*, 1995. **25**(9): p. 791-4.
18. *Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* *Eur Respir J*, 1998. **12**(2): p. 315-35.
19. Lewis, S., *ISAAC--a hypothesis generator for asthma? International Study of Asthma and Allergies in Childhood.* *Lancet*, 1998. **351**(9111): p. 1220-1.
20. Delmas, M., et al., *Asthme: prévalence et impact sur la vie quotidienne - Analyse des données de l'enquête décennale santé 2003 de l'Insee.* 2003, Institut de veille sanitaire: Saint-Maurice. p. 89.
21. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic.* *N Engl J Med*, 2006. **355**(21): p. 2226-35.
22. Lai, C., et al., *Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* *Thorax*, 2009.

23. Zollner, I.K., et al., *No increase in the prevalence of asthma, allergies, and atopic sensitisation among children in Germany: 1992-2001*. Thorax, 2005. **60**(7): p. 545-8.
24. Anderson, H.R., et al., *Trends in prevalence of symptoms of asthma, hay fever, and eczema in 12-14 year olds in the British Isles, 1995-2002: questionnaire survey*. Bmj, 2004. **328**(7447): p. 1052-3.
25. Ronchetti, R., et al., *Is the increase in childhood asthma coming to an end? Findings from three surveys of schoolchildren in Rome, Italy*. Eur Respir J, 2001. **17**(5): p. 881-6.
26. Annesi-Maesano, I., et al., *Time trends in prevalence and severity of childhood asthma and allergies from 1995 to 2002 in France*. Allergy, 2009.
27. Braun-Fahrlander, C., et al., *No further increase in asthma, hay fever and atopic sensitisation in adolescents living in Switzerland*. Eur Respir J, 2004. **23**(3): p. 407-13.
28. Garcia-Marcos, L., et al., *Stabilization of asthma prevalence among adolescents and increase among schoolchildren (ISAAC phases I and III) in Spain*. Allergy, 2004. **59**(12): p. 1301-7.
29. Toelle, B.G., et al., *Prevalence of asthma and allergy in schoolchildren in Belmont, Australia: three cross sectional surveys over 20 years*. Bmj, 2004. **328**(7436): p. 386-7.
30. Wong, G.W., et al., *Declining asthma prevalence in Hong Kong Chinese schoolchildren*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(10): p. 1550-5.
31. Demoly, P., et al., *Validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma)*. Allergy, 2003. **58**(7): p. 672-5.
32. Annesi-Maesano, I., et al., *The score for allergic rhinitis (SFAR): a simple and valid assessment method in population studies*. Allergy, 2002. **57**(2): p. 107-14.
33. Guillam, M. and C. Segala, *Pollens et effets sanitaires : synthèse des études épidémiologiques*. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2008. **48**: p. 14-19.
34. Ait-Khaled, N., et al., *Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three*. Allergy, 2009. **64**(1): p. 123-48.
35. Annesi-Maesano, I., M. Oryszczyn, and A. Lanteaume, *Prévalence et sévérité de la rhinite allergique parmi les adolescents*. Rev Mal Respir, 1997. **14**(s4): p. 23-31.
36. Bousquet, J., P. Van Cauwenberge, and N. Khaltaev, *Allergic rhinitis and its impact on asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5 Suppl): p. S147-334.
37. Bousquet, J., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)*. Allergy, 2008. **63 Suppl 86**: p. 8-160.
38. Schroeder, A., et al., *Food allergy is associated with an increased risk of asthma*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(2): p. 261-70.
39. Young, E., et al., *A population study of food intolerance*. Lancet, 1994. **343**(8906): p. 1127-30.
40. Jansen, J.J., et al., *Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(2): p. 446-56.
41. Moneret-Vautrin, A., *Épidémiologie de l'allergie alimentaire* Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 2008. **48**(3): p. 171-178.
42. Duteau, G., *Épidémiologie des allergies alimentaires*. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2003. **43**: p. 501-506.
43. Kanny, G., et al., *Population study of food allergy in France*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(1): p. 133-40.
44. Flohr, C., et al., *The role of atopic sensitization in flexural eczema: findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Two*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(1): p. 141-147 e4.

45. Williams, H., et al., *Is eczema really on the increase worldwide?* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 947-54 e15.
46. Barberio, G., et al., *Does a 'reverse' atopic march exist?* Allergy, 2008. **63**(12): p. 1630-2.
47. Von Mutius, E., *Les chemins de l'atopie : leçons de l'étude MAS.* Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2003(43): p. 427-430.
48. Nickel, R., et al., *Messages from the German Multicentre Allergy Study.* Pediatr Allergy Immunol, 2002. **13 Suppl 15**: p. 7-10.
49. Rosenau, M. and J. Anderson, *A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum: hereditary transmission of the susceptibility in guinea pigs.* Hyg Lab Bull 1906(29): p. 73-79.
50. Szepefalusi, Z., *The maturation of the fetal and neonatal immune system.* J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1773S-1781S.
51. Prescott, S.L., et al., *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile.* J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
52. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
53. Szepefalusi, Z., et al., *Direct evidence for transplacental allergen transfer.* Pediatr Res, 2000. **48**(3): p. 404-7.
54. Holloway, J.A., et al., *Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood.* Lancet, 2000. **356**(9245): p. 1900-2.
55. Szepefalusi, Z., et al., *Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta.* Clin Exp Allergy, 2006. **36**(9): p. 1130-7.
56. Miller, D.L., T. Hiravonen, and D. Gitlin, *Synthesis of IgE by the human conceptus.* J Allergy Clin Immunol, 1973. **52**(3): p. 182-8.
57. Shirakawa, T., et al., *Effect of maternal lifestyle on cord blood IgE factor.* Eur J Epidemiol, 1997. **13**(4): p. 395-402.
58. Pfefferle, P.I., et al., *Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) Study.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(4): p. 711-6.
59. Holt, P.G., *Prenatal versus postnatal priming of allergen specific immunologic memory: the debate continues.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(4): p. 717-8.
60. Boyle, R.J. and M.L. Tang, *Can allergic diseases be prevented prenatally?* Allergy, 2006. **61**(12): p. 1423-31.
61. Miller, R.L., et al., *Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(6): p. 995-1001.
62. Kulig, M., et al., *Long-lasting sensitization to food during the first two years precedes allergic airway disease. The MAS Study Group, Germany.* Pediatr Allergy Immunol, 1998. **9**(2): p. 61-7.
63. Erwin, E.A., et al., *Asthma and indoor air: contrasts in the dose response to cat and dust-mite.* Indoor Air, 2005. **15 Suppl 10**: p. 33-9.
64. Kulig, M., et al., *Effect of pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first 3 years of life. Multicenter Allergy Study Group, Germany.* Allergy, 1999. **54**(3): p. 220-8.
65. Wahn, U., et al., *Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life.* J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(6 Pt 1): p. 763-9.
66. Lau, S., et al., *Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group.* Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1392-7.

67. Illi, S., et al., *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 925-31.
68. van der Hulst, A.E., H. Klip, and P.L. Brand, *Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 565-9.
69. Tariq, S.M., et al., *Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age*. Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11**(3): p. 162-7.
70. Nickel, R., et al., *Sensitization to hen's egg at the age of twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(5): p. 613-7.
71. Koenig, J.Q., *Air pollution and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(4 Pt 1): p. 717-22.
72. Dutau, G., ed. *Le dictionnaire des allergènes*. 3 ed. 2002, Phase5: Paris.
73. Chapman, M.D., et al., *Nomenclature and structural biology of allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(2): p. 414-20.
74. Dubus, J.C., et al., *Allergy to cypress pollen*. Allergy, 2000. **55**(4): p. 410-1.
75. Kihlstrom, A., et al., *Exposure to high doses of birch pollen during pregnancy, and risk of sensitization and atopic disease in the child*. Allergy, 2003. **58**(9): p. 871-7.
76. Kihlstrom, A., et al., *Exposure to birch pollen in infancy and development of atopic disease in childhood*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(1): p. 78-84.
77. Duffy, D.L., et al., *Genetics of asthma and hay fever in Australian twins*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1351-8.
78. Larsen, F.S., N.V. Holm, and K. Henningsen, *Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample*. J Am Acad Dermatol, 1986. **15**(3): p. 487-94.
79. Cookson, W., *The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 978-88.
80. Laitinen, T., et al., *Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits*. Science, 2004. **304**(5668): p. 300-4.
81. Allen, M., et al., *Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 258-63.
82. Nishio, Y., et al., *Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese*. Genes Immun, 2003. **4**(7): p. 515-7.
83. Kato, A., et al., *Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population*. Br J Dermatol, 2003. **148**(4): p. 665-9.
84. Miedzobrodzki, J., et al., *Proteolytic activity of Staphylococcus aureus strains isolated from the colonized skin of patients with acute-phase atopic dermatitis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. **21**(4): p. 269-76.
85. Marenholz, I., et al., *Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(4): p. 866-71.
86. Weidinger, S., et al., *Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1203-1209 e1.
87. Rodriguez, E., et al., *Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(6): p. 1361-70 e7.
88. Mazoni, A. and D.M. Segal, *Controlling the Toll road to dendritic cell polarization*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(5): p. 721-30.
89. Liu, A.H., *Innate microbial sensors and their relevance to allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(5): p. 846-58; quiz 858-60.
90. Goldman, M., *Translational mini-review series on Toll-like receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 208-16.

91. Tse, K. and A.A. Horner, *Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases*. *Semin Immunopathol*, 2008. **30**(1): p. 53-62.
92. Horner, A.A., V. Redecke, and E. Raz, *Toll-like receptor ligands: hygiene, atopy and therapeutic implications*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004. **4**(6): p. 555-61.
93. Yamamoto, M. and S. Akira, *Mechanisms of innate immune responses mediated by Toll-like receptors*. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2005. **5**: p. 167-83.
94. McIntire, J.J., et al., *Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease*. *Nature*, 2003. **425**(6958): p. 576.
95. Kabesch, M., et al., *Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(4): p. 813-7.
96. Eder, W., et al., *Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 482-8.
97. Ege, M.J., et al., *Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(4): p. 817-23.
98. Bruce, S., et al., *The protective effect of farm animal exposure on childhood allergy is modified by NPSR1 polymorphisms*. *J Med Genet*, 2009. **46**(3): p. 159-67.
99. von Mutius, E., *Gene-environment interactions in asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(1): p. 3-11; quiz 12-3.
100. Vuillermin, P.J., et al., *Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease*. *Allergy*, 2009. **64**(3): p. 348-53.
101. Vercelli, D., *Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 381-6; quiz 387.
102. Vercelli, D., *Gene-environment interactions: the road less traveled by in asthma genetics*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(1): p. 26-7.
103. Kabesch, M. and R.P. Lauener, *Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(3): p. 383-7.
104. Downs, S.H., et al., *Continued increase in the prevalence of asthma and atopy*. *Arch Dis Child*, 2001. **84**(1): p. 20-23.
105. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. *Bmj*, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
106. von Mutius, E., *Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence*. *Immunobiology*, 2007. **212**(6): p. 433-9.
107. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. *Thorax*, 2000. **55 Suppl 1**: p. S2-10.
108. Liu, A.H. and J.R. Murphy, *Hygiene hypothesis: fact or fiction?* *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(3): p. 471-8.
109. Liu, A.H. and D.Y. Leung, *Renaissance of the hygiene hypothesis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(5): p. 1063-6.
110. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(5): p. 969-77; quiz 978.
111. von Mutius, E., *Influences in allergy: epidemiology and the environment*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 373-9; quiz 380.
112. von Mutius, E., *Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence*. *Eur Respir J*, 2001. **18**(5): p. 872-81.
113. Platts-Mills, T., et al., *Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study*. *Lancet*, 2001. **357**(9258): p. 752-6.

114. Platts-Mills, T.A., et al., *Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma?* Allergy, 2005. **60 Suppl 79**: p. 25-31.
115. van Schayck, C.P. and J.A. Knottnerus, *Can the 'hygiene hypothesis' be explained by confounding by behavior?* J Clin Epidemiol, 2004. **57**(5): p. 435-7.
116. van Schayck, C.P. and J.A. Knottnerus, *No clinical evidence base to support the hygiene hypothesis.* Prim Care Respir J, 2004. **13**(2): p. 76-9.
117. Braback, L., A. Hjern, and F. Rasmussen, *Selective migration contributes to a healthy worker effect in the farming population.* J Clin Epidemiol, 2006. **59**(1): p. 102-3; author reply 103.
118. Vitart, V., et al., *Increased level of linkage disequilibrium in rural compared with urban communities: a factor to consider in association-study design.* Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 763-72.
119. Wjst, M., *Allergy risk of vitamin D supplements has been described in various settings.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 1065-6; author reply 1066.
120. Douwes, J. and N. Pearce, *Asthma and the westernization 'package'.* Int J Epidemiol, 2002. **31**(6): p. 1098-102.
121. Douwes, J. and N. Pearce, *Commentary: The end of the hygiene hypothesis?* Int J Epidemiol, 2008. **37**(3): p. 570-2.
122. Linneberg, A., *Hygiene hypothesis: wanted--dead or alive.* Int J Epidemiol, 2008.
123. Douwes, J. and N. Pearce, *Hygiene hypothesis: wanted--dead or alive.* Int J Epidemiol, 2008.
124. Maziak, W., *Point-counterpoint. The triumph of the null hypothesis: epidemiology in an age of change.* Int J Epidemiol, 2009. **38**(2): p. 393-402.
125. Perkin, M.R., *Football position and atopy--both subject to the birth order effect?* Bmj, 2003. **327**(7429): p. 1473-4.
126. Holt, P.G., et al., *The role of allergy in the development of asthma.* Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B12-7.
127. Martinez, F.D. and P.G. Holt, *Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma.* Lancet, 1999. **354 Suppl 2**: p. SII12-5.
128. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
129. Romagnani, S., *The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?* Immunology, 2004. **112**(3): p. 352-63.
130. Castro, M., et al., *Could asthma be worsened by stimulating the T-helper type 1 immune response?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(2): p. 143-6.
131. Prescott, S.L., et al., *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children.* Lancet, 1999. **353**(9148): p. 196-200.
132. Bottcher, M.F., M.C. Jenmalm, and B. Bjorksten, *Immune responses to birch in young children during their first 7 years of life.* Clin Exp Allergy, 2002. **32**(12): p. 1690-8.
133. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
134. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 271-83.
135. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. First of two parts.* N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 30-7.
136. Garn, H. and H. Renz, *Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis.* Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 441-52.
137. Romagnani, S., *Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(6): p. 1511-3.

138. Ahern, D.J. and D.S. Robinson, *Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005. **5**(6): p. 531-6.
139. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(4): p. 735-46; quiz 747-8.
140. Lanier, L.L., *Evolutionary struggles between NK cells and viruses*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 259-68.
141. Vuitton, D.A., *Immunologie*, ed. Simplissime. 2009, Rueil-malmaison: Pradel. 209.
142. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 199-205.
143. Willart, M.A. and B.N. Lambrecht, *The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma*. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(1): p. 12-9.
144. Romagnani, S., et al., *Properties and origin of human Th17 cells*. *Mol Immunol*, 2009.
145. O'Shea, J., A. Laurence, and A. Adamson, *CD4+ T-cell diversity*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(2).
146. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *T regulatory cells in allergy*. *Chem Immunol Allergy*, 2006. **91**: p. 159-73.
147. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(12): p. 911-20.
148. Hamelmann, E., et al., *Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(3): p. 934-41.
149. Gavett, S.H., et al., *Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(2 Pt 1): p. L253-61.
150. Schwarze, J., et al., *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*, 1998. **102**(1): p. 86-93.
151. Brusselle, G.G., et al., *Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice*. *Clin Exp Allergy*, 1994. **24**(1): p. 73-80.
152. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(5): p. 298-304.
153. Hamelmann, E. and E.W. Gelfand, *Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999. **120**(1): p. 8-16.
154. Hamelmann, E., U. Wahn, and E.W. Gelfand, *Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999. **118**(2-4): p. 90-4.
155. Kay, A.B. and C.J. Corrigan, *Asthma. Eosinophils and neutrophils*. *Br Med Bull*, 1992. **48**(1): p. 51-64.
156. Corrigan, C.J. and A.B. Kay, *Asthma. Role of T-lymphocytes and lymphokines*. *Br Med Bull*, 1992. **48**(1): p. 72-84.
157. Fergusson, D.M., L.J. Horwood, and F.T. Shannon, *Early solid feeding and recurrent childhood eczema: a 10-year longitudinal study*. *Pediatrics*, 1990. **86**(4): p. 541-6.
158. Zheng, T. and Z. Zhu, *Lessons from murine models of atopic dermatitis*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. **5**(4): p. 291-7.
159. Galli, E., et al., *Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches*. *Curr Mol Med*, 2003. **3**(2): p. 127-38.
160. Turrone, F., et al. *Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality*. in *14th Meeting of the International-Symposia-on-the-Biology-of-Actinomycetes (ISBA)*. 2007. Newcastle upon Tyne, ENGLAND.
161. Kalliomaki, M., et al., *Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2003. **361**(9372): p. 1869-71.

162. Joo, S.S., et al., *Therapeutic advantages of medicinal herbs fermented with Lactobacillus plantarum, in topical application and its activities on atopic dermatitis*. Phytother Res, 2009.
163. Segawa, S., et al., *Oral administration of heat-killed Lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates the development of dermatitis and inhibits immunoglobulin E production in atopic dermatitis model NC/Nga mice*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(5): p. 884-9.
164. Omland, O., *Exposure and respiratory health in farming in temperate zones--a review of the literature*. Ann Agric Environ Med, 2002. **9**(2): p. 119-36.
165. Johnson, C.C. and S.H. Alford, *Do animals on the farm and in the home reduce the risk of pediatric atopy?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002. **2**(2): p. 133-9.
166. Naleway, A.L., *Asthma and atopy in rural children: is farming protective?* Clin Med Res, 2004. **2**(1): p. 5-12.
167. von Mutius, E., *Asthma and allergies in rural areas of Europe*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(3): p. 212-6.
168. von Mutius, E. and K. Radon, *Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course*. Immunol Allergy Clin North Am, 2008. **28**(3): p. 631-47, ix-x.
169. Ernst, P. and Y. Cormier, *Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1563-6.
170. Dimich-Ward, H., et al., *Contact with livestock--a protective effect against allergies and asthma?* Clin Exp Allergy, 2006. **36**(9): p. 1122-9.
171. Midodzi, W.K., et al., *Reduced risk of physician-diagnosed asthma among children dwelling in a farming environment*. Respirology, 2007. **12**(5): p. 692-9.
172. Hugg, T.T., et al., *Exposure to animals and the risk of allergic asthma: a population-based cross-sectional study in Finnish and Russian children*. Environ Health, 2008. **7**: p. 28.
173. Hoppin, J.A., et al., *Pesticides and atopic and nonatopic asthma among farm women in the Agricultural Health Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(1): p. 11-8.
174. Barnes, M., et al., *Crete: does farming explain urban and rural differences in atopy?* Clin Exp Allergy, 2001. **31**(12): p. 1822-8.
175. Zekveld, C., et al., *The effects of farming and birth order on asthma and allergies*. Eur Respir J, 2006. **28**(1): p. 82-8.
176. Wickens, K., et al., *Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children*. Allergy, 2002. **57**(12): p. 1171-9.
177. Douwes, J., et al., *Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 603-11.
178. Merchant, J.A., et al., *Asthma and farm exposures in a cohort of rural Iowa children*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(3): p. 350-6.
179. Adler, A., I. Tager, and D.R. Quintero, *Decreased prevalence of asthma among farm-reared children compared with those who are rural but not farm-reared*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 67-73.
180. Elliott, L., K. Yeatts, and D. Loomis, *Ecological associations between asthma prevalence and potential exposure to farming*. Eur Respir J, 2004. **24**(6): p. 938-41.
181. Radon, K., A. Schulze, and D. Nowak, *Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood: protection, underreporting or selection?* Allergy, 2006. **61**(4): p. 443-6.
182. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
183. Douwes, J., et al., *Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults*. Allergy, 2007. **62**(10): p. 1158-65.
184. Remes, S.T., et al., *Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children?* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(4): p. 427-34.

185. Portengen, L., et al., *Low prevalence of atopy in young Danish farmers and farming students born and raised on a farm*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(2): p. 247-53.
186. Ege, M.J., et al., *Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(2): p. 407-12, 412 e1-4.
187. Braun-Fahrlander, C., et al., *Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community*. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(1): p. 28-34.
188. Von Ehrenstein, O.S., et al., *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 187-93.
189. Horak, F., Jr., et al., *Parental farming protects children against atopy: longitudinal evidence involving skin prick tests*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(8): p. 1155-9.
190. Riedler, J., et al., *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 194-200.
191. Downs, S.H., et al., *Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(4): p. 570-5.
192. Remes, S.T., et al., *Does heredity modify the association between farming and allergy in children?* Acta Paediatr, 2002. **91**(11): p. 1163-9.
193. Melsom, T., et al., *Asthma and indoor environment in Nepal*. Thorax, 2001. **56**(6): p. 477-81.
194. Perkin, M.R. and D.P. Strachan, *Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy?* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(6): p. 1374-81.
195. Waser, M., et al., *Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(5): p. 661-70.
196. Gassner-Bachmann, M. and B. Wuthrich, *[Farmers' children suffer less from hay fever and asthma]*. Dtsch Med Wochenschr, 2000. **125**(31-32): p. 924-31.
197. Filipiak, B., et al., *Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany--results from the MONICA/KORA study Augsburg*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(12): p. 1829-38.
198. Radon, K., et al., *Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(8): p. 1178-83.
199. Schulze, A., et al., *Characterisation of asthma among adults with and without childhood farm contact*. Eur Respir J, 2007. **29**(6): p. 1169-73.
200. Kiechl-Kohlendorfer, U., et al., *Neonatal characteristics and risk of atopic asthma in schoolchildren: results from a large prospective birth-cohort study*. Acta Paediatr, 2007. **96**(11): p. 1606-10.
201. Alfven, T., et al., *Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study*. Allergy, 2006. **61**(4): p. 414-21.
202. Benn, C.S., et al., *Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life*. Bmj, 2004. **328**(7450): p. 1223.
203. Eduard, W., et al., *Atopic and non-atopic asthma in a farming and a general population*. Am J Ind Med, 2004. **46**(4): p. 396-9.
204. Ronmark, E., et al., *Major increase in allergic sensitization in schoolchildren from 1996 to 2006 in northern Sweden*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(2): p. 357-63, 63 e1-15.
205. Braback, L., A. Hjern, and F. Rasmussen, *Trends in asthma, allergic rhinitis and eczema among Swedish conscripts from farming and non-farming environments. A nationwide study over three decades*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(1): p. 38-43.

206. Klintberg, B., et al., *Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a closed birth cohort from Sweden*. Eur Respir J, 2001. **17**(6): p. 1151-7.
207. Stipic-Markovic, A., et al., [*Prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) in a population of schoolchildren in Zagreb*]. Acta Med Croatica, 2003. **57**(4): p. 281-5.
208. Remes, S.T., et al., *Allergen-specific sensitization in asthma and allergic diseases in children: the study on farmers' and non-farmers' children*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(2): p. 160-6.
209. Kilpelainen, M., et al., *Farm environment in childhood prevents the development of allergies*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 201-8.
210. Pekkanen, J., B. Xu, and M.R. Jarvelin, *Gestational age and occurrence of atopy at age 31--a prospective birth cohort study in Finland*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(1): p. 95-102.
211. Kilpelainen, M., et al., *Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood*. Allergy, 2002. **57**(12): p. 1130-5.
212. Koskela, H.O., et al., *Pet- and pollen-induced upper airway symptoms in farmers and in nonfarmers*. Eur Respir J, 2003. **22**(1): p. 135-40.
213. Leynaert, B., et al., *Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 658-65.
214. Leynaert, B., et al., *Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood?* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1829-34.
215. Chew, G.L., et al., *Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-->3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust*. Indoor Air, 2001. **11**(3): p. 171-8.
216. Schram, D., et al., *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children--the PARSIFAL Study*. Allergy, 2005. **60**(5): p. 611-8.
217. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
218. van Strien, R.T., et al., *Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 860-7.
219. Schram-Bijkerk, D., et al., *Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(10): p. 1272-8.
220. Eduard, W., et al., *Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms*. Occup Environ Med, 2001. **58**(2): p. 113-8.
221. Smit, L.A., et al., *Exposure-response analysis of allergy and respiratory symptoms in endotoxin-exposed adults*. Eur Respir J, 2008. **31**(6): p. 1241-8.
222. Lauener, R.P., et al., *Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 465-6.
223. Eder, W., et al., *Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(3): p. 601-7.
224. Warner, J.O., *The early life origins of asthma and related allergic disorders*. Arch Dis Child, 2004. **89**(2): p. 97-102.
225. Taylor, A., et al., *T regulatory cells and allergy*. Microbes Infect, 2005. **7**(7-8): p. 1049-55.
226. Bieli, C., et al., *A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(6): p. 1308-15.

227. Smit, L.A., et al., *CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(5): p. 363-8.
228. Eder, W., et al., *Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1*. Allergy, 2006. **61**(9): p. 1117-24.
229. Stern, D.A., 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**(2): p. 351-8.
230. Stern, D., et al., *Rethinking Th2 antibody responses and allergic sensitization*. Novartis Found Symp, 2004. **257**: p. 25-37; discussion 37-50, 276-85.
231. Schaub, B., et al., *Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(4): p. 774-82 e5.
232. Griffiths, W.D., et al., *The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols*. Journal of Aerosol Science Sampling and Rapid Assay of Bioaerosols, 1997. **28**(3): p. 437-457.
233. Vincent, J.H., *Aerosol sampling : science, standards, instrumentation and applications*. 2007, Chichester: John Wiley & Sons. 636.
234. CEN., *Workplace atmospheres: Size fraction definitions for measurements of airborne particles in the workplace.*, C.E.d. Normalisation, Editor. 1995: Bruxelles, Belgique.
235. ISO. *Air quality - Particle size fraction definitions for health-related sampling - ISO standard 7708*. ISO standard 1995 [cited].
236. ACGIH, *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices.*, in American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 1995, ACGIH: Cincinnati, Ohio.
237. American Thoracic Society, M.S.o.A.I.A., *Respiratory Health Hazards in Agriculture* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(5): p. S1-S76.
238. AFNOR, *Atmosphères des lieux de travail - Règles pour le mesurage de micro-organismes et d'endotoxine en suspension dans l'air.*, A.A.F.d. Normalisation., Editor. 2000, AFNOR : Association Française de Normalisation. p. 28.
239. Eduard, W., *Exposure to non-infectious microorganisms and endotoxins in agriculture*. Ann Agric Environ Med, 1997. **4**: p. 179-186.
240. Eduard, W. and D. Heederik, *Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments*. Am Ind Hyg Assoc J, 1998. **59**(2): p. 113-27.
241. IRSST, *Les bioaérosols en milieu du travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention*. Etudes et recherche - guide technique - édition IRSST, 2001.
242. Blomquist, G., U. Palmgren, and G. Strom, *Methodological aspects of measurement of exposure to mould*. Eur J Respir Dis Suppl, 1987. **154**: p. 29-36.
243. Nelson, H.S. and W.R. Solomon, *How ill the wind? Issues in aeroallergen sampling*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(1): p. 3-8; quiz 9.
244. Kate, *Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration*. Ann. occup.hyg., 2002. **46**(1): p. 113-118.
245. Edwards, R.D., E.J. Yurkow, and P.J. Liroy, *Seasonal deposition of housedusts onto household surfaces*. Sci Total Environ, 1998. **224**(1-3): p. 69-80.
246. Liroy, P.J., N.C. Freeman, and J.R. Millette, *Dust: a metric for use in residential and building exposure assessment and source characterization*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(10): p. 969-83.
247. Wurtz, H., et al., *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, 2005. **15 Suppl 9**: p. 33-40.
248. Solomon, *How ill the wind? Issues in aeroallergen sampling*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112 number 1**.

249. Noss, I., et al., *Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(18): p. 5621-7.
250. Jensen, P.A., et al., *Instrumentation used with microbial aerosols*. Atmosphérique Microbial Aerosols, 1995: p. 226-284.
251. Jensen, P.A., et al., *Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria*. Am Ind Hyg Assoc J, 1992. **53**(10): p. 660-7.
252. Hauswirth, D.W. and J.S. Sundry, *Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(5): p. 361-6.
253. Dillon, H.K., et al., *Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children*. Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 3**: p. 473-80.
254. Levetin, E. and W.E. Horner, *Fungal aerobiology: Exposure and measurement*, in *Fungal Allergy and Pathogenicity*. 2002, Karger: Basel. p. 10-27.
255. CAREPS. and ADEME., *Etude bibliographique sur l'évaluation des risques liés aux bio-aérosols générés par le compostage des déchets*. 2002, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.: Angers.
256. Le bacle, C., *Les risques biologiques en milieu professionnel*. Hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires, 2007. **Pr 28 - 207**: p. 85-96.
257. Duquenne, P. and G. Greff-mirguet, *L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens*. Hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires, 2005. **ND 2222-198**: p. 23-28.
258. Douwes, J., et al., *Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects*. Ann Occup Hyg, 2003. **47**(3): p. 187-200.
259. Chang, C.W., et al., *Evaluation of counting error due to colony masking in bioaerosol sampling*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(10): p. 3732-8.
260. Nehme, B., et al., *Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect*. Environmental Microbiology, 2008. **10**(3): p. 665-675.
261. Thorne, P.S., et al., *Bioaerosol sampling in field studies: can samples be express mailed?* Am Ind Hyg Assoc J, 1994. **55**(11): p. 1072-9.
262. Heikkila, P., et al., *Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscope*. Ann Occup Hyg, 1988. **32**(2): p. 241-8.
263. Eduard, W., et al., *Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments*. Am Ind Hyg Assoc J, 1990. **51**(8): p. 427-36.
264. Szponar, B. and L. Larsson, *Use of mass spectrometry for characterising microbial communities in bioaerosols*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 111-7.
265. Pomorska, D., et al., *Levels of bacterial endotoxin in air of animal houses determined with the use of gas chromatography-mass spectrometry and Limulus test*. Ann Agric Environ Med, 2007. **14**(2): p. 291-8.
266. de Blay, F., et al. *Dust and airborne concentrations of endotoxins in Strasbourg and in a rural environment (Haut-Doubs)*. in *63rd Annual Meeting of the American-Academy-of-Allergy-Asthma-and-Immunology*. 2007. San Diego, CA: Mosby-Elsevier.
267. Hyvarinen, A., et al., *Dust sampling methods for endotoxin - an essential, but underestimated issue*. Indoor Air, 2006. **16**(1): p. 20-7.
268. Reboux, G. and N. Nolard, *[Moulds in indoor environments: sampling and measurement techniques]*. Rev Mal Respir, 2007. **24**(2): p. 243-5.
269. Goto, H., K. Yuasa, and R. Rylander, *(1-->3)-beta-D-glucan in indoor air, its measurement and in vitro activity*. Am J Ind Med, 1994. **25**(1): p. 81-3.
270. Rylander, R., *Indoor air-related effects and airborne (1 --> 3)-beta-D-glucan*. Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 3**: p. 501-3.
271. Proano-Perez, F., *Mycotoxine en milieu du travail*. 2005, Paris V: Paris. p. 212.

272. Alvarez, A.J., M.P. Buttner, and L.D. Stetzenbach, *PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(10): p. 3639-44.
273. Pitkaranta, M., et al., *Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(1): p. 233-44.
274. Drancourt, M., et al., *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3623-30.
275. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 2761-4.
276. Stetzenbach, L.D., M.P. Buttner, and P. Cruz, *Detection and enumeration of airborne biocontaminants*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(3): p. 170-4.
277. Oppliger, A., et al., *Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; Use of real-time PCR for airborne bacterial quantification*. Annals of Occupational Hygiene, 2008. **52**(5): p. 405-412.
278. An, H.R., G. Mainelis, and L. White, *Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples*. Atmospheric Environment, 2006. **40**(40): p. 7924-7939.
279. Lignell, U., et al., *Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house*. Lett Appl Microbiol, 2008.
280. Dutkiewicz, J., *Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard*. Ann Agric Environ Med, 1997. **4**(1): p. 11-16.
281. Roussel, S., et al., *Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung*. Occup Environ Med, 2004. **61**(1): p. e3.
282. Radon, K., et al., *Air contaminants in different European farming environments*. Ann Agric Environ Med, 2002. **9**(1): p. 41-8.
283. Kullman, G.J., et al., *Organic dust exposures from work in dairy barns*. Am Ind Hyg Assoc J, 1998. **59**(6): p. 403-13.
284. Seedorf, J., et al., *Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe*. Journal of Agricultural Engineering Research, 1998. **70**(1): p. 97-109.
285. Seedorf, J. and J. Hartung. *Emission of airborne particulates from animal production*. in *Workshop 4 on Sustainable Animal Production*. 2000. Hannover, Germany: Bundesforschungsanstalt Landwirtschaft (Fal).
286. Melbostad, E. and W. Eduard, *Organic dust-related respiratory and eye irritation in Norwegian farmers*. Am J Ind Med, 2001. **39**(2): p. 209-17.
287. Dutkiewicz, J., et al., *Airborne Microorganisms and Endotoxin in Animal Houses*. Grana, 1994. **33**(2): p. 85-90.
288. Moloczniak, A., *Qualitative and quantitative analysis of agricultural dust in working environment*. Ann Agric Environ Med, 2002. **9**(1): p. 71-8.
289. Moloczniak, A. and J. Zagorski, *Exposure of farmers to dust on private farms of various production profiles*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 151-61.
290. Moloczniak, A. and J. Zagorski, *Exposure of female farmers to dust on family farms*. Ann Agric Environ Med, 2000. **7**(1): p. 43-50.
291. Buczaj, A., *Studies of the level of farmers' exposure to dust on private farms - based on fraction analyses*. Ann Agric Environ Med, 2008. **15**(1): p. 79-84.
292. Berger, I., et al., *Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria*. Ann Agric Environ Med, 2005. **12**(1): p. 101-7.

293. Lacey, J. and J. Dutkiewicz, *Bioaerosols and Occupational Lung-Disease*. Journal of Aerosol Science, 1994. **25**(8): p. 1371-1404.
294. Dutkiewicz, J., *Exposure to dust-borne bacteria in agriculture. I. Environmental studies*. Arch Environ Health, 1978. **33**(5): p. 250-9.
295. Kotimaa, M.H., E.O. Terho, and K. Husman, *Airborne moulds and actinomycetes in work environment of farmers*. Eur J Respir Dis Suppl, 1987. **152**: p. 91-100.
296. Kotimaa, M.H., L. Oksanen, and P. Koskela, *Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms*. Scand J Work Environ Health, 1991. **17**(2): p. 117-22.
297. Pepys, J., et al., *Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen*. 1963. Allergy Proc, 1990. **11**(2): p. 101-2, discussion 97-9.
298. Kock, M., et al., *Air-borne microorganisms in the metropolitan area of Graz, Austria*. Cent Eur J Public Health, 1998. **6**(1): p. 25-8.
299. Jones, B.L. and J.T. Cookson, *Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area*. Appl Environ Microbiol, 1983. **45**(3): p. 919-34.
300. Luoma, M. and S.A. Batterman, *Characterization of particulate emissions from occupant activities in offices*. Indoor Air, 2001. **11**(1): p. 35-48.
301. Scheff, P.A., et al., *Indoor air quality in a middle school, Part II: Development of emission factors for particulate matter and bioaerosols*. Appl Occup Environ Hyg, 2000. **15**(11): p. 835-42.
302. Matkovic, K., et al., *Effect of microclimate on bacterial count and airborne emission from dairy barns on the environment*. Ann Agric Environ Med, 2006. **13**(2): p. 349-54.
303. Kollner, B. and D. Heller, *Bioaerosols from farms - current investigations in North-Rhine Westphalia*. Gefahrstoffe Reinhaltung Der Luft, 2005. **65**(9): p. 374-376.
304. Lis, D.O., G. Mainelis, and R.L. Gorny, *Microbial air contamination in farmhouses quantitative aspects*. Clean-Soil Air Water, 2008. **36**(7): p. 551-555.
305. Korthals, M., et al., *Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust*. J Microbiol Methods, 2008. **73**(1): p. 49-56.
306. Pasanen, A.L., et al., *Fungi carried from farmers' work into farm homes*. Am Ind Hyg Assoc J, 1989. **50**(12): p. 631-3.
307. Kasprzyk, I., *Aeromycology--main research fields of interest during the last 25 years*. Ann Agric Environ Med, 2008. **15**(1): p. 1-7.
308. Wu, P.C., H.J. Su, and C.Y. Lin, *Characteristics of indoor and urban homes in two seasons*. The science of the total environment, 2000. **253**: p. 111-118.
309. Hargreaves, M., et al., *A pilot investigation into associations between indoor airborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia*. Sci Total Environ, 2003. **312**(1-3): p. 89-101.
310. Gorny, R.L. and J. Dutkiewicz, *Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries*. Ann Agric Environ Med, 2002. **9**(1): p. 17-23.
311. Ren, P., et al., *The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics*. Allergy, 2001. **56**(5): p. 419-24.
312. Karwowska, E., *Microbiological air contamination in farming environment*. Polish Journal of Environmental Studies, 2005. **14**(4): p. 445-449.
313. Reboux, G., S. Roussel, and F. Grenouillet, *Fungi in agricultural environment*. Journal De Mycologie Medicale, 2006. **16**(4): p. 248-262.
314. Reboux, G., et al., *Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(7): p. 1534-9.

315. Adhikari, A., et al., *Assessment of human exposure to airborne fungi in agricultural confinements: personal inhalable sampling versus stationary sampling*. Ann Agric Environ Med, 2004. **11**(2): p. 269-77.
316. Hanhela, R., K. Louhelainen, and A.L. Pasanen, *Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of Wallemia sebi and Fusaria*. Scand J Work Environ Health, 1995. **21**(3): p. 223-8.
317. Dalphin, J.C., et al., *Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France*. Thorax, 1991. **46**(9): p. 619-23.
318. Reboux, G., et al., *Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms*. Ann Agric Environ Med, 2006. **13**(2): p. 267-73.
319. Reboux, G., et al., *Influence of buffered propionic acid on the development of microorganisms in hay*. Mycoses, 2002. **45**(5-6): p. 184-7.
320. Roussel, S., et al., *Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents*. Ann Agric Environ Med, 2005. **12**(2): p. 217-21.
321. Green, B.J., et al. *Airborne fungal fragments and allergenicity*. in *2nd Advances against Aspergillosis Conference*. 2006. Athens, GREECE: Taylor & Francis Ltd.
322. Gorny, R.L., *Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air--a review*. Ann Agric Environ Med, 2004. **11**(2): p. 185-97.
323. Green, B.J., et al., *Measurement of personal exposure to outdoor aeromycota in northern New South Wales, Australia*. Ann Agric Environ Med, 2006. **13**(2): p. 225-34.
324. Lee, S.A., et al., *Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2006. **3**(3): p. 118-130.
325. Larsson, K., et al., *Exposure to microorganisms, airway inflammatory changes and immune reactions in asymptomatic dairy farmers. Bronchoalveolar lavage evidence of macrophage activation and permeability changes in the airways*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1988. **87**(2): p. 127-33.
326. Duchaine, C., et al., *Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives*. Am Ind Hyg Assoc J, 1999. **60**(1): p. 89-95.
327. Lange, L., P. Thorne, and G.J. Kullman, *Determinants of culturable bioaerosol concentration in dairy barn*. Ann Agric Environ Med, 1997. **4**: p. 187-194.
328. Chai, T.J., W. Muller, and B.A. Zucker, *Investigations on airborne microorganisms in animal stables .I. Airborne anaerobic bacteria in a calf stable with special regard to Clostridium perfringens*. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 1997. **110**(1): p. 1-4.
329. Rylander, R. and B. Fogelmark, *Inflammatory responses by inhalation of endotoxin and (1-->3)-beta-D-glucan*. Am J Ind Med, 1994. **25**(1): p. 101-2.
330. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 169-76.
331. Schulze, A., et al., *Ambient endotoxin level in an area with intensive livestock production*. Ann Agric Environ Med, 2006. **13**(1): p. 87-91.
332. Laitinen, S., et al., *Evaluation of exposure to airborne bacterial endotoxins and peptidoglycans in selected work environments*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 213-9.
333. Wan, G.H., et al., *An airborne mold-derived product, beta-1,3-D-glucan, potentiates airway allergic responses*. Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2491-7.
334. Douwes, J., *(1-->3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence*. Indoor Air, 2005. **15**(3): p. 160-9.

335. Beck, J.P., A. Heutelbeck, and H. Dunkelberg, *Volatile organic compounds in dwelling houses and stables of dairy and cattle farms in Northern Germany*. *Sci Total Environ*, 2007. **372**(2-3): p. 440-54.
336. Campbell, A.R., et al., *Aeroallergens in dairy barns near Cooperstown, New York and Rochester, Minnesota*. *Am Rev Respir Dis*, 1989. **140**(2): p. 317-20.
337. Pratt, D.S., et al., *Massive Exposure to Aeroallergens in Dairy Farming - Radioimmunoassay Results of Dust Collection During Bedding Chopping with Culture Confirmation*. *American Journal of Industrial Medicine*, 1990. **17**(1): p. 103-104.
338. Mullins, J. and J. Emberlin, *Sampling pollens*. *Journal of Aerosol Science Sampling and Rapid Assay of Bioaerosols*, 1997. **28**(3): p. 365-370.
339. Mogensen, J.E., et al., *The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes*. *Biochemistry*, 2007. **46**(11): p. 3356-3365.
340. Hrabina, M., et al., *Grass pollen allergens*. *Clinical & Experimental Allergy Reviews*, 2008. **8**(1): p. 7-11.
341. Taylor, P.E., et al., *Links between pollen, atopy and the asthma epidemic*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. **144**(2): p. 162-70.
342. Behrendt, H., et al., *Pollen-associated lipid mediators in the elicitation of allergic reactions*. *Allergy Frontiers and Futures*, 2003: p. 5-10.
343. Spinozzi, F. and S.A. Porcelli, *Recognition of lipids from pollens by CD1-restricted T cells*. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2007. **27**(1): p. 79-+.
344. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Pollen-associated phytoprostaes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization (vol 201, pg 627, 2005)*. *Journal of Experimental Medicine*, 2005. **201**(8): p. 1347-1347.
345. Mariani, V., et al., *Pollen associated lipid mediators (PALMs) modulate cytokine and chemokine profile of human dendritic cells leading to induction and attraction of Th2-cells*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005. **125**(3): p. 303.
346. Jaeger, T., et al., *Pollen-associated lipid mediators induce T-helper 2 chemokines in human keratinocytes*. *Experimental Dermatology*, 2006. **15**(3): p. 191-191.
347. Gilles, S., et al., *Pollen-derived mediators inhibit human dendritic cell IL-12 p70 production via activation of e-series prostaglandin receptors*. *Allergy*, 2007. **62**: p. 41-41.
348. Mariani, V., et al., *Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction*. *Journal of Immunology*, 2007. **178**(12): p. 7623-7631.
349. Traidl-Hoffmann, C., T. Jakob, and H. Behrendt, *Determinants of allergenicity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(3): p. 558-66.
350. Russano, A.M., et al., *Recognition of pollen-derived phosphatidylethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006. **117**(5): p. 1178-1184.
351. Rylander, R., et al., *(1-->3)-beta-D-glucan may contribute to pollen sensitivity*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **115**(3): p. 383-4.
352. Emberlin, J., *The effects of patterns in climate and pollen abundance on allergy*. *Allergy*, 1994. **49**(18 Suppl): p. 15-20.
353. Petersen, G., B. Johansen, and O. Seberg, *PCR and sequencing from a single pollen grain*. *Plant Molecular Biology*, 1996. **31**(1): p. 189-191.
354. Jaeger, S., *Exposure to grass pollen in Europe*. *Clin exp Allergy reviews*, 2008. **8**(1): p. 2-6.
355. Jaeger, S. www.polleninfo.org. 2009 [cited 2009 10 février]; Available from: <http://www.polleninfo.org/>.
356. Burr, M.L., et al., *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**(12): p. 1675-80.

357. RNSA. *Réseau National de Surveillance Aérobiologique*. 2009 [cited 2009 10 février]; Available from: <http://www.pollens.fr/le-reseau/les-pollens.php>.
358. Chakraborty, P., et al., *Airborne allergenic pollen grains on a farm in West Bengal, India*. Grana, 1998. **37**(1): p. 53-57.
359. Chakraborty, P., et al., *Differences in concentrations of allergenic pollens and spores at different heights on an agricultural farm in West Bengal, India*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 123-30.
360. Teranishi, H., et al., *Allergenic pollens and spores in the working environment of Japanese pear farmers*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007. **20**(2 Suppl 2): p. 65-7.
361. Brunekreef, B., D. Noy, and P. Clausing, *Variability of exposure measurements in environmental epidemiology*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(5): p. 892-8.
362. Armstrong, B.G., *Effect of measurement error on epidemiological studies of environmental and occupational exposures*. Occup Environ Med, 1998. **55**(10): p. 651-6.
363. Tielemans, E., et al., *Individual-based and group-based occupational exposure assessment: some equations to evaluate different strategies*. Ann Occup Hyg, 1998. **42**(2): p. 115-9.
364. Preller, L., et al., *Modeling long-term average exposure in occupational exposure-response analysis*. Scand J Work Environ Health, 1995. **21**(6): p. 504-12.
365. Eduard, W., *Measurement methods and strategies for non-infectious microbial components in bioaerosols at the workplace*. Analyst, 1996. **121**(9): p. 1197-201.
366. Muhausen, *Strategy for Assessing and Managing Occupational Exposures*. AIHA J (Fairfax, Va), 1998(324-EA-98).
367. ACGIH, *Bioaerosols: Assessment and Control*. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati., 1999.
368. von Mutius, E. and S. Schmid, *The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe*. Allergy, 2006. **61**(4): p. 407-13.
369. Grant Smith, E., *Sampling and identifying allergenic pollens and molds (An illustrated manual for air samplers)*, B. press, Editor. 1986: San Antonio (Texas -USA). p. 98.
370. Rabe-Hesketh, S. and A. Skrondal, eds. *Multilevel and longitudinal modeling using stata*. ed. Statacorp. 2005, Stata Press: College Station.
371. Snijders, T. and R. Bosker, eds. *Multilevel analysis*. 1999, Sage Publications. 272.
372. Hruschka, D.J., B.A. Kohrt, and C.M. Worthman, *Estimating between- and within-individual variation in cortisol levels using multilevel models*. Psychoneuroendocrinology, 2005. **30**(7): p. 698-714.
373. Gehring, U., et al., *Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 847-54.
374. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
375. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. J Bacteriol, 2001. **183**(12): p. 3770-83.
376. Patel, J.B., *16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory*. Mol Diagn, 2001. **6**(4): p. 313-21.
377. Herzum, I., et al., *Diagnostic and analytical performance of a screening panel for allergy*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(9): p. 963-6.
378. Pfeifferle, P.I., et al., *Cord Blood Cytokines are Modulated by Maternal Farming Activities and Consumption of Farm Products during Pregnancy - The PASTURE-Study*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(2): p. S21.
379. Yanase, T., et al., *Detection of Coxiella burnetii from dust in a barn housing dairy cattle*. Microbiol Immunol, 1998. **42**(1): p. 51-3.

380. Sadecky, E., *Infection of cattle and livestock handlers with Coxiella burnetti and Chlamydiae in the farm of Bernolakovo (West Slovakia)*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1981. **25**(1): p. 52-9.
381. Tylewska-Wierzbanska, S., et al., *Epidemic of Q fever in Leszno district in Poland*. Eur J Epidemiol, 1991. **7**(3): p. 307-9.
382. Reintjes, R., W. Hellenbrand, and A. Dusterhaus, [*Q-fever outbreak in Dortmund in the summer of 1999. Results of an epidemiological outbreak study*]. Gesundheitswesen, 2000. **62**(11): p. 609-14.
383. Tissot-Dupont, H., et al., *A pedagogical farm as a source of Q fever in a French city*. Eur J Epidemiol, 2005. **20**(11): p. 957-61.
384. Maltezos, H.C. and D. Raoult, *Q fever in children*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(11): p. 686-91.
385. Ege, M.J., et al., *Specific IgE to allergens in cord blood is associated with maternal immunity to Toxoplasma gondii and rubella virus*. Allergy, 2008. **63**(11): p. 1505-11.
386. Kaarakainen, P., et al., *Microbial content of house dust samples determined with qPCR*. Sci Total Environ, 2009.
387. Rintala, H., et al., *Detection of streptomycetes in house dust--comparison of culture and PCR methods*. Indoor Air, 2004. **14**(2): p. 112-9.
388. Rintala, H. and A. Nevalainen, *Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR*. J Environ Monit, 2006. **8**(7): p. 745-9.
389. Abdallah, M., *Environnement bactérien et allergie en milieu rural*. 2005, Université de Franche Comté: Besançon. p. 27.
390. Korthals, M., et al., *Occurrence of Listeria spp. in mattress dust of farm children in Bavaria*. Environ Res, 2008. **107**(3): p. 299-304.
391. Green, B.J., J.K. Sercombe, and E.R. Tovey, *Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 1043-8.
392. Braun-Fahrlander, C., *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, 2003. **3**(5): p. 325-9.
393. Waser, M., et al., *Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(3): p. 389-97.
394. Pakarinen, J., et al., *Predominance of Gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia*. Environ Microbiol, 2008. **10**(12): p. 3317-25.
395. Douwes, J., et al., *Endotoxin, (1 --> 3)-beta-D-glucans and fungal extra-cellular polysaccharides in New Zealand homes: a pilot study*. Ann Agric Environ Med, 2006. **13**(2): p. 361-5.
396. von Hertzen, L. and T. Haahnela, *Disconnection of man and the soil: reason for the asthma and atopy epidemic?* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2): p. 334-44.
397. von Hertzen, L.C., et al., *Infectious burden as a determinant of atopy-- a comparison between adults in Finnish and Russian Karelia*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **140**(2): p. 89-95.
398. Rintala, H., et al., *Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 56.
399. Vermaelen, K. and R. Pauwels, *Pulmonary dendritic cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(5): p. 530-51.
400. Bush, R.K., et al., *The medical effects of mold exposure*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2): p. 326-33.
401. Bush, R.K. and J.J. Prochnau, *Alternaria-induced asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 227-34.
402. Eduard, W., et al., *Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers*. Thorax, 2004. **59**(5): p. 381-6.

403. Roussel, S., et al., *Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study*. Mycopathologia, 2005. **160**(4): p. 273-9.
404. Kaukonen, K., et al., *Identification of the reactive subunits of Aspergillus umbrosus involved in the antigenic response in farmer's lung*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(6): p. 689-96.
405. Brown, G.D., et al., *Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1119-24.
406. Olynych, T.J., D.L. Jakeman, and J.S. Marshall, *Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(4): p. 837-43.
407. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
408. Ege, M.J., et al., *Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1140-7.
409. Boasen, J., et al., *House dust extracts elicit Toll-like receptor-dependent dendritic cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(1): p. 185-91.
410. Batzer, G., et al., *Using house dust extracts to understand the immunostimulatory activities of living environments*. Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 491-8.
411. Chisholm, D., et al., *Airway peptidoglycan and immunostimulatory DNA exposures have divergent effects on the development of airway allergen hypersensitivities*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 448-54.
412. Ng, N., et al., *House dust extracts have both TH2 adjuvant and tolerogenic activities*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 1074-81.
413. Peters, M., et al., *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. Thorax, 2006. **61**(2): p. 134-9.
414. Gorelik, L., et al., *Modulation of dendritic cell function by cowshed dust extract*. Innate Immun, 2008. **14**(6): p. 345-55.
415. Debarry, J., et al., *Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(6): p. 1514-21.
416. Andersson, A.M., et al., *Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres*. J Appl Microbiol, 1999. **86**(4): p. 622-34.
417. Fedulov, A., et al., *Immunostimulatory CpG oligonucleotides abrogate allergic susceptibility in a murine model of maternal asthma transmission*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4292-300.
418. Roy, S.R., et al., *Bacterial DNA in house and farm barn dust*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(3): p. 571-8.
419. Klinman, D.M., *Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 249-58.
420. Gauvreau, G.M., et al., *Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(1): p. 15-20.
421. Vercelli, D., *Mechanisms of the hygiene hypothesis--molecular and otherwise*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(6): p. 733-7.
422. Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata, *Epigenetic control of T-helper-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 91-105.
423. Wachholz, P.A., et al., *Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(5): p. 915-22.
424. Radulovic, S., et al., *Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1467-72, 1472 e1.
425. Frew, A.J., *Sublingual immunotherapy*. N Engl J Med, 2008. **358**(21): p. 2259-64.

426. Akdis, M. and C.A. Akdis, *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(4): p. 780-91.
427. Francis, J.N., et al., *Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1120-1125 e2.
428. Milovanovic, M., et al., *Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(5): p. 671-8.
429. Lack, G., et al., *Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon-gamma production in CD4+ T cells*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(4): p. 530-8.
430. Durham, S.R., et al., *Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1356-65.
431. Platts-Mills, T.A., et al., *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**(1-3): p. 126-9.
432. Woodfolk, J.A., *High-dose allergen exposure leads to tolerance*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(1): p. 43-58.
433. Schramm, C.M., 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**(1): p. 295-304.
434. Suzuki, M., et al., *Oligonucleotide based-strategies for allergy with special reference to siRNA*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(4): p. 441-50.
435. Askenase, P.W., *Gee whiz: CpG DNA allergy therapy!* J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 37-40.
436. Blanks, D.A. and C.S. Ebert, Jr., *Immune modulatory oligonucleotides in the prevention and treatment of allergen-induced eustachian tube dysfunction in the animal model*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(6): p. 508-12.
437. Kline, J.N., *Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(3): p. 283-8.

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° 25.09.12

Présentée par Madame, Monsieur, *SUDRE Bertrand*

Né(e) le *trois septembre 1972*

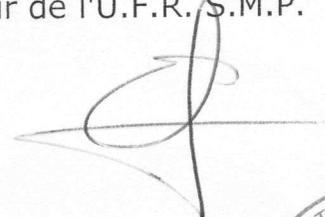
et ayant pour titre : *Bioaerosols de l'environnement agricole
et protection contre l'allergie*

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le *11/21/2010*

Le Directeur de l'U.F.R. S.M.P.

Le Directeur de Thèse,



Le Professeur E. SAMAIN

