

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

SCD UNIV. LIMOGES



D 035 042586 5

Année 1997

Thèse n° 343

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 15 Décembre 1997

par

Sandrine CLOT

née le 18 Juin 1969

**LA BRONCHITE CHRONIQUE EN MILIEU AGRICOLE.
ETUDE DES AEROCONTAMINANTS D'ORIGINE FONGIQUE.**



EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Madame BOSGIRAUD, Professeur	Président
Mademoiselle DARDE, Professeur-Praticien Hospitalier	Juge
Mademoiselle ANTONIJI, Maître de Conférences-Praticien Hospitalier	Juge
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS: Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de thèse

Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD,
Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie,

*Nous vous remercions d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider
le jury de notre thèse.*

Veillez trouver ici, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Gilles DREYFUSS,
Maître de Conférences,
Habilité à diriger des recherches,
Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie,

*Nous vous remercions sincèrement d'avoir bien voulu vous intéresser à
ce travail et pour votre aide et vos conseils.*

A nos juges

Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDE,
Praticien Hospitalier,
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
Centre Hospitalier Universitaire de Limoges,

Mademoiselle le Docteur Marie-Thérèse ANTONINI,
Maître de conférences, Praticien Hospitalier,
Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires,
Centre Hospitalier Universitaire de Limoges,

*Nous vous remercions pour votre gentillesse et pour avoir accepté de
participer à ce jury.*

Nous vous exprimons ici toute notre gratitude.

A Dominique, à ma famille et à mes amis,

Merci de m'avoir supportée tout au long de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
CHAPITRE PREMIER : ETUDE DES AEROCONTAMINANTS DU MILIEU AGRICOLE.....	8
1. Les différents aérocontaminants du milieu agricole.....	10
1.1. Les poussières organiques.....	11
1.2. Les poussières inorganiques.....	20
2. Méthodes d'étude de la poussière en suspension dans l'air du milieu agricole.....	20
2.1. Les méthodes de prélèvement.....	21
2.2. Choix de la méthode et de la stratégie de prélèvement.....	24
2.3. Etude quantitative des particules prélevées.....	26
2.4. Identification des moisissures.....	31
3. Rôle clinique des aérocontaminants du milieu agricole dans la pathologie respiratoire.....	34
3.1. Rôle de l'intensité et de l'ancienneté de l'exposition aux aérocontaminants dans la bronchite chronique.....	34
3.2. Rôle des aérocontaminants dans les asthmes professionnels agricoles.....	38
3.3. Rôle des spores de champignons dans la maladie du poumon de fermier.....	43
3.4. Rôle des aérocontaminants dans un syndrome aigu fébrile ou syndrome toxique des poussières organiques.....	45
3.5. Rôle des émanations gazeuses et des pesticides.....	46
CHAPITRE DEUXIEME : MATERIELS ET METHODES.....	48
1. Echantillon de la population.....	49
2. Méthode et conditions de prélèvement des poussières.....	51
2.1. Le capteur de poussières CPM3.....	51
2.2. Conditions de prélèvement.....	56

3. Mesure pondérale des poussières respirables	56
3.1. Préliminaires à la pesée.....	57
3.2. Pesée	57
3.3. Mode opératoire	57
4. Méthode d'étude des spores inhalées.....	58
4.1. Extraction des poussières respirables.....	58
4.2. Mise en culture des poussières extraites.....	58
4.3. Comptage et identification des champignons en culture	58
CHAPITRE TROISIEME : RESULTATS	61
1. Essais préliminaires de mesure pondérale des poussières respirables	62
1.1. Prélèvements dans une grange.....	63
1.2. Prélèvements dans une étable	65
2. Etude qualitative et quantitative des particules fongiques prélevées	65
2.1. Analyse qualitative des moisissures.....	65
2.2. Analyse quantitative des moisissures.....	70
CHAPITRE QUATRIEME : DISCUSSION	76
1. Résumé des résultats de notre étude.....	77
1.1. Mesure pondérale des poussières respirables	77
1.2. Etude mycologique des poussières respirables	78
2. Comparaison à la littérature	80
2.1. Mesure pondérale des poussières respirables en milieu agricole.....	80
2.2. Etude des micro-organismes en suspension dans l'atmosphère du milieu agricole.....	83
CONCLUSION.....	89
BIBLIOGRAPHIE.....	91

INTRODUCTION

La pathologie respiratoire en milieu agricole a fait l'objet de nombreuses études. La plupart, réalisées dans plusieurs pays européens et états nord-américains, montrent une prévalence des désordres respiratoires régulièrement plus élevée dans la population agricole par rapport à une population témoin.

Les problèmes respiratoires sont dominés en terme de fréquence, de gravité et de constance d'un secteur à l'autre, par les broncho-pneumopathies chroniques obstructives : bronchite chronique, obstruction bronchique chronique et asthme ; les alvéolites allergiques extrinsèques et la pathologie "toxique" restent prévalentes dans certains milieux spécifiques.

- Bronchite chronique et obstruction bronchique.

La bronchite chronique répond à une définition clinique : il s'agit d'une affection respiratoire caractérisée par une hypersécrétion de mucus suffisante pour entraîner une toux et une expectoration muqueuse ou mucopurulente survenant au moins trois mois par an pendant au moins deux années consécutives. Cette définition s'applique à des patients indemnes de toute autre maladie bronchopulmonaire.

Elle peut être simple ou obstructive. Dans ce dernier cas, elle s'accompagne d'un trouble ventilatoire obstructif détectable par la diminution du débit expiratoire. Le risque est l'évolution vers l'insuffisance respiratoire chronique.

La prévalence de la bronchite chronique en milieu agricole est variable selon le secteur concerné et les caractéristiques de la population étudiée (âge, sexe et tabagisme) ; elle s'établit de 5 à près de 50 %.

De nombreuses études ont permis d'observer un excès de bronchite chronique obstructive en milieu agricole par rapport à des groupes contrôles de sujets non-agriculteurs, après prise en compte du tabagisme et d'autres facteurs de confusion.

En France, la prévalence de la bronchite chronique est estimée à 5 % dans la population globale par Sadoul (1977). Peu après, Pariente *et al.* (1979) ont établi la prévalence de la bronchite chronique en milieu agricole français à 21,5 %.

Plus récemment, une enquête réalisée dans le Doubs par Dalphin *et al.* (1989) trouve une fréquence des bronchopneumopathies chroniques deux fois plus élevée dans la population agricole qu'au sein d'une population témoin (12 % contre 6 %).

Aux Etats-Unis, Babott *et al.* (1980) décrivent un taux de 25 % de bronchite chronique chez les agriculteurs contre 17 % pour un groupe témoin citadin. Et Do Pico *et al.* (1984) dénombrent 49 % de bronchite chronique dans le secteur de l'industrie céréalière contre 18 % dans une population de sujets travaillant dans le secteur tertiaire.

Au Canada, Dossman *et al.* (1980) établissent un taux de bronchite chronique de 23,1 % parmi un groupe d'agriculteurs non-fumeurs de l'industrie céréalière, contre seulement 3,3 % chez des sujets non-fumeurs et non-agriculteurs.

- Asthme.

L'asthme est défini comme une affection caractérisée par des crises de dyspnée déclenchées par différents agents ou par l'exercice, accompagnées par des signes cliniques d'obstruction partiellement ou totalement réversibles entre les crises. Cette obstruction correspond à un accroissement subit des résistances des voies aériennes, lié à des mécanismes immunologiques ou non.

L'asthme est dit "professionnel" s'il est induit ou exacerbé par l'exposition à des agents présents dans l'environnement professionnel.

La prévalence de la maladie asthmatique en milieu agricole semble supérieure à celle de la population générale. Il y aurait dans la population française un peu plus de 3 % de sujets asthmatiques. Dans une étude effectuée en milieu rural dans les Deux-Sèvres, Blandin et Sabbah

(1977) trouvent un pourcentage de 7,3 % d'asthmatiques. D'Arco (1993) établit la prévalence de l'asthme en milieu agricole en Haute-Vienne à 6,8 %.

L'atopie n'est pas plus fréquente en milieu agricole que dans le reste de la population, mais des symptômes asthmatiformes relevant plus de mécanismes inflammatoires que de mécanismes allergiques, sont rapportés par 15 à 40 % des agriculteurs, selon les secteurs étudiés, soit une fréquence beaucoup plus élevée que dans la population générale.

Ces troubles seraient particulièrement fréquents en milieu d'élevage confiné ainsi que chez les ouvriers céréaliers des grands silos à grains.

- Alvéolites allergiques extrinsèques.

Ce terme désigne des pneumopathies interstitielles et alvéolaires de mécanisme immunologique allergique, liées à l'inhalation chronique de particules organiques d'origine animale ou végétale. Ces pneumopathies d'hypersensibilité diffèrent les unes des autres par l'antigène en cause.

Les alvéolites allergiques sont rencontrées notamment en milieu fourrager, mais aussi dans les élevages de volailles et en milieu de production de champignons. Leur prévalence peut dépasser 5 % dans certains groupes à risque.

Le poumon de fermier est la plus fréquente des alvéolites allergiques. Sa fréquence exacte est difficile à apprécier. Elle dépend de facteurs climatiques et géographiques : l'humidité et le froid sont favorables. Interviennent aussi des facteurs économiques et professionnels : la catégorie la plus touchée est celle d'ouvriers agricoles dans les régions fourragères d'élevage. La prévalence de la maladie est estimée entre 0,4 et 4 %. Depierre *et al.* (1988) trouvent une prévalence de 4,4 % sur une population d'agriculteurs dans le département du Doubs. Dans son enquête en Haute-Vienne, d'Arco (1993) l'estime inférieure à 1 %.

- Bronchopneumopathies toxiques.

- Syndrome aigu fébrile ou " organic dust toxic syndrome " (ODTS).

Cette atteinte parenchymateuse a une présentation clinique proche de celle d'une pneumopathie d'hypersensibilité, mais la pathologie ne fait pas intervenir ici de mécanismes immunologiques. Elle fait suite à une exposition massive et inhabituelle à des particules organiques. Sa résolution est spontanée, mais selon Husman *et al.* (1990), ce syndrome serait un facteur prédisposant au développement d'une bronchite chronique.

Les milieux les plus contaminés sont les élevages en batterie de volailles et les élevages de porcs, où des prévalences supérieures à 10 % ont été rapportées. Mais tous les secteurs de l'agriculture sont plus ou moins touchés. La fréquence de cette affection est établie à 13,6 % par Husman *et al.* (1990) parmi une population de fermiers finlandais. Malmberg *et al.* (1987) identifient 6,1 % de syndromes aigus fébriles chez les fermiers suédois.

- Oedèmes pulmonaires et agressions toxiques.

Bien que leur fréquence soit relativement faible, des accidents très graves sont causés par l'utilisation de pesticides et par les émanations gazeuses provenant de la fermentation de céréales et plantes fourragères en silos ou celle de lisier dans les élevages de porcs et de volailles.

L'appareil respiratoire en milieu agricole est soumis à des agressions multiples. Les aérocontaminants peuvent être des poussières organiques (débris végétaux, micro-organismes bactériens, parasitaires ou fongiques et leurs toxines, protéines d'origine animale, insectes, acariens...), des substances chimiques (pesticides, engrais), ou des substances gazeuses provenant de la fermentation des céréales ou du lisier. L'exposition prolongée au froid et à l'humidité majore le risque de survenue de pathologie respiratoire.

Cependant la relation entre les désordres respiratoires en milieu agricole et l'exposition professionnelle n'est pas toujours facile à analyser. De plus en plus, des études se développent afin de mettre au point des méthodes d'évaluation précise de l'exposition aux aérocontaminants en milieu agricole et de leurs effets respiratoires spécifiques. A cet effet, différentes méthodes de prélèvement et d'analyse des poussières en suspension dans l'atmosphère sont étudiées et adaptées au milieu agricole.

Le travail qui nous a été confié fait suite à l'étude entreprise en 1992 par le service de Pneumologie du CHU de Limoges et exposée dans la thèse de Xavier d'Arco (1993).

Cette enquête épidémiologique transversale avait pour but de mieux comprendre les désordres respiratoires en milieu agricole. Réalisée sur une population de 1020 actifs agricoles en Haute-Vienne, elle a permis de déterminer quelques caractéristiques du monde agricole dans ce département. Puis, une analyse statistique a permis d'établir des corrélations significatives : la survenue d'une obstruction bronchique périphérique est corrélée statistiquement à l'âge des actifs agricoles et à la petite taille des exploitations chez les non-fumeurs. Or, ces deux facteurs, âge des

sujets et taille de l'exploitation, sont des indices indirects de l'exposition aux poussières de foin.

- la taille des fermes, parce que les petites et moyennes exploitations sont moins mécanisées que les autres et favorisent ainsi l'exposition directe aux poussières de foin par l'importance du travail manuel et l'exiguïté des locaux ;

- l'âge des sujets, car il est le reflet du cumul de l'exposition.

A la suite de ces résultats, nous avons entrepris notre étude.

Il s'agissait d'établir un protocole expérimental permettant de quantifier de manière directe l'exposition aux poussières de foin, afin de mettre en relation ce paramètre avec la survenue d'une obstruction bronchique périphérique et avec la taille des exploitations.

Nous avons effectué des essais préliminaires de prélèvements de poussières respirables dans une grange et dans une étable, en quantifiant l'importance de ces poussières par la pesée des filtres après le prélèvement. A la différence des particules minérales, celles retenues par les filtres ont un poids trop faible, et leur concentration dans le milieu ne peut pas être appréciée de manière pondérale. Il nous a donc paru nécessaire de réorienter notre travail vers une analyse qualitative et quantitative des particules fongiques retenues sur les filtres de prélèvement. Le présent mémoire rapporte les résultats de cette étude.

Dans un premier chapitre, nous allons étudier les différents aérocontaminants du milieu agricole, présenter les différentes méthodes permettant de les quantifier et de les identifier et voir les rôles cliniques qu'ils peuvent jouer dans la pathologie respiratoire agricole.

Dans le second chapitre, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail.

Le troisième chapitre sera consacré à la présentation des résultats obtenus, qui seront comparés avec ceux de la littérature au cours du chapitre quatrième.

Le mémoire s'achève par une conclusion générale.

CHAPITRE PREMIER

**ETUDE DES AEROCONTAMINANTS DU MILIEU
AGRICOLE.**

Le milieu agricole expose le poumon quotidiennement à des agressions physiques, toxiques, allergiques et infectieuses.

Parmi les agressions physiques, le climat joue un rôle non négligeable : l'exposition prolongée au froid et à l'humidité est un facteur de risque dans la survenue d'une pathologie respiratoire.

Mais l'agression de l'appareil bronchopulmonaire résulte aussi de l'inhalation de différentes substances identifiées comme les aérocontaminants. Le dépôt de ces particules au niveau du poumon dépend de leur taille. Les travaux du "Task Group on Lung Dynamics" de l'"International Radiological Protection Commission" ont distingué trois compartiments au niveau pulmonaire, suivant la taille de ces particules :

- le compartiment nasopharyngé, des narines au larynx,
- le compartiment trachéobronchique, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales,
- le compartiment pulmonaire profond, qui comprend les bronchioles respiratoires, les canaux et les sacs alvéolaires.

Les particules inhalées se répartissent dans les différents compartiments essentiellement en fonction de leur taille. Les particules de taille supérieure à 5 μm sont arrêtées, pour la plupart, dans les voies aériennes supérieures (compartiment nasopharyngé). Les particules d'un diamètre compris entre 5 et 0,5 μm se déposent dans l'arbre trachéobronchique et sur les parois alvéolaires. Les particules d'un diamètre inférieur à 0,5 μm pénètrent dans les alvéoles ou sont rejetées à l'expiration.

Dans ce chapitre, nous allons étudier les différents aérocontaminants du milieu agricole,

avec un paragraphe spécial sur les moisissures. Puis nous allons répertorier les différentes méthodes permettant d'étudier les poussières en suspension dans l'air du milieu agricole : les méthodes de prélèvement et les méthodes d'analyse quantitative et qualitative des particules, et notamment des spores fongiques. Ensuite, nous verrons quels rôles cliniques jouent les aérocontaminants du milieu agricole dans la pathologie respiratoire des agriculteurs.

1. LES DIFFERENTS AEROCONTAMINANTS DU MILIEU AGRICOLE.

Les aérocontaminants du milieu agricole sont multiples, mais dominés par les poussières organiques.

Selon Dosman *et al.* (1980), la composition de la poussière de céréales serait de 65% de substances organiques et 35% de substances inorganiques. Quant à la distribution des tailles des particules, elle révèle que 60% ont un diamètre aérodynamique supérieur ou égal à 5 μm et 40% un diamètre aérodynamique inférieur à 5 μm , donc susceptibles de pénétrer au niveau des petites voies aériennes et des alvéoles pulmonaires.

Dans une autre étude réalisée en Finlande, Louhelainen *et al.* (1987), en analysant la poussière dégagée pendant l'alimentation des animaux dans une porcherie et dans une étable, trouvent un taux d'environ 90% de particules organiques dans la poussière totale.

L'agriculteur peut être gêné par ces poussières dans de nombreuses circonstances :

- dans le grenier à céréales, lorsque celles-ci sont engrangées depuis longtemps,
- dans la grange où le foin est stocké et manipulé,
- pendant les moissons,
- lors de l'alimentation du bétail,
- lors du remplissage et de l'évacuation des silos céréaliers.

Les facteurs favorisant l'empoussièrement sont :

- l'absence de mécanisation, avec manipulation du foin manuellement,
- le manque d'aération des granges,
- le travail quotidien d'affouragement du bétail,
- la proximité entre les lieux d'habitation et de travail.

Ces critères concernent particulièrement les petites exploitations artisanales dans des régions peu mécanisées.

Il est à rappeler que le tabagisme est un autre facteur d'aérocontamination du milieu agricole, dont la répartition est comparable à celle des autres secteurs d'activité, mais de façon moins intense.

1.1. Les poussières organiques.

Les poussières organiques représentent la majorité des aérocontaminants du milieu agricole. Parmi elles, on retrouve différentes particules dont la complexité de structure est considérable : débris végétaux, pollens, protéines aviaires, protéines d'origine animale (animaux d'élevage ou domestiques), acariens, insectes, micro-organismes bactériens, parasitaires ou fongiques et leurs toxines.

Quelques études, principalement dans les pays scandinaves, s'intéressent à la composition en micro-organismes de la poussière inhalée dans différents environnements agricoles. Les résultats concordent quant aux différentes espèces de moisissures le plus souvent observées.

Ainsi, Darke *et al.* (1976) entreprennent une enquête chez un groupe d'agriculteurs du Lincolnshire se disant affectés par la poussière pendant la moisson. Des prélèvements de poussières en suspension dans l'air autour des moissonneuses sont effectués. Leur analyse microscopique révèle essentiellement des spores fongiques et des fragments d'hyphes fongiques. Parmi ces spores, l'auteur met en évidence une prédominance pour les genres *Cladosporium* et *Alternaria*. Les actinomycètes et les autres bactéries représentent moins de 10% du nombre total de spores.

Malmberg *et al.* (1987) et Eduard *et al.* (1990) en Suède, comme Kotimaa *et al.* (1984) et Karlsson et Malmberg (1989) en Finlande, étudient la poussière en suspension dans l'air dans des exploitations d'élevage de vaches laitières. Ils analysent la composition de la poussière inhalée par les agriculteurs lors de la manipulation de foin moisi, ainsi que celle en suspension dans l'air ambiant des granges et étables.

Ces quatre études révèlent que les micro-organismes présents en plus grande quantité dans la poussière de foin sont les actinomycètes thermophiles, avec une prédominance de *Thermoactinomyces vulgaris*. Viennent ensuite les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* (surtout *A. glaucus* et *A. fumigatus*) et *Penicillium*, ainsi que quelques *Rhizomucor*.

Dans la poussière dégagée pendant la manipulation de grains, Kotimaa *et al.* (1984) trouvent une majorité de *Cladosporium* et *Penicillium*. Selon les mêmes auteurs, le foin stocké en balles serrées libère plus de spores fongiques qu'un foin rangé de manière plus libre.

1. MYXOMYCETES (= GYMNOMYCETES : 118 genres).

Appareil végétatif sous forme de plasmode ou de pseudo-plasmode.
Présence de cellules flagellées (= myxamibes).

- A) *Acrasiomycètes* ou champignons muqueux cellulaires.
- B) *Myxomycètes* ou champignons muqueux.
- C) *Plasmodiophoromycètes*.

2. EUMYCETES (= vrais champignons).

* MASTIGOMYCETES (204 genres) :

Thalle filamenteux non cloisonné, plus ou moins développé.
Reproduction asexuée par spores mobiles (= zoospores).

- A) *Chytridiomycètes*
- B) *Oomycètes*

* AMASTIGOMYCETES :

A) Zygomycètes (115 genres) :

Mycélium coenocytique. Reproduction asexuée à l'aide de conidies, le plus souvent formées dans une vésicule.
Reproduction sexuée par fusion de gamétocystes et formation de zygospores.

B) Ascomycètes (2720 genres) :

Reproduction asexuée par conidies ou fragmentation mycélienne.

Reproduction sexuée à l'aide d'ascospores, formées dans des asques.

- *Hémiascomycètes* : asques non enfermés dans un sporocarpe à thalle unicellulaire : Levures (= endomycétales).

- *Euscomycètes* : asques enfermés dans un sporocarpe (périthèce). Thalle filamenteux développé :

- Pyrénomycètes*
- Discomycètes*
- Laboulbéniomycètes*

C) Basidiomycètes (1100 genres) :

Thalle unicellulaire (chez les levures) ou filamenteux.

Multiplication végétative connue dans quelques groupes.

Reproduction sexuée à l'aide de basidiospores, formées sur des basides.

Téliomycètes (Rouilles et Charbons). *Hyménomycètes*. *Gastéromycètes*.

D) Deutéromycètes (= *Fungi imperfecti* : 1680 genres).

Thalle unicellulaire ou filamenteux.

Reproduction sexuée absente ou inconnue.

Reproduction asexuée identique à celle des Ascomycètes.

Blastomycètes (= levures). *Hyphomycètes*. *Coelomycètes*.

Pas de reproduction = *Mycelia sterila*

Tableau I :
Classification générale des champignons. Mallea et Charpin (1986)

D'après Malmberg *et al.* (1987), les travaux provoquant le plus de poussière moisie seraient la manipulation d'un grain pas assez séché et le nettoyage des greniers ayant contenu le grain pendant plusieurs années.

RAPPELS GENERAUX SUR LES MOISSURES.

Les rappels présentés dans ce paragraphe sont tirés des ouvrages de Charpin et Vervloet (1992) et de Botton *et al.* (1990). Les caractères généraux des principaux ordres de micro-organismes fongiques sont rappelés dans le tableau I. On appelle moisissures, au sens strict, les champignons microscopiques filamenteux appartenant essentiellement à la classe des Zygomycètes, Ascomycètes et Deutéromycètes.

A- Généralités sur les champignons.

Les champignons sont des organismes eucaryotes non photosynthétiques, uni- ou pluricellulaires, dont l'appareil végétatif est un thalle sans vaisseaux conducteurs et dépourvu de chlorophylle. Ils se reproduisent à l'aide de spores.

- Mode de vie.

Les champignons vivent à peu près partout. Certains sont parasites des végétaux ou des animaux. D'autres sont saprophytes sur les substances organiques mortes, dans le sol ou en milieu aquatique. D'autres encore vivent en symbiose avec des algues ou des racines de plantes.

- Appareil végétatif.

Le thalle est généralement constitué par un mycélium à structures diverses. Il peut être unicellulaire (chez les levures), se présenter sous forme d'une masse protoplasmique plurinucléée sans membrane (chez les Myxomycètes).

Généralement, le mycélium est filamenteux, limité par une paroi rigide. Les filaments ou hyphes prennent naissance à partir de la germination d'une cellule reproductrice. Ils s'allongent et se ramifient à la même vitesse ; leur croissance est limitée à l'apex des hyphes. Ils peuvent s'agglomérer en cordons, en coussinets, en tubercules. Enfin, le thalle peut avoir une structure hétérogène, associant mycélium et faux tissu ou plectenchyme.

Parfois, il forme des chlamydospores (spores ou fragments de mycélium enkystés) ou des sclérotés.

- Cytologie.

Les cellules de champignon sont pourvues d'un noyau typique, de grosses vacuoles, de mitochondries, d'un réticulum endoplasmique, d'un appareil de Golgi, de nombreuses vésicules et d'une membrane ou plasmalemme, présentant des lomasomes.

La paroi des champignons renferme 80 à 90 % de polysaccharides associés à des protéines, des lipides... Les principaux constituants glucidiques sont la chitine et la cellulose qui rendent la paroi résistante. Cette paroi cellulaire est souvent colorée par de la mélanine.

- Conditions de croissance.

La croissance des champignons demeure étroitement liée aux conditions du milieu. Un climat chaud et humide est favorable à la croissance du mycélium, à la sporulation et à la germination des spores. Leur température optimale de développement se situe, pour les espèces mésophiles, entre 20 et 25°C. Mais beaucoup d'espèces thermophiles vont croître à des températures supérieures (40 à 50°C), tandis que les espèces psychrophiles se développent à des températures égales ou inférieures à 10°C. Une hygrométrie relativement élevée est nécessaire à leur croissance. La lumière n'est pas indispensable.

Par ailleurs, les champignons exigent comme éléments chimiques, essentiellement du carbone sous forme d'hydrates, de l'azote sous forme de nitrates. Ils utilisent en outre, des acides aminés, des vitamines, des éléments minéraux. Ils absorbent toujours leurs aliments sous forme dissoute. Leur croissance, relativement rapide, s'effectue de préférence dans des milieux peu acides.

- Reproduction.

Il peut s'agir de multiplication végétative (phénomène asexué) ou de reproduction sexuée.

-Multiplication végétative ou reproduction directe.

Elle assure la propagation de l'espèce et s'effectue par fragmentation du thalle ou par sporulation. Le thalle produit des spores dites de dissémination, appelées conidies. Elles peuvent être exogènes, formées un peu partout sur le thalle, ou souvent supportées par un filament différencié, le conidiophore.

Chez les Zygomycètes, les conidies sont endogènes. Elles se forment dans une vésicule ou sporocyste. En germant, les conidies forment un nouveau mycélium semblable à celui qui leur a

donné naissance.

- Reproduction sexuée.

Elle s'effectue au moyen de gamètes ou cellules sexuelles engendrées par des organes sexuels, ou gamétocystes. La fusion des cellules aboutit à la formation d'un oeuf ou zygote. Celui-ci germe en produisant un filament, puis une vésicule ou sporocyste : ce peut être un asque contenant des ascospores, ou une baside sur laquelle naissent les basidiospores.

B- Classification des moisissures.

La classification des champignons repose sur la structure du thalle, le mode de fructification et de reproduction. On appelle moisissures au sens strict, les champignons microscopiques filamenteux appartenant aux classes des Zygomycètes, Ascomycètes et Deutéromycètes.

1. Les Zygomycètes.

Ce groupe se divise en 2 ordres : les Mucorales et les Entomophtorales.

*** LES MUCORALES.**

Ce sont des champignons filamenteux à mycélium souvent envahissant, non septé (siphonné) ou à cloisons formées exceptionnellement au niveau des organes reproducteurs ou lors de la différenciation de spores de résistance (chlamydozoospores).

La reproduction asexuée s'effectue au moyen de spores immobiles, formées généralement en grand nombre dans des sporocystes pourvus, à l'intérieur, d'une vésicule centrale ou columelle prolongeant le sporocystophore.

Selon les espèces, les sporocystophores présentent quatre modes de ramification :

- monopodique
- sympodique
- dichotomique
- verticillé

Les sporocystophores peuvent se former sur de longs filaments non ramifiés, à croissance rapide, appelés stolons, et s'ancrer au substrat par des structures filamenteuses rappelant des racines, ou rhizoïdes. Une reproduction sexuée peut aussi intervenir.

Quatre genres incluent la plupart des espèces de Mucorales isolées dans des recensements atmosphériques:

- *Absidia*
- *Mucor*
- *Rhizomucor*
- *Rhizopus*
- LES ENTOMOPHTORALES.

Ce sont des champignons parasites le plus souvent d'insectes.

2. Les Ascomycètes.

Ces champignons, à thalle filamenteux septés ou levuroïdes, présentent une structure caractéristique appelée asque qui est un sporocyste particulier formé au cours de la reproduction sexuée. L'asque renferme le plus souvent un nombre défini de spores ou ascospores formées après fusion de deux noyaux, suivie d'une méiose. Il peut être globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou double. La morphologie des ascospores est très variée.

A côté de cette forme sexuée ascogène (ou forme parfaite), beaucoup d'Ascomycètes se reproduisent par multiplication asexuée (forme imparfaite). La majorité des Deutéromycètes sont des formes imparfaites d'Ascomycètes. De nombreux Ascomycètes sont des parasites redoutables de végétaux (chancre du châtaigner, ergot du seigle), ou de l'homme (histoplasmes).

3. Les Deutéromycètes.

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores, et qui se multiplient au moyen de conidies. Ils sont unicellulaires (levures) ou à thalle filamenteux septé.

Ils se divisent en trois classes:

- *Les Blastomycètes.*

Ce sont des levures avec ou sans pseudomycélium.

- *Les Hyphomycètes.*

Ces champignons filamenteux produisent des conidies directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés. Certains Hyphomycètes ne forment jamais de spores et sont de ce fait stériles ; ce sont les Agonomycétales.

* Caractéristiques des différentes structures :

- les spores.

On peut distinguer :

i) les chlamydozores, qui sont des spores de résistance, le plus souvent à paroi épaisse, terminales ou intercalaires, différenciées par transformation de cellules ou d'articles du mycélium ou de conidies.

ii) les arthrospores, formées par fragmentation d'hyphes indifférenciés. Arthrospores et chlamydozores constituent des thallospores.

iii) les conidies proprement dites, le plus souvent bourgeonnées par des cellules spécialisées (phialides, annellides).

La forme, les dimensions, la couleur, la structure, l'ornementation des conidies varient selon les genres et les espèces. Les conidies peuvent être solitaires, bourgeonnées de façon synchrone sur des renflements, associées en glomérules, disposées en chaînes basipétales s'accroissant par la base (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou en chaînes acropétales s'allongeant au sommet (*Alternaria*, *Cladosporium*).

- les cellules conidiogènes.

i) les phialides bourgeonnent à l'apex des spores en succession basipétale, réunies en glomérules ou en chaînes (*Aspergillus*, *Penicillium*). Elles sont de diverses formes, solitaires ou groupées en verticilles ou en têtes (*Aspergillus*, *Penicillium*).

ii) les annellides s'allongent au fur et à mesure de la sporulation. Les conidies formées en succession basipétale, laissent l'une après l'autre, en se détachant, une cicatrice en forme d'anneau.

iii) les cellules sporogènes à croissance sympodiale : après formation d'une première conidie terminale, la cellule sporogène s'allonge latéralement et donne naissance à une deuxième conidie. Le processus se répétant, il s'ensuit la formation d'une structure allongée plus ou moins en zig-zag.

- les conidiophores.

Ils sont simples ou ramifiés.

Les conidiophores très ramifiés et agrégés forment des appareils massifs et allongés appelés corémies. Groupés en coussinets superficiels, ils constituent des sporodochies.

Fongicides minéraux	<ul style="list-style-type: none"> - composés soufrés - sels de cuivre (bouillie bordelaise) - arséniate de sodium
Fongicides organiques	<ul style="list-style-type: none"> - dithiocarbamates métalliques (Ferbame, Nabame, Zinèbe, Manèbe) - organo-mercuriels (Diméthylmercure, Diéthylmercure) - dérivés des thiurames (Thirame, Carbatène) - dérivés nitrés et chlorés du phénol (Pentachlorophénol, Dinitrophénol) - dérivés de la phtalimide (Captan, Captafol, Folpet)

Tableau II :
Les principaux fongicides d'après Lauwerys (1992) et Lebhar (1983).

Herbicides minéraux	<ul style="list-style-type: none"> - chlorate de sodium et de potassium - acide sulfurique - sulfates de fer - borates - cyanamide de calcium
Herbicides organiques	<ul style="list-style-type: none"> - colorants nitrés : dérivés nitrés du phénol et du crésol (Dinosèbe, Dinoterbe, Dinitro-orthocrésol, Nitrofène) - ammoniums quaternaires ou dipyridyliques : diquat, paraquat (Gramoxone, Gramixel, Priglex, Totacol) - phytohormones ou aryloxyacides (2.4.D. ou acide dichlorophénoxyacétique, 2.4.5.T. ou acide trichlorophénoxyacétique) - benzonitriles (Loxynil, Dichlobénil, Bromoxynil) - urées substituées (Diuron, Linuron, Néburon, Monuron) - diazines et triazines (Simazine, Atrazine) - carbamates (Prophane, Barbane, Monolate, Nabame)

Tableau III :
Les principaux herbicides d'après Lauwerys (1992) et Lebhar (1983).

Insecticides végétaux	- pyrèthre, roténone, nicotine
Insecticides organiques	<ul style="list-style-type: none"> - organo-chlorés : - dérivés du chlorobenzène (Dichloro diphényl trichloroéthane ou DDT, Endosulfan) <li style="padding-left: 20px;">- dérivés chlorés du camphène (Toxaphène) <li style="padding-left: 20px;">- dérivés de l'indane (Chlordane, Heptachlore, Dieldrin, Aldrin) <li style="padding-left: 20px;">- dérivés du cyclohexane (Lindane, Hexachlorocyclohexane) - organophosphorés (Parathion, Malathion, Azinphos, Dichlorvos, Chlorothion, Diazinon) - carbamates (Carbaryl, Carbofuran, Dimetan, Isolan) - pyréthrénoïdes (Décaméthrine, Fenvalérate, Perméthrine) - insecticides gazeux ou fumigants : <ul style="list-style-type: none"> - sulfure de carbone - tétrachlorure de carbone - bromure de méthyle - acide cyanhydrique

Tableau IV :
Les principaux insecticides d'après Lauwerys (1992) et Lebhar (1983).

- les sclérotés.

Ils sont considérés comme des organes de conservation (divers *Aspergillus* et *Penicillium* en possèdent). Ils se présentent sous la forme de masses mycéliennes compactes, souvent très dures, globuleuses, ellipsoïdales ou allongées.

- Les Coelomycètes.

Les cellules conidiogènes des membres de ce groupe sont incluses dans des fructifications appelées pycnides chez les Sphaeropsidales et acervules chez les Melanconiales.

1.2. Les poussières inorganiques.

Les travailleurs agricoles sont soumis de plus à l'exposition d'aérocontaminants de nature chimique. En effet, l'utilisation de substances chimiques s'est considérablement développée dans l'agriculture moderne. Les principales sont les pesticides (insecticides, herbicides, fongicides), les engrais et les antibiotiques ajoutés aux aliments du bétail. Les tableaux II, III et IV présentent les différents pesticides utilisés en agriculture.

Mais il faut aussi considérer des émanations gazeuses, d'origine et de nature variées en milieu agricole :

- le dégagement de dioxyde d'azote lors de la fermentation de céréales ou de plantes fourragères en silos,

- les substances gazeuses irritantes issues de la fermentation du lisier, notamment dans les élevages en batterie de porcs et de volailles : ammoniac, méthane, hydrogène sulfureux, gaz carbonique.

2. METHODES D'ETUDE DE LA POUSSIERE EN SUSPENSION DANS L'AIR DU MILIEU AGRICOLE.

Afin de pouvoir analyser la relation entre l'exposition professionnelle aux aérocontaminants et les troubles respiratoires en milieu agricole, il est nécessaire de trouver des méthodes permettant une évaluation précise de l'exposition. Certaines études ont essayé d'apprécier ce risque de manière indirecte.

Ainsi Saïa *et al.* (1984) ont établi une relation significative entre la survenue d'une bronchite chronique et l'âge, la taille de l'exploitation et l'activité de traite des vaches. Terho *et al.* (1987) mettent en évidence une prédominance de la bronchite chronique dans les exploitations où les céréales sont manipulées à la main. Dans l'étude de D'Arco (1993), l'altération du DEM₂₅₋₇₅

(débit expiratoire maximal moyen) est corrélée avec l'âge des agriculteurs et le travail dans de petites exploitations. Récemment, Dalphin *et al.* (1994) trouvent une relation positive entre la fréquence des bronchopneumopathies chroniques obstructives en milieu agricole, dans le Doubs, et l'ancienneté de l'exposition professionnelle.

Mais de telles relations restent quelque peu imprécises. Une appréciation précise du risque professionnel ne peut être effectuée qu'avec une mesure directe de l'exposition aux aérocontaminants. Différentes méthodes de prélèvement et d'analyse des poussières en suspension dans l'atmosphère peuvent être employées.

Dans le milieu agricole, les études concernent particulièrement la mesure de la concentration en poussières dans l'air inhalé, et l'analyse qualitative et quantitative des micro-organismes et notamment des spores fongiques. Nous allons répertorier dans ce paragraphe les principales méthodes permettant de réaliser de telles études.

2.1. Les méthodes de prélèvement.

Différentes méthodes de prélèvement de la poussière en suspension dans l'air ont été étudiées. Ces méthodes utilisent un des deux phénomènes physiques suivants :

- le phénomène d'impact des particules sur une surface liquide ou sur un gel. Les systèmes utilisant ce phénomène servent à l'étude des micro-organismes en suspension dans l'air.

- le phénomène de filtration de l'air à travers des filtres en gélatine, en polycarbonate ou en acétate de cellulose. Les méthodes utilisant ce procédé permettent à la fois une étude pondérale de la poussière totale en suspension dans un environnement et une étude détaillée des particules constituant cette poussière, et notamment les micro-organismes.

2.1.1. Les techniques basées sur un phénomène d'impact des particules.

Un volume d'air connu est aspiré en un temps déterminé et est projeté soit dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture pour le développement des micro-organismes, soit dans un milieu de récolte.

Il existe les appareillages suivants :

- * **L'impacteur en cascade Andersen ou "Cascade impactor"**.

Il s'agit du premier appareil, mis au point à la fin des années 1950 par Andersen (1958), permettant de prélever les micro-organismes dans l'air, de les trier en fonction de leur taille

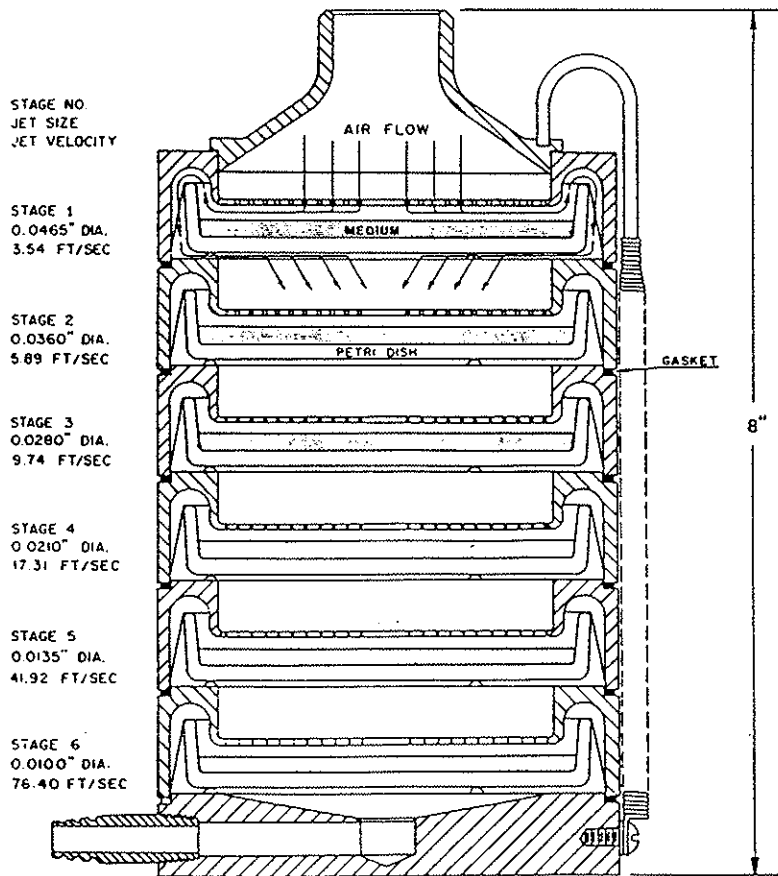
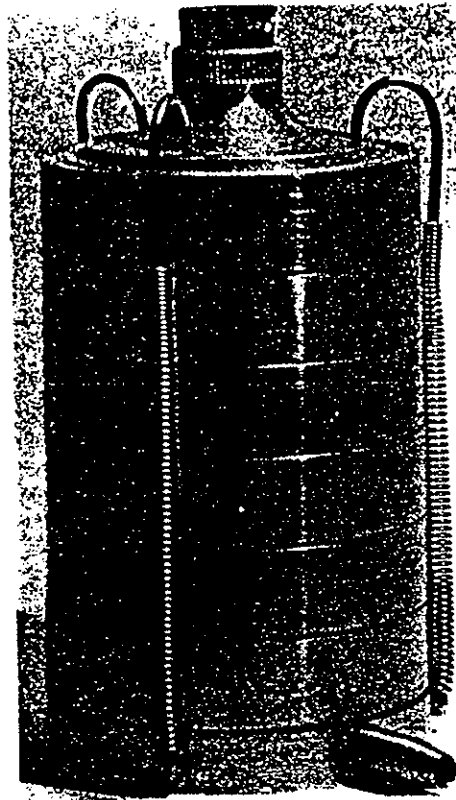


Figure 1 : L'impacteur en cascade Andersen : vue générale et coupe schématique.

aérodynamique et de les dénombrer. C'est un appareil à six étages (figure 1) au travers desquels l'air est conduit de haut en bas. Chaque étage est constitué d'un plateau perforé de 400 trous, juste en-dessous duquel se trouve une boîte de Pétri contenant un milieu de culture.

L'appareil est relié à une pompe à air comprimé à débit constant, calibrée à 28,3 litres par minute, et l'air circule dans l'appareil à travers les trous.

La taille des trous est constante et connue pour chaque étage mais diminue de haut en bas; la vitesse du flux d'air est donc uniforme dans chaque étage mais augmente en descendant. Ceci implique que les particules se répartissent dans les différentes boîtes de Pétri selon leurs dimensions.

Après prélèvement les boîtes de Pétri sont mises à incuber telles quelles.

*** Le capteur à fente.**

C'est un appareil contenant une boîte de Pétri remplie d'un milieu de culture et animée d'un mouvement de rotation, au-dessus de laquelle se trouve une fente. L'air à analyser est aspiré au moyen d'une pompe et passe à travers la fente. Les micro-organismes sont piégés dans le milieu de culture. Le débit d'air est réglé à 30 litres par minute. La distance entre la fente et la surface du milieu de culture est ajustée et doit rester constante pendant la durée du prélèvement. Après prélèvement la boîte de Pétri est directement mise à incuber.

Ce système présente deux inconvénients importants auxquels on peut remédier à l'aide de modifications :

- si le temps de prélèvement est assez long, l'eau contenue dans le milieu de culture a tendance à s'évaporer, ce qui augmente la distance entre la fente et la surface du milieu et qui diminue l'efficacité de la récolte. Une solution à ce problème consiste à ajouter du glycérol sur le milieu de culture, ce qui ralentit l'évaporation.

- ce système est rapidement surchargé lors de prélèvement dans des milieux contenant de fortes concentrations en micro-organismes. Si trop de spores fongiques sont piégées, il sera difficile d'en évaluer le nombre, les colonies se gênant entre elles et inhibant le développement de leurs voisines.

Une modification de la technique permet de pallier cet inconvénient : on remplace le milieu de culture par un milieu de récolte à base de gélatine, d'eau et de glycérol. Après prélèvement, le milieu de récolte est homogénéisé, dilué en série et étendu sur milieu de culture. Puis on met à incuber.

* Le cyclone.

Il s'agit d'un système qui piège les micro-organismes dans un liquide de récolte. Le liquide est dilué en série après prélèvement et étendu sur milieu de culture, puis mis à incuber.

2.1.2. La technique basée sur un phénomène de filtration de l'air inhalé.

Il s'agit d'un filtre à surface lisse, aux pores de diamètre connu, monté sur un support cellulosique et placé dans une cassette en plastique préalablement stérilisée. L'appareil est relié à une pompe portable à débit constant calibré à 1 litre par minute. L'air passe à travers le filtre sur lequel sont retenues les particules de poussière. La nature du filtre est variable : il peut être en gélatine, en polycarbonate ou en acétate de cellulose.

La méthode la plus récente et la plus employée actuellement, "The C.A.M.N.E.A. Method", décrite par Palmgren *et al.* (1986), utilise des filtres en polycarbonate (filtres "Nucleopore") de 37 mm de diamètre avec des pores de 0,4 μm . Après la période de prélèvement, la pompe est déconnectée, les cassettes contenant les filtres sont fermées et amenées au laboratoire.

Ces prélèvements sont destinés soit à une analyse pondérale des poussières retenues sur les filtres, soit à une étude des micro-organismes prélevés. Dans ce dernier cas, les micro-organismes sont extraits du filtre grâce à un mélange d'eau peptonée. Le liquide d'extraction est dilué en séries et étendu sur milieu de culture, avant mise à incubation.

2.2. *Choix de la méthode et de la stratégie de prélèvement.*

D'une manière générale, le choix des appareils à utiliser dépend du problème posé, du contexte dans lequel doivent s'effectuer les mesures, du niveau de connaissance préalable de la pollution, et des techniques analytiques qui doivent être appliquées pour traiter les échantillons issus des prélèvements.

Les méthodes de filtration de l'air sont utilisées pour la mesure du niveau d'exposition aux poussières atmosphériques dans un environnement, par pesée directe du filtre de prélèvement. De plus, les poussières collectées peuvent ensuite être extraites du filtre pour différentes analyses (physico-chimique, granulométrique, microbiologique, mycologique...).

Les techniques d'impaction des particules sont réservées à l'étude des micro-organismes contenus dans la poussière en suspension dans l'atmosphère, et en particulier des moisissures, bactéries et actinomycètes.

Pour l'étude des micro-organismes, le choix de la méthode de prélèvement dépend du niveau de pollution supposé de l'atmosphère :

- Pour des prélèvements à l'intérieur, dans un milieu non industriel, où la concentration en micro-organismes dans l'atmosphère n'excède pas $10^6/m^3$, on peut utiliser le capteur à fente, l'impacteur en cascade ou le cyclone.

- Dans des environnements fortement contaminés par la poussière organique, comme le milieu agricole où la concentration en micro-organismes dépasse $10^6/m^3$, les systèmes de prélèvement par impaction sont assez vite surchargés. On peut alors utiliser la méthode modifiée du capteur à fente. Mais on préfère la méthode des filtres en polycarbonate.

Outre le choix de la méthode de prélèvement, le choix d'une stratégie de prélèvement est aussi important. Le prélèvement est fortement dépendant de l'environnement, de la période de l'année, de l'activité au lieu de travail, de l'humidité et de la température ambiante.

Pour l'étude des micro-organismes, la période de prélèvement est un facteur déterminant:

- à l'extérieur, la concentration en micro-organismes varie selon les saisons : les concentrations les plus fortes sont enregistrées à la fin de l'été, quand les champignons sporulent.

- à l'intérieur, la concentration en micro-organismes dépend du travail effectué, qui, en général, est plus intensif pendant l'hiver.

- quand on étudie une maladie, on doit préférer le moment où la concentration en micro-organismes est suspectée être la plus forte. On nomme de telles mesures "prélèvements en cas extrême". Par exemple, dans le milieu agricole, il s'agira du moment où le travailleur manipule du foin, du grain ou de la paille, qui sont des matériaux connus pour dégager de fortes quantités de poussières organiques.

On distingue deux modes de prélèvement :

- le prélèvement en stationnaire : l'appareil qui collecte les poussières est placé sur un poste fixe pendant toute la durée du prélèvement.

- le prélèvement individuel, réalisable avec des appareils associant une pompe miniature autonome positionnée au niveau de la ceinture et un capteur placé au niveau des voies respiratoires supérieures du travailleur.

Dans les méthodes de prélèvement que nous avons citées, seules celles de filtration de l'air proposent de tels appareils portatifs. Cette technique de prélèvement est préférée pour étudier l'exposition de certains travailleurs dont les fonctions impliquent une grande mobilité physique.

La durée du prélèvement varie selon l'appareillage utilisé et la stratégie de prélèvement choisie. En général :

- elle est courte lorsque l'on utilise une méthode de prélèvement par impaction afin d'étudier la composition de l'atmosphère en micro-organismes (de l'ordre de quelques minutes, voire de quelques secondes).

- avec un appareil de prélèvement par filtration, elle varie selon le problème posé et la stratégie de prélèvement adoptée :

 - # elle est longue (plusieurs heures) pour un prélèvement réalisé en stationnaire dans un environnement où l'activité humaine ou animale est faible ou non constante.

 - # elle peut être longue pour un prélèvement individuel, si l'on veut étudier l'exposition d'un travailleur très mobile pendant une journée de travail.

 - # elle est plus courte (plusieurs minutes à une ou deux heures), si l'on étudie l'exposition pendant une activité spécifique susceptible de provoquer le dégagement de fortes quantités de poussières, que ce soit en prélèvement stationnaire ou individuel.

2.3. Etude quantitative des particules prélevées.

2.3.1. La méthode gravimétrique.

Cette méthode permet de quantifier la poussière totale prélevée par un capteur à filtre. Elle est utilisée pour déterminer le niveau d'empoussièrement dans un environnement ou pendant une occupation professionnelle donnée. La quantité de poussière prélevée est déterminée par pesée directe des filtres avant et après prélèvement sur une balance précise à 0,01 mg. Avant chaque pesée, ils ont séjourné un temps déterminé dans un dessiccateur, afin d'en retirer toute trace d'humidité qui fausserait les pesées.

La concentration en poussières dans l'air étudié est alors facilement calculée :

- soit P la masse de poussière prélevée en mg,
- soit T le temps de prélèvement en heures,
- soit D le débit de la pompe aspirant l'air en mètres cubes par heure,

la concentration en poussières dans l'air est (en mg par m³) :

$$C = P/D.T$$

Une analyse granulométrique des particules peut ensuite être réalisée afin de déterminer la fraction respirable de poussières.

2.3.2. Détection et dénombrement des micro-organismes.

L'analyse quantitative des micro-organismes prélevés dans l'air peut être effectuée soit par une méthode de mise en culture et de comptage des colonies, soit par des méthodes utilisant la microscopie.

2.3.2.1. COMPTAGE DES COLONIES APRÈS MISE EN CULTURE.

Cette méthode consiste à mettre à incuber un milieu de cultureensemencé par les micro-organismes atmosphériques. Après incubation, chaque thalle observé provient du développement d'une spore présente au départ. Le nombre de thalles correspond donc au nombre de colonies ou de spores viables qui ont été mises en culture.

Comme nous l'avons déjà vu, certaines techniques de prélèvement des poussières piègent les particules directement sur un milieu de culture contenu dans une boîte de Pétri. Dans ce cas, les boîtes de Pétri revenant du site de prélèvement sont mises à incuber telles quelles.

Si l'on utilise la méthode du capteur à fente modifiée, qui piège les poussières sur un milieu de récolte, il convient, après prélèvement, d'homogénéiser ce milieu, de le diluer si la concentration en micro-organismes est élevée, et d'en ensemercer un milieu de culture approprié.

Quant à la méthode de prélèvement par filtration, elle nécessite l'extraction des poussières du filtre à l'aide d'un liquide diluant et l'ensemencement de milieu de culture avec ce liquide d'extraction après avoir réalisé ou non une série de dilutions. Différents diluants peuvent être employés. Les principaux renferment un agent mouillant tel que le Tween 80. Le plus usuel est l'eau peptonée dont la composition est :

Peptones	1g
Tween 80	1g
Eau	1000 mL

Quand des dilutions sont nécessaires, elles sont réalisées de raison 10, immédiatement après la mise en suspension et l'homogénéisation.

- Répartition des milieux et ensemencement.

Les milieux de culture sont en général coulés en boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, à raison de 15 mL par boîte. L'ensemencement se fait en surface, par étalement du liquide contenant les micro-organismes sur le milieu gélosé refroidi.

- Mise en incubation.

Les boîtes de Pétriensemencées sont mises à incuber. La température et la durée d'incubation varient selon les auteurs et ce que l'on veut isoler. Certains auteurs comme Blomquist *et al.* (1984) ou Smid *et al.* (1989) préconisent une incubation entre 20 et 24°C pendant 4 jours; d'autres comme Palmgren *et al.* (1986) ou Karlsson et Malmberg (1989) préfèrent soit la même température pendant 7 jours, soit une température élevée pendant 4 jours :

45°C pour le développement des moisissures,

55°C pour les actinomycètes et les autres bactéries.

- Composition des milieux de culture.

Les milieux de culture utilisés varient selon les études et les micro-organismes que l'on veut isoler. On distingue:

i) les milieux de routine, peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de micro-organismes. Parmi eux, on rencontre souvent :

le milieu de Mossel, milieu gélosé glucosé à l'extrait de levures, dont l'acidité le rend inhibiteur à l'égard des bactéries.

le milieu malté, à base d'extrait de malt, d'agar et d'eau.

le milieu de Sabouraud, composé de glucose, peptone, agar et eau.

ii) les milieux sélectifs, adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces en particulier :

les milieux anti-bactériens : l'addition d'antibiotiques aux milieux de culture est réalisée pour empêcher le développement des bactéries indésirables dans les isollements de moisissures. Les antibiotiques les plus utilisés sont la gentamicine et le chloramphénicol en raison de leurs larges spectres d'action et de leur stabilité (ils peuvent être stérilisés avec le milieu). Sont aussi utilisés : la pénicilline, la streptomycine, l'auréomycine.

les milieux anti-fongiques : on peut privilégier la croissance des bactéries et actinomycètes au détriment des moisissures par addition d'actidione au milieu de culture. L'addition de rose bengale ralentit la croissance des champignons exubérants comme les *Mucor* et les *Rhizopus*, et inhibe certaines autres moisissures.

les milieux différentiels sont utilisés pour repiquer des souches en vue de différencier deux espèces voisines ou pour identifier des genres difficilement reconnaissables avec un milieu ordinaire.

- Le dénombrement.

Après incubation, les colonies développées dans les boîtes de Pétri sont comptées. Pour une boîte de 9 cm de diamètre, 50 colonies paraît le nombre limite en raison d'une compétition entre moisissures qui se manifeste au-delà. Les résultats sont exprimés en u. f. c. (unités formant colonie). Compte-tenu de la dilution et du volume d'air aspiré pendant le prélèvement, on peut définir la concentration en micro-organismes dans l'air en u. f. c./m³.

2.3.2.2. COMPTAGE DIRECT DES SPORES GRÂCE À LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE.

Cette technique peut être appliquée après des prélèvements utilisant la méthode du filtre Nucleopore. Des petits fragments de la surface du filtre revenant du site de prélèvement sont découpés et placés sous l'objectif (1000x à 6000x selon les études) d'un microscope électronique à balayage. Le comptage des particules est réalisé sur plusieurs champs microscopiques. Plusieurs parties de la surface du filtre sont ainsi analysées.

Le comptage inclut : les spores individuelles, les spores en agrégats et les autres particules contenant des micro-organismes et appelées "unités contenant spores" (u.c.s.). D'après le volume d'air aspiré pendant le prélèvement, on peut calculer la concentration en particules micro-organiques dans l'environnement étudié. Les résultats sont exprimés en nombre de particules ou en nombres de spores par m³ d'air.

Cette méthode permet aussi :

- de déterminer la taille des particules et donc la fraction de particules ou de spores respirables (taille inférieure à 5 µm).

- une classification partielle des micro-organismes dans la poussière totale :

- # les proportions en actinomycètes et en spores fongiques sont établies grâce à des critères morphologiques.

- # certains types de spores sont identifiables d'après leur apparence morphologique, notamment les spores du groupe *Aspergillus glaucus*.

2.3.2.3. COMPTAGE DES SPORES GRÂCE À LA MICROSCOPIE FLUORESCENTE.

Cette méthode est utilisée le plus souvent sur des prélèvements par filtre Nucleopore. Elle nécessite une certaine préparation. Les poussières prélevées sont d'abord extraites des filtres grâce à un mélange d'eau peptonée, comme avant la mise en culture. Puis, on ajoute à cette suspension du formaldéhyde pour fixer les spores, et de l'orange acridine pour les

colorer. La suspension est alors passée à travers un filtre en polycarbonate coloré en noir, qui est séché à l'air libre puis monté sous l'objectif (100x) d'un microscope à épifluorescence. Les micro-organismes, apparaissant colorés en jaune fluorescent, sont comptés sur plusieurs champs microscopiques et peuvent aussi être classés selon leur taille si l'on adapte un micromètre à l'objectif.

Comme avec la méthode précédente, le comptage regroupe les spores isolées et celles en agrégats ou contenues dans des unités particulières. La taille des particules et la forme des spores individuelles peuvent aussi être déterminées. Bien que de nombreuses spores aient une apparence caractéristique, l'identification n'est possible que dans un certain degré à l'aide des critères morphologiques.

2.3.3. Comparaison des méthodes de comptage.

Plusieurs études ont été réalisées afin de comparer les différentes méthodes de comptage des micro-organismes sur des filtres de prélèvement provenant d'environnements agricoles (Palmgren *et al.* (1986), Karlsson et Malmberg (1989), Eduard *et al.* (1990)). Selon toutes les études, la méthode de comptage des colonies après mise en culture des poussières extraites sous-estime le nombre total de micro-organismes, et en particulier la proportion en actinomycètes, alors que les deux méthodes utilisant la microscopie donnent des résultats similaires.

En moyenne, le nombre total d' u.f.c. correspond au 1/6 du nombre total de micro-organismes comptés avec les méthodes microscopiques, mais la variabilité individuelle est grande. De toute manière, le nombre d' u.f.c. reflète le nombre d'unités contenant des spores et non le nombre réel de micro-organismes isolés. Le pourcentage d'actinomycètes est d'environ 10% avec la méthode de comptage en u.f.c. contre 50 % avec les méthodes microscopiques. Ceci est en partie expliqué par le phénomène de l'agrégation des spores. En effet, selon une étude de Karlsson et Malmberg (1989), il y a une moyenne de trois spores par unité contenant spores (u.c.s.) avec la méthode de la microscopie fluorescente mais la variation est grande. Le pourcentage de spores individuelles varie de 2 à 65 % et environ 93 % des spores sont isolées ou en agrégats de moins de 10 µm de diamètre. La tendance des spores à se rassembler en agrégats est plus prononcée pour les actinomycètes et lorsque le nombre total de spores est élevé. Ceci explique en partie la différence entre le comptage en u.f.c. et le comptage direct des spores sous microscope, mais la grande variabilité laisse présumer d'autres explications telles que :

- une perte de viabilité des spores les empêchant de former des colonies,
- une croissance lente des actinomycètes,
- une compétition entre moisissures lorsqu'elles sont nombreuses,
- des conditions de cultures inadéquates.

Mais n'oublions pas que la fraction viable de micro-organismes (représentée par le nombre d' u.f.c.) peut varier considérablement, dans un même environnement, en fonction de la source de micro-organismes aéroportés, qui peut subir des changements tout au long de la journée, selon la ventilation, la température, l'humidité, l'activité des animaux ou des travailleurs durant le prélèvement...

Les méthodes microscopiques permettent une classification partielle des spores fongiques d'après leur taille et leurs caractères morphologiques, mais ne suffisent pas pour identifier de manière précise tous les micro-organismes. La méthode du microscope épifluorescent ne distingue pas les actinomycètes des autres bactéries, et le microscope électronique à balayage ne détecte pas les bactéries autres que les actinomycètes. Sont comptées comme actinomycètes et autres bactéries toutes les spores de taille inférieure à 1,5 µm.

Le choix de la méthode d'analyse d'un prélèvement de poussières en suspension dans l'air dépend de l'information que l'on recherche et de l'environnement étudié. Les informations provenant de différentes méthodes peuvent être combinées.

Une classification détaillée des micro-organismes en suspension dans l'air ne peut être obtenue que grâce à la mise en culture et à l'étude des colonies, comme nous le verrons plus loin. Par contre, pour une étude précise du nombre total de micro-organismes, il est préférable d'utiliser une méthode de comptage sous microscope.

La méthode de la microscopie fluorescente convient le mieux lorsque les micro-organismes sont en faible proportion, dans un prélèvement, par rapport au nombre de particules non organiques qui rendent le comptage des spores difficile lorsque celles-ci ne sont pas colorées.

2.4. Identification des moisissures.

Comme nous venons de le voir, les méthodes d'observation directe du prélèvement au microscope permettent une identification partielle des spores, mais ne suffisent pas pour une analyse qualitative précise de l'atmosphère. C'est la méthode des cultures en boîtes de Pétri qui permet l'identification la plus précise des micro-organismes prélevés dans l'air. Cette identification

est basée sur les caractères morphologiques à la fois macroscopiques des colonies observées dans la boîte de Pétri et microscopiques des fructifications du champignon observées au microscope.

2.4.1. Etude des champignons en culture.

Cette analyse est basée sur les caractères morphologiques des colonies en culture observées à l'oeil nu et à la loupe.

- La couleur : elle est due à la pigmentation soit du mycélium, soit des spores ou des deux à la fois.

- L'aspect du thalle : les colonies peuvent être plates, bombées, sèches, humides, à surface lisse ou plissée...Elles peuvent être duveteuses, veloutées, laineuses, floconneuses, feutrées, poudreuses...

- La vitesse de croissance : les colonies sont plus ou moins extensives en un temps donné.

- Le contour : régulier ou irrégulièrement lobé.

- L'odeur : plus ou moins prononcée, ou inexistante.

- Le pigment : diffusible dans le milieu ou limité au revers de la colonie.

2.4.2. Etude microscopique sur lame.

L'analyse microscopique des moisissures nécessite le montage de préparations microscopiques, parfois une coloration du matériel à examiner, l'étude détaillée de la morphologie et, quelquefois, des mesures micrométriques.

2.4.2.1. PRÉPARATION DES LAMES.

Le choix du site de prélèvement de l'échantillon sur le thalle est déterminant pour la réalisation d'une bonne préparation. Cultivés en boîtes de Pétri, les champignons présentent tous les stades de leur développement, du mycélium juvénile à la marge aux structures les plus différenciées au centre. L'âge du matériel fongique à étudier est aussi important : dans une structure trop jeune, les appareils sporifères font défaut ; avec un thalle âgé, les structures fugaces ou fragiles ne sont plus observables.

Contrairement aux bactéries, l'étude des moisissures ne nécessite pas la réalisation de frottis colorés observables dans l'huile à immersion. Le matériel fongique est observé en milieu liquide, entre lame et lamelle. L'eau convient bien au montage des préparations, avec cependant l'inconvénient de provoquer un gonflement des structures, de retenir facilement les bulles d'air et de s'évaporer rapidement. Le lactophénol donne de meilleurs résultats. Prélevé superficiellement dans la culture, l'échantillon à observer est placé sur une lame, dans une goutte de liquide de

montage, puis recouvert d'une lamelle.

2.4.2.2. COLORATION.

Le plus souvent, l'observation microscopique des moisissures ne requiert aucune coloration. Cependant, une goutte de colorant mélangée au liquide de montage peut améliorer la qualité du contraste ou mettre en relief certains détails de la structure (ornementations des spores, cloisonnement des hyphes...). Les colorants les plus utilisés sont le Bleu coton et la Lactofuschine.

2.4.2.3. OBSERVATION.

Elle est réalisée successivement aux différents grossissements du microscope, jusqu'à l'immersion. Les bulles d'air indésirables peuvent être éliminées par chauffage ménagé de la préparation sur la flamme. Des mesures des différentes structures observées peuvent être réalisées avec un micromètre oculaire.

2.4.2.4. IDENTIFICATION.

Elle est basée sur la morphologie des spores et des structures observées.

- La taille des spores : entre 2 et 80 μm .
- La pigmentation : spores hyalines ou colorées (brunes, noires, vertes, ocre...).
- La forme des spores : symétrique ou asymétrique, arrondie ou allongée, hélicoïdale, anguleuse, en fuseau, droite ou courbe...
- Structure des spores : absence ou présence d'une ou de plusieurs cloisons transversales, longitudinales ou obliques.
- Ornementations : membrane sporale lisse, finement ou grossièrement ornementée (présence de stries, échinules, verrues, granules, crêtes...).
- Pore germinale : zone ronde ou allongée, plus claire, visible surtout dans les spores colorées, à paroi épaisse.
- Mode d'insertion des spores : directement attachées sur le mycélium ou sur des appareils sporifères à accroissement défini, dressés perpendiculairement au plan où s'étend le mycélium ; simples ou ramifiés, ou enfermées dans des organes reproducteurs différenciés.
- Etude microscopique du mycélium : absence ou présence de cloisons, couleur, ornementation des parois, largeur, mode de ramification, différenciation des thallospores.
- Nature des organes différenciés : zygosporangies, apothécies, périthèces, chlamydospores, sclérotas, conidiophores...

- Etude des organes différenciés et de leur contenu : forme, couleur, dimensions, texture des parois, ornementsations...

3. ROLE CLINIQUE DES AEROCONTAMINANTS DU MILIEU AGRICOLE DANS LA PATHOLOGIE RESPIRATOIRE.

3.1. Rôle de l'intensité et de l'ancienneté de l'exposition aux aérocontaminants dans la bronchite.

3.1.1. Les enquêtes épidémiologiques.

En 1983, le rapport de l'O.M.S. portant sur les niveaux d'exposition aux poussières végétales, a montré que l'incidence des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (B.P.C.O.) chez les agriculteurs était directement reliée à l'ancienneté et à l'intensité du contact particulaire respiratoire.

Depuis lors, de plus en plus d'études tentent de démontrer que la manipulation de foin ou de céréales, et donc l'exposition aux poussières végétales, est un facteur de risque dans le développement d'une broncho-pneumopathie obstructive.

Certaines d'entre elles, basées sur les symptômes cliniques, confirment la prévalence de la symptomatologie chronique (toux, expectoration, dyspnée) chez les manutentionnaires agricoles. Ainsi, Dopico *et al.* (1984) décrivent 49 % de bronchiteux chroniques chez les manutentionnaires de céréales contre 18 % dans un groupe témoin. Dosman *et al.* (1980), qui étudient 90 travailleurs dans l'industrie céréalière, non fumeurs, trouve 23 % de bronchite chronique contre 3,3 % dans le groupe témoin non fumeur.

D'autres études sont effectuées dans le milieu fourrager, c'est à dire dans les exploitations agricoles où le type d'activité est proche de l'activité principale de la Haute-Vienne, l'élevage. Ainsi, Babott *et al.* (1980) comparent les éleveurs de vaches laitières du Vermont (U.S.A.) avec des employés d'industrie du même état. Il observe une différence significative entre ces deux populations pour la dyspnée et la bronchite chronique : 25 % de bronchite chronique chez les fermiers contre 17 % chez les employés d'industrie.

Plus récemment Terho (1988), en Finlande, confirme la prédominance de la bronchite chronique dans les exploitations où les céréales et le foin sont manipulés manuellement y compris pour l'alimentation des animaux.

En France, Pariente *et al.* (1979) comparent une population de 1900 salariés agricoles

avec un groupe témoin (salariés de la S.N.C.F.) et mettent en évidence un taux d'insuffisance respiratoire quatre fois plus faible parmi les cheminots.

Plus récemment, Dalphin *et al.* (1989) comparent un groupe de 250 éleveurs de bovins à un groupe contrôle (ouvriers administratifs) : dans le groupe des actifs agricoles, 12 % présentent une symptomatologie de bronchite chronique contre 6 % dans le groupe témoin. La différence est encore plus significative pour les sous-groupes : âge supérieur à 40 ans et non-fumeurs. Parmi les non-fumeurs, le risque d'avoir une bronchite chronique est 7 fois plus important chez les agriculteurs que dans la population témoin. Les auteurs concluent à une responsabilité du travail agricole dans le développement de cette pathologie bronchique.

De même, Milosevic (1986) met en évidence un pourcentage de bronchite chronique plus important chez les éleveurs de bétail non fumeurs (28 %) que parmi les autres catégories professionnelles non tabagiques : artisans 9 %, conducteurs d'engins 10,7 %.

D'autres enquêtes, basées sur l'étude spirométrique, complètent l'orientation clinique. Ainsi, Yach *et al.* (1985) décrivent une diminution significative du V.E.M.S. (volume expiratoire maximal seconde) et du D.E.M.₂₅₋₇₅ (débit expiratoire maximal moyen) dans la semaine de travail parmi les manutentionnaires de céréales sud-africains. Babott *et al.* (1980), aux U.S.A., constatent un risque deux fois plus élevé de syndrome obstructif (Tiffeneau (c'est à dire rapport V.E.M.S. sur capacité vitale) inférieur à 70 % de la théorie) dans un groupe d'éleveurs de vaches laitières non fumeurs (14 %) que dans un groupe témoin (7 %).

Dans le travail de Terho *et al.* (1987) en Finlande, une étude compare des éleveurs de bétail non-fumeurs, sans antécédents respiratoires, à une population de référence travaillant dans le milieu urbain avec les mêmes critères d'inclusion. Les résultats mettent en évidence des valeurs moyennes pour le Tiffeneau et le D.E.M.₂₅₋₇₅ inférieures pour les agriculteurs.

Dalphin *et al.* (1989) mettent en évidence une baisse significative de tous les paramètres ventilatoires dans la population globale agricole. Une étude plus précise du D.E.M.₂₅₋₇₅ met en évidence une baisse de ce paramètre significative dans la population d'âge supérieur à 40 ans par rapport à un groupe témoin. Pour l'auteur, ceci reflète le lien unissant l'âge et la durée de travail, donc du temps d'exposition.

Heller *et al.* (1986) retrouvent une baisse significative du V.E.M.S. et du D.E.M.₂₅₋₇₅ pour les éleveurs de vaches laitières et les manutentionnaires céréaliers par rapport à des sujets témoins.

Une relation dose-effet entre la concentration en poussières de céréales et la vitesse de

décroissance du débit de pointe (V.E.M.S.) a été mise en évidence par Enarson *et al.* (1985). Un taux d'empoussiérement supérieur ou égal à 5 mg/m³ serait responsable d'une modification significative du V.E.M.S..

Des études de Heederik *et al.* (1991) et de Smid *et al.* (1992) ont mis en évidence une corrélation significative entre les niveaux d'exposition aux poussières de céréales, aux endotoxines et à l'ammoniaque, et le développement d'une altération des petites voies aériennes supérieures.

En conclusion, l'exposition professionnelle à la poussière de céréales et de foin augmenterait la prévalence des symptômes respiratoires chroniques et abaisserait les valeurs spirométriques.

3.1.2. Physiopathologie.

Par quels mécanismes la poussière de céréales ou de foin est-elle responsable de la symptomatologie respiratoire de la bronchite chronique ?

Dosman *et al.* (1980) rappellent la composition de ce matériel : son analyse révèle 65 % de substances organiques et 35% de substances inorganiques. On y retrouve des particules de grains de céréales, des insectes, des pollens, des micro-organismes bactériens, fongiques ou parasitaires et leurs toxines, des substances chimiques et des particules de silice. La distribution des tailles de ces particules est d'environ :

- 60% de particules de diamètre aérodynamique supérieur ou égal à 5 µm,
- 40% de particules de diamètre aérodynamique inférieur à 5 µm, donc susceptibles de pénétrer au niveau des petites voies aériennes et des alvéoles, et de provoquer une obstruction périphérique.

Chez les sujets symptomatiques, on retrouve une inflammation diffuse des voies aériennes, une hyper-réactivité bronchique non spécifique et une hypersécrétion.

Les mécanismes physiopathologiques de la bronchite chronique obstructive agricole ne sont pas clairement élucidés. Pour la plupart des études, elle s'expliquerait par des phénomènes inflammatoires récidivants ou chroniques au niveau des espaces aériens terminaux. Il a été en effet démontré par des expérimentations animales, puis chez l'homme, que l'inhalation de certaines particules végétales (avoine, sorgho...) et surtout de toxines bactériennes ou fongiques, s'accompagnait d'un afflux de cellules inflammatoires, et notamment de polynucléaires neutrophiles, au niveau des espaces aériens terminaux.

Bronchoconstriction réflexe	- air froid, charge particulaire, gaz irritants, fumées...
Bronchoconstriction allergique	- acariens (stockage, domestiques) - animaux et protéines animales - spores fongiques (<i>Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium...</i>) - céréales (orge, avoine, soja, ricin...)
Bronchoconstriction inflammatoire	- toxines bactériennes et fongiques - poussières de céréales, de fourrage
Bronchoconstriction pharmacologique	- anticholinestérases (pesticides : organophosphorés, carbamates)

Tableau V :
Mécanismes physiopathogéniques impliqués
dans l'asthme en milieu agricole.
(D'après Dalphin, 1993).

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Relative rareté des crises aiguës sévères - Fréquence des manifestations asthmatiformes - Fréquence de la polysensibilisation - Rareté de l'allergie pollinique et aux animaux domestiques - Mécanismes plurifactoriels (rôle dominant de phénomènes non immunologiques) |
|---|

Tableau VI :
Particularités de l'asthme en milieu agricole.
(D'après Dalphin, 1993).

3.2. Rôle des aérocontaminants dans les asthmes professionnels agricoles.

3.2.1. Epidémiologie et physiopathologie.

Entre 3 et 8 % des agriculteurs, en fonction des secteurs étudiés, seraient porteurs d'un asthme connu et diagnostiqué par un médecin. Cette fréquence ne serait que très légèrement supérieure à celle rapportée dans la population générale.

En revanche, en fonction des secteurs étudiés, 15 à 40 % des agriculteurs rapportent des épisodes de sibilance, notamment après exposition professionnelle, soit une fréquence beaucoup plus élevée que dans la population générale. Ces symptômes asthmatiformes relèveraient plus de mécanismes inflammatoires (tableau V) que de mécanismes allergiques. L'atopie n'est pas plus fréquente en milieu agricole que dans le reste de la population.

En milieu agricole, on retrouve souvent une polysensibilisation, et paradoxalement, l'allergie aux animaux domestiques et aux graminées est rare ; en revanche, la fréquence de l'allergie aux acariens de stockage, à certaines moisissures et aux squames d'animaux agricoles est documentée.

Une des spécificités de l'asthme en milieu agricole est le caractère multifactoriel de ses mécanismes physiopathogéniques (tableaux V et VI), qui regroupent :

- des mécanismes immunologiques :

réaction allergique de type hypersensibilité immédiate à IgE,

hypersensibilité semi-retardée à IgG et complément,

hypersensibilité retardée à médiation cellulaire (lymphocytes T activés).

- des mécanismes non immunologiques :

histaminolibération et libération de leucotriènes non IgE-dépendantes après inhalation de certaines poussières,

activation du complément,

inhibition enzymatique : par exemple, l'action anticholinestérasique des insecticides organophosphorés.

- des mécanismes réflexes :

phénomènes irritatifs ou toxiques.

Tous ces mécanismes peuvent être imbriqués ; ils sont encore mal connus et les recherches sur le sujet ne cessent d'apporter de nouveaux éléments.

3.2.2. Les pneumallergènes ruraux.

Les pneumallergènes ruraux comprennent essentiellement des allergènes végétaux et des allergènes animaux, mais il faut aussi considérer des substances chimiques.

3.2.2.1. LES ALLERGÈNES VÉGÉTAUX.

Les poussières de céréales.

Il s'agit en général d'allergènes multiples souvent associés. Dans la poussière de céréales, il existe de nombreux facteurs antigéniques : grains, pollens, acariens, moisissures, insectes, actinomycètes thermophiles, bactéries et endotoxines. Parmi les insectes, le charançon du blé (*Sitophilus granarius*, Coléoptères) et *Ephestia kuehniella* (Lépidoptères) sont incriminés pour leur pouvoir allergisant.

Pour les grains de céréales, l'orge est particulièrement allergisant. Les autres céréales (blé, maïs, avoine) sont plus rarement en cause, mais il existe souvent des réactions croisées. L'agriculteur peut être gêné par ces poussières dans de nombreuses circonstances :

- dans le grenier à céréales, lorsque celles-ci sont engrangées depuis longtemps,
- dans la grange, où le foin est stocké,
- pendant les moissons,
- lors de l'alimentation du bétail,
- lors du remplissage et de l'évacuation des silos céréaliers.

Les pollens.

D'après une étude de Blandin et Sabbah (1977), 19% des agriculteurs asthmatiques présentent des tests positifs aux pollens. Par ordre de fréquence, il retrouve d'abord les pollens de graminées, puis de légumineuses, type luzerne et trèfle. La pollinose reste peu fréquente chez les agriculteurs par rapport aux autres catégories professionnelles.

Les aliments du bétail.

On distingue les aliments simples, comportant les plantes fourragères, les légumineuses (trèfle, luzerne), les crucifères (colza), la betterave fourragère, les graminées, les céréales et les tourteaux oléagineux (ricin, soja, colza) ; les aliments composés présentés en granulés, qui associent plusieurs aliments simples, des éléments minéraux, des vitamines et des antibiotiques. Parmi les aliments simples responsables d'allergie respiratoire, on retient essentiellement la farine d'orge, de luzerne, la poudre de soja et les tourteaux oléagineux.

Classes	Genres	Espèces les plus communes
Deutéromycètes	<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i> <i>A. versicolor</i>
	<i>Botrytis</i>	<i>B. cinerea</i> <i>B. allii</i>
	<i>Cladosporium</i>	<i>C. herbarum</i> <i>C. cladosporioides</i> <i>C. sphaerospermum</i>
	<i>Curvularia</i>	<i>C. lunata</i>
	<i>Epicoccum</i>	<i>E. purpurascens</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. lateritium</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. decumbens</i> <i>P. expansum</i> <i>P. glabrum</i> <i>P. italicum</i> <i>P. purpurogenum</i> <i>P. rugulosum</i>
	<i>Stemphylium</i>	<i>S. botryosum</i>
Zygomycètes	<i>Mucor</i>	
	<i>Rhizopus</i>	<i>R. arrhizus</i> <i>R. nigricans</i> <i>R. oryzae</i>

Tableau VII :
Moisissures fréquemment impliquées
dans les phénomènes allergiques. Mallea et Charpin (1986).

Les moisissures.

Il existe en milieu rural une très grande variété de moisissures dont la majorité colonise les poussières de céréales, de foin, de paille... Leur développement est d'autant plus intense que les récoltes sont effectuées par temps humide. L'allergénicité de certaines est reconnue. Le tableau VII indique les moisissures le plus fréquemment responsables d'allergies. Ce sont essentiellement les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Cladosporium*.

Le parasitisme de certaines cultures doit être retenu : *Botrytis* pour l'ail, *Alternaria* pour le colza, *Aspergillus* ou *Verticillium* pour le foin et les céréales.

- *Alternaria* est l'un des principaux genres en cause dans les allergies respiratoires d'origine fongique. Plusieurs allergènes ont été mis en évidence sur *Alternaria alternata* notamment.

- *Aspergillus* est responsable de l'aspergillose bronchopulmonaire allergique ou maladie de Hinson-Pepys. Plusieurs allergènes ont été identifiés, sur *Aspergillus fumigatus* en particulier.

- *Cladosporium* a suscité de nombreux travaux sur la caractérisation de ses allergènes. Seule l'espèce *Cladosporium herbarum*, plus abondante dans les pays nordiques, a été particulièrement étudiée.

- *Penicillium* donne un grand nombre de tests cutanés positifs, mais son rôle clinique dans les allergies respiratoires n'est pas encore bien connu.

- *Mucor* et *Rhizopus* sont des allergènes fongiques importants.

3.2.2.2. LES ALLERGÈNES ANIMAUX.

- Les acariens.

L'habitat rural est propice au développement des acariens. Une étude suédoise de Van Hage-Hamsten *et al.* (1985), sur 440 fermiers, note une prévalence de l'atopie de 15,6%. L'allergie aux acariens de stockage après anamnèse, prick-tests et dosage des IgE spécifiques est de 12%.

Pour Davies *et al.* (1976), *Glyphiphagus destructor* paraît l'allergène le plus important de la poussière de céréales. Le tableau VIII (page suivante) permet de distinguer les familles responsables de manifestations respiratoires selon Bousquet et Vergnenègre (1987).

Nom des acariens	Maison	Céréales
<u>Pyroglyphidae:</u> <i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i> <i>Dermatophagoïdes farinae</i> <i>Euroglyphus longior-manei</i>	++ ++ + à +++	
<u>Glyciphagidae:</u> <i>Lepidoglyphus destructor</i> <i>Glyciphagus domesticus</i>	+ ++	+++ +++
<u>Tyroglyphidae:</u> <i>Acarus siro</i> <i>Acarus farris</i> <i>Tyroglyphus siro, T. longior</i> <i>Tyroglyphus putrescenciae</i>		+++ +++ ++ +++

Tableau VIII :
Répartition et fréquence des acariens de maison et stockage.
(D'après Bousquet et Vergnenègre, 1987).

- Les allergènes des mammifères et volailles.

La plupart des statistiques d'asthme en France montrent la fréquence chez l'agriculteur, de tests positifs aux squames de bovins. Les phanères de chat, de chien, de lapin sont, pour tous les auteurs, plus rarement en cause à la campagne qu'à la ville. Les plumes et les déjections de volailles sont responsables d'allergies respiratoires fréquentes chez les agriculteurs.

3.2.2.3. LES SUBSTANCES CHIMIQUES.

L'utilisation de ces produits s'est considérablement développée dans l'agriculture moderne. Les principaux sont les pesticides (insecticides, fongicides, herbicides), les engrais et les antibiotiques contenus dans les aliments du bétail. Les tableaux II, III et IV (pages 18 et 19) indiquent les principales familles de pesticides potentiellement responsables de manifestations respiratoires. Les organophosphorés et les carbamates peuvent déclencher des crises d'asthme du fait de leur action anticholinestérasique.

Une étude récente de Senthilselvan *et al.* (1992), effectuée sur une population de 1939 agriculteurs canadiens, met en évidence une relation significative entre l'utilisation d'insecticides de type carbamate et une prévalence d'asthme élevée. L'asthme aux organophosphorés est pris en charge au tableau n°11 des maladies professionnelles. Le pyrèthre aussi est allergisant et peut provoquer de l'asthme.

3.3. Rôle des spores de champignons dans la maladie du poumon de fermier.

Reconnue comme maladie professionnelle en milieu agricole depuis 1971, la maladie du "poumon de fermier" est une forme d'alvéolite allergique extrinsèque, due à l'inhalation bronchique chronique de poussières végétales moisies. Le foin est habituellement en cause mais d'autres végétaux peuvent être incriminés (paille, céréales...).

Les antigènes responsables les plus souvent rencontrés sont des actinomycètes thermophiles comme *Micropolyspora faeni* et *Thermoactinomyces vulgaris*. Il s'agit de micro-organismes de petite taille (0,5 à 1 µm de diamètre) se développant de façon préférentielle en milieu humide et à température élevée.

D'autres micro-organismes ont été incriminés, notamment les moisissures telles que *Aspergillus umbrosus*, *Aspergillus fumigatus* ou encore *Candida sp.*

L'aspect quantitatif et le mode d'exposition sont également importants. Plusieurs études aérobiologiques récentes ont permis d'observer, d'une part un lien étroit entre risque d'alvéolite allergique et concentration en micro-organismes, et d'autre part la nécessité d'une exposition

Dénomination	Réservoir antigénique habituel	Antigène
Maladie du poumon de fermier	- Fourrages moisissés - Paille, céréales...	<u>Actinomycètes thermophiles:</u> <i>Micropolyspora faeni</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>Streptomyces sp.</i> <u>Micromycètes :</u> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus umbrosus</i> <u>Bactéries gram négatif :</u> <i>Erwinia herbicola</i>
Maladie des éleveurs d'oiseaux	- Déjections d'oiseaux - Sérum	Protéines aviaires (IgA)
Maladie des fromagers	- Croûtes de fromages	<i>Penicillium casei</i> <i>Acarus siro</i>
Maladie des champignonnistes	- Compost moisissé	<u>Actinomycètes thermophiles:</u> <i>Actinobifida dichotomica</i> <i>Micropolyspora faeni</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <u>Micromycètes :</u> <i>Aspergillus glaucus</i>
Maladie des écorceurs d'érable	- Moisissures d'écorces	<i>Cryptostroma corticale</i>
Maladie des ouvriers du bois	- Poussières de bois exotiques - Sciure ou bois moisissés	<i>Alternaria</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Mucor sp.</i>
Maladie des charançons du blé	- Vieux blé - Farine de blé	<i>Sitophilus granarius</i>
Bagassose	- Résidus fibreux moisissés de canne à sucre	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>Thermoactinomyces sacchari</i>
Suberose	- Poussière de liège	<i>Penicillium frequentans</i>

Tableau IX :
Les principales alvéolites allergiques extrinsèques en milieu agricole.
(D'après Dalphin, 1993).

antigénique pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Ainsi Palmgren *et al.* (1986), en Suède, ont démontré que les attaques aiguës de poumon de fermier apparaissaient à partir d'une concentration en micro-organismes dans l'atmosphère de $10^9 / m^3$. Les symptômes apparaissent l'hiver, particulièrement lorsque l'été précédent a été pluvieux.

L'engrangement d'un fourrage mal séché favorise le développement des micro-organismes. La distribution de ce foin moisi, dégageant une poussière blanchâtre, va entraîner la symptomatologie clinique.

D'autres alvéolites allergiques sont rencontrées en milieu agricole ; elles sont répertoriées dans le tableau IX avec la nature de l'allergène en cause. L'explication physiopathologique d'une alvéolite allergique extrinsèque est complexe et reste encore incomplètement élucidée. Différents mécanismes, immunologiques et non immunologiques peuvent être incriminés et peuvent s'associer.

La théorie première proposée par Pepys applique au poumon une réaction d'hypersensibilité semi-retardée (de type III de Gell et Coombs). A l'appui de cette théorie, la symptomatologie clinique (survenue semi-retardée des symptômes dans les formes aiguës) et la présence d'anticorps précipitants de type IgG dans le sérum.

Mais il existe certainement associée une hypersensibilité retardée à médiation cellulaire (type IV de Gell et Coombs), comme en témoigne la présence de lymphocytes T suppresseurs dans les liquides de lavage alvéolaire.

Différentes études évoquent le rôle d'une hypersensibilité immédiate.

Enfin, les spores contenues dans la poussière de foin moisi peuvent, soit activer la voie alterne du complément, soit provoquer de façon directe au niveau alvéolaire une réaction inflammatoire à polynucléaires neutrophiles.

3.4. Rôle des aérocontaminants dans un syndrome aigu fébrile ou syndrome toxique des poussières organiques.

Il est reconnu que l'exposition massive et inhabituelle à des particules organiques est un facteur déclenchant dans la survenue d'une symptomatologie respiratoire aiguë fébrile survenant quelques heures après.

Dans une étude récente de Rask-Andersen (1989), sur 80 agriculteurs victimes d'un syndrome aigu fébrile, la cause principale, dans 80% des cas, est la manipulation de grains de céréales moisies. Vient ensuite la manipulation de foin moisi. Les agents principalement

responsables seraient des endotoxines libérées par les membranes cellulaires de bactéries Gram négatif ainsi que des moisissures présentes dans la poussière inhalée en grande quantité.

Deux études suédoises de Malmberg *et al.* (1988, 1993) comparent l'exposition aux micro-organismes en suspension dans l'atmosphère pendant la manipulation de foin moisi parmi une population d'agriculteurs sains et une population d'agriculteurs ayant présentés un syndrome aigu fébrile. La concentration moyenne en spores fongiques est environ 100 fois supérieure dans les fermes des sujets malades ($8,4.10^9$ spores/m³ contre $0,1.10^9$ spores/m³). La survenue d'un syndrome aigu fébrile est corrélée à des concentrations en micro-organismes dans l'atmosphère de 10^{10} / m³.

La physiopathologie du syndrome toxique des poussières organiques reste assez floue. Elle ne fait pas intervenir de mécanismes immuno-allergiques, à l'inverse de l'alvéolite allergique. La réaction inflammatoire observée au niveau des voies aériennes serait liée aux propriétés pro-inflammatoires de certaines substances (probablement toxines bactériennes et fongiques).

Différents mécanismes peuvent être impliqués:

- un mécanisme direct par pouvoir chimiotactique sur les polynucléaires neutrophiles et histaminolibération non IgE-dépendante.
- un mécanisme indirect par activation de la voie alterne du complément ou des macrophages alvéolaires.

3.5. Rôle des émanations gazeuses et des pesticides.

3.5.1. Les émanations gazeuses.

Elles sont d'origine et de nature variées en milieu agricole.

- La "maladie des remplisseurs de silos" est secondaire à l'inhalation de dioxyde d'azote, gaz produit par la fermentation de céréales, de plantes fourragères ensilées. Cette production gazeuse atteint un pic dès les 24 heures après le remplissage et diminue progressivement en une dizaine de jours. L'exposition à ce gaz entraîne des signes d'irritation bronchique tels que : toux, dyspnée, fièvre, céphalées. L'évolution peut conduire à la constitution de détresse respiratoire aiguë pouvant être mortelle. Les accidents se produisent quand il y a non respect des mesures de prévention, c'est à dire de ventilation.

- Des symptômes respiratoires non spécifiques peuvent apparaître après exposition à différentes substances présentes dans la plupart des secteurs agricoles. C'est le cas de certains gaz tels que l'hydrogène sulfuré, le gaz carbonique qui résultent de la fermentation du lisier, de

l'ammoniac à forte concentration en milieu d'élevage et en particulier dans les élevages de volailles et de porcs, mais aussi des vapeurs et gaz dégagés par les moteurs thermiques. La panne des systèmes de ventilation peut entraîner une élévation de concentrations gazeuses importante, pouvant être mortelle.

3.5.2. Les pesticides.

Des oedèmes pulmonaires évoluant vers des fibroses gravissimes peuvent être dus à l'inhalation accidentelle de pesticides. Les tableaux II, III et IV (pages 18 et 19) présentent les principaux pesticides utilisés en agriculture.

Parmi les insecticides, les produits les plus souvent mis en cause sont:

- les organochlorés,
- les organophosphorés,
- les carbamates,
- l'hydrogène phosphoré.

Parmi les fongicides, le soufre et ses composés sont irritants au niveau de la muqueuse respiratoire.

Parmi les herbicides, il faut citer particulièrement les ammoniums quaternaires, avec notamment le paraquat, très largement utilisé.

CHAPITRE DEUXIEME
MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, nous décrirons successivement les différents matériels utilisés et les populations étudiées. Puis, nous présenterons les méthodes et les protocoles mis en oeuvre au cours de l'étude, destinés à identifier les aérocontaminants d'origine fongique du milieu agricole.

1. ECHANTILLON DE LA POPULATION.

Comme nous l'avons signalé précédemment, notre travail fait suite à l'étude de Xavier D'Arco (1993) intitulée "Enquête épidémiologique sur les désordres respiratoires chez 1020 actifs agricoles en Haute-Vienne". Nous avons utilisé les résultats de cette enquête, afin de sélectionner un échantillonnage d'exploitations agricoles où réaliser des prélèvements de poussières.

Afin de mettre en relation l'exposition professionnelle aux poussières de foin avec la survenue d'une bronchopneumopathie chronique obstructive et avec la taille de l'exploitation, nous avons sélectionné, parmi les sujets entrant dans l'enquête de D'Arco, 40 personnes réparties en deux groupes :

- un groupe de 20 exploitants agricoles actifs présentant, aux épreuves fonctionnelles respiratoires, un DEM_{25-75} inférieur à 75 % de la théorie ; ces sujets sont atteints d'une bronchopneumopathie chronique obstructive et constituent le "groupe BPCO".
- un "groupe témoin", comprenant 20 exploitants agricoles actifs, présentant un DEM_{25-75} normal.

Chaque groupe est divisé en deux sous-groupes de 10 personnes :

- un sous-groupe de 10 personnes travaillant dans une exploitation de moins de 50 hectares. Ce sous-groupe est nommé "expl. < 50 ha".

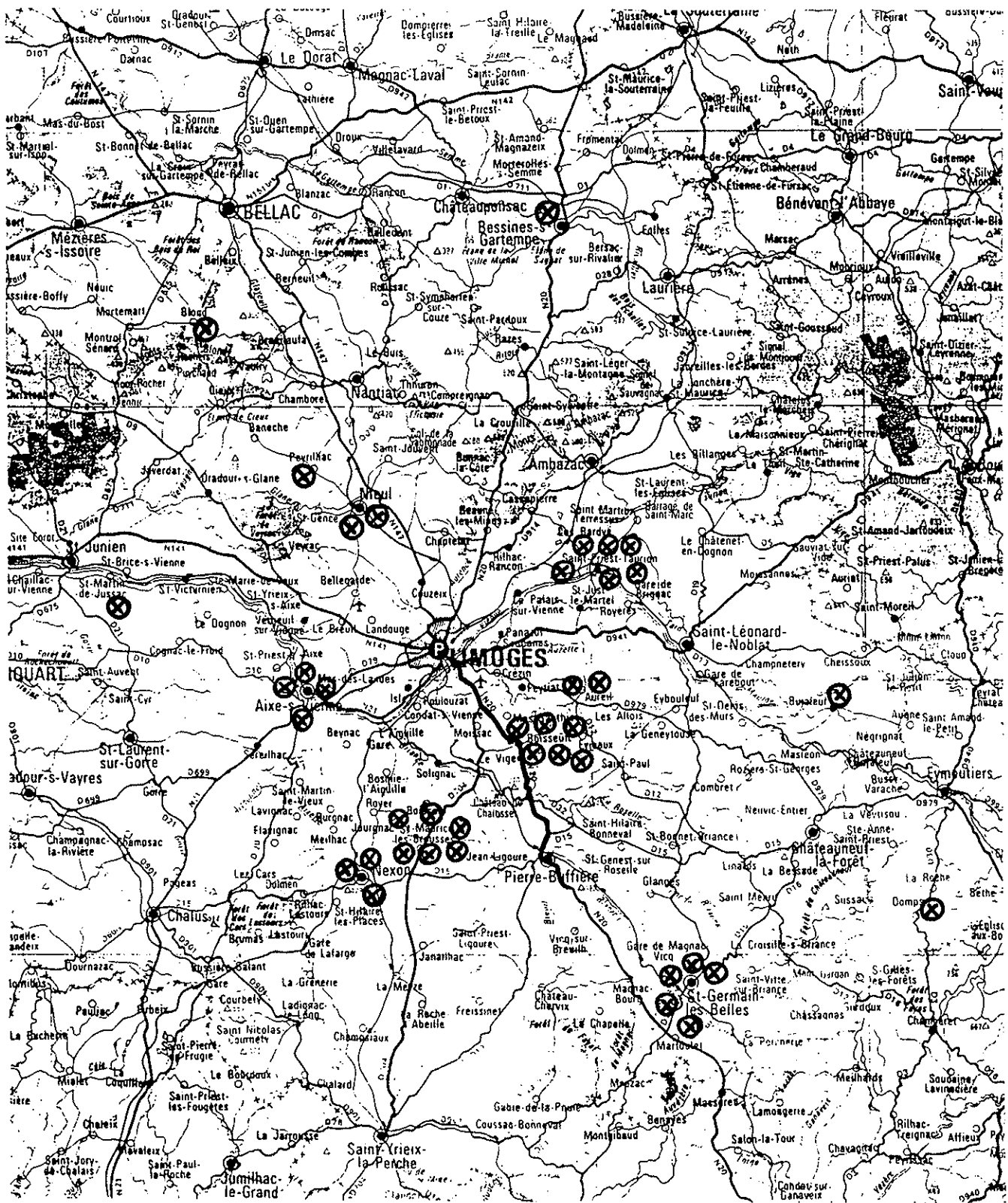


Figure 2 : Localisation des sites de prélèvement.

- un sous-groupe de 10 personnes travaillant dans une exploitation de 50 hectares ou plus.
Ce sous-groupe est nommé "expl. \geq 50 ha".

Les critères communs de sélection des 40 sujets sont les suivants :

- lieu de travail dans une exploitation située en Haute-Vienne dans un rayon de 60 kms autour de Limoges. Les différents sites sont indiqués sur la carte figure 2.
- type d'activité de l'exploitation : élevage et polyculture.
- particularité de l'activité : foin engrangé.
- activité horaire hebdomadaire autour du foin engrangé supérieure ou égale à 7 heures.
- sexe : indifférent.
- âge : entre 40 et 60 ans.
- tabagisme : néant, car, étant un facteur de risque dans la survenue d'une obstruction périphérique, il est un critère confondant important.
- antécédents cardio-respiratoires et pulmonaires : néant, car même ceux n'entraînant pas d'obstruction bronchique peuvent induire des symptômes respiratoires et modifier les épreuves fonctionnelles respiratoires ; ils sont donc aussi un facteur confondant.

2. METHODE ET CONDITIONS DE PRELEVEMENT DES POUSSIÈRES.

2.1. Le capteur de poussières CPM3.

2.1.1. Présentation générale.

Le capteur de poussières CPM3 est un appareil autonome destiné à la mesure pondérale des particules respirables en suspension dans l'atmosphère, c'est à dire susceptibles de pénétrer dans les alvéoles pulmonaires et de s'y déposer, conformément aux plus récentes données médicales.

Il se présente sous la forme d'un cylindre muni d'un pied et surmonté d'une poignée permettant son transport et sa mise en place au lieu de prélèvement. Sa caractéristique essentielle est qu'il reproduit le mécanisme du dépôt des poussières dans les voies respiratoires de l'homme.

Lorsqu'un ouvrier travaille dans une atmosphère poussiéreuse, trois possibilités apparaissent :

- une partie des poussières qu'il respire est arrêtée dans les voies respiratoires supérieures (nez, bouche, trachée, bronches) ;
- une autre partie pénètre dans les alvéoles pulmonaires et s'y dépose ;

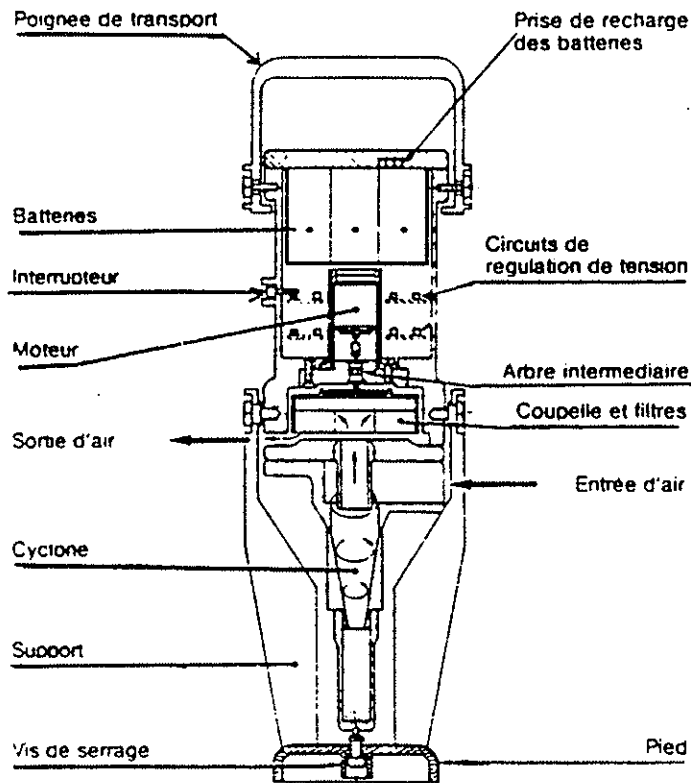


Figure 3 : Schéma du capteur CPM3.

- une troisième partie est rejetée à l'expiration.

L'autonomie de l'appareil est en moyenne de 10 heures et son débit de 3 m³ par heure.

2.1.2. Description.

La figure 3 présente le capteur CPM3.

L'ensemble de l'appareillage comprend le capteur proprement dit et un chargeur. Le capteur comprend :

- une poignée destinée au transport et à la suspension de l'appareil au point de prélèvement.
- un corps cylindrique comprenant :
 - un bloc batterie,
 - un circuit électronique de régulation de tension,
 - un moteur électrique,
 - une coupelle rotative amovible renfermant les filtres en mousse de polyuréthane, destinée à la captation des poussières respirables.

L'élément filtrant comprend :

- un filtre à larges mailles (diamètre des pores de 500 à 600 µm) de 5 mm d'épaisseur, placé au fond de la coupelle.
- un filtre fin (diamètre des pores de 250 µm) de 15 mm d'épaisseur, comportant un orifice central de 20 mm, placé à la partie supérieure.
- un cyclone destiné à la captation des plus grosses particules, non respirables, qui sont collectées dans un godet.
- un pied cylindrique permettant la pose du capteur au point de prélèvement.

2.1.3. Principe de fonctionnement.

*** Aspiration :**

La mise sous tension du moteur a pour effet d'animer la coupelle renfermant les filtres d'un mouvement de rotation. La rotation de l'équipage mobile, à une vitesse de l'ordre de 5000 tours par minute, a pour effet de produire la dépression nécessaire à l'aspiration de l'air, à l'image d'un ventilateur centrifuge.

L'air poussiéreux à analyser :

- est aspiré dans le cyclone par l'orifice d'entrée où il prend un mouvement tourbillonnaire,
- pénètre dans le corps de l'appareil,

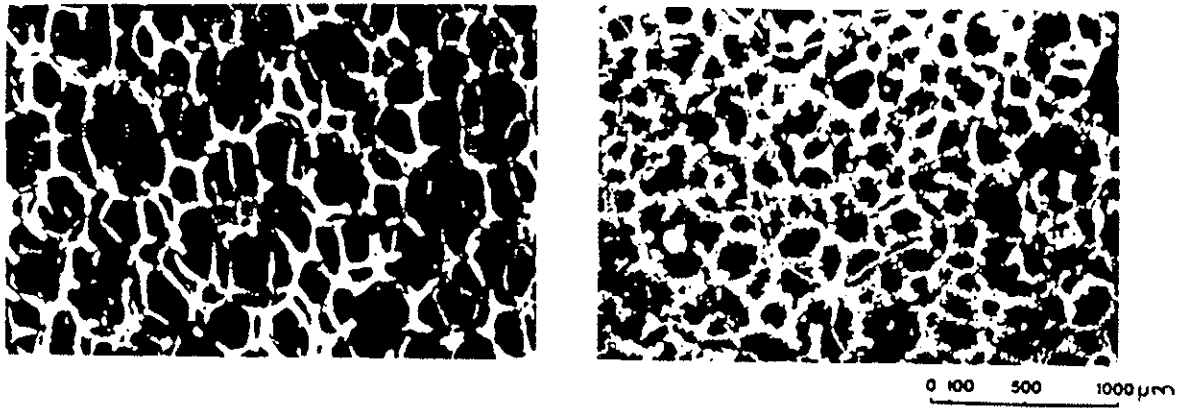


Figure 4 : Vue microscopique du filtre avant et après prélèvement.

- traverse en mouvement radial la coupelle renfermant les filtres,
- ressort à l'atmosphère par l'orifice de sortie d'air.

*** Captation des poussières :**

Les poussières en suspension sont arrêtées de la manière suivante :

- Les plus grosses particules, qui se déposent normalement dans les voies respiratoires supérieures de l'homme, sont retenues par le cyclone et se rassemblent dans le godet inférieur.
- Les particules fines respirables, qui pénètrent normalement dans les alvéoles pulmonaires et s'y déposent, sont captées par les filtres placés dans la coupelle.
- Les plus fines, qui sont normalement rejetées à l'expiration, s'échappent par l'orifice de sortie d'air.

*** Mécanisme de la captation des poussières respirables :**

La mousse de polyuréthane utilisée est du type à cellules ouvertes. Il s'agit d'un matériau poreux constitué d'un grand nombre de fibres reliées les unes aux autres et de faible épaisseur par rapport aux alvéoles qu'elles délimitent. La figure 4 donne une vue de ce filtre placé sous le microscope.

L'air poussiéreux pénétrant dans ce milieu, animé d'un mouvement rotatif rapide perpendiculairement à son écoulement, voit ses particules captées par impact sur les fibres qui se présentent. Chaque fibre, en commençant par les premières rangées, se charge ainsi de poussières. La capacité de rétention des fibres est toutefois limitée. Lorsqu'elles sont recouvertes d'une certaine quantité de poussières, elles ne peuvent plus en absorber. A ce stade, si d'autres particules se présentent, il y a alors surcharge et réentraînement des poussières sous forme d'agglomérats. Ces derniers sont alors captés par les fibres plus profondes non encore saturées et ainsi de suite. A la limite, il y a rejet des particules à l'extérieur.

Il s'ensuit que :

- les pores ou alvéoles restent toujours largement ouverts et il n'y a pas de colmatage ;
- la capacité de rétention du filtre est limitée par la saturation des fibres. Elle est de l'ordre de 1 gramme avant que n'apparaisse tout phénomène de rejet.

2.2. Conditions de prélèvement.

2.2.1. Lieu de prélèvement.

Dans un premier temps, nous avons effectué des prélèvements destinés aux essais préliminaires de mesure pondérale des poussières respirables. Deux séries de prélèvements ont été réalisées : - une première série dans une grange, au milieu du foin, porte fermée, sans activité autour du capteur

- une deuxième série dans une étable, en présence d'animaux.

Dans tous les cas, le capteur est posé ou suspendu à environ 1,70 m du sol.

Puis les prélèvements destinés à l'analyse qualitative et quantitative des particules fongiques sont réalisés dans les 40 exploitations définies précédemment.

Dans chaque exploitation, le prélèvement est effectué dans une grange où du foin est stocké depuis plusieurs mois. Les prélèvements étant effectués durant les mois de mai à septembre 1993, le foin présent dans les granges est toujours celui stocké depuis l'année précédente.

L'appareil est posé ou suspendu à environ 1,70 mètre du sol dans la grange, à proximité du foin.

Dans certaines granges, il peut y avoir présence d'animaux pendant un certain temps du prélèvement, mais ils se trouvent toujours à distance de l'appareil (au moins 5 mètres). Pendant le temps du prélèvement il y a peu d'activité autour de l'appareil. La porte de la grange reste fermée le plus longtemps possible pendant le prélèvement.

2.2.2. Temps de prélèvement.

L'appareil est laissé en place pendant 7 heures. Son débit étant de 3 m³ par heure, 21 m³ d'air sont donc aspirés pendant chaque prélèvement.

3. MESURE PONDERALE DES POUSSIÈRES RESPIRABLES.

Les principes mis en oeuvre par la coupelle tournante font qu'une partie de la poussière prélevée se trouve fixée dans la mousse de polyuréthane, alors qu'une fraction complémentaire se dépose sur les rebords internes de la coupelle. Pour cette raison, les pesées portent sur la coupelle munie de sa mousse et non sur la mousse seule.

Les opérations de pesée des coupelles ont pour objet de donner le poids total des poussières captées durant le prélèvement : elles se font suivant une méthode différentielle utilisant une coupelle témoin.

3.1. Préliminaires à la pesée.

La mousse de polyuréthane étant sensible à la température et au degré hygrométrique de la pièce au moment de la pesée, il convient de mettre les filtres en équilibre hygrométrique avec l'atmosphère du laboratoire. Pour cela, on laisse séjourner chaque coupelle durant un quart d'heure dans l'atmosphère du laboratoire avant la pesée, afin qu'elle s'équilibre avec l'humidité relative et la température de la pièce.

Avant chaque pesée, les coupelles ont séjourné une nuit dans un dessiccateur : la coupelle chargée revenant du site de prélèvement est placée dans le dessiccateur contenant la coupelle témoin, le soir ; elle est donc prête à la pesée le lendemain matin. Nous avons essayé deux types de dessiccateur : l'étuve à 28 °C, et une boîte hermétique contenant du gel de silice.

3.2. Pesée.

Les pesées sont effectuées avant et après prélèvement à l'aide d'une balance de laboratoire à 0,1 mg. Le poids des poussières recueillies par une coupelle est égal à l'augmentation de son poids différentiel par rapport au témoin. L'incertitude absolue sur ce poids est de 1,2 mg.

3.3. Mode opératoire.

*On choisit un filtre de référence : celui ayant le plus faible poids. Ce dernier est destiné à rester dans le dessiccateur et à être pesé en même temps que les filtres de mesure.

*Avant toute pesée, on laisse chaque coupelle pendant 15 minutes dans l'atmosphère du laboratoire afin de réaliser la mise en équilibre thermique et hygrométrique.

*Les coupelles sont pesées rapidement.

*Calcul du poids de poussières prélevées :

- soient P_1 le poids de la coupelle renfermant le filtre de mesure avant prélèvement et P_2 le poids de cette même coupelle après prélèvement,

- soient T_1 le poids de la coupelle témoin avant prélèvement et T_2 le poids de la coupelle témoin après prélèvement.

Le poids de poussières prélevées est :

$$P = (P_2 - P_1) - (T_2 - T_1)$$

4. METHODE D'ETUDE DES SPORES INHALEES.

4.1. *Extraction des poussières respirables.*

Les poussières contenues dans les filtres en mousse de polyuréthane sont récupérées pour l'analyse mycologique ultérieure. Les filtres revenant du site de prélèvement sont placés au fond d'un bécher d'un diamètre légèrement supérieur au leur. Ils sont rincés à l'aide de 20 mL d'eau distillée. Pour cela on procède en deux étapes :

- on verse d'abord la moitié de l'eau distillée dans le bécher, on presse plusieurs fois les filtres à l'aide d'un agitateur en verre. La suspension obtenue est versée dans un tube de centrifugation en maintenant les filtres pressés.

- l'opération est recommencée avec l'eau distillée restante. La suspension obtenue, contenant les poussières extraites, est centrifugée.

Les filtres, après séchage, sont réutilisables.

4.2. *Mise en culture des poussières extraites.*

Un milieu de culture a préalablement été préparé et coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Il s'agit d'une gélose de Sabouraud-chloramphénicol, milieu sélectif adapté à la recherche des moisissures et inhibiteur à l'égard des bactéries.

Le culot de centrifugation obtenu à l'étape précédente est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur et sert à l'ensemencement d'une boîte de Pétri. L'ensemencement est réalisé en surface, par étalement sur le milieu gélosé refroidi. Puis, la boîte de Pétri fermée est mise à incuber à l'étuve à 28°C pendant 6 jours.

4.3. *Comptage et identification des champignons en culture.*

4.3.1. Comptage des colonies.

Après incubation, des colonies se sont développées, chacune correspondant à une spore viable présente dans la suspension étalée sur la gélose. On différencie plusieurs types de colonies selon leurs caractéristiques morphologiques. Pour chaque type, on exprime la quantité en " unités formant colonie " (u.f.c.).

4.3.2. Identification des moisissures.

Une première identification est basée sur les caractères cultureux. Il s'agit d'une observation macroscopique des colonies. Puis une détermination plus précise des moisissures est obtenue par l'observation au microscope de préparations montées sur lames.

***Caractères cultureux.**

Les colonies sont observées à l'oeil nu et leurs caractères morphologiques sont relevés :

- *La vitesse de croissance* : les colonies sont plus ou moins extensives en un temps donné.
- *La couleur* : elle est due à la pigmentation soit du mycélium, soit des spores, soit des deux à la fois.
- *L'aspect* : les colonies peuvent être plates, bombées, sèches, humides, à surface lisse ou plissée...Elles peuvent être duveteuses, veloutées, laineuses, floconneuses, feutrées, poudreuses...
- *Le contour* : il peut être régulier ou irrégulièrement lobé.
- *L'odeur* : elle peut être plus ou moins prononcée ou inexistante.
- *Le pigment* peut être diffusible dans le milieu ou limité au revers de la colonie.

***Analyse microscopique.**

Afin d'affiner l'identification des champignons, il est nécessaire de se référer à leurs caractères microscopiques. Cette observation nécessite le montage de préparations microscopiques.

i) Préparation des lames.

Un échantillon de chaque sorte de colonie est prélevé en vue d'un montage entre lame et lamelle. On choisit de prélever un morceau de thalle situé approximativement à égale distance du centre de la colonie et de sa périphérie, de manière à pouvoir observer les structures les plus différenciées sans qu'elles soient pour autant trop âgées et fragilisées.

L'échantillon, prélevé superficiellement dans la culture, est placé sur une lame dans une goutte de bleu lactique, puis recouvert d'une lamelle. La préparation est légèrement chauffée sur la flamme afin de chasser les bulles d'air indésirables et de fixer le montage. Le champignon est prêt pour l'observation.

ii) Observation microscopique.

L'observation est réalisée successivement aux différents grossissements du microscope, jusqu'à l'immersion. L'identification est basée sur la morphologie des spores et des fructifications observées.

iii) Organisation du champignon.

- *Etude microscopique du mycélium* : absence ou présence de cloisons, couleur, ornementation des parois, largeur, mode de ramification, différenciation des thallospores.

- *Nature des organes différenciés* : zygospores, apothécies, périthèces, chlamydo-spores, sclérotés, conidiophores...

- *Etude des organes différenciés et de leur contenu* : forme, couleur, dimensions, texture des parois, ornementations.

- *Mode d'insertion des spores* : directement attachées sur le mycélium ou sur des appareils sporifères à accroissement défini, dressés perpendiculairement au plan où s'étend le mycélium, simples ou ramifiés ou alors enfermées dans les organes reproducteurs différenciés.

iv) Caractères morphologiques des spores.

- *Taille* : entre 2 et 80 μm .

- *Pigmentation* : spores hyalines ou colorées (brunes, noires, vertes, ocrées...).

- *Forme* : symétrique ou asymétrique, arrondie ou allongée, hélicoïdale, anguleuse, en fuseau, droite ou courbe...

- *Structure* : absence ou présence d'une ou de plusieurs cloisons transversales, longitudinales ou même obliques.

- *Ornementation* : membrane sporale lisse, finement ou grossièrement ornementée (présence de stries, échinules, verrues, granules, crêtes...).

- *Pore germinal* : zone ronde ou allongée plus claire, visible surtout dans les spores colorées, à paroi épaisse.

CHAPITRE TROISIEME

RESULTATS

Nous allons présenter dans ce chapitre les résultats obtenus lors de nos expériences. Une première partie est consacrée aux résultats des essais préliminaires de mesure pondérale des poussières respirables.

Dans une deuxième partie nous allons exposer les résultats concernant l'analyse qualitative et quantitative des particules fongiques prélevées.

Des comparaisons seront effectuées dans les différents groupes de prélèvements.

1. ESSAIS PRÉLIMINAIRES DE MESURE PONDÉRALE DES POUSSIÈRES RESPIRABLES.

Afin d'évaluer la sensibilité et la reproductibilité de la méthode et de l'appareil de prélèvement, plusieurs essais sont réalisés dans une grange et dans une étable. L'objectif est de mesurer la quantité de poussières captées sur les filtres.

Rappelons la formule énoncée dans le chapitre précédent pour le calcul du poids de poussières prélevées :

Soient : - P_1 le poids de la coupelle renfermant le filtre de mesure avant prélèvement,

- P_2 le poids de cette même coupelle après prélèvement,

- T_1 le poids de la coupelle témoin avant prélèvement,

- T_2 le poids de la coupelle témoin après prélèvement,

Le poids de poussières prélevées est :

$$P = (P_2 - P_1) - (T_2 - T_1).$$

1.1. Prélèvements dans une grange.

Une première série de prélèvements a été réalisée dans une grange, au milieu du foin, porte fermée, sans activité autour du capteur.

Plusieurs méthodes de mesure pondérale des poussières ont été essayées :

i) Sans utilisation d'un dessiccateur et sans utilisation de la formule utilisant la coupelle-témoin. Les coupelles contenant les filtres sont pesées avant et après prélèvement. La différence entre les deux pesées donne la quantité de poussières prélevées.

Cinq prélèvements sont effectués dans les mêmes conditions, au même endroit.

On obtient les résultats suivants :

$$P_1 = 5 \text{ mg}$$

$$P_2 = 12 \text{ mg}$$

$$P_3 = 37 \text{ mg}$$

$$P_4 = 1 \text{ mg}$$

$$P_5 = - 61 \text{ mg}$$

ii) Même expérience, mais les filtres sont pesés après avoir passé une nuit à l'étuve à 28°C (avant et après prélèvement).

On obtient 5 autres résultats :

$$P_6 = -2 \text{ mg}$$

$$P_7 = 0 \text{ mg}$$

$$P_8 = 8 \text{ mg}$$

$$P_9 = -1 \text{ mg}$$

$$P_{10} = 0 \text{ mg}$$

iii) L'étuve est remplacée par un dessiccateur contenant un gel de silice.

On utilise la formule avec la coupelle témoin afin de tenir compte de la variation du degré hygrométrique entre les pesées. La coupelle témoin reste au laboratoire dans le dessiccateur.

Cinq mesures sont réalisées dans ces conditions, dont voici les résultats :

$$P_{11} = 7 \text{ mg}$$

$$P_{12} = 1 \text{ mg}$$

$$P_{13} = 0 \text{ mg}$$

$$P_{14} = 3 \text{ mg}$$

$$P_{15} = 1 \text{ mg}$$

Type de moisissure	Nombre de prélèvements où sont identifiées les moisissures	Fréquence d'identification
<i>Aspergillus niger</i>	40	100 %
<i>Aspergillus glaucus</i>	8	20 %
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16	40 %
<i>Aspergillus flavus</i>	3	7,5 %
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	2,5 %
<i>Penicillium sp.</i>	2	5 %
Mucorales	25	62,5 %
<i>Fusarium sp.</i>	2	5 %

TABLEAU X :
Fréquence d'identification des différentes colonies
dans les prélèvements de poussière.

1.2. Prélèvements dans une étable.

Une deuxième série de prélèvements, dans une étable, en présence d'animaux, donc d'activité autour du capteur, est réalisée. On utilise le dessiccateur à gel de silice et la formule avec coupelle témoin.

On obtient cinq autres résultats :

$$P_{16} = 1 \text{ mg}$$

$$P_{17} = 0 \text{ mg}$$

$$P_{18} = 2 \text{ mg}$$

$$P_{19} = 0 \text{ mg}$$

$$P_{20} = 1 \text{ mg}$$

On constate globalement la fiabilité limitée de cette méthode, qui a fourni dans certains cas des résultats négatifs. La nature irrégulièrement adsorbante du support en mousse dépend de manière trop sensible de l'humidité relative ambiante. Ces résultats ne sont pas exploitables.

2. ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES PARTICULES FONGIQUES.

Les résultats exposés ici concernent l'analyse des 40 prélèvements effectués dans les 40 exploitations et dans les conditions définies dans le chapitre précédent.

2.1. Analyse qualitative des moisissures.

Les moisissures qui se sont développées en culture appartiennent aux Mucorales et aux Deutéromycètes.

L'identification des colonies, après six jours d'incubation, a permis de distinguer différentes espèces. Parfois l'identification s'arrête au genre. Nous avons pu identifier :

Aspergillus niger

Penicillium sp.

Aspergillus glaucus

Fusarium sp.

Aspergillus fumigatus

Rhizopus sp

Aspergillus flavus

Absidia sp., notamment *A. corymbifera*

Aspergillus versicolor

Mucor sp.

Le tableau X présente la fréquence d'identification des différents types de colonies dans les 40 prélèvements de poussières.

Type de moisissure	Nombre de prélèvements où ont été identifiées les moisissures		
	Exploitations inférieures à 50 ha	Exploitations supérieures ou égales à 50 ha	Total
<i>Aspergillus niger</i>	20	20	40
<i>Aspergillus glaucus</i>	7	1	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	9	16
<i>Aspergillus flavus</i>	2	1	3
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0	1
<i>Penicillium sp.</i>	2	0	2
Mucorales	13	12	25
<i>Fusarium sp.</i>	0	2	2

TABLEAU XI :
Fréquence d'identification des colonies
selon la taille de l'exploitation.

Type de moisissure	Nombre de prélèvements où ont été identifiées les moisissures.		
	Groupe témoin	Groupe BPCO	Total
<i>Aspergillus niger</i>	20	20	40
<i>Aspergillus glaucus</i>	5	3	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	11	16
<i>Aspergillus flavus</i>	2	1	3
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0	1
<i>Penicillium sp.</i>	2	0	2
Mucorales	9	16	25
<i>Fusarium sp.</i>	2	0	2

TABLEAU XII :

Fréquence d'identification des colonies selon l'état de santé respiratoire.

Le groupe BPCO comprend les personnes atteintes de bronchopneumopathie chronique obstructive. Elles présentent aux épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) un DEM_{25-75} inférieur à 75 % de la théorie.

Le groupe témoin présente aux EFR un DEM_{25-75} normal (supérieur ou égal à 75 %).

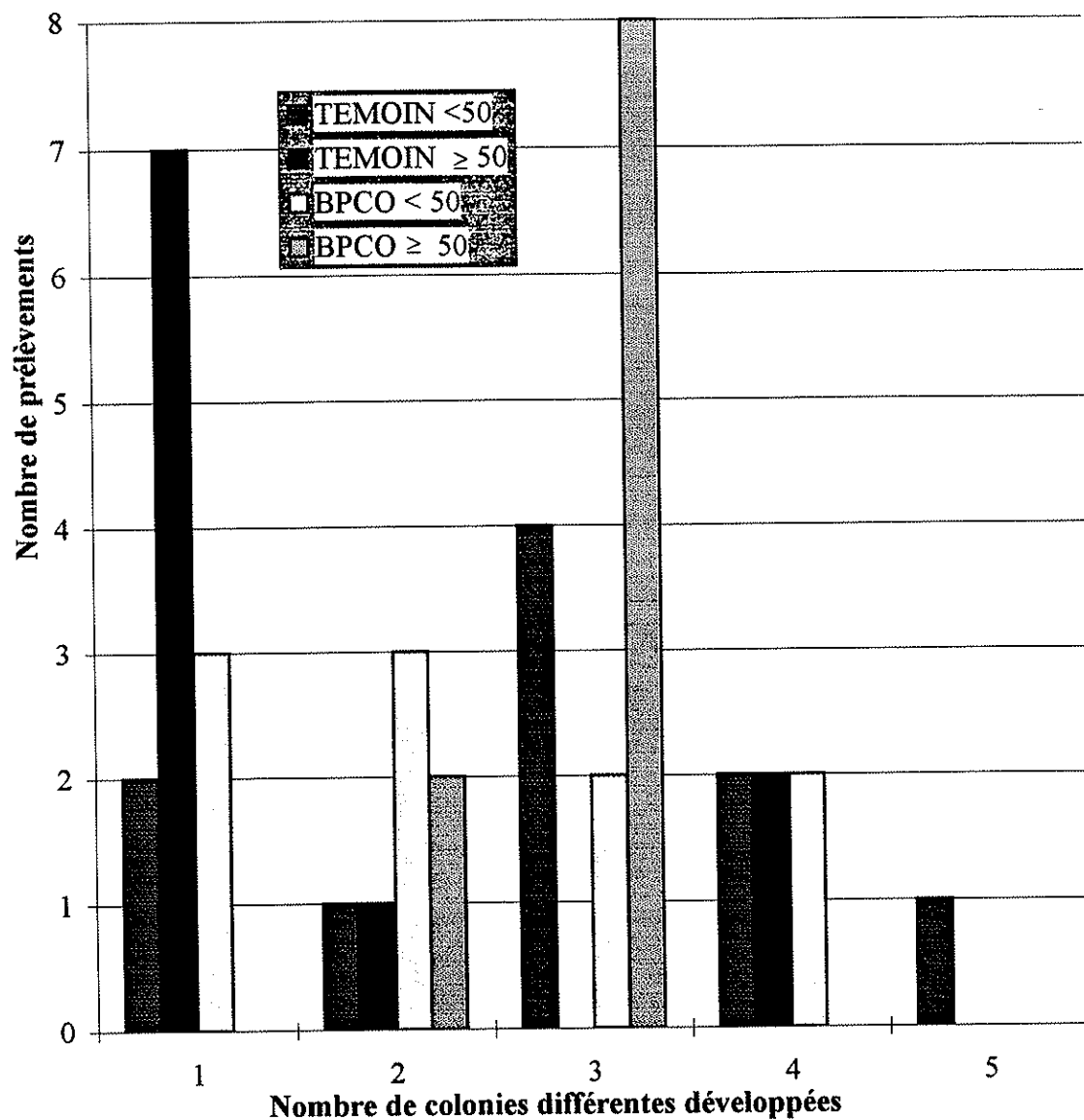


Figure 5 : Répartition des différents groupes de prélèvements selon le nombre de colonies différentes développées.

Groupe T<50 : Prélèvements effectués dans une exploitation < 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.

Groupe T ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.

Groupe BPCO<50 : Prélèvements effectués dans une exploitation <50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

Groupe BPCO ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

On remarque la forte présence du genre *Aspergillus*, dont 5 espèces sont représentées, avec l'omniprésence d'*A. niger*, identifié dans tous les prélèvements. *A. fumigatus* est retrouvé dans 40 % des prélèvements. Les autres espèces d'*Aspergillus* (*A. glaucus*, *A. flavus*, *A. versicolor*) sont moins souvent identifiées.

Les Mucorales, représentées par différentes espèces de *Mucor*, *Absidia* et *Rhizopus*, sont aussi souvent présentes (62,5 % des prélèvements). Il s'agit de colonies très envahissantes qui rendent difficile l'identification d'autres espèces.

Les *Penicillium* et *Fusarium* sont peu représentés. Chacun des deux genres a été identifié dans seulement deux prélèvements.

2.1.1. Comparaison des fréquences d'identification des moisissures en fonction de la taille des exploitations.

Les fréquences d'identification des espèces de moisissures en fonction de la taille de l'exploitation agricole sont présentées dans le tableau XI.

On remarque peu de différences entre les valeurs hormis pour *A. glaucus*, identifié dans 7 prélèvements provenant d'exploitations inférieures à 50 hectares, contre seulement 1 prélèvement provenant d'une exploitation supérieure à 50 hectares.

2.1.2. Comparaison des fréquences d'identification des moisissures en fonction de l'état de santé respiratoire des sujets travaillant dans les exploitations étudiées.

Les résultats de ces comparaisons sont présentés dans le tableau XII.

On retrouve environ deux fois plus souvent *A. fumigatus* et les Mucorales dans les prélèvements correspondant au groupe des sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (groupe BPCO) que dans les prélèvements provenant du groupe de sujets sains (groupe témoin).

2.1.3. Infestation unique ou polyinfestation ?

La figure 5 présente la répartition des différents groupes de prélèvements selon le nombre de sortes différentes de colonies développées.

On remarque que dans la majorité des prélèvements on observe de un à trois types de colonies. On trouve plus de 4 types de colonies différentes dans seulement 7 prélèvements, dont 5 proviennent d'une exploitation inférieure à 50 hectares.

On remarque que sur les 12 prélèvements où l'on a retrouvé une seule espèce de

Nombre total d'u.f.c.	Nombre de prélèvements				
	T<50	T≥50	BPCO<50	BPCO≥50	Total
20 à 59	3	8	4	2	17
60 à 89	2	0	3	5	10
100 ou plus	5	2	3	3	13

TABLEAU XIII :

Répartition des différents groupes de prélèvements selon la quantité d'unités formant colonies (u.f.c.) développées.

Groupe T<50 : Prélèvements effectués dans une exploitation inférieure à 50 ha, lieu de travail de sujets sains appartenant au groupe témoin.

Groupe T≥50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 ha, lieu de travail de sujets sains appartenant au groupe témoin.

Groupe BPCO<50 : Prélèvements effectués dans une exploitation inférieure à 50 ha, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

Groupe BPCO≥50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 ha, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

champignon, 9 ont été réalisés dans le groupe témoin. De même, sur les 14 prélèvements où l'on a identifié 3 types différents de colonies, 10 font partie du groupe BPCO. Donc, dans la moitié des prélèvements réalisés dans le groupe témoin, nous avons identifié une seule espèce de moisissure, alors que nous en avons identifié 3 différentes dans la moitié des prélèvements du groupe BPCO.

En conclusion :

- La présence de *A. glaucus* serait corrélée avec la petite taille des exploitations.
- *A. fumigatus* et des Mucorales seraient présents préférentiellement dans les prélèvements provenant du groupe BPCO.
- Les prélèvements provenant du groupe BPCO contiendraient un nombre plus élevé de moisissures différentes que ceux du groupe témoin.

2.2. Analyse quantitative des moisissures.

2.2.1. *Nombre total d'unités formant colonies.*

Le nombre d'unités formant colonies (u.f.c.) développées par boîte de Pétri après six jours d'incubation varie de 20 à environ 130.

Le tableau XIII montre la répartition des différents groupes et sous-groupes de prélèvements dans des tranches quantitatives correspondant au nombre d'u.f.c. développées par prélèvement.

On remarque :

- la prédominance de prélèvements comptant de 20 à 59 u.f.c.
- que la tranche 20-59 u.f.c. regroupe une majorité de prélèvements provenant d'exploitations de taille supérieure ou égale à 50 hectares (10 sur 17), alors que les prélèvements contenant au moins 100 u.f.c. sont en majorité issus d'exploitations de taille inférieure à 50 hectares (8 sur 13).
- que la tranche 20-59 u.f.c. regroupe plus de prélèvements du groupe témoin que de prélèvements du groupe BPCO (11 sur 17), alors que 14 prélèvements du groupe BPCO sur 20 contiennent au moins 60 u.f.c. (contre 9 prélèvements sur 20 dans le groupe témoin).

En conclusion, les grandes exploitations seraient moins infestées par les moisissures que les petites, et les prélèvements provenant du groupe BPCO seraient légèrement plus colonisés que ceux provenant du groupe témoin.

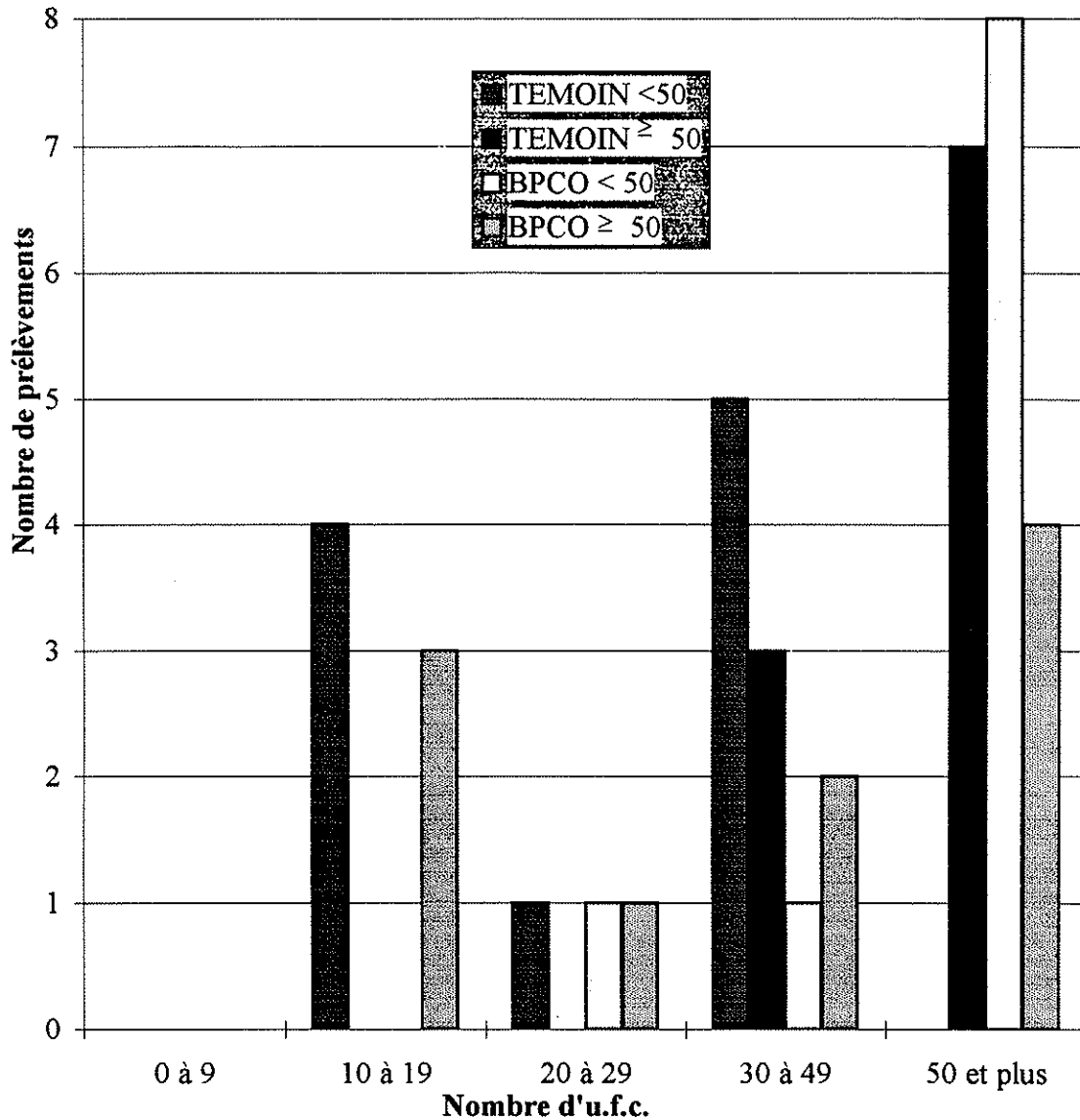
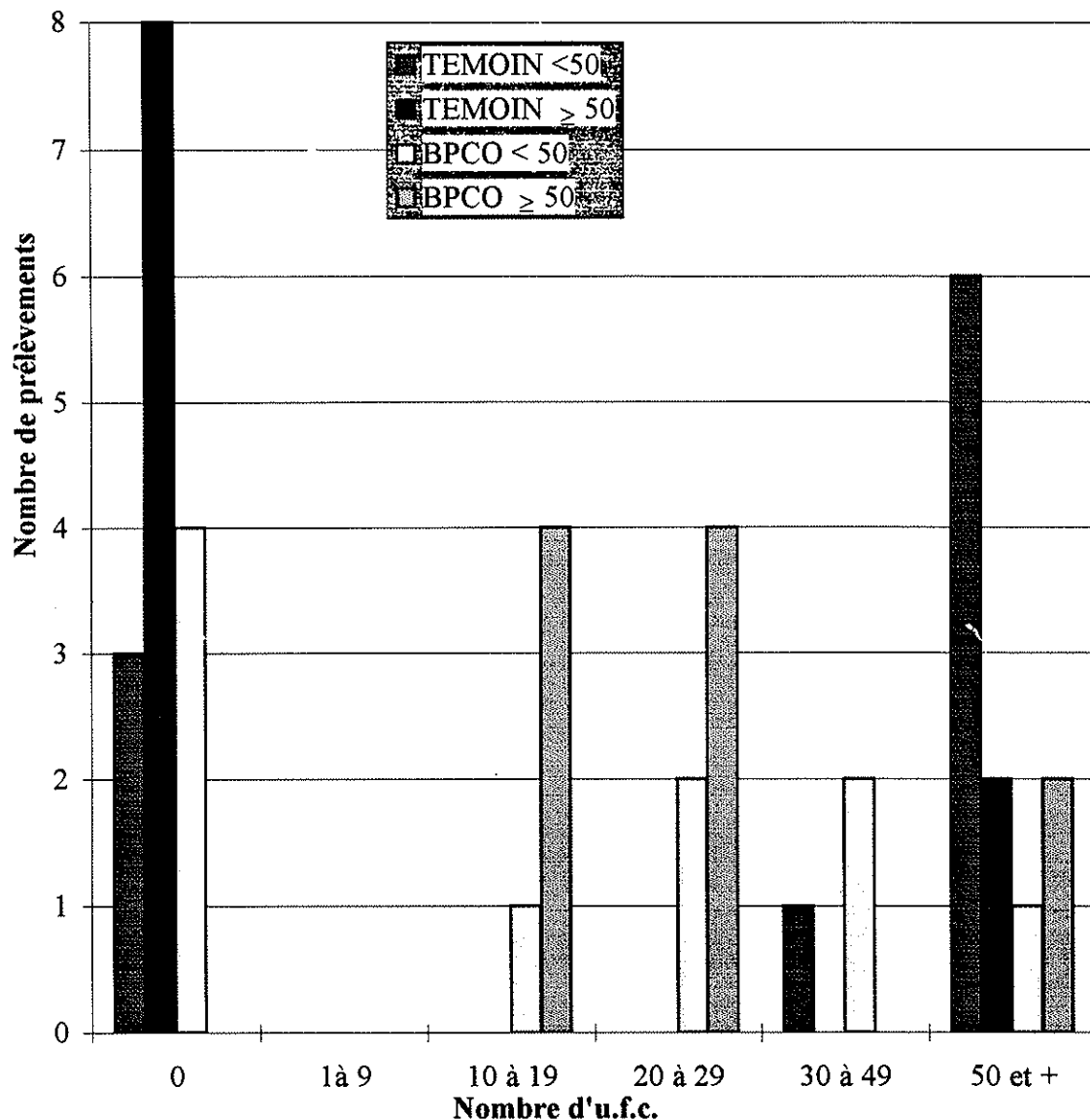


Figure 6 : Etude quantitative d' *Aspergillus niger* : répartition des différents groupes de prélèvements selon le nombre d'unités formant colonies développées.

- Groupe T <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation < 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.
- Groupe T ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.
- Groupe BPCO <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation <50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.
- Groupe BPCO ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.



**Figure 7 : Etude quantitative des Mucorales :
répartition des différents groupes de prélèvements
selon le nombre d'unités formant colonies développées.**

Groupe T <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation < 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.

Groupe T ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.

Groupe BPCO <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation <50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

Groupe BPCO ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

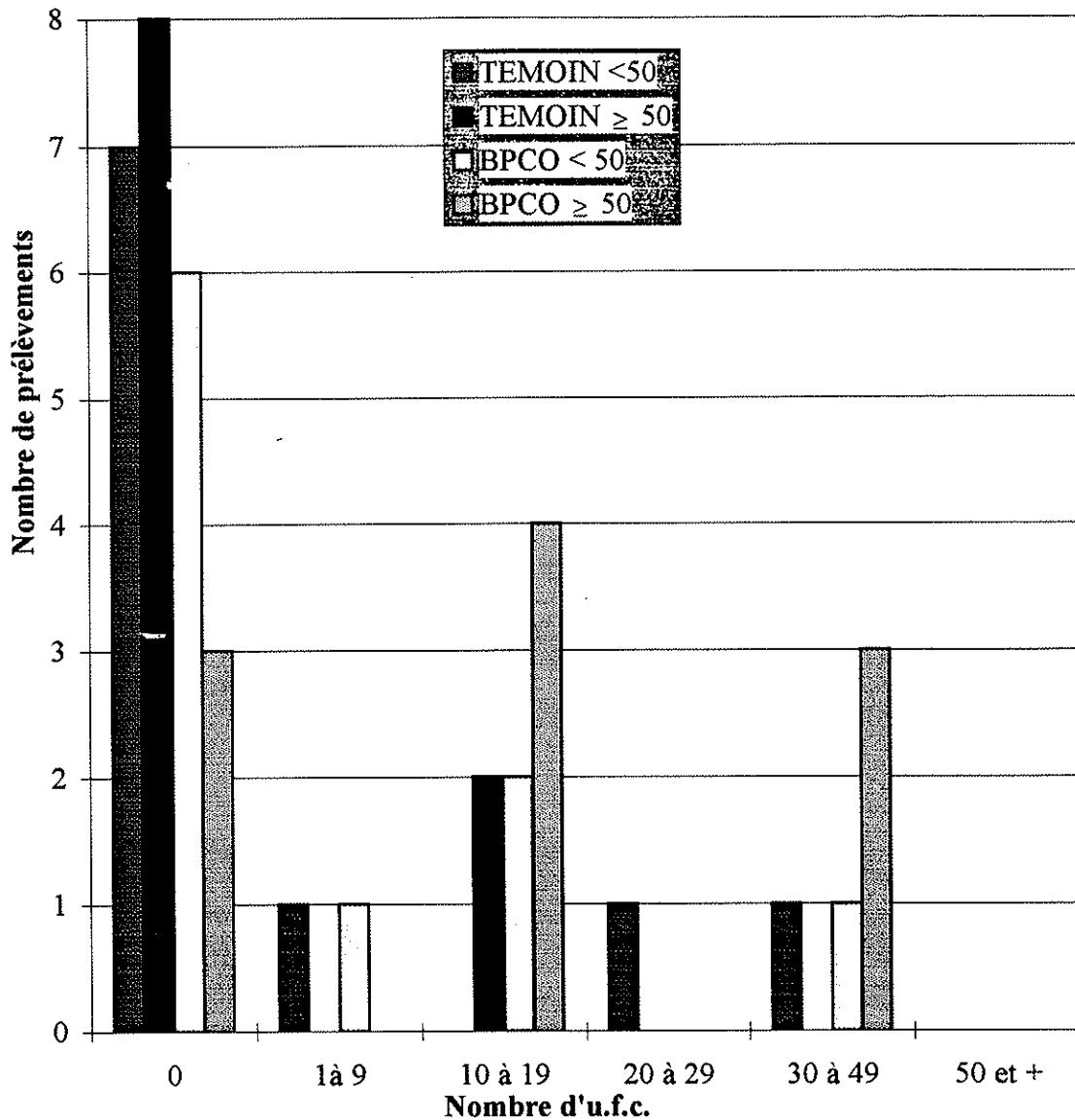


Figure 8 : Etude quantitative d' *Aspergillus fumigatus* : répartition des différents groupes de prélèvements selon le nombre d'unités formant colonies développées.

- Groupe T <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation < 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.
- Groupe T ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets appartenant au groupe témoin.
- Groupe BPCO <50 : Prélèvements effectués dans une exploitation <50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.
- Groupe BPCO ≥ 50 : Prélèvements effectués dans une exploitation d'au moins 50 hectares, lieu de travail de sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.

2.2.2. Etude quantitative des différentes espèces identifiées.

Lorsqu'une espèce ou un genre de moisissure est identifié dans un prélèvement, le nombre d'u.f.c. observées varie de 1 à plus de 50.

Pour l'expression des résultats, nous avons distingué 5 tranches quantitatives représentant le nombre d'u.f.c. approximatif de chaque espèce ou genre :

- absence de colonie,
- nombre d'u.f.c. de 1 à 9,
- nombre d'u.f.c. de 10 à 19,
- nombre d'u.f.c. de 20 à 29,
- nombre d'u.f.c. de 30 à 49,
- nombre d'u.f.c. supérieur ou égal à 50.

Les figures 6, 7 et 8 répartissent les différents groupes et sous-groupes de prélèvements dans les différentes tranches quantitatives pour les moisissures le plus souvent identifiées.

- Etude quantitative d'*Aspergillus niger*.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 6.

Des colonies d'*A. niger* ont été identifiées dans tous les prélèvements et en quantité importante par rapport aux autres moisissures. En effet, près de la moitié des prélèvements (19 sur 40) a révélé plus de 50 u.f.c. d'*A. niger* et les trois-quarts plus de 30 u.f.c.

Si on compare les deux groupes de prélèvements, on remarque que ce sont surtout des prélèvements provenant du groupe BPCO qui révèlent au moins 50 u.f.c. d'*A. niger* (12 prélèvements BPCO contre 7 témoins).

- Etude quantitative des Mucorales.

Les résultats concernant les Mucorales sont présentés dans la figure 7.

Rappelons que nous avons identifié trois genres dans l'ordre des Mucorales : *Rhizopus sp.*, *Absidia sp.* (notamment *A. corymbifera*) et *Mucor sp.*

Les différentes colonies sont assez envahissantes, et nous n'avons pas pu quantifier chaque genre avec précision. Les résultats quantitatifs regroupent donc les trois genres. Nous avons déjà remarqué que les Mucorales n'étaient pas présentes dans tous les prélèvements. Quand elles sont présentes, elles sont souvent en quantité importante : 11 prélèvements, sur 25 en contenant, révèlent au moins 50 u.f.c. de Mucorales.

Si l'on compare les quantités de Mucorales en fonction de la taille des exploitations, on

remarque que ce sont surtout des prélèvements provenant des petites exploitations qui contiennent des Mucorales en grande quantité : 10 prélèvements provenant d'exploitation de taille inférieure à 50 hectares contiennent plus de 30 u.f.c. contre 4 prélèvements provenant d'exploitation d'au moins 50 hectares.

- Etude quantitative d'*Aspergillus fumigatus*.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 8.

Nous avons déjà remarqué que *A. fumigatus* se retrouve dans moins de la moitié des prélèvements (16 sur 40). *A. fumigatus* n'a jamais été identifié en grande quantité : aucun prélèvement ne contient plus de 50 u.f.c. et la majorité en contient moins de 20.

On constate que 11 prélèvements sur les 16 qui ont permis l'identification d'*A. fumigatus*, font partie du groupe BPCO, ce qui correspond à près de 70 %. De plus, sur les 5 prélèvements qui contiennent le plus d'*A. fumigatus* (30-49 u.f.c.), 4 font partie du groupe BPCO.

En conclusion :

- les colonies d'*A. niger* ont été isolées en quantité plus importante dans les prélèvements provenant du groupe BPCO,
- les Mucorales se sont développées en quantité plus importante dans les prélèvements provenant de petites exploitations,
- les prélèvements contenant le plus d'u.f.c. d'*A. fumigatus* proviennent en majorité du groupe BPCO.

CHAPITRE QUATRIEME

DISCUSSION

Après un bref rappel des résultats obtenus dans notre étude et quelques remarques sur les méthodes que nous avons employées, nous comparerons nos résultats à ceux relevés dans la littérature au cours de différentes études sur l'aérocontamination en milieu agricole.

1. RESUME DES RESULTATS DE NOTRE ETUDE.

1.1. Mesure pondérale des poussières respirables.

Comme le montrent les essais préliminaires, les résultats obtenus avec la méthode que nous avons employée ne peuvent pas être exploités. Cette méthode est une extrapolation d'une technique d'évaluation des poussières minérales inhalées par les sujets soumis au risque de silicose. Elle nous avait été proposée par des pneumologues. De toute évidence, la méthode n'est pas adaptée à l'appréciation du poids de particules organiques, et notamment de spores fongiques, retenues sur les filtres, compte-tenu de leur très faible densité.

De plus, il paraîtrait plus intéressant, pour apprécier de manière la plus fiable possible l'exposition réelle du travailleur à la poussière, d'utiliser un détecteur individuel porté par l'ouvrier durant son travail. Nous ne disposons pas d'un tel appareil pour notre étude.

Peut-être aurait-il été plus judicieux de réaliser les prélèvements sur une durée plus courte, mais en reproduisant, à côté du capteur, les activités d'un agriculteur produisant de la poussière, comme, par exemple, la manipulation de foin.

Enfin, des facteurs climatiques, et notamment l'humidité relative de l'air ambiant et la température, jouent probablement un rôle dans la dispersion de la poussière dans l'atmosphère.

1.2. Etude mycologique des poussières respirables.

1.2.1. Résultats.

1.2.1.1. Analyse qualitative.

Les moisissures le plus souvent identifiées dans les prélèvements appartiennent:

- au genre *Aspergillus*, avec surtout *A. niger*, puis *A. fumigatus* et *A. glaucus*.
- à l'ordre des Mucorales, avec les genres *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus*.

La présence d'*A. glaucus* paraît être corrélée avec la petite taille des exploitations.

Les prélèvements provenant du groupe présentant une obstruction bronchique contiennent, en moyenne, plus de types différents de moisissures et contiennent plus souvent *A. fumigatus* et des Mucorales que les prélèvements issus du groupe témoin.

1.2.1.2. Analyse quantitative.

Le nombre d'unités formant colonie (u.f.c.) développées par boîte de Pétri varie de 20 à plus de 130. Les colonies développées en plus grand nombre sont celles d'*A. niger* et des Mucorales. Les mucorales sont présentes en plus grande quantité dans les petites exploitations que dans les grandes. Globalement, les grandes exploitations seraient moins infestées par les moisissures que les petites et les prélèvements provenant du groupe BPCO seraient légèrement plus contaminés que ceux issus du groupe témoin.

1.2.2. Remarques.

* Le capteur de poussières CPM3 que nous avons utilisé est un appareil destiné à la mesure pondérale des particules " respirables " en suspension dans l'atmosphère. Il est utilisé en particulier dans les houillères pour mesurer l'exposition aux particules de silice. Même si la notice livrée avec l'appareil prévoit le prélèvement et l'extraction de tous les types de poussières (selon le mode opératoire que nous avons suivi), nous pouvons nous demander si cette méthode est vraiment adaptée à notre étude aéromycologique :

- notamment, les spores fongiques, une fois piégées dans les filtres en mousse de polyuréthane, gardent-elles toutes leur viabilité jusqu'au moment de la mise en culture ? Il est possible que des spores de certaines espèces de moisissures plus fragiles aient été prélevées mais ne se soient pas développées en culture. Ceci expliquerait en partie l'absence de nombreuses

espèces fongiques identifiées dans plusieurs études aéromycologiques de la littérature.

- le temps de prélèvement de sept heures, recommandé pour les mesures pondérales, est-il approprié pour l'étude des spores fongiques ?

* D'autre part, les méthodes de mise en culture et d'incubation pendant 6 jours que nous avons utilisées conviennent au développement de la plupart des champignons, mais peut-être ne représentent-elles pas les conditions de croissance idéales pour certaines espèces qui, de ce fait, n'ont pas été identifiées.

* Nous avons pu remarquer que les Mucorales sont observées en grande quantité et qu'elles se développent en colonies très envahissantes. Il faut noter que les espèces de cet ordre ont des sporocystes très fragiles, ce qui favorise une large dissémination des spores. Peut-être ont-elles masqué d'autres colonies que nous n'avons pu détecter.

* Une autre explication de l'absence de certaines espèces fongiques pourrait être la compétition entre les moisissures lorsqu'elles se retrouvent en trop grand nombre sur un milieu de culture : certaines inhiberaient le développement des autres. Selon Blomquist *et al.* (1984), le nombre limite de colonies pouvant se développer sans se gêner dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre est de 40 à 50 au maximum. Or, nous avons détecté beaucoup plus d'unités formant colonie (u.f.c.) dans de nombreux prélèvements. Nous aurions donc peut-être dû adopter la technique de dilution et d'homogénéisation de la suspension d'extraction avant d'ensemencer un milieu de culture avec une petite quantité de cette suspension, ou bien réduire le temps de prélèvement.

* Les études sur les micro-organismes en suspension dans l'atmosphère référencées dans notre bibliographie ont été réalisées à l'aide de capteurs de poussière recueillant la poussière totale en suspension dans l'atmosphère étudiée. Notre capteur CPM3 ne retient sur ses filtres que les particules " respirables " (c'est à dire susceptibles de pénétrer dans les alvéoles pulmonaires et de s'y déposer) de taille comprise entre 0,5 et 5 μm de diamètre aérodynamique. Or, certaines moisissures possèdent de grosses spores, notamment le genre *Alternaria* dont les conidies mesurent 20 à 200 μm de long sur 9 à 20 μm de large. Ceci peut expliquer leur absence dans nos prélèvements. De plus, selon plusieurs études (Karlsson et Malmberg, 1989 ; Eduard *et al.*, 1990; Blomquist *et al.*, 1994), les spores peuvent se présenter rassemblées en agrégats, ce qui forme des particules plus grosses non captées par le CPM3.

* Nous avons effectué un seul prélèvement dans chaque environnement étudié. Or, nous

savons que le contenu d'un prélèvement peut varier, dans un même environnement, selon la température, l'humidité, la ventilation, le moment de la journée, l'activité autour de l'appareil. Il faudrait donc réaliser plusieurs prélèvements dans un même environnement afin d'obtenir des résultats plus fiables.

* Contrairement à toutes les études sur le sujet, nous n'avons pas déterminé la concentration en spores fongiques dans l'atmosphère. Par contre, nous avons essayé de réaliser tous les prélèvements et les études qualitative et quantitative dans les mêmes conditions, afin de pouvoir comparer les résultats pour les différents prélèvements.

Nous voyons donc qu'il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature puisque l'appareillage et les méthodes utilisées diffèrent sur plusieurs points.

2. COMPARAISON A LA LITTERATURE.

2.1. Mesure pondérale des poussières respirables en milieu agricole.

Les études sur l'exposition aux poussières en milieu agricole sont peu nombreuses, surtout dans le secteur de l'élevage et de la polyculture, où les activités agricoles sont multiples, la durée d'exposition journalière aux poussières imprécise, variable dans l'année, en fonction des saisons. Des mesures d'empoussièrement en milieu confiné ou dans l'industrie céréalière sont plus courantes.

2.1.1. Mesure en milieu d'élevage confiné.

Différentes études, principalement dans des pays scandinaves et les états nord-américains, mesurent la concentration en poussières dans des élevages de porcs et de volailles. Les prélèvements sont réalisés selon la méthode du filtre Nucleopore, en position stationnaire à 1,6 m au-dessus du sol, en différents sites dans les bâtiments où sont logés les animaux, et avec des capteurs individuels, dans la zone de respiration durant le travail.

La concentration totale en poussières est mesurée selon la méthode gravimétrique que nous avons utilisée dans nos essais préliminaires, avec utilisation d'un filtre témoin et passage des filtres au dessiccateur avant chaque pesée. La proportion de poussières organiques est quelquefois déterminée après réduction des poussières en cendres.

Certaines études réalisent une distribution des tailles des particules grâce à des prélèvements avec un capteur centripète à cascade à plusieurs étages.

Une étude finlandaise (Louhelainen *et al.*, 1987) s'intéresse à la concentration en poussières en suspension dans l'air dans 15 porcheries, comprenant des fermes d'engraissement de porcs et

des élevages de truies. La concentration moyenne en poussières totales sur les sites de prélèvements stationnaires est de 9,4 mg/m³ dans les fermes d'engraissement de cochons et de 5,2 mg/m³ dans les élevages de truies. Dans la zone de respiration pendant le travail, elle est respectivement de 8,6 mg/m³ et 7,9 mg/m³. La proportion en poussières organiques s'élève à 90 % par rapport au poids de poussières totales.

La norme d'empoussiérage maximal, fixée à 5 mg/m³ par le "National Board of Labour Protection" pour les poussières organiques, est donc facilement dépassée. La distribution des particules selon la taille permet de calculer un taux de 14 % de poussières respirables (de taille inférieure à 5 µm) par rapport à la masse totale, ce qui correspond à 1,3 mg/m³ de poussières respirables dans les fermes d'engraissement de porcs et 0,7 mg/m³ dans les élevages de truies.

Une autre étude réalisée en Finlande (Louhelainen *et al.*, 1987) concerne la concentration en poussières dans des élevages de volailles et de porcs. Les résultats révèlent une concentration en poussières totales de 12,6 mg/m³ dans les porcheries et 12,8 mg/m³ pour les élevages de volailles.

Plus récemment, une étude menée dans un état nord-américain par Donham *et al.* (1995), compare la relation entre l'exposition professionnelle à la poussière et les perturbations de la fonction pulmonaire parmi 207 éleveurs de porcs. La corrélation entre l'exposition et la réponse pulmonaire est plus importante après 6 années d'exposition. L'étude montre qu'une concentration en poussières totales supérieure ou égale à 2,8 mg/m³ est associée à une baisse de 10 % du FEV₁.

Enfin, une étude canadienne (Zejda *et al.*, 1994) réalisée parmi 54 éleveurs de porcs révèle une concentration moyenne en poussières totales de 2,93 mg/m³, et en poussières respirables de 1,13 mg/m³. Les études de corrélation ne montrent pas de relation entre la concentration en poussières respirables et les troubles respiratoires.

2.1.2. Mesure en milieu céréalier.

Deux enquêtes réalisées aux Pays-Bas et en Finlande ont mesuré la concentration en poussières en suspension dans l'atmosphère au sein d'exploitations céréalières.

La première, aux Pays-Bas (Smid *et al.*, 1992), est effectuée au moyen de prélèvements de poussières par des capteurs individuels à filtre Nucleopore portés par les ouvriers pendant 8 heures durant leur travail. Des prélèvements sont effectués sur plusieurs ouvriers occupant différents postes de travail. Les concentrations en poussières totales sont déterminées par la méthode gravimétrique classique. Les concentrations les plus importantes sont retrouvées parmi

les ouvriers déchargeant les céréales ($29,7 \text{ mg/m}^3$). La moyenne de tous les prélèvements est de 9 mg/m^3 . La corrélation avec les problèmes respiratoires montre que les valeurs d'exploration fonctionnelle respiratoire diminuent quand le niveau d'exposition aux poussières augmente.

La deuxième étude, réalisée en Finlande (Louhelainen *et al.*, 1987), mesure la concentration en poussières en suspension dans l'air dans trois exploitations de production de grains. Les prélèvements sont effectués pendant le travail en des endroits fixes et aussi dans la zone de respiration des travailleurs grâce à des capteurs individuels. La teneur en poussières est mesurée selon la méthode gravimétrique. Différents postes de travail sont étudiés. Dans tous les cas, la concentration moyenne en poussières organiques dans la zone de respiration excède la valeur d'empoussiérage maximal fixée à 5 mg/m^3 . L'empoussiérage serait maximal pendant le traitement des grains avant semence : la concentration moyenne en poussières totales à ce poste est de $31,4 \text{ mg/m}^3$.

Les travaux de labour produisent aussi beaucoup de poussières : 16 mg/m^3 en moyenne. Pendant le labour, les mesures révèlent que la concentration en poussières est inférieure dans la cabine du tracteur qu'à l'extérieur (11 mg/m^3 contre $52,4 \text{ mg/m}^3$).

Lorsque les céréales sont sorties du séchoir, la concentration en poussières est élevée quand les prélèvements sont effectués dans la zone de respiration (22 mg/m^3), mais ne serait que de $8,9 \text{ mg/m}^3$ quand les prélèvements sont réalisés selon la méthode stationnaire.

2.1.3. Mesure en milieu fourrager.

Les études réalisées dans le milieu fourrager, c'est-à-dire dans des exploitations agricoles où le type d'activité est proche de l'activité principale de la Haute-Vienne, sont peu nombreuses et orientées vers l'analyse mycologique des prélèvements de poussières plus que vers les mesures pondérales.

Cependant, une étude finlandaise de Louhelainen *et al.* (1987) a réalisé ce type de mesures dans 8 exploitations d'élevage de vaches laitières. Des prélèvements ont été effectués dans des étables et des granges en des sites stationnaires et dans la zone de respiration grâce à des capteurs individuels. La méthode gravimétrique est utilisée pour mesurer la quantité de poussières prélevées. Les résultats donnent des concentrations en poussières totales très inférieures à celles trouvées dans les autres secteurs de l'agriculture. La concentration moyenne en poussières totales d'après les prélèvements stationnaires est de 1 mg/m^3 . Selon les prélèvements individuels, elle est de $5,6 \text{ mg/m}^3$.

2.2. Etude des micro-organismes en suspension dans l'atmosphère du milieu agricole.

La plupart des études sur les micro-organismes en suspension dans l'atmosphère du milieu de travail agricole s'intéressent à l'ensemble des micro-organismes, ce qui englobe non seulement les spores des moisissures filamenteuses mais aussi les levures, les actinomycètes et les bactéries.

Les méthodes de prélèvement varient selon les études (cf. chap. I) : des méthodes basées sur l'impaction des particules sur des milieux de culture aux méthodes de filtration de l'air.

L'identification des micro-organismes est réalisée à l'aide de la méthode de mise en culture des poussières prélevées ou par observation des spores sur le filtre, au microscope. Le dénombrement des micro-organismes utilise soit la méthode de comptage des colonies après mise en culture, ce qui correspond au nombre de germes viables et permet de déterminer la concentration en u.f.c./ m³ d'air, soit une méthode de comptage direct sur le filtre de prélèvement, utilisant la microscopie, les résultats s'exprimant en nombre de micro-organismes ou de spores par m³ d'air. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'analyse de l'environnement de travail est différente selon que l'on prend en compte le comptage direct au microscope ou le comptage de la fraction viable.

2.2.1. Les micro-organismes identifiés.

Les micro-organismes que l'on retrouve dans la poussière inhalée dans le milieu agricole varient selon le secteur étudié. La plupart des études portent soit sur le milieu fourrager, soit sur le milieu céréalier. D'une manière générale, les moisissures les plus fréquemment rencontrées dans le milieu fourrager appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et aux Mucorales. Dans le milieu céréalier, dominent les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Verticillium* et *Penicillium*.

Les principales études sur le sujet sont réalisées dans des pays scandinaves. Ainsi, Karlsson et Malmberg (1989) ont étudié la composition en micro-organismes dans des élevages de vaches laitières en Suède. Il ont détecté environ 50 espèces fongiques dans des prélèvements de poussières réalisés pendant le travail de l'agriculteur dans les granges et les étables. Mais la composition en micro-organismes est très variable selon les prélèvements et certaines espèces ne sont représentées que rarement et en faible quantité. Seules quelques espèces sont retrouvées fréquemment. De nombreux prélèvements sont dominés par la présence des genres *Aspergillus* et *Penicillium* et par les actinomycètes, dans des proportions très variables.

Le tableau ci-dessous présente les espèces les plus communes, isolées dans 97 prélèvements, avec leur fréquence d'identification.

<i>Aspergillus</i>	76 %, avec	<i>A. fumigatus</i>	24 %
		<i>A. glaucus</i>	16 %
<i>Penicillium</i>	67 %, avec	<i>P. verrucosum</i>	22 %
Mucorales	27 %, avec	une forte majorité de <i>Rhizomucor sp.</i>	
<i>Cladosporium</i>	19 %		
Actinomycètes	34 %		

Aucune différence significative n'est détectée, dans la composition en micro-organismes, entre des prélèvements provenant de fermes où l'agriculteur se plaint de symptômes respiratoires et des prélèvements provenant de fermes où aucun symptôme respiratoire n'est rapporté.

Une autre étude suédoise effectuée récemment par Eduard *et al.* (1990), réalise la mise en culture de poussières prélevées dans des granges pendant la manipulation du foin. L'identification des colonies révèle une forte proportion en actinomycètes et autres bactéries (plus de 80 % en moyenne) avec, en majorité, les espèces *Faenia rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*. Les principales espèces fongiques identifiées parmi une vingtaine sont, par ordre d'importance décroissant : *A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Rhizomucor pusillus*. Les *Penicillium* et *A. niger* ne sont identifiés qu'en très faible quantité.

D'autres prélèvements sont effectués à côté d'un silo à grains. L'analyse des micro-organismes révèle des concentrations en actinomycètes et autres bactéries encore plus importantes (plus de 90 % par rapport au nombre total de micro-organismes). Dans les colonies fongiques, ce sont les *Rhizomucor* et les *Penicillium* qui dominent. Les *Aspergillus* sont en plus faible quantité, et on note la présence du genre *Cladosporium*.

En Finlande, deux études réalisées par Kotimaa *et al.* (1984, 1991) ont pour but de comparer la composition en micro-organismes contenus dans la poussière prélevée pendant la manipulation de matériels végétaux. La mise en culture des poussières permet de constater que l'espèce *A. glaucus* domine dans la poussière dégagée par le foin moisi, alors que, pendant la manipulation de grains, les moisissures les plus répandues sont des *Cladosporium sp.* et des *Penicillium sp.* L'étude des actinomycètes met en évidence la prépondérance de *Thermoactinomyces vulgaris* et de *Streptomyces sp.* dans les deux environnements.

D'autre part, des comparaisons sont effectuées entre des prélèvements provenant de fermes où l'agriculteur est atteint de poumon de fermier et des prélèvements issus de fermes où aucun symptôme respiratoire n'est rapporté. La concentration atmosphérique en spores totales est trois

fois plus importante dans les fermes de sujets malades, la supériorité étant surtout marquée pour *Thermoactinomyces vulgaris* et *Aspergillus umbrosus*, dont la quantité est multipliée par 9 par rapport à celle présente dans les fermes de sujets sains.

Enfin, une étude réalisée en Grande-Bretagne dans le milieu céréalier par Darke *et al.* (1976) analyse la poussière dégagée pendant la moisson. Des prélèvements sont effectués dans la cabine de moissonneuses-batteuses. L'analyse aéromycologique révèle la prédominance de moisissures appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Botrytis* et *Mucor*.

2.2.2. Comptage des micro-organismes.

Le dénombrement des micro-organismes en suspension dans l'atmosphère varie, pour un même environnement, selon la méthode de comptage utilisée. Nous avons déjà souligné que la méthode de mise en culture et de comptage des colonies mesure la fraction viable des micro-organismes, alors que les méthodes de comptage direct au microscope dénombrent la totalité des spores.

Selon toutes les études, la méthode de mise en culture sous-estime le nombre total de micro-organismes présents dans les prélèvements de poussières et apporte des résultats d'une grande variabilité.

2.2.2.1. *Comptage direct au microscope.*

Différentes études ont montré que les résultats étaient identiques avec les deux méthodes de comptage des spores sous microscope, que nous avons présentées dans un chapitre précédent (microscope à balayage et microscope à fluorescence).

En revanche, le dénombrement des micro-organismes est très variable selon les études en fonction de l'environnement étudié et de la stratégie de prélèvement. Dans le milieu agricole, la concentration en micro-organismes totaux, c'est-à-dire en spores fongiques, actinomycètes et autres bactéries, dans l'atmosphère, varie de 10^6 à 10^{11} micro-organismes/m³ (Darke *et al.*, 1976; Palmgren *et al.*, 1986 ; Blomquist *et al.*, 1987 ; Malmberg *et al.*, 1987 ; Malmberg et Rask-Andersen, 1988 ; Karlsson et Malmberg, 1989 ; Eduard *et al.*, 1990 ; Malmberg *et al.*, 1993).

Dans la plupart des études, il n'est pas fait d'analyse de taille des particules et le comptage englobe toutes les spores contenues dans le prélèvement, quelle que soit leur taille. Selon différentes études, la fraction respirable des spores (spores de diamètre aérodynamique inférieur

ou égal à 5 µm) en suspension dans l'atmosphère du milieu agricole serait supérieure à 90 % par rapport au nombre total de spores.

Les études que nous avons référencées ont pour la plupart été réalisées dans des pays scandinaves. Les prélèvements sont réalisés avec un capteur individuel équipé d'un filtre en polycarbonate.

Selon plusieurs études (Blomquist *et al.*, 1987 ; Eduard *et al.*, 1990 ; Palmgren *et al.*, 1986), les plus fortes concentrations sont retrouvées au niveau des silos à céréales et pendant la manipulation de grains ou de foin dans les granges et les étables.

La concentration en micro-organismes dans l'atmosphère varie selon l'état du matériel végétal manipulé. Une étude suédoise (Malmberg *et al.*, 1987) montre que la concentration en micro-organismes totaux dans l'atmosphère pendant la manipulation de foin varie de 10^7 à $10^{10}/m^3$, selon si le foin manipulé est plus ou moins moisi. La proportion en actinomycètes et en bactéries dans les prélèvements est très variable : de 10 à 100 %.

Selon Karlsson et Malmberg (1989) les spores d'actinomycètes et bactéries représentent en moyenne 50 % de la concentration, mais la variabilité est très grande selon les prélèvements (0 à 100 %).

La concentration en micro-organismes est différente selon l'activité sur le lieu de prélèvement des poussières. Une étude suédoise (Malmberg et Rask-Andersen, 1988) compare le niveau d'exposition aux micro-organismes pendant la manipulation de matériel végétal moisi, situation représentant une exposition massive inhabituelle à la poussière, et pendant des travaux agricoles produisant moins de poussière. La concentration en micro-organismes totaux est 100 à 1000 fois supérieure (10^9 à 10^{10} micro-organismes/ m^3) lors d'une forte exposition à la poussière végétale.

Enfin, plusieurs études (Malmberg et Rask-Andersen, 1988 ; Malmberg *et al.*, 1987, Malmberg *et al.*, 1993) comparent les niveaux d'exposition aux micro-organismes de différents agriculteurs pendant la manipulation de matériel végétal : des sujets sans symptômes respiratoires, des sujets présentant un syndrome aigu fébrile après une forte exposition à la poussière végétale et des sujets atteints de poumon de fermier. Les résultats montrent une corrélation significative entre un niveau d'exposition aux spores élevé et la présence d'un syndrome aigu fébrile ou d'une alvéolite allergique extrinsèque : l'exposition aux micro-organismes est 10 à 100 fois supérieure pour les sujets malades que pour les sujets sains. Le déclenchement d'une crise aiguë de poumon de fermier est corrélé à un niveau d'exposition aux spores de 10^9 micro-organismes par m^3 .

Un syndrome aigu fébrile est corrélé à une concentration en micro-organismes de $10^{10}/m^3$.

2.2.2.2. *Mise en culture.*

Deux études scandinaves utilisent cette méthode pour dénombrer les micro-organismes viables dans la poussière prélevée dans l'atmosphère de différents environnements agricoles.

La première, en Suède (Eduard *et al.*, 1990), mesure l'exposition aux micro-organismes dans différents environnements agricoles à l'aide de capteurs individuels à filtre. La concentration moyenne en spores totales viables varie de 10^5 à 10^8 u.f.c./ m^3 , la proportion d'actinomycètes et autres bactéries variant de 80 à plus de 90 %. Les plus fortes concentrations sont retrouvées dans l'environnement d'un silo céréalier et pendant la manipulation de foin.

La deuxième étude, finlandaise (Kotimaa *et al.*, 1989), compare l'exposition aux spores en suspension dans l'atmosphère dans des fermes de sujets sains et dans des fermes de sujets atteints de poumon de fermier. Les prélèvements de poussière sont réalisés en stationnaire avec un impacteur en cascade dans des situations réelles de travail. La concentration moyenne en spores aéropartées dans les fermes témoins est de $7,7.10^5$ u.f.c./ m^3 , avec une proportion en actinomycètes thermophiles et autres bactéries de 20 % ; elle est multipliée par 3,5 dans les fermes de sujets atteints de poumon de fermier, avec une proportion en actinomycètes de plus de 50 %.

L'étude des poussières respirables en milieu agricole paraît donc assez difficile. Ce chapitre montre la grande variabilité des résultats obtenus.

Les difficultés sont liées en partie au milieu agricole lui-même, surtout le secteur de l'élevage et de la polyculture où l'exposition est multifactorielle et variable dans l'année.

De plus, la diversité des méthodes employées, tant au niveau du prélèvement que de l'analyse quantitative et qualitative, limite les comparaisons entre les différentes études.

Cependant, on peut retenir quelques grands traits :

- Les secteurs de l'agriculture qui exposent le plus à la poussière sont le secteur de l'élevage confiné et le secteur céréalier. Les mesures pondérales de poussières dans l'atmosphère du secteur fourrager sont peu nombreuses et révèlent des niveaux d'empoussièrément en moyenne inférieurs, mais de grande variabilité.

- Les principaux micro-organismes identifiés dans la poussière respirable du milieu agricole sont des bactéries, des actinomycètes et des moisissures.

Dans le milieu fourrager les moisissures dominantes sont des *Aspergillus*, des

Penicillium et des Mucorales. En milieu céréalier, on retrouve plutôt des moisissures appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Verticillium* et *Penicillium*.

- Un niveau d'exposition élevé aux micro-organismes totaux en suspension dans la poussière du milieu agricole est responsable de pathologies respiratoires :

- le déclenchement d'une crise aiguë de poumon de fermier est corrélé à un niveau d'exposition aux spores de 10^9 micro-organismes par m^3 .
- un syndrome aigu fébrile est corrélé à une concentration en micro-organismes de $10^{10} / m^3$.

CONCLUSION

Il a été démontré que la prévalence des désordres respiratoires est plus élevée dans la population agricole que dans la population générale, notamment en terme de broncho-pneumopathie obstructive.

Les activités agricoles exposent quotidiennement l'arbre respiratoire au froid et à l'humidité, mais aussi à de nombreux aérocontaminants, parmi lesquels des poussières d'origine végétale ou organique, susceptibles de pénétrer dans le poumon.

Le but de notre travail était de trouver un moyen de quantifier de manière directe le risque encouru par l'exposition aux poussières de foin, afin de mettre en relation ce paramètre avec la survenue d'une bronchopneumopathie obstructive et avec la taille des exploitations agricoles.

A l'aide d'un capteur de poussières fonctionnant par filtration de l'air aspiré, nous avons effectué des essais préliminaires de mesure pondérale des poussières respirables. Les résultats de ces essais n'étant pas exploitables, nous avons réorienté notre objectif vers une analyse mycologique des poussières respirables. Quarante prélèvements ont été réalisés dans des granges d'exploitations agricoles d'élevage en Haute-Vienne.

Les moisissures le plus souvent identifiées dans les prélèvements appartiennent au genre *Aspergillus*, avec surtout *A. niger*, puis *A. fumigatus* et *A. glaucus*, et à l'ordre des Mucorales, avec les genres *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus*.

L'analyse comparative des résultats montre que la présence d'*A.glaucus* paraît être corrélée avec la petite taille des exploitations (inférieure à 50 hectares). De même, les Mucorales sont présentes en plus grande quantité dans ces petites exploitations. Globalement, les grandes exploitations seraient moins infestées par les moisissures que les petites.

Les prélèvements effectués dans les installations où travaillent des sujets présentant une obstruction bronchique révèlent plus souvent la présence d'*Aspergillus fumigatus* et des Mucorales et, d'une manière générale, sont plus "polyinfestés" que ceux réalisés dans les granges appartenant à des sujets sains.

Bien sûr, ces résultats ne sont pas définitifs et une étude sur un plus grand échantillon de population est nécessaire.

Nous avons vu aussi que des modifications des méthodes que nous avons employées pourraient se révéler profitables. Ainsi, la réalisation de plusieurs prélèvements répartis dans une année, dans chaque environnement, permettrait de prendre en compte le rôle des conditions climatiques. Par ailleurs, une dilution de la suspension avant la mise en culture éviterait le phénomène de compétition des moisissures entre elles lorsqu'elles sont trop nombreuses et permettrait une évaluation plus précise du nombre de colonies développées.

Même si l'existence d'un risque professionnel en milieu agricole lié à l'exposition à des aérocontaminants divers semble évidente, la relation entre la symptomatologie et l'exposition professionnelle n'est pas facile à analyser.

La diversité des méthodes employées dans les différentes études et la variabilité des résultats obtenus montrent qu'il persiste encore à l'heure actuelle un besoin impératif d'évaluation précise des expositions et de leurs effets respiratoires spécifiques, préalables nécessaires au développement de programmes de prévention adaptés.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSEN A. (1958).

New samplers for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.* **76** 471- 484.

BABBOTT F.L., GUMP D.W., DAVID L., MAC PHERSON B.V., HOLLY C. (1980).

Respiratory symptoms and lung function in a sample of Vermont dairy men and industrial workers. *Am. J. Public Health* **70** 241-245.

BLANDIN G., SABBAAH A. (1977).

L'asthme en pays rural. *Rev. Fr. Allergol.* **17** (5) 251-257.

BLOMQUIST G. (1994).

Sampling of biological particles. *Analyst.* **119** 53-56.

BLOMQUIST G., PALMGREN U., STRÖM G. (1984).

Improved techniques for sampling airborne fungal particles in highly contaminated environments. *Scand. J. Work Environm. Health* **10** 253-258.

BLOMQUIST G., PALMGREN U., STRÖM G. (1987).

Methodological aspects of measurement of exposure to mould. *Eur. J. Respir. Dis.* **71** (154) 29-36.

BLOMQUIST G., STRÖM G., STRÖMQUIST L. (1984).

Sampling of high concentrations of airborne fungi. *Scand. J. Work Environm. Health* **10** 109-113.

BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S. (1990).

Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Masson (Paris). 512 p.

BOUSQUET J., VERGNENEGRE A. (1987).

Agricultural asthma. in MICHEL F., BOUSQUET J., GODARD P. Highlights in asthmologie. Springer Verlag (Berlin). 453 p.

CHARPIN J., VERVLOET D. (1986).

Allergologie. *Flammarion Med.* Paris. 1152 p.

- DALPHIN J.C. (1993).
 La pathologie respiratoire en milieu agricole. in MARTINET Y., ANTHONNE D. (1993).
Les maladies respiratoires d'origine professionnelle. Masson (Paris). 283 p.
- DALPHIN J.C. (1993).
 Les alvéolites allergiques extrinsèques en milieu professionnel. in MARTINET Y.,
 ANTHONNE D. (1993). Les maladies respiratoires d'origine professionnelle. Masson
 (Paris). 283 p.
- DALPHIN J.C., BILDSTEIN F., PERNET D., DUBIEZ E., DEPIERRE A. (1989).
 Prevalence of chronic bronchitis and respiratory function in a group of dairy farmers in the
 french Doubs province. *Chest* **95** 1244-1247.
- DALPHIN J.C., DEBIEUVRE D., PERNET D., MAHEU M., POLIO J.C., TOSON B. (1994).
 Prevalence and risk factors for chronic bronchitis and farmer's lung in French dairy
 farmers. *Br. J. Int. Med.* **50** 941-944.
- D'ARCO X. (1993).
Enquête épidémiologique sur les désordres respiratoires chez 1020 actifs agricoles en
 Haute-Vienne. Doctorat en médecine. Limoges. 159 p.
- DARKE C.S., KNOWELDEN J., LACEY J., MILFORD WARD A. (1976).
 Respiratory disease of workers harvesting grain. *Thorax.* **31** 294-302.
- DAVIES R., GREEN M., SCHOFFIELD N. (1976).
 Recurrent nocturnal asthma after exposure to grain dust. *Am. Rev. Respir. Dis.* **114** 1011.
- DEPIERRE A., DALPHIN J.C., PERNET D., DUBIEZ A., FAUCOMPRE C., BRETON J.L.
 (1988).
 Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the french Doubs province.
Thorax **43** 429-435.
- DONHAM K.J., REYNOLDS S.J., WHITTEN P., MERCHANT J.A., BURMEISTER L.,
 POPENDORF W.J. (1995).
 Respiratory dysfunction in swine production facility workers : dose-response relationships
 of environmental exposures and pulmonary function. *Am. J. Int. Med.* **27** (3) 405-418.

- DONHAM K.J., ZAVALA D.C., MERCHANT J.A. (1984).
Respiratory symptoms and lung function among workers in swine confinement buildings: a cross-sectional epidemiological study. *Arch. Environm. Health* **39** (2) 96-101.
- DOPICO G., REDDAN W., TSIATIS A., RANKIN J. (1984).
Epidemiological study of clinical and physiological parameters in grain handlers of northern United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* **130** 759-765.
- DOSMAN J., COTTON D., GRAHAM B., ROBERT LEE K., FROH F., BARNETT D. (1980).
Chronic bronchitis and decreased forced expiratory flow rates in lifetime non smoking grain workers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **121** 11-16.
- EDUARD W., LACEY J., KARLSSON K., PALMGREN U., STRÖM G., BLOMQUIST G. (1990).
Evaluation of methods for enumerating micro-organisms in filter samples from highly contaminated occupational environments. *Am. Int. Hyg. Assoc. J.* **51** (8) 427-436.
- ENARSON D., VEDAL S., CHAN-YEUNG M. (1985).
Rapid decline in FEV in grain handlers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132** 814-817.
- HEEDERIK D., BROUWER R., BIERSTEKER K., BOLEIJ J. (1991).
Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *Int. Arch. Occup. Environm. Health* **62** 595-601.
- HELLER R.F., HAYWARD D.M., FAREBROTHER M. (1986).
Lung function of farmers in England and Wales. *Thorax.* **41** 117-121.
- HUSMAN K., TERHO E.O., NOTKOLAV, NUUTINEN J. (1990).
Organic dust toxic syndrom among finnish farmers. *Am. J. Fin. Med.* **17** 79-80.
- KARLSSON K., MALMBERG P. (1989).
Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method. *Scand. J. Work. Environ. Health.* **15** 353-359.
- KOTIMA M.H., OKSANEN L., KOSKELA P. (1991).
Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand. J. Work. Environ. Health* **17** (2) 117-122.

- KOTIMA M.H., TERHO E.O., HUSMAN K. (1984).
Airborne moulds and actinomycetes in the work environment of farmers. *Scand. J. Work. Environ. Health* **10** 115-119.
- LAUWERYS R. (1992).
Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Masson (Paris) .693 p.
- LEBHAR J. (1983).
La médecine du travail en agriculture. Masson (Paris). 145 p.
- LOUHELAINEN K., KANGAS J., HUSMAN K., TERHO E.O. (1987).
Total concentrations of dust in the air during farm work. *Eur. J. Respir. Dis.* **152** 73-79.
- LOUHELAINEN K., VILHUNEN P., KANGAS J., TERHO E.O. (1987).
Dust exposure in piggeries. *Eur. J. Respir. Dis.* **152** 80-90.
- MALLEA M., CHARPIN J. (1986).
Moisissures. in CHARPIN J., VERVLOET D. (1992). *Allergologie*. Médecine Sciences Flammarion (Paris). 1152 p.
- MALMBERG P., RASK-ANDERSEN A., PALMGREN U., HÖGLUNG S., KOLMODIN-HEDMAN B. (1987).
Respiratory problems among swedish farmers, correlation between symptoms and environment. *Eur. J. Respir. Dis.* **154** 22-27.
- MALMBERG P., RASK-ANDERSEN A. (1988).
Natural and adaptative immune reactions to inhaled micro-organisms in the lungs of farmers. *Scand. J. Work. Environ. Health* **14** 68-71.
- MALMBERG P., RASK-ANDERSEN A., ROSENHALL L. (1993).
Exposure to micro-organisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers. *Chest.* **103** (4) 1202-1209.
- MILOSEVIC M. (1986).
The prevalence of chronic bronchitis in agricultural workers of Slavonia. *Am. J. Int. Med.* **10** 319-322.

- MOLINA C., CHEMINAT J.C., CAILLAUD D. (1986).
Allergies en milieu rural. in CHARPIN J., VERVLOET D. (1992). *Allergologie*. Médecine Sciences Flammarion (Paris). 1152 p.
- MUR J.M. (1992).
Les enquêtes épidémiologiques récentes sur les risques respiratoires professionnels. *Arch. Mal. Prof.* **53** (6) 515-524.
- PALMGREN U., STRÖM G., BLOMQUIST G., MALMBERG P. (1986).
Collection of airborne micro-organisms on Nuclepore filters, estimation and analysis (the C.A.M.N.E.A. method). *J. Applied Bacteriol.* **61** 401-406.
- PARIENTE R., COULAUD C., MARTIN J.P., BERTHET C., BALDEYROU P., TOUATY E. (1979).
Enquête sur les bronchopneumopathies chroniques en milieu agricole (Eure, France). *Rev. Fr. Mal. Respir.* **7** 633-638.
- RASK-ANDERSEN A. (1989).
Organic dust toxic syndrom among farmers. *Br. J. Int. Med.* **46** 233-238.
- SADOUL P. (1977).
Problèmes médico-sociaux des bronchopathies chroniques graves : fréquence, perspectives de lutte. *Rev. Fr. Mal. Respir.* **5** 115-124.
- SAÏA B., MASTRANGELO G., MARCER G., REGGIO O. (1984).
Prevalence and risk factors of chronic respiratory disease in a farming population. *Med. Lav.* **75** (2) 101-109.
- SENTHILSELVAN A., McDUFFIE H., DOSMAN J. (1992).
Association of asthma with use of pesticides. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146** 884-887.
- SMID T., HEEDERIK D., HOUBA R., QUANJER P. (1992).
Dust and endotoxin-related respiratory effects in the animal feed industry. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146** 1474-1479.
- SMID T., SCHOKKIN E., BOLEIJ J., HEEDERIK D. (1989).
Enumeration of viable fungi in occupational environments : a comparison of samplers and media. *Am. Int. Hyg. Assoc. J.* **50** (5) 235-239.

TERHO E.O. (1988).

Work-related respiratory disorders among finnish farmers. *Am. J. Int. Med.* **18** 269-272.

TERHO E.O., HUSMAN K., VOHLONER I. (1987).

Work-related respiratory diseases among finnish farmers. *Eur. J. Respir. Dis.* **152** 91-94.

VAN HAGE-HAMSTEN M., JOHANSON S., HÖGLUND S., TÜLL P., WIREN A., ZETTERSTROM O. (1985).

Storage mite allergy is common in a farming population. *Clin. Allergy* **15** 555-564.

VERGNENEGRE A., BONNAUD F., BOUSQUET J., MELLONI B., NICOLAS A. (1990).

Mould and yeast induced bronchial damage in agricultural population. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* **8** 85-94.

YACH D., MYERS J., BRADSHAW D., BENATAR S.R. (1985).

A respiratory epidemiologic survey of grain mill workers in Cape town, South Africa. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131** 505-510.

ZEJDA J.E., BARBER E., DOSMAN J.A., OLENCHOCK S.A., McDUFFIE H., RHODES C., HURST T. (1994).

Respiratory health status in swine producers relates to endotoxin exposure in the presence of low dust levels. *J. Occup. Med.* **36** (1) 49-56.

BON A IMPRIMER N° 43

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

CLOT Sandrine. LA BRONCHITE CHRONIQUE EN MILIEU AGRICOLE. ETUDE DES AEROCONTAMINANTS D'ORIGINE FONGIQUE.

Université de Limoges, 1997. 96 p.

La revue de la littérature met en évidence une prévalence des désordres respiratoires supérieure dans la population agricole par rapport à la population générale, notamment en terme de bronchopathies chroniques obstructives.

Outre le froid et l'humidité, les agriculteurs sont exposés quotidiennement à des aérocontaminants divers tels que des poussières végétales et organiques.

Le but premier de notre travail était de mettre au point une méthode permettant de quantifier de manière directe l'exposition professionnelle des agriculteurs aux poussières. Ce but n'a pu être atteint complètement.

Finalement, nous avons réalisé une étude mycologique de poussières respirables prélevées dans 40 exploitations fourragères de Haute-Vienne.

Les moisissures le plus souvent identifiées dans les prélèvements sont des *Aspergillus* et des Mucorales.

La présence d'*A.glaucus* semble être corrélée avec la petite taille des exploitations (inférieure à 50 hectares). De même la quantité des Mucorales semble être supérieure dans ces petites exploitations.

Globalement, les grandes exploitations seraient moins infestées par les moisissures que les petites.

Les prélèvements effectués chez des sujets présentant une obstruction bronchique révèlent en moyenne plus souvent des *A.fumigatus* et des Mucorales et, d'une manière générale, sont plus "polyinfestés" que ceux réalisés chez des sujets sains.

L'existence d'un risque professionnel en milieu agricole lié à l'exposition à des aérocontaminants divers semble évidente de nos jours. Cependant la relation entre la symptomatologie et l'exposition professionnelle n'est pas facile à analyser.

Ce travail, de petite ampleur, demande à être confirmé par une étude sur un plus grand échantillon de population. Des matériels et méthodes de travail plus fiables peuvent être proposés.

MOTS-CLÉS: - agriculture
- bronchite chronique
- aérocontaminants
- moisissures
- exposition professionnelle