

Réponse aux contaminants microbiologiques de l'air en milieu de travail agricole : tout est une question de *timing*



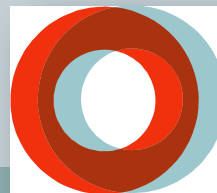
**CAROLINE DUCHAINE
CRIUCPQ (UNIVERSITÉ LAVAL)**

SALON INTERNATIONAL DES
TECHNOLOGIES ENVIRONNEMENTALES

AMERICANA



**UNIVERSITÉ
LAVAL**

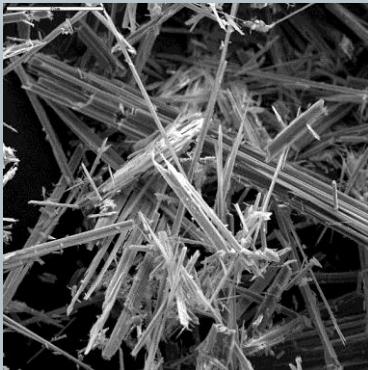


**CENTRE DE RECHERCHE
INSTITUT UNIVERSITAIRE
DE CARDIOLOGIE
ET DE PNEUMOLOGIE
DE QUÉBEC**

Introduction



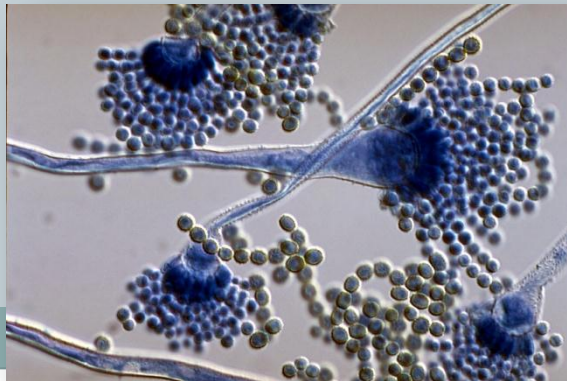
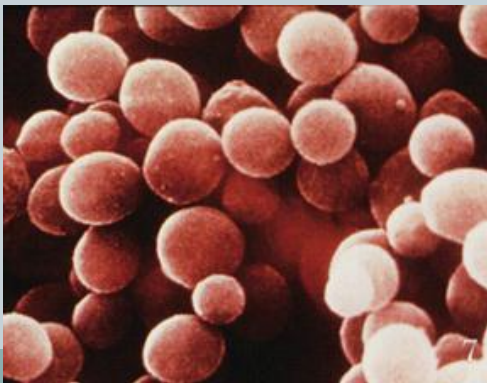
- Particules en suspension dans l'air : **aérosols**
- De 0,001 à 200 μm
- Chimiques et minéraux :
 - Amiante, sels
- Agents biologiques dans l'air : **bioaérosols**
- Conséquences de l'exposition aux bioaérosols :
 - Humains, animaux, plantes, pureté de produits manufacturés



Bioaérosols



- Microorganismes entiers (vivants ou morts)
- Fragments, produits métaboliques, acides nucléiques, protéines
- Fragments d'autres agents
 - Cellules humaines, cellules animales, cellules végétales (ex. grains de pollen)
- Matériel provenant d'une entité biologique



Les bioaérosols *en milieu agricole*

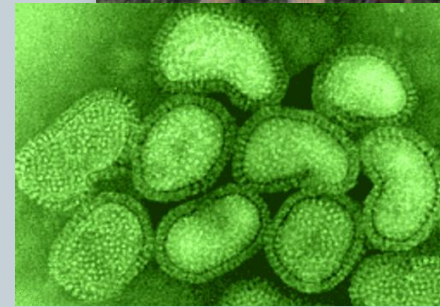


CARACTÉRISATION

Bioaérosols *en milieu agricole*



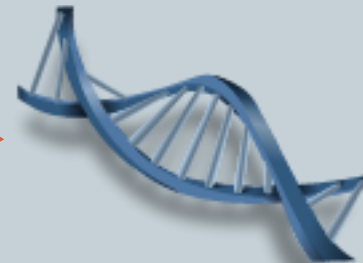
- Complexes & en hautes concentrations
- Sources très diverses...
- Bactéries, virus, etc.
 - Sur quelles particules (d_a)?
 - Résistance aux stress
 - Infectivité (*pouvoir pathogène*)
- Plusieurs questions...
 - ✦ Synergie, effet additif seulement
 - ✦ Cultivables *vs* non cultivables?
 - ✦ Effets protecteur *ou* néfaste?



Bioaérosols *en milieu agricole* : un historique



- Méthodes de culture très incomplètes
- Microorganismes mésophiles (37°C) :
 - Donham *et al.* 1986, 1991
 - Duchaine *et al.* 2000
 - Chang *et al.* 2001
- Peu d'études mettant à profit la biologie moléculaire



Bioaérosols *en milieu agricole* : un historique (2)



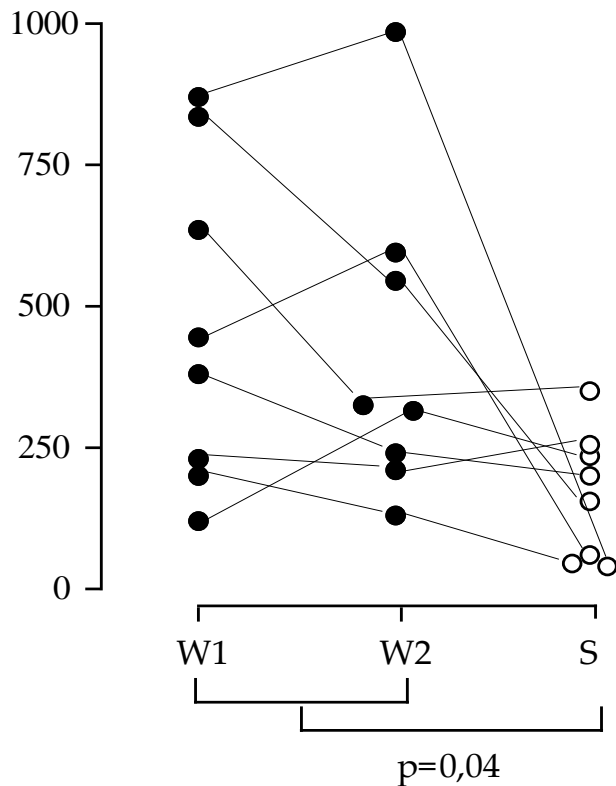
- Variations temporelles des bioaérosols
- Mise au point de l'échantillonnage :
 - Barboteurs
 - Impaction inertielle sur pétris
 - Identification des agents microbiens
- Comparaison de la qualité de l'air intérieur/extérieur :
 - Une différence = une source est présente dans le bâtiment



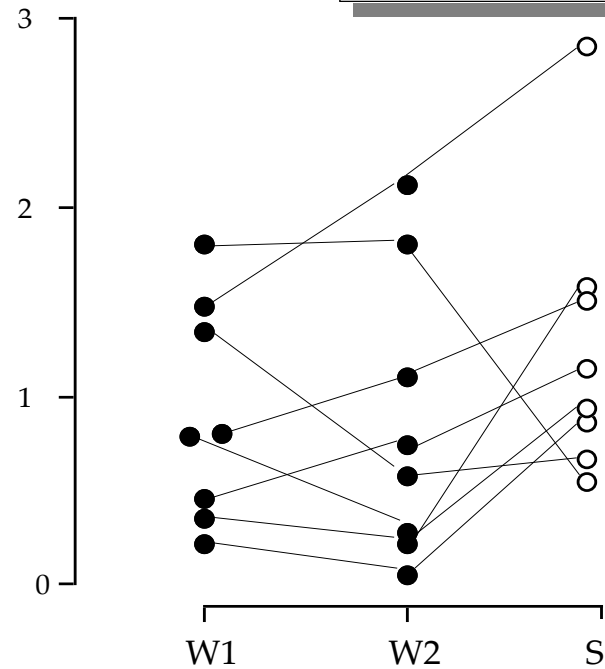
Bioaérosols de porcheries : hiver *vs* été



Culturable bacteria
($\times 10^3$ CFU/ m³)



Culturable molds
($\times 10^3$ CFU/ m³)



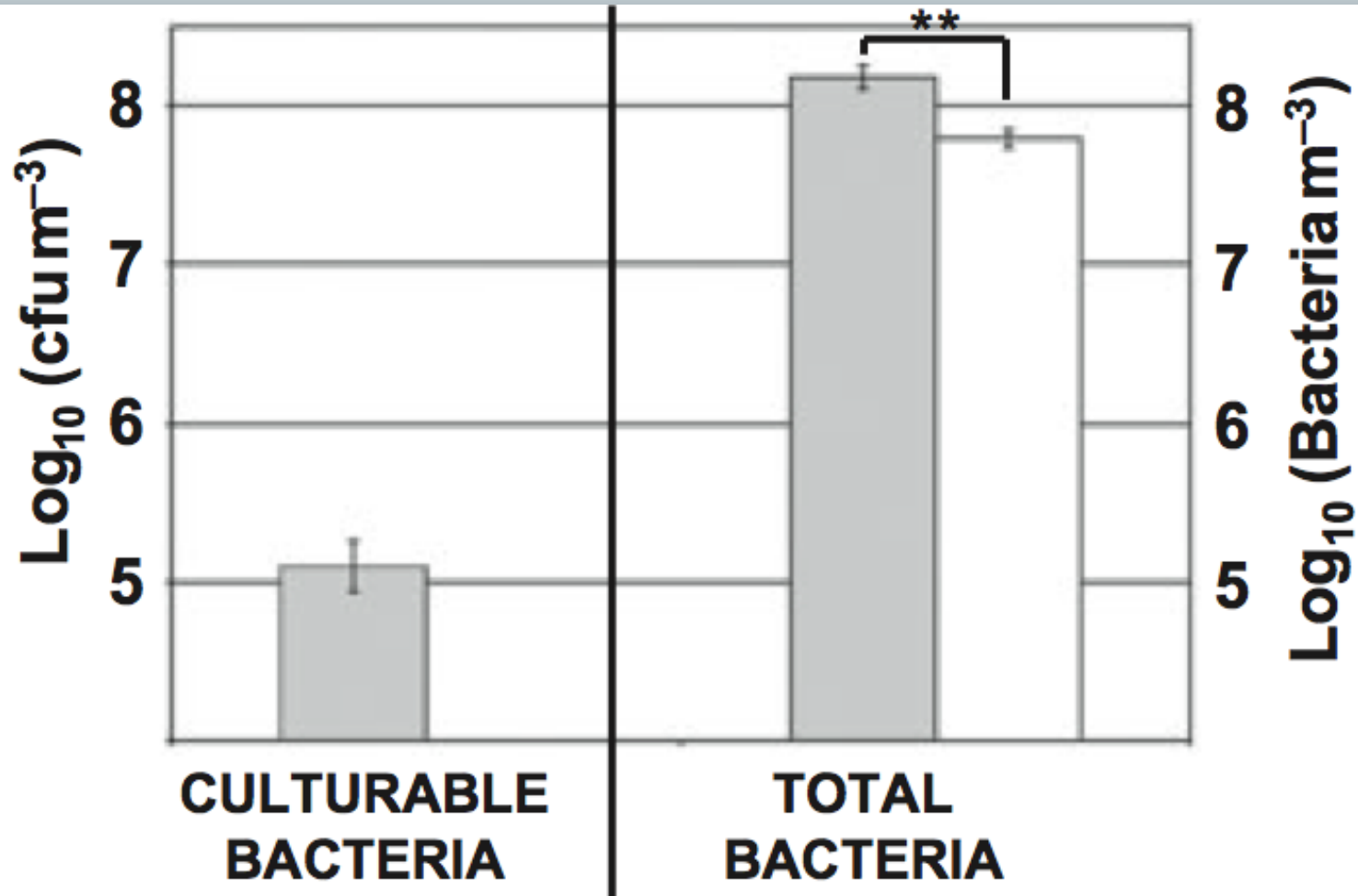
Bioaérosols *en milieu agricole* : aujourd'hui



- Culture :
 - Organismes cultivables
 - Littérature est riche pour effectuer des comparaisons
 - Recherche d'agents spécifiques (ex. actinomycètes thermophiles)
- Désavantages :
 - Une faible proportion des microorganismes sont cultivables dans l'environnement
 - Air → stress de l'aérosolisation et de l'échantillonnage



Bactéries dans l'air des porcheries



Bioaérosols *en milieu agricole* : aujourd'hui (2)



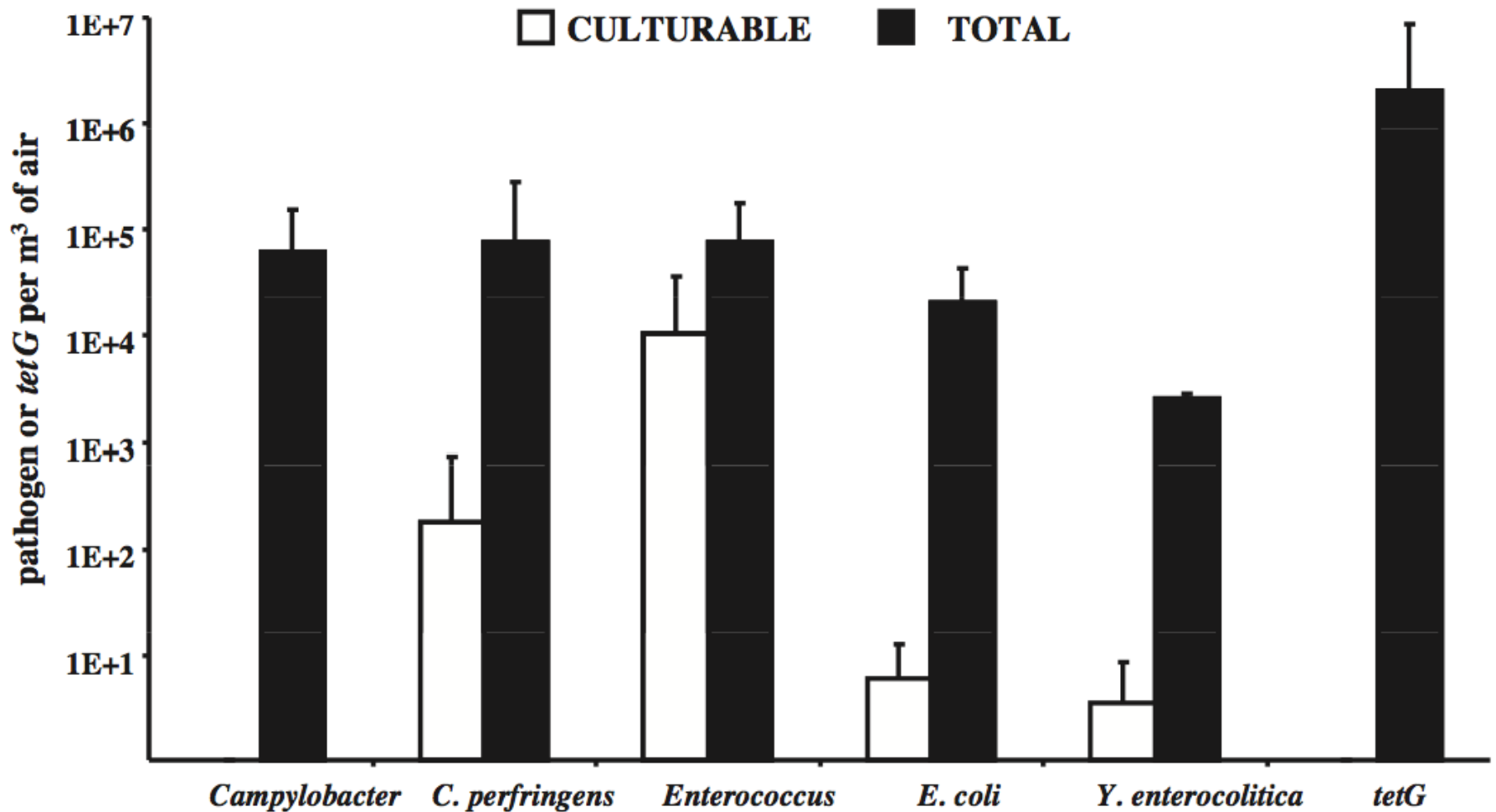
- Biologie moléculaire :
 - Les microorganismes contiennent des a. nucléiques servant de cible pour les analyses moléculaires
 - ADN et/ou ARN sont extraits des échantillons d'air
 - Sensible
 - Mesure de la biomasse (général)
 - Recherche d'agents spécifiques (ex. *Clostridium*)
 - Évaluation de la bio-diversité
 - Détermination des sources (clonalité)
 - Détection d'agents non cultivables, non résistants au stress
- Résultats indépendants de la cultivabilité

Biologie moléculaire : les méthodes les plus utilisées

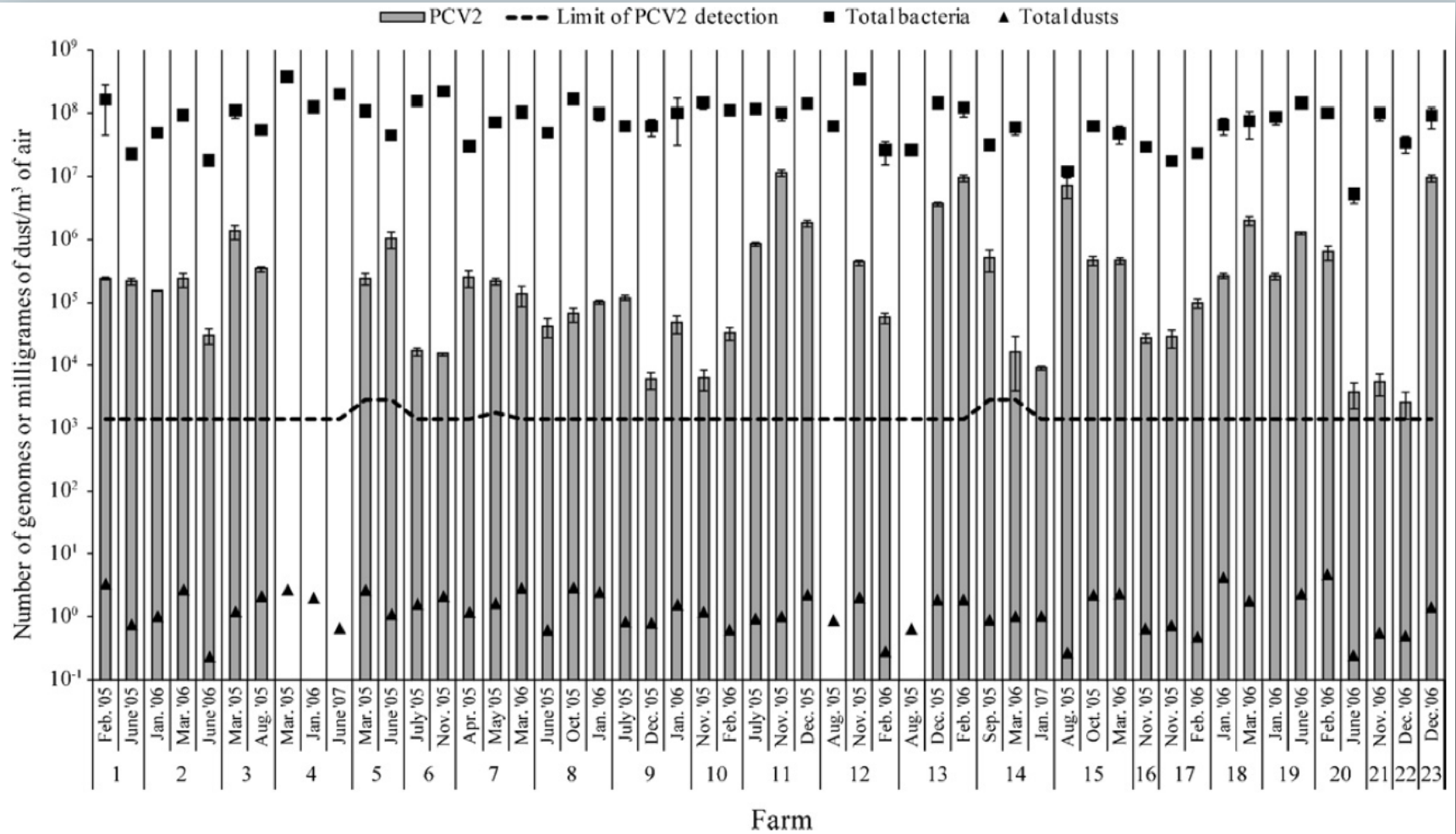


- Réaction de la polymérisation en chaîne (PCR)
- Quantification PCR
 - Universel ou spécifique
 - Pathogènes
 - Gènes de résistance aux antibiotiques
- DGGE (méthodes de profilage génétique)
 - Biodiversité, richesse
- Clonage/séquençage, pyroséquençage
 - ARNr16S, ITS
- Métagénomique
 - ARNm
 - ADN génomique

Bioaérosols des porcheries : Gènes de résistance aux antibiotiques



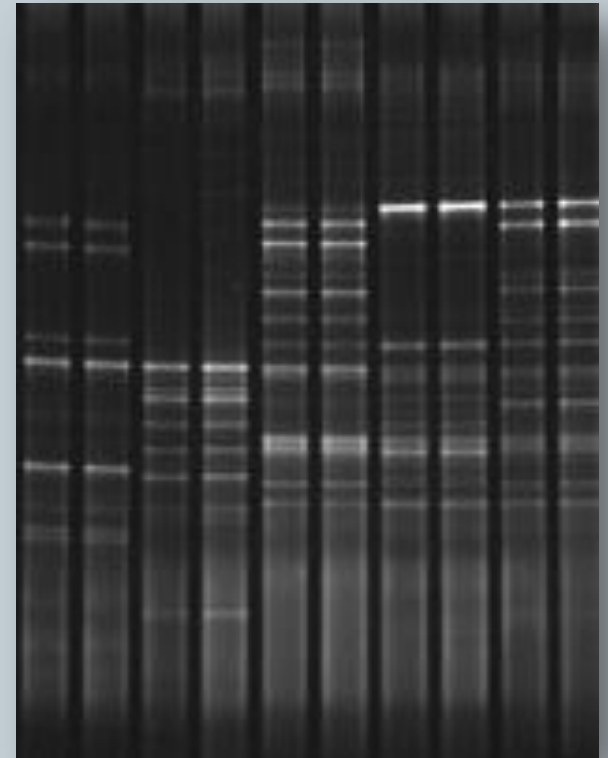
Bioaérosols des porcheries : circovirus (PCV2)



Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)



- Extraction de l'ADN à partir d'échantillons d'air
- Amplification des gènes de l'ARNr16S à l'aide d'amorces universelles couplées à des pinces GC
- Migration sur gel



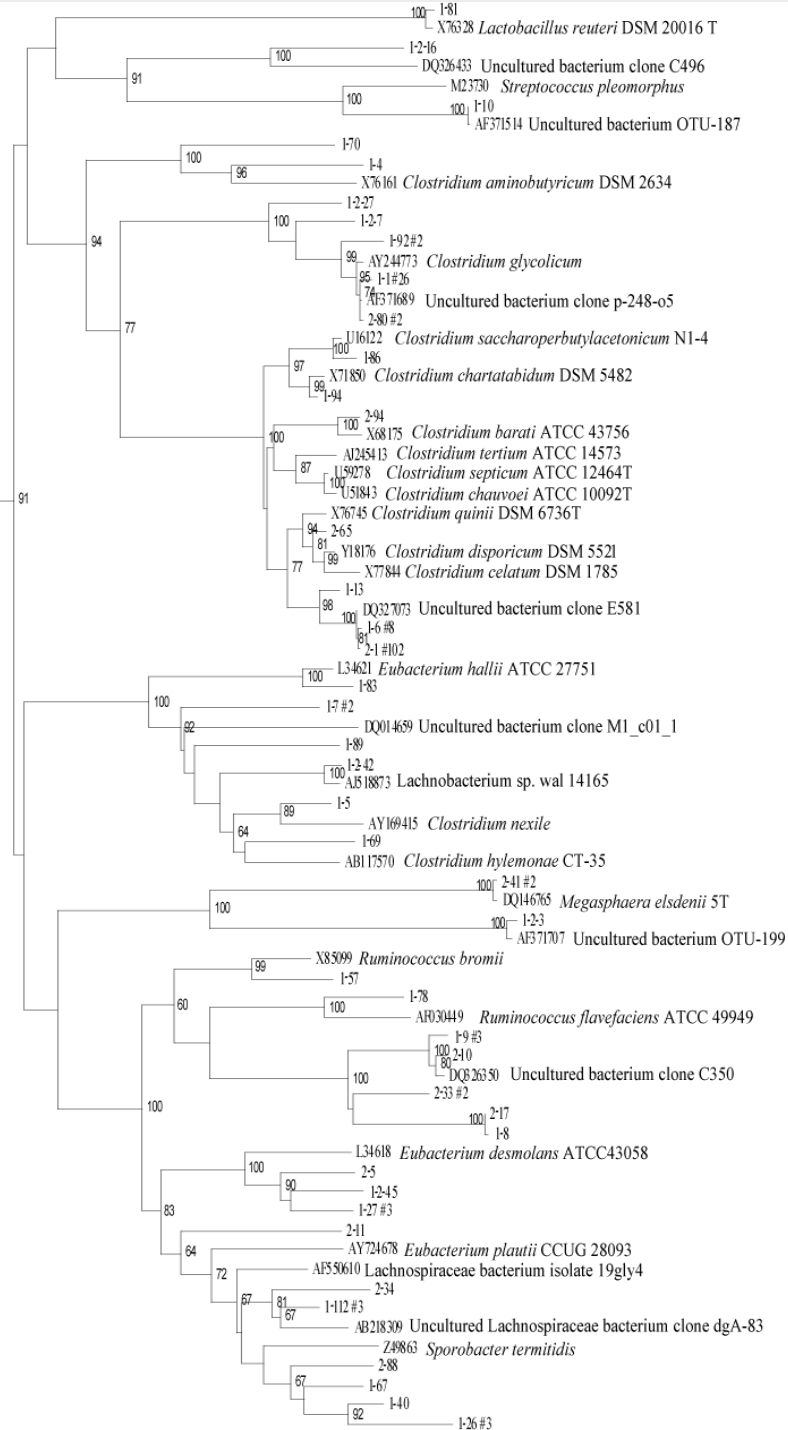
Clonal

Environ Microbiol. 2008 Mar;10

Culture-independent
assessment of the s

Nehme B, Létourneau V, Fo

From Figure 4



Clostridia cluster X

Clostridia cluster XI

Clostridia cluster I

Clostridia cluster XIVa

Clostridia cluster IX

Clostridia cluster IV

r16S

ent buildings, and

Bioaérosols des porcheries : flore nasale des travailleurs

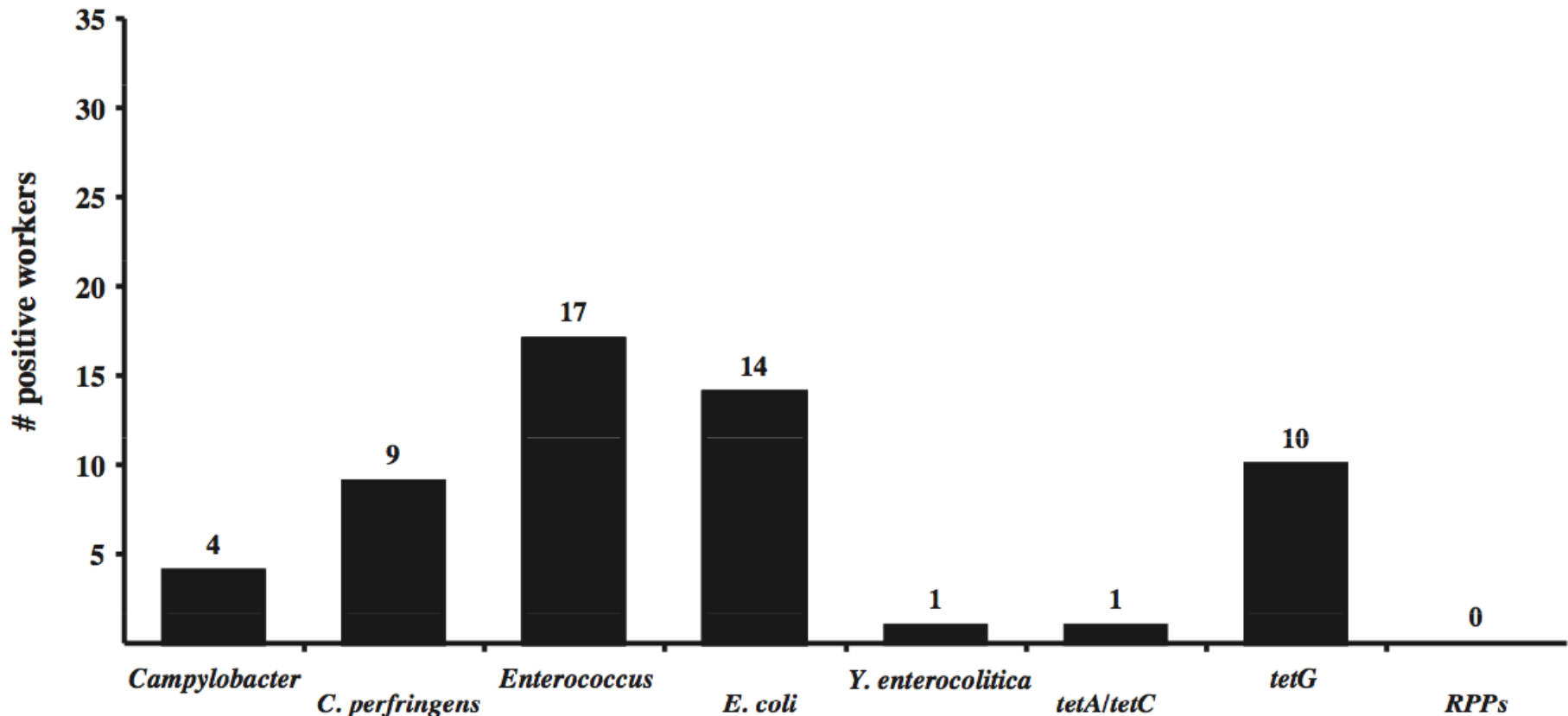


Fig. 2. Human pathogens and tetracycline resistance genes in the nasal flora of 35 hog producers.

Les bioaérosols *en milieu agricole*



LEURS EFFETS SUR LA SANTÉ DES TRAVAILLEURS

Pathologies associées aux bioaérosols



- Mortalité due à des maladies infectieuses transmissibles par l'air :
 - Tuberculose
 - *Legionella pneumophila*
- Les allergènes sont aussi transmis par l'air :
 - Asthme
 - Alvéolites allergiques extrinsèques (poumon du fermier)
 - Pathologies non liées à la viabilité des agents microbiens

Les bioaérosols des porcheries : effets sur la santé



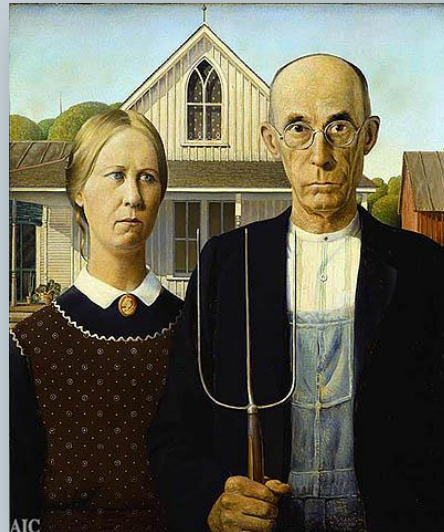
- Volontaires naïfs ont des réactions très marquées :
 - Inflammation systémique
 - Cellules inflammatoires dans les poumons
 - Hyperréactivité bronchique
- **Travailleurs :**
 - Peu de symptômes
 - Travailleurs et leurs familles → moins d'ASTHME!



Les travailleurs ?!?



- Réponse plus modérée
- Rapportent peu de problèmes respiratoires
- Adaptation ? Effet saisonnier ?
- Enfants élevés dans un environnement agricole (porcherie) :
 - Moins d'asthme
 - Effet protecteur ?



Globules blancs des travailleurs : été vs hiver

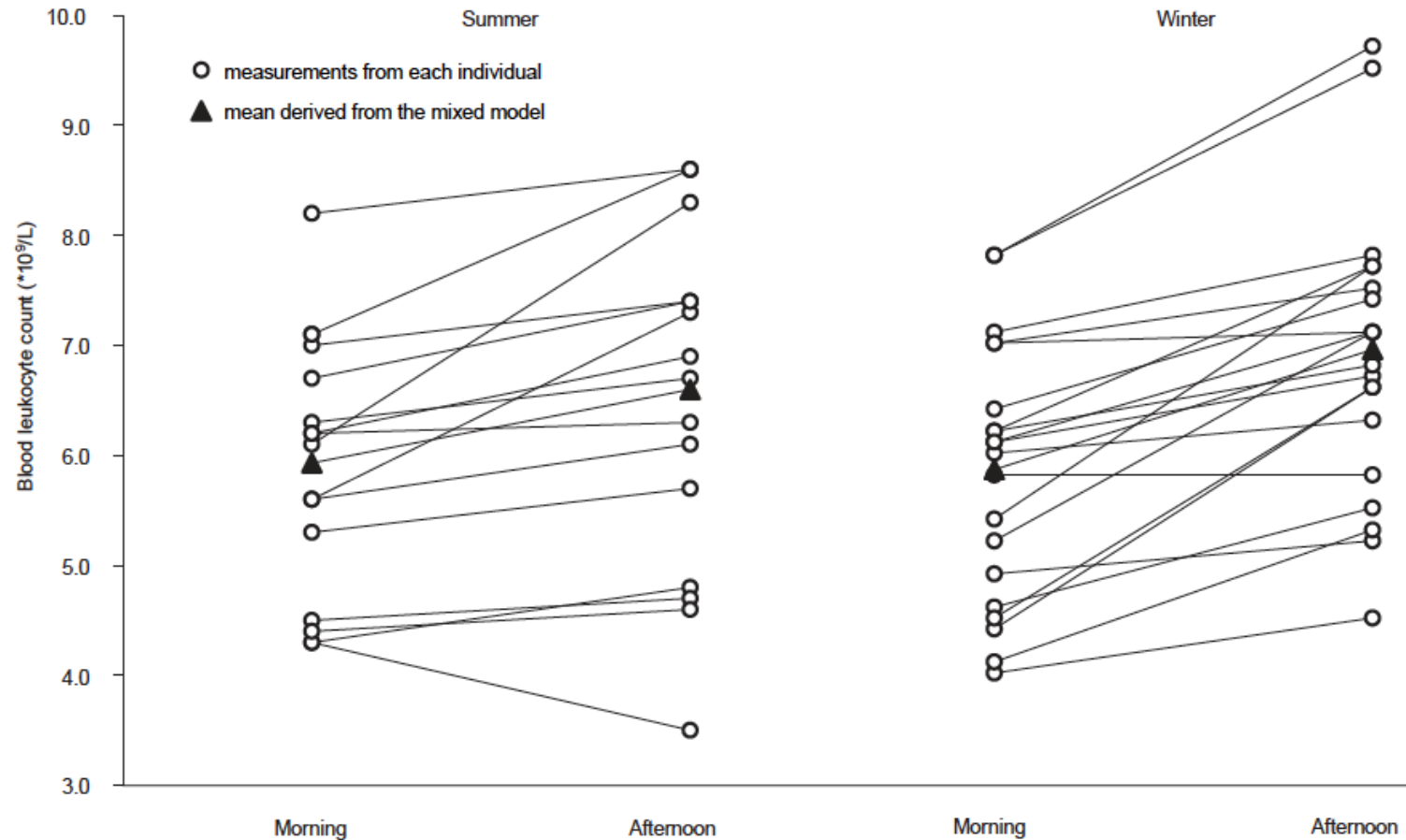


Figure 1. Cross shift changes in blood leukocyte counts during summer and winter in the 24 visited workers.

Le port d'un masque chez les travailleurs : perte de l'adaptation



Table 3. Blood and plasma markers of inflammation before and after the workshift during the two visits.

	After ≥4 days of mask usage			After ≥4 days of ordinary work			P (interaction) ^a
	Morning mean (SE)	Afternoon mean (SE)	P	Morning mean (SE)	Afternoon mean (SE)	P	
Blood leucocytes, n (*10 ⁹ /l)	5.56 (1.56)	7.13 (1.56)	0.0001	5.80 (1.04)	6.88 (1.04)	0.0001	0.0101
TNF, pg/ml	1.18 (1.08)	1.13 (1.08)	0.15	1.32 (1.08)	1.23 (1.08)	0.07	0.7495
TNF-RII, pg/ml	1659 (1.05)	1479 (1.05)	0.0001	1618 (1.05)	1469 (1.05)	0.0007	0.5552
IL-6, pg/ml	1.05 (1.13)	1.78 (1.13)	0.0001	1.00 (1.10)	1.35 (1.10)	0.0021	0.0599
CD62L, ng/ml	803 (23)	785 (23)	0.17	768 (28)	779 (28)	0.81	0.0267
CD14, ng/ml	1.46 (0.03)	1.50 (0.03)	0.11	1.57 (0.04)	1.55 (0.04)	0.67	0.0883
CRP, µg/ml	1.00 (0.18)	0.99 (0.18)	0.91	1.04 (0.15)	1.00 (0.15)	0.0509	0.1246
BPI, ng/ml	47.8 (1.30)				21.5 (1.29)	0.61	0.0151
LBP, ng/ml	111.7 (1.05)	1			120.0 (1.07)	0.49	0.1137



Effets des bioaérosols sur la santé respiratoire des travailleurs



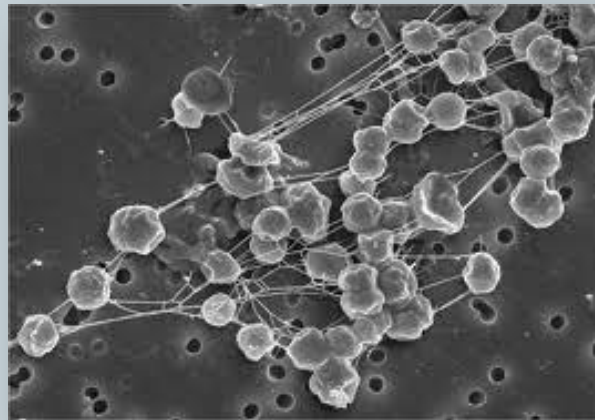
- Quels sont les agents microbiens responsables ?
 - Protection
 - Réponse inflammatoire
 - Tolérance
- Quels mécanismes ?



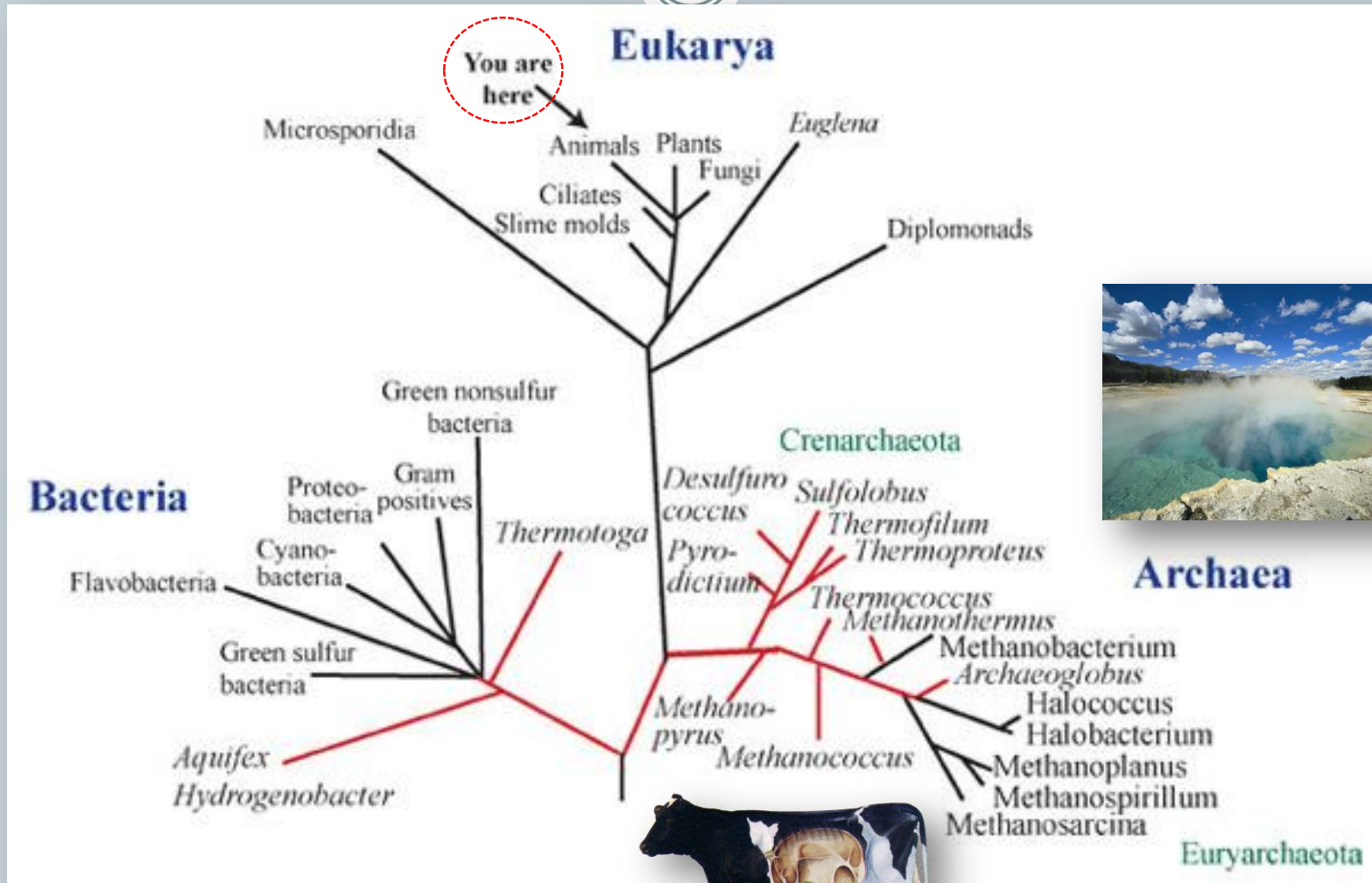
Les Archaea ?!?



- Nouvel agent méconnu des bioaérosols
- Responsable de l'adaptation ou de la protection?
- Modèles expérimentaux (modèle murin) :
 - Effets pro-inflammatoire
 - Effets immuno-protecteur



Les Archaea ??? (2)



Les Archaea dans les bioaérosols des porcheries



- Concentrations comparables à celles des bactéries
 - Jusqu'à 10^8 /m³ air
 - Très difficiles à cultiver
 - Très sensibles à l'oxygène (méthanogènes anaérobies stricts)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2009, p. 5445–5450
0099-2240/09/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.00726-09
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 75, No. 17

Culture-Independent Characterization of Archaeal Biodiversity in Swine Confinement Building Bioaerosols[∇]

Benjamin Nehmé,^{1,2†} Yan Gilbert,^{1,2†} Valérie Létourneau,^{1,2} Robert J. Forster,³
Marc Veillette,¹ Richard Villemur,⁴ and Caroline Duchaine^{1*}

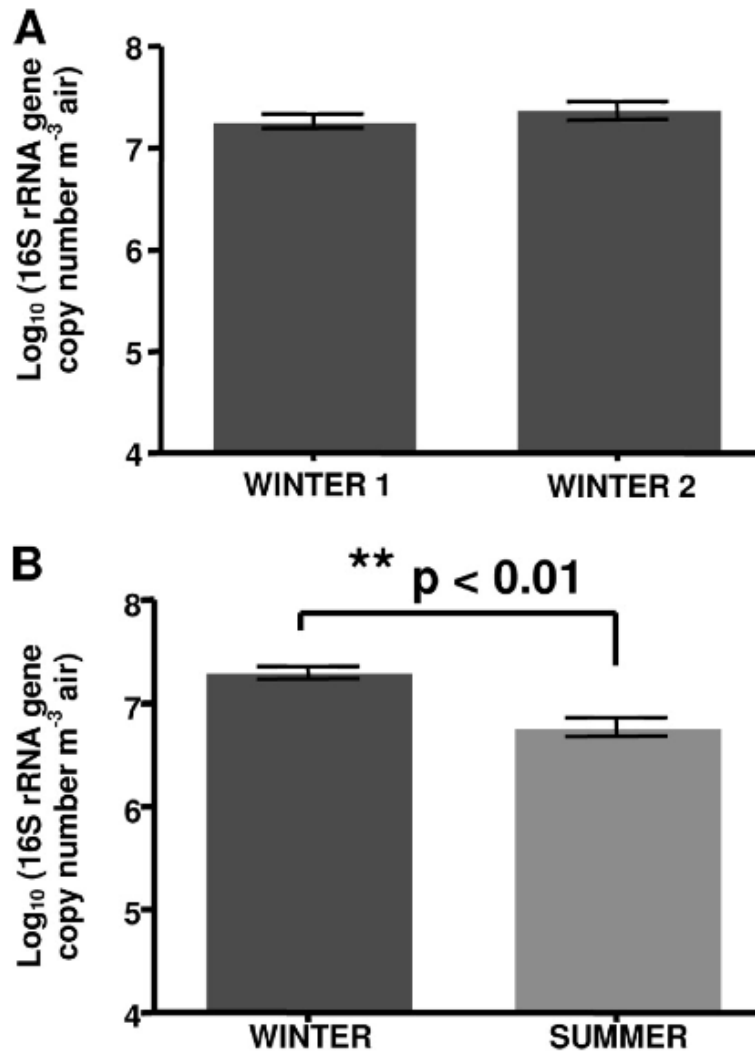
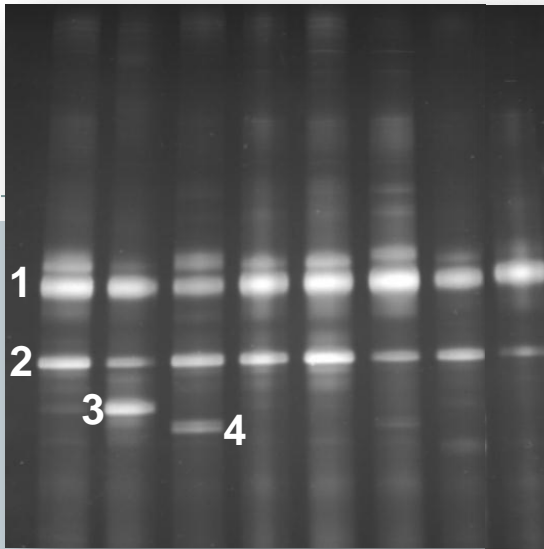
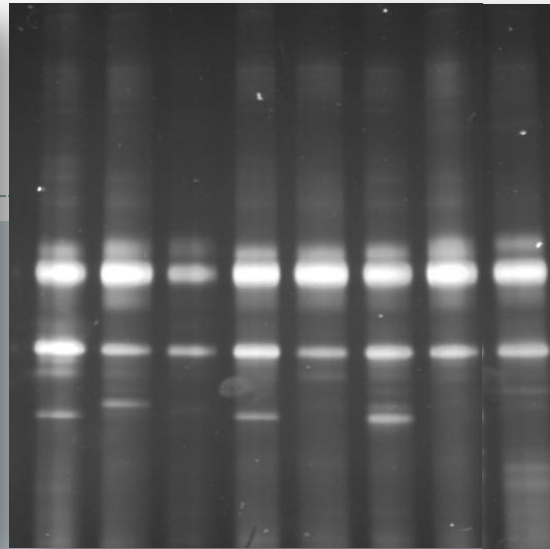


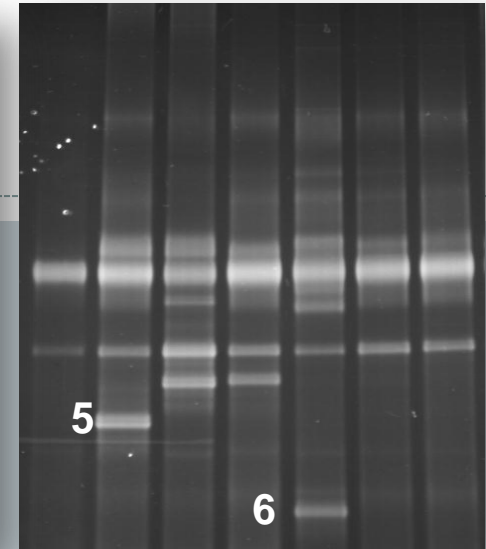
FIG. 1. Number of 16S rRNA gene copies from archaea as determined by real-time PCR. (A) Comparison between the two winter samples ($n = 8$ each). (B) Comparison between the winter and summer samples (winter, $n = 16$; summer, $n = 8$). The error bars represent the standard deviation.



WINTER 1



WINTER 2



SUMMER

Band	Size (bp)	Affiliation (Genbank Accession No.)	% similarity
1, 3	152	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> (AY196684)	96.7
2, 6	152	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> (AY196684)	96.1
4	152	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> (AY196684)	95.4
5	155	Uncultured archaeon clone EcoP2-45F (AY911640)	98.7

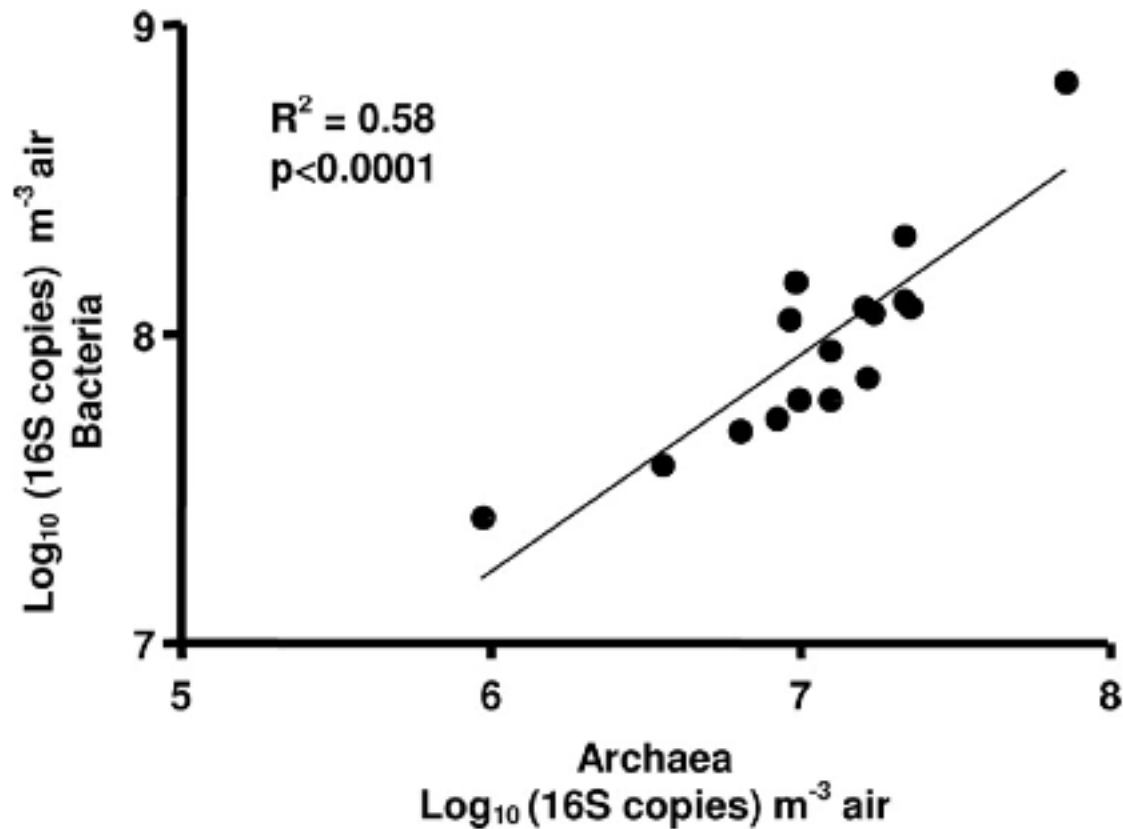


FIG. 4. Correlation between the number of bacterial and archaeal 16S rRNA gene copies in SCBs.

Conclusions



- Biologie moléculaire permet de mieux comprendre le contenu des bioaérosols
- Combinaison de méthodes pour évaluer la concentration, la diversité et le rôle des agents biologiques dans l'air
- Très peu de données dans la littérature
- Besoin d'étudier le rôle des agents microbiens non cultivables dans les problèmes de santé
- *Timing* de l'exposition → importance cruciale dans la réponse des travailleurs

QUESTIONS ?