



HAL
open science

Caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers bretons : déterminants professionnels de l'exposition à la fraction thoracique des bioaérosols, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, et effets inflammatoires des poussières organiques

Hugo Pfister

► To cite this version:

Hugo Pfister. Caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers bretons : déterminants professionnels de l'exposition à la fraction thoracique des bioaérosols, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, et effets inflammatoires des poussières organiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B046 . tel-01830189

HAL Id: tel-01830189

<https://theses.hal.science/tel-01830189>

Submitted on 4 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention Biologie et Sciences de la santé

Ecole doctorale Biologie Santé

présentée par

Hugo PFISTER

Préparée à l'unité mixte de recherche INSERM 1085
Institut de recherche en santé, environnement et travail

**Caractérisation des
expositions
professionnelles des
éleveurs laitiers bretons :**
Déterminants professionnels de
l'exposition de la fraction thoracique
des bioaérosols, à l'ammoniac, et à
l'acétaldéhyde, et effets
inflammatoires des poussières
organiques

Thèse dirigée par :

Laurent VERNHET

Professeur des Universités, Université Rennes 1

Stéphane JOUNEAU

Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Université Rennes 1

Laurent MADEC

Maître de conférence, EHESP

et soutenue à Rennes

le 14 décembre 2017

devant le jury composé de :

Jean-Charles DALPHIN

Professeur des universités – Praticien hospitalier,
Université de Besançon/ *rapporteur*

Alain GARRIGOU

Professeur des universités,
Université de Bordeaux / *rapporteur*

Séverine TUAL

Cadre de recherche,
Université de Caen/ *examineur*

Anne GOUGEON

Professeur des universités – Praticien hospitalier,
Université Rennes 1 / *examineur, présidente du jury*

Laurent VERNHET

Professeur des Universités,
Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

Martine CHOUVET

Directrice technique, ITGA

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord la direction de l'ITGA sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. En particulier Mr Olivier Perez, directeur général de l'entreprise, qui a donné son feu vert pour démarrer ce projet, mais surtout Martine Chouvet, directrice technique de l'ITGA, dont la compétence et l'expertise auront permis à cette thèse de se dérouler dans un cadre idéal, tout en m'offrant des perspectives professionnelles enthousiasmantes.

Je remercie également le personnel d'ITGA qui est intervenu à un moment ou à un autre sur cette thèse : le service logistique, le laboratoire hygiène, l'équipe technique. Merci aussi à mes collègues de bureau, qui n'ont pas forcément travaillé avec moi, mais qui ont rendu ces 3 années de thèse agréables à l'ITGA.

Je tiens également à remercier Laurent Madec, avec qui j'ai commencé à travailler à la construction de ce projet de thèse dès l'année 2013 et qui a continué à m'encadrer durant toute la durée de ce projet ... Un grand merci à toi !

J'en profite pour remercier tous les enseignants-chercheurs au DSET&GS qui sont intervenus à un moment donné sur le sujet, Olivier Blanchard, Barbara Le Bot et Philippe Glorennec, et plus particulièrement Pierre Le Cann, qui a participé à de nombreux travaux réalisés durant ce doctorat.

Merci également à l'équipe microbiologie du laboratoire LERES, qui a réalisé pour moi les analyses microbiologiques, avec une mention spéciale pour Anne Gerard !

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le professeur Laurent Vernhet. Tout d'abord pour avoir accepté de diriger cette thèse après avoir participé à la genèse du projet, mais surtout pour ton investissement aux moments cruciaux, en particulier les phases rédactionnelles Un très, très, grand merci !

Je remercie également le Professeur Stephane Jouneau.. Merci pour ton encadrement durant ces 3 années de thèse, tes nombreux conseils et la pertinence de tes remarques tout au long du projet ont fortement contribué à la réussite de ce doctorat.

Je remercie également toute l'équipe une de l'IRSET pour leurs accueil. Je remercie plus particulièrement le professeur Olivier Fardel, Valerie Lecureur, et Claudie Morzadec, dont l'aide aura été précieuse durant ce doctorat.

Je remercie Benoit Martin, mon tuteur de thèse ainsi que tous les membres de mon comité de thèse, Christophe Paris, Denis Zmirou, pour vos remarques et suggestions qui ont contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier également les professeurs Jean-Charles Dalphin et Alain Garrigou d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Séverine Tual et Anne Gougeon d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer ce travail.

Un grand merci à mes meilleurs amis. Tout d'abord aux Strasbourgeois, Lydia, Shannon Basile, Martin, Solène, Thomas, Ophélie Amandine, Seb, Julien mais aussi les Rennais (ou ex Rennais), Jean, Arnaud et Stephan et Nico B (même si pas vraiment Rennais !). Merci pour ces bons moments passés et à venir !

Merci à toi Adelaïde. Merci pour ta patience et ton aide pendant la rédaction. Tu as su me supporter dans les moments difficiles, mais c'est terminé maintenant !... merci pour tout, sans toi je n'y serai pas arrivé !

Merci enfin à ma famille, en particulier, ma mère Elisabeth, ma sœur Aurore et mes grands parents Suzanne, Bernard et Annie, pour avoir cru en moi et m'avoir soutenu. Cette thèse vous est dédiée !

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
Table des matières	3
Liste de abréviations	6
Liste des illustrations	8
Valorisations scientifiques.....	10
Préambule	14
Contexte et parties prenantes de la thèse	17
PARTIE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	19
1 L'ACTIVITE PROFESSIONNELLE D'UN ELEVEUR LAITIER EN BRETAGNE	20
1.1 Un objectif de quantité et de qualité	20
1.2 Une gestion du cheptel pour optimiser la production de lait	21
1.3 Une alimentation contrôlée par l'usage de « rations alimentaires »	21
1.4 Description de l'environnement physique de travail	23
1.5 Organisation du travail et description des tâches principales	25
2 UNE EXPOSITION A DES AEROCONTAMINANTS EN LIEN AVEC DES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES	30
2.1 Les pathologies respiratoires des éleveurs laitiers	30
2.2 Contaminants présents dans les exploitations laitières	32
2.2.1 Poussières organiques	32
2.2.2 Bactéries à Gram négatif et endotoxines	33
2.2.3 Bactéries à Gram positif et peptidoglycanes	34
2.2.4 Moisissures et β -glucanes	35
2.2.5 Ammoniac et Composés Organiques Volatils	35
2.3 Métrologies des contaminants.....	36
2.3.1 Introduction à la métrologie de l'exposition sur le lieu de travail.....	36
2.3.2 Métrologie et analyse des poussières organiques	37

2.3.3	Les conventions d'échantillonnage des aérosols sur le lieu de travail	37
2.3.4	Principe physique permettant la section des particules selon les conventions inhalable, thoracique et alvéolaire	40
2.3.5	Métrologie et analyse des contaminants biologiques	42
2.3.6	Métrologie et analyse des contaminants gazeux.....	43
2.3.7	Les dispositifs de prélèvement utilisés durant la thèse :.....	44
3	ETAT DES CONNAISSANCES DES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES DES ELEVEURS LAITIERS.....	45
3.1	Étude des déterminants de l'exposition professionnelle par construction de modèles empiriques à effets mixtes : intérêt et aspects méthodologiques.....	45
3.1.1	Modèle de régression linéaire classique	46
3.1.2	Modèle à effets aléatoires	47
3.1.3	Modèle à effets mixtes.....	49
3.1.4	Exemple illustratif	49
3.2	Niveaux, variabilité et déterminants de l'exposition individuelle des éleveurs laitiers	51
3.2.1	Niveaux d'expositions aux contaminants de l'air.....	51
3.2.2	Variabilité de l'exposition dans les professions d'élevages	53
3.2.3	Déterminants professionnels de l'exposition.....	53
3.3	Synthèse : quels besoins de recherches en matière de caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers ?.....	55
3.3.1	Etude des déterminants de l'exposition aux bactéries à Gram positif, aux moisissures, à l'ammoniac et aux COV	55
3.3.2	Etude de la fraction thoracique des bio-aérosols : déterminants et effets inflammatoires	56
3.3.3	L'impact des tâches selon leurs modalités de réalisation	57
4	OBJECTIFS DE LA THESE	58
	PARTIE 2 : TRAVAUX REALISES	60

5	TRAVAUX REALISES	61
	ARTICLE 1.....	61
	ARTICLE 2.....	91
	ARTICLE 3.....	105
	PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	126
6	DISCUSSION GENERALE	127
6.1	Rappel des principaux résultats	127
6.2	Des hypothèses renforcées	129
6.3	Des résultats originaux.....	131
6.4	Force des travaux	133
6.5	Limites des travaux	134
6.6	Perspectives.....	136
7	CONCLUSION	137
8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139
9	ANNEXES	147
	Annexe 1 : probabilité de pénétration des particules d'un aérosol dans l'arbre respiratoires	148
	Annexe 2 : repartitions de particules inhalées dans l'arbre respiratoire en fonction de leur diamètre aérodynamique.....	150
	Annexe 3 : démonstration de l'effet multiplicatif des déterminants de l'exposition dans le cadre d'un modèle construit à partir du logarithme naturel de l'exposition.	152

Liste de abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

AIRBAg : Analyse, Incidence et facteur de Risque de la Broncho-pneumopathie chronique obstructive Agricole.

AIC : Akaike Information Criterion.

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

CEN : Comité Européen de Normalisation.

CLHP-MS : Chromatographie Liquide à Hautes Performances Couplée à la Spectrométrie de Masse.

CPG-MS : Chromatographie Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse.

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes.

COVs : Composés Organiques Volatils.

DAE : Diamètre Aérodynamique.

DSET&GS : Département Santé Environnement Travail & Génie Sanitaire.

DECOS : Dutch Expert Committee on Occupational Safety .

DNPH : Di-Nitro-Phenyl-Hydrazine.

DG 18 : milieu de culture Diacyl Glycerol.

ET : milieu de culture Diacyl Glycerol.

ETG : Ecart Type Géométrique.

EHESP : Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique.

IRSET : Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail.

ITGA : Institut Technique des Gaz et de l'Air.

LAL : Méthode au Lysat d'Améboocytes de Limule.

LQ : Limite de quantification.

MG : Moyenne Géométrique.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PPI-T : Parallel particle Impactor – version Thoracique.

PM :Particulate matter.

TLR : Toll-Like-Receptor.

TSA : milieu de culture Tryptone SojA.

UE : Unité d'Endotoxine

UFC : Unité Formant Colonie

VLEP : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle.

Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : vaches « Prim'holstein », première race laitière en Bretagne	21
Figure 2 : silo à ensilage de maïs	22
Figure 3 : silo à ensilage d'herbe	22
Figure 4 : stabulation en aire paillée (à gauche) et stabulation en logettes (à droite)	25
Figure 5 : distribution d'ensilage mécanisé (à l'aide d'une désileuse)	26
Figure 6 : chargement de grains manuels (à l'aide d'une brouette + seau)	27
Figure 7 : déversement de litières mécanisé (à gauche) et manuel (à droite)	27
Figure 8 : raclage ponctuel du fumier manuel (à gauche) ou mécanisé (à droite)	28
Figure 9 : illustration d'un éleveur effectuant la traite du matin	29
Figure 10: probabilités de pénétration des particules selon leur diamètre aérodynamique dans les zones de l'arbre respiratoire définies par les conventions inhalable, thoracique et alvéolaire.	39
Figure 11 : probabilités de pénétrations des particules selon leur diamètre aérodynamique dans les zones intermédiaire de l'arbre respiratoire calculées à partir des conventions de la norme EN 481	40
Figure 12 : représentation schématique de la séparation des particules par impaction (Renoux et Boulaud, 1998)	41
Figure 13 : représentation réelle et schématique d'un "Parallel Particle Impactor" version Thoracique	42
Figure 14 : illustration des dispositifs de prélèvement utilisés durant cette thèse	44
Figure 15 : illustration de la décomposition de la variabilité	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : exemple de décomposition de la variation (modèles aléatoire).	50
Tableau 2 : exemple de variabilité résiduelle d'un modèle mixte.	50
Tableau 3 : variabilité expliquée par un modèle mixte.	51
Tableau 4 : carte de chaleur décrivant les effets des déterminants sur les expositions.	128

Tableau 5 : effet de la fermeture de la cabine du tracteur sur l'exposition induite par le déversement de litières

130

Valorisations scientifiques

Articles scientifiques

- Pfister, H., Madec, L., Le Cann P., Costet, N, Lecureur N., Chouvet, M., Jouneau, S., Vernhet, L., **Determinants of dairy farmers' exposure to thoracic organic dusts**, à soumettre
- Pfister, H., Morzadec, C., Le Cann, P., Madec, L., Lecureur, V., Chouvet, M., Jouneau, S., Vernhet, L., 2017. **Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms**. Environ. Res. 158, 691–702. doi:10.1016/j.envres.2017.07.025

Communication orale

- Pfister, H., Vernhet, L., Madec, L., Jouneau, S., Chouvet, M., **AgrExPro: Breton dairy farmer's occupational exposures related to lower airways diseases**, 2016, European Doctoral College on Environment and Health, Rennes

Communications affichées

- Pfister, H., Chouvet M., Vernhet L., Jouneau S., Madec L., **Expositions professionnelles des éleveurs laitiers breton en relation avec la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) – Résultats de l'étude pilote**, 2015, 5^e Journée Santé Et Société de l'Université Paris Est, Creteil
- Pfister, H., Chouvet M., Vernhet L., Jouneau S., Madec L., **AgrExPro: Breton dairy farmer's occupational exposures related to lower airway diseases**, 2016, EPICOH, Barcelone.

AgrExPro: Breton dairy farmer's occupational exposures related to lower airways diseases.

Hugo Pfister^{1,2}, Laurent Vernhet², Stéphane Jouneau^{2,3}, Laurent Madec⁴, Martine Chouvet¹

¹: *Institut Technique des Gaz et de l'Air* | City: *Saint-Gregoire* | Region: *Britany* | Country: *France*

² *Research Institute for Environmental and Occupational Health (Irset-Inserm UMR 1085)* | City: *Rennes* | Region: *Britany* | Country: *France*.

³ *Rennes University Hospital* | City: *Rennes* | Region: *Britany* | Country: *France*.

⁴ *French school of public health - Department of environmental and occupational health and sanitary engineering* | City: *Rennes* | Region: *Britany* | Country: *France*.

CONTEXT: Dairy farming is associated with an increased risk of lower airways diseases that may be linked to different occupational exposures.

AIMS: AgrExPro is an ongoing study of personal repeated measurements of Breton dairy farmer's exposure to thoracic dust, endotoxins, mold, bacteria, ammonia and acetaldehyde.

The campaign aims at:

- Identifying determinants of dairy farmer's exposure.
- Characterizing long term exposure to contaminants for an ongoing epidemiological study on Breton dairy farmer's respiratory health.

METHODS: Each farmer included in the study is visited for sampling at least 2 times during contrasted season. At term, 120 measurements of each contaminant are expected.

Simultaneously to sampling, potential exposure determinants are recorded by an observer in a predetermined record sheet including exhaustive lists of occupational task and farm characteristics.

To identify exposure determinants, multivariate linear mixed effect models will be used on log transformed concentrations as dependent variable of time by task and farm characteristics. Final models will be used to reconstitute long term exposures.


FIRST RESULTS: Multivariate linear mixed effect models have been applied on first 42 measurements of thoracic dust, endotoxins and ammonia.

For dusts and endotoxins exposure, two similar models have been established, including mainly task done by farmers: grain handling, bedding (mechanical and manual) have a significant positive impact for both contaminants. Temperature is slightly significant for endotoxins only ($p < 0.10$). R^2 is 0.53 for dust and 0.47 for endotoxins.


For ammonia exposures, a 5 parameter's model has been established: number of cow; time spent milking in a closed parlor; time spent in a closed stable, have a significant positive impact. Ventilation and outdoor storage of slurry has a significant negative impact on exposure to. R^2 is 0.65

CONCLUSION: These first results are promising as some exposure determinants have been identified with a small number of measurements

KEYWORDS: occupational exposure, dairy farmers, personal sampling, exposure modelling,





AgrExPro
Expositions professionnelles des éleveurs laitiers breton en relation avec la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) - Résultats de l'étude pilote



Hugo Pfister^{1,2}, Martine Chouvet¹, Laurent Vernhet², Stéphane Jouneau^{2,3} et Laurent Madec⁴


¹ : Institut Technique des Gaz de l'Air, 35738 Saint-Grégoire cedex
² : UMR Inserm 1085, IRSET, Université de Rennes-1
³ : Service de pneumologie, CHU de Rennes
⁴ : Ecole des Hautes études en santé publique, Département Santé Environnement Travail et Génie Sanitaire





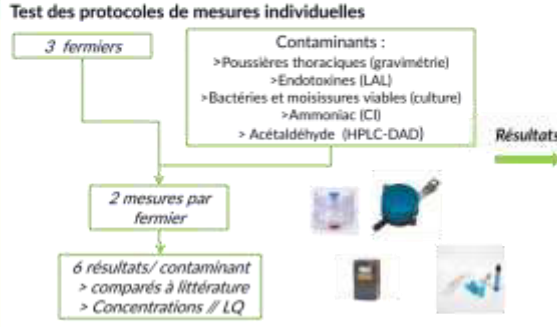
AIRBAG (Analyse Incidence et Facteurs de Risques de la BPCO agricole) est une étude prospective incluant 1200 éleveurs laitiers bretons, dont l'un des objectifs est d'identifier les étiologies de la BPCO agricole grâce à un questionnaire professionnel. AIRBAG ne prévoit pas la mesure de l'exposition réelle des éleveurs aux aéro-contaminants ; celle-ci est pourtant nécessaire pour objectiver les facteurs de risques de la BPCO agricole et proposer des mesures de prévention. L'étude AgrExPro répond à ces besoins par la mise en place d'une campagne de mesures individuelles de l'exposition des éleveurs aux poussières thoraciques, aux endotoxines, aux micro-organismes viables, à l'ammoniac et aux aldéhydes. Préalablement au lancement de la campagne, une étude de faisabilité a été réalisée. Elle avait pour objectifs de tester les protocoles de mesures envisagés et d'investiguer la faisabilité de l'échantillonnage de la fraction thoracique des poussières, pour laquelle la littérature en milieu agricole reste encore peu abondante.

Campagne de mesures : Stratégie générale envisagée



Etude de faisabilité : Méthodes et résultats

Test des protocoles de mesures individuelles



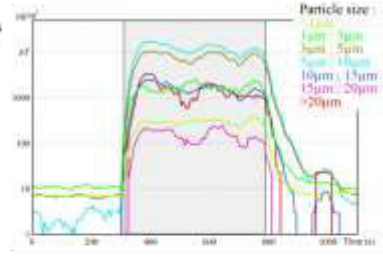
Fraction thoracique des poussières - faisabilité



Distribution granulométrique massique des poussières de grains de blé et de paille

Grain size (µm)	Grains de blé (%)	Paille (%)
< 1 µm	~5	~5
1µm - 2µm	~10	~10
2µm - 3µm	~25	~15
3µm - 5µm	~45	~25
5µm - 10µm	~35	~15
10µm - 15µm	~10	~5
15µm - 20µm	~5	~5
> 20µm	~5	~5

Exemple d'une mesure sur COP : Concentration ambiante en poussières selon la taille des particules durant le meulage de grains



DISCUSSION : Les niveaux en endotoxines mesurés dans les poussières thoraciques sont comparables à ceux mesurés la fraction inhalable des aérosols chez des éleveurs danois (Basins et al 2014). De plus, les résultats sur COP montrent qu'environ 70% de la masse des poussières est constituée de particules de diamètres inférieures à 10µm. Ces arguments montrent la faisabilité de l'échantillonnage de la fraction thoracique. Les concentrations mesurées en bactéries et moisissures (MA = 10³ UFC/m³) sont supérieures de deux ordres de grandeur aux niveaux mesurés en ambiance chez des éleveurs hollandais par impaction sur gélose (Samadi et al, 2013). La mesure individuelle semble donc pertinente. Les niveaux en ammoniac mesurés se situent dans le même ordre de grandeur que ceux observés dans des exploitations Estoniennes (Kaasik, 2013). Il n'existe pas de référence citant l'exposition individuelle d'éleveurs à l'acétaldéhyde. Les concentrations mesurées bien que faibles, sont exploitables.

CONCLUSION : Les résultats de l'étude de faisabilité sont satisfaisants, l'ensemble des protocoles sera ainsi déployé dans le cadre de la campagne de mesures.

References
 Basins, L. et al. Exposure-effecting factors of dairy farmers' exposure to inhalable dust and endotoxins. *Ann Occup Hyg* 58, 707-723 (2014).
 Samadi, S. et al. The influence of bedding materials on bio-aerosol exposure in dairy farms. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 365-368 (2012).
 Kaasik, A. & Mäasik, M. Concentrations of airborne particles (aerobic bacteria, ammonia and carbon dioxide) in large-scale intensively housed housing conditions in Estonia. *Biosystems Engineering* 114, 223-231 (2013).

CONTEXT:

Dairy farming is associated with an increased risk of lower airway diseases that may be linked to different occupational exposures.

AIMS:

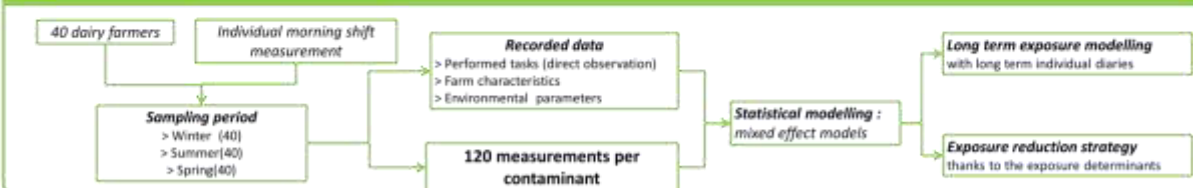
AgrExPro is an ongoing campaign of 120 personal repeated measurements of the morning shift exposure of Breton dairy farmers. The campaign aims at:

- (1) Identifying determinants of dairy farmer's exposure to thoracic dust, endotoxins, cultivable molds and bacteria, ammonia and acetaldehyde.
- (2) Characterizing long term exposure to these contaminants for an ongoing epidemiological study on Breton dairy farmer's respiratory health.

PRESENTED RESULTS:

The descriptive results of 62 first measurements already obtained for thoracic dust, thoracic endotoxins and ammonia are presented here. Statistical models identifying exposure determinants to thoracic dust and thoracic endotoxins are also presented.

AgrExPro: methodology



Intermediate results

23 farmers

>Thoracic dust (gravimetry)
>Endotoxins (LAL*)
>Ammonia (IC*)

~ 3 Morning shift measurements / farmer

62 measurements / contaminant

Descriptive results + Mixed effect models

Sampling device

Ammonia sampling
Thoracic dust and endotoxins
Sampling pump (L/min)

Descriptive results			
Parameters	GM*	GSD*	Min - Max
Thoracic dust (mg/m ³)	0.25	2.8	<0,05 - 1,37
Ammonia (mg/m ³)	0.318	3.3	0,022 - 1,81
Endotoxins (UE/m ³)	103	3.1	16 - 549

GM: geometric mean; GSD: geometric standard deviation

LAL = Lintabus amebocyte lysate
IC = toxic chromatography

Exposure modelling using mixed effect models:

Fixed effects = exposure determinants

BGL = background level

B_1, \dots, B_n = linear coefficient associated to an exposure determinant (exposure determinants can be either tasks nor a farm characteristics)

X_1, \dots, X_n = value that can be taken by an exposure determinant

The X_1, \dots, X_n and the $\ln(\text{exposure})$ are known. They are used to estimate the B_1, \dots, B_n and their statistical significance.

$\ln(\text{exposure})$

$$= \text{fixed effects } (BGL + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + \dots + B_n \cdot X_n) + \text{random effects } (\text{farm ID} + \text{farmer ID})$$

Thoracic dust mixed effects model - Random effects on farm ID and farmer in farm ID - Fitted by REML			
Fixed effect	B (se)	P-value	
background level	-2,769 (0,194)	< 0,001	
land work (min)	0,014 (0,003)	< 0,001	
re - bedding - mechanical (min)	0,05 (0,013)	< 0,001	
re - bedding - manual (min)	0,035 (0,012)	0,009	
grain handling (min)	0,038 (0,015)	0,021	
time spent in free stall (min)	0,015 (0,004)	< 0,001	
time spent in cubicle stall (min)	0,006 (0,002)	0,022	
Overall variability explained : 50%			

se = standard error

Endotoxins mixed effects model - Random effects on farm ID and farmer in farm ID - Fitted by REML			
Fixed effect	B (se)	P-value	
background level	3,769 (0,241)	<0,001	
locking animal in stable (min)	0,026 (0,015)	0,102	
grain handling (min)	0,051 (0,016)	0,003	
re - bedding (min)	0,051 (0,009)	<0,001	
emptying slurry from stable (min)	0,013 (0,005)	0,016	
high pressure milking parlour washing (min)	0,045 (0,022)	0,048	
automatic walk alley scrapping (1/0)	-0,578 (0,243)	0,027	
stable area (50m ² increment)	0,039 (0,015)	0,013	
outdoor area > 250m ² (1/0)	-0,543 (0,241)	0,034	
Overall variability explained : 51%			

DISCUSSION: to our knowledge, we are the first to describe personal exposure level of dairy farmers to thoracic dust and thoracic endotoxins. As expected, the thoracic levels of endotoxins and dust are lower than those observed for inhalable fraction in previous dairy farmer exposure studies (Basinas et al, 2014), (Samadi et al, 2012).

However, numerous measurements of thoracic endotoxins exceed the 90 EU/m³ value (GM = 103 UE/m³). Thus, these data may suggest a role of thoracic endotoxins in pathogenesis in chronic lower airway diseases.

Concerning exposure determinants, we found that re-bedding and grain handling are both strong contributors to these exposures. These 2 tasks have already been identified in a recent study as strong exposure determinants to inhalable dust and endotoxins (Basinas et al, 2014). Nevertheless, in our study, the regression coefficients of these 2 tasks are higher. It could be attributed to a better accuracy in the recorded duration of tasks. In fact the use of direct observation leads to more accurate results than retrospective recording used in other studies.

CONCLUSION: These first results are promising as highly significant determinants has been identified despite a small number of measurements. The completion of the campaign may allow to identify other determinants that have a lower influence.

BIBLIOGRAPHY:

- Basinas, I. et al. Exposure-affecting factors of dairy farmers' exposure to inhalable dust and endotoxin. *Ann Occup Hyg* 58, 707-723 (2014).
- Samadi, S. et al. The influence of bedding materials on bioaerosol exposure in dairy barns. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 22, 361-368 (2012).

Préambule

Les maladies respiratoires chroniques représentent un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. On estime en effet que plus de 235 millions de personnes souffrent d'asthme (OMS, 2017a), plus de 200 millions de personnes de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) dont plus de 65 millions à des stades modérés ou sévères (OMS 2017b). Si le facteur de risques principal de ces pathologies reste le tabagisme, on compte plus de 50 millions de personnes présentant une affection chronique respiratoire d'origine professionnelle (OMS, 2017c). Chaque année, 4 millions de personnes meurent prématurément d'une maladie respiratoire chronique (OMS, 2017c). Dans ce contexte, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que, par rapport à la population générale, les éleveurs laitiers possèdent un risque accru de développer des pathologies respiratoires d'origine inflammatoire telles que la BPCO, la bronchite chronique et la pneumopathie d'hypersensibilité (Reynolds et al., 2013).

L'exposition des éleveurs laitiers à un ensemble d'aéro-contaminants pourrait contribuer fortement au développement de ces maladies respiratoires (May et al., 2012; Reynolds et al., 2013). En effet, des mesures réalisées dans différents élevages européens et américains ont déjà montré que les éleveurs laitiers sont exposés à une large diversité de contaminants durant leurs activités professionnelles : poussières organiques (Basinas et al., 2012) constituées notamment de bactéries et/ou de moisissures ou de leurs constituants telles que les endotoxines (Basinas et al., 2012, 2014; Samadi et al., 2012; Spaan et al., 2006). D'autres études ont montré l'implication des composés organiques volatils (COVs) (May et al., 2012; Poole et al., 2011), ou encore de gaz inorganiques tels que l'ammoniac (Kaasik et Maasikmets, 2013), qui sont présents et mesurables dans les élevages de bovins laitiers. Différentes études expérimentales ont démontré que les poussières organiques, notamment celles prélevées en milieu d'élevage porcin, induisent des réponses inflammatoires puissantes dans les cellules immunitaires humaines et chez la souris exposée chroniquement. Les effets biologiques des poussières organiques prélevées dans les élevages laitiers, notamment ceux en lien avec l'apparition des pathologies respiratoires, restent en revanche très mal connus.

Par ailleurs, les mécanismes physiopathologiques des maladies respiratoires décrites chez les agriculteurs impliquent le plus souvent une inflammation chronique des voies respiratoires basses, dite « zone thoracique », notamment au niveau des bronches et bronchioles. Or, les

études actuellement publiées dans la littérature scientifique décrivent très majoritairement une exposition des éleveurs aux poussières et aux endotoxines de la fraction dite « inhalable », incluant des particules de grande taille qui ne peuvent se déposer dans les parties inférieures de l'arbre respiratoire, contrairement à la fraction dite « thoracique ». Alors même qu'il existe des dispositifs techniques pour prélever sélectivement la fraction thoracique d'un aérosol, aucune étude n'a pourtant encore utilisé de tels dispositifs de mesure chez les éleveurs laitiers.

De plus, les modalités - ou plus généralement les déterminants - des expositions aux aéro-contaminants des éleveurs laitiers, lors de leurs activités professionnelles, restent encore mal connues. Or ces déterminants doivent être caractérisés au mieux pour identifier les niveaux d'exposition des agriculteurs aux différents contaminants de l'air et *in fine* pour proposer des moyens de réduction de l'exposition et donc de prévention des maladies. A notre connaissance, l'identification des déterminants professionnels de l'exposition aux poussières organiques inhalables des éleveurs laitiers n'a été recherchée que dans quelques études menées au Danemark, aux Pays bas, et aux Etats Unis (Basinas et al., 2014). Les résultats de ces études semblent difficilement généralisables à l'ensemble des éleveurs, notamment français, du fait notamment d'une organisation des activités professionnelles et de conditions climatiques différentes en France.

C'est dans ce contexte que ce projet de thèse a été développé afin de répondre aux objectifs suivants :

- Caractériser les niveaux d'exposition professionnelle d'un échantillon d'éleveurs laitiers bretons à la fraction thoracique des poussières organiques, endotoxines, moisissures et bactéries cultivables ainsi qu'à ceux de deux gaz : ammoniac et acétaldéhyde.
- Identifier les déterminants professionnels de l'exposition à ces contaminants, c'est-à-dire quantifier en quoi la réalisation des tâches effectuées par les éleveurs, les caractéristiques de leurs bâtiments agricoles ou l'organisation générale du travail vont influencer positivement ou négativement les niveaux d'exposition à chacun des contaminants étudiés.
- Caractériser les poussières thoraciques en termes de composition microbienne et d'effets pro-inflammatoires lors du paillage mécanisé - tâche déjà connue pour contribuer fortement à l'exposition aux poussières organiques des éleveurs.

Pour réaliser ces trois objectifs, une campagne de 112 mesures individuelles de l'exposition des éleveurs laitiers à chacun des contaminants a été mise en œuvre. En parallèle, des paramètres pouvant avoir une influence sur l'exposition, telles que les tâches effectuées

par l'éleveur et les caractéristiques de son exploitation (ventilation des bâtiments, nombre d'animaux, mode de gestion du fumier...), ont été recueillis durant la campagne de mesures. Le traitement statistique des données a permis de développer des modèles d'exposition en fonction des caractéristiques de l'activité des éleveurs et de leur exploitation, qui pourront conduire par la suite à une reconstitution de l'exposition d'un éleveur selon son activité journalière et cela sans métrologie supplémentaire.

Contexte et parties prenantes de la thèse

Cette thèse a été financée par un contrat CIFRE et principalement par l'Institut Technique des Gaz et de l'Air (ITGA). Les travaux de recherche se sont déroulés dans le cadre d'un contrat de collaboration tripartite entre L'ITGA, l'équipe 1 de l'Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail (UMR Inserm 1085, IRSET), et l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP).

L'ITGA, entreprise fondée en 1995, filiale du groupe CARSO depuis 2003 et dont l'activité historique est le contrôle de l'exposition aux fibres d'amiante, emploie aujourd'hui plus de 1000 salariés, dispose de 3 laboratoires dédiés à l'analyse des fibres d'amiantes et d'agences réparties sur tout le territoire français. Depuis 2007, l'entreprise a étendu son champ d'activité à l'hygiène industrielle, et en particulier à l'évaluation et au contrôle de l'exposition sur le lieu de travail, tant sur le domaine du prélèvement de contaminants que sur leur analyse. A cette date, l'ITGA s'est en effet doté d'un laboratoire d'analyse dédié aux contaminants mesurés en milieu industriel, et d'une flotte de techniciens accrédités pour ce type d'intervention. L'ITGA dispose ainsi de solides compétences scientifiques et techniques qui ont permis la bonne mise en œuvre de ce sujet de thèse, dont la thématique principale relève de l'hygiène industrielle. Mon encadrement « entreprise » a été conduit par Martine Chouvet, directrice technique d'ITGA, dont l'expertise des expositions professionnelles et le pragmatisme ont permis la réalisation efficace des travaux de thèse. Les personnels du laboratoire hygiène d'ITGA ont également pris part au projet en prenant en charge les analyses d'acétaldéhyde et d'ammoniac. Le service matériel d'ITGA m'a également mis à disposition tout au long de la thèse les matériels de prélèvement nécessaires à la réalisation de la campagne de mesures. Une dernière mention doit être faite à Christine De Azevedo, responsable d'essai à ITGA, avec qui nous avons développé une méthode de quantification des poussières adaptée pour l'extraction ultérieure de constituants microbiens des poussières. C'est également dans les locaux d'ITGA que je réalisais moi-même la quantification des poussières après avoir effectué les prélèvements des différents contaminants sur le terrain.

Concernant L'EHESP, Laurent Madec, Maître de Conférences au Département Santé Environnement & Génie Sanitaire (DSET&GS) de l'EHESP et Chercheur associé au sein de l'équipe 10 Epidémiologie en Santé Travail et Ergonomie (ESTER) de l'IRSET a opéré la mise en relation des différents partenaires, puis participé au co-encadrement scientifique (co-

directeur de thèse), en mettant à disposition son expertise sur les questions d'évaluation et de gestion des risques en milieu professionnel. Sa vision interdisciplinaire a permis de faire une jonction cohérente entre les différentes parties prenantes intervenant sur ce sujet. C'est notamment Laurent Madec qui a soumis ce projet de recherche à l'ITGA en 2013 – projet que nous avons construit ensemble suite à mon stage de master 2, en collaboration avec Stéphane Jouneau et Laurent Vernhet, mais aussi avec Olivier Blanchard, Barbara Le Bot et Philippe Glorennec, enseignants-chercheurs au DSET&GS, et présents dès la genèse de cette problématique scientifique.

Pierre Le Cann, Professeur de Microbiologie au département DSET&GS de l'EHESP et responsable du pôle microbiologie du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Environnement et Santé (LERES) a participé à de nombreuses réunions scientifiques en début de thèse. Il a également coordonné les analyses microbiologiques des poussières réalisées par le LERES (endotoxines, bactéries et moisissures cultivables et NGS), l'ITGA ne disposant pas de ces compétences en interne.

Enfin concernant l'équipe 1 de l'IRSET, Laurent Vernhet, Professeur des Universités en Toxicologie à l'Université Rennes 1, a assuré l'encadrement académique en tant que directeur de thèse. Son expérience de l'encadrement des travaux de recherche, notamment au niveau doctoral, a permis que cette thèse déroule dans les meilleures conditions. C'est aussi grâce à son expertise en immuno-toxicologie que nous avons pu mettre en place l'étude des effets pro-inflammatoires sur le macrophage humain de poussières émises lors du paillage. Dans ce contexte il faut également aussi mentionner Claudie Morzadec, Technicienne au sein de l'équipe 1 de l'IRSET, qui a réalisé les cultures de macrophages humains et mené les analyses de l'expression des cytokines induites par les poussières. Enfin, Stéphane Jouneau, Professeur des Université et Praticien Hospitalier (PU-PH) en Pneumologie au Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, membre de l'équipe 1 de l'IRSET, a également co-encadré cette thèse. Ses nombreux conseils et la pertinence de ses remarques tout au long du projet ont fortement contribué à la réussite de ce Doctorat.

PARTIE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1 L'ACTIVITE PROFESSIONNELLE D'UN ELEVEUR LAITIER EN BRETAGNE

La France constitue le deuxième producteur européen de lait après l'Allemagne, avec une production de 25 milliards de litres en 2015. Le lait de vache, qui représente 9% de la production laitière, est transformé pour la fabrication de beurre, fromages, crème et divers produits laitiers. La filière laitière, avec un chiffre d'affaires d'environ 30 milliards d'euros en 2013, est un moteur de l'économie française. Elle représente le deuxième secteur agro-alimentaire après la filière viande (Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, 2016). La production laitière employait près de 250 000 personnes travaillant dans plus de 63 000 exploitations en 2014 en France. La Bretagne était la première région française pour la production de lait de vache en 2014 (Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, 2016). On compte en Bretagne environ 11630 producteurs laitiers assurant une production de plus de 5 383 262 m³ de lait en 2016, soit plus de 22% de la production nationale. La majorité des exploitations relève de la « polyculture-élevage », système de production agricole combinant une ou plusieurs cultures destinée(s) à l'alimentation des animaux en complément de l'élevage d'au moins un cheptel de vaches laitières. En moyenne, les élevages bovins comportent 58 vaches et très majoritairement moins de 150 bêtes.

1.1 Un objectif de quantité et de qualité

Pour bien comprendre l'activité des éleveurs laitiers, il est primordial de rappeler qu'elle relève d'un double objectif: produire du lait avec une *quantité* et une *qualité* déterminées.

La quantité de lait moyenne produite par année d'une vache varie selon sa race La vache « Prim Holstein » (figure 1), race la plus fréquemment rencontrée dans les élevages laitiers bretons et à haut potentiel laitier permet une production moyenne de 9000 litres de lait par an en France en 2016 alors que les races Montbéliarde et Normande se situent aux environs de 6000 litres de lait par an. Les éleveurs utilisent ces moyennes pour situer leurs objectifs de production. La qualité du lait est validée notamment par son taux de protéines et de matières grasses ainsi que par l'absence de leucocytes, ces derniers signalant la présence de maladie infectieuse rendant le lait impropre à la vente.

La quantité et la qualité du lait produit sont principalement fonction de deux paramètres :

- le cycle biologique de gestation/naissance de la vache
- la ration alimentaire dont elle se nourrit.



Figure 1 : vaches « Prim'holstein », première race laitière en Bretagne

1.2 Une gestion du cheptel pour optimiser la production de lait

Les veaux et génisses (jeune vaches femelles ne produisant pas encore de lait) sont habituellement hébergés dans des bâtiments différents de celui des vaches produisant du lait. Les veaux sont progressivement sevrés par l'ajout progressif à leur alimentation de céréales puis de foin. Les veaux mâles sont ensuite vendus, tandis que les génisses pourront être inséminées pour rejoindre la production de lait.

Après insémination, la gestation de la vache dure un peu plus de 9 mois et le pic de production de lait est atteint environ 2 mois après la mise bas d'un veau. Lorsque la production laitière d'une vache commence à devenir insuffisante, la vache est placée en quarantaine pour une nouvelle gestation.

1.3 Une alimentation contrôlée par l'usage de « rations alimentaires »

Afin d'obtenir une qualité de lait optimale, l'alimentation des vaches est particulièrement étudiée par les éleveurs. On définit par « ration » l'ensemble des aliments distribués aux vaches. La ration est généralement composée de fourrages et de compléments alimentaires.

Le fourrage est le principal constituant d'une ration. Il permet à la vache de ruminer et lui apporte la majorité de l'énergie nécessaire à la production de lait. Les fourrages classiquement utilisés en Bretagne sont le maïs ensilé, l'herbe ensilée ou enrubannée et le foin :

- le maïs ensilé est de loin le fourrage le plus utilisé dans les exploitations bretonnes (figure 2). Il s'agit de maïs « plante entière » stocké dans un silo couvert d'une bâche. Cette couverture permet de créer des conditions anaérobiques entraînant une production d'acide lactique par fermentation. L'acide lactique permet une bonne conservation du maïs avec des pertes énergétiques faibles.



Figure 2 : silo à ensilage de maïs

- l'herbe ensilée est stockée de façon analogue au maïs ensilé mais plus rarement utilisée (figure 3).



Figure 3 : silo à ensilage d'herbe

- l'herbe enrubannée est composée d'herbe fraîchement coupée puis rapidement stockée dans des balles rondes en plastique.
- le foin est constitué d'herbe qui a séché pendant quelques jours après la fauche pour permettre la bonne conservation du fourrage. De moins en moins utilisé en Bretagne, il sert principalement à l'alimentation des génisses car il leur permet une bonne mise en place de la rumination.

De manière quasi systématique, les éleveurs ajoutent à la ration des vaches des compléments alimentaires. Ces compléments peuvent prendre différentes formes et ont pour objectif principal d'augmenter le taux d'azote de la ration et ainsi d'enrichir la quantité de protéines du lait produit. Des compléments alimentaires sont souvent ajoutés par les éleveurs qui utilisent un fourrage uniquement à base d'ensilage de maïs car ce dernier possède un taux

d'azote assez faible comparé au fourrage à base d'herbe. Par ailleurs, lorsque la saison et le climat le permettent, les vaches sont mises en pâturages dans les prairies avoisinant l'exploitation. La durée de mise en pâturage peut aller de moins d'une heure par jour à la journée entière (les vaches n'étant alors en stabulation que pour la durée de la traite). Selon la saison et le climat, l'herbe des pâturages sera de plus ou moins bonne qualité. Lorsque l'herbe des pâturages est de bonne qualité, les éleveurs ont peu ou pas besoin de distribuer des aliments en stabulation pour atteindre leurs objectifs de production. C'est souvent le cas au printemps, où l'herbe est réputée être de meilleure qualité que lors des autres périodes de l'année

1.4 Description de l'environnement physique de travail

L'exploitation laitière peut schématiquement être résumée en quatre espaces géographiques, tels que décrits ci-dessous : la stabulation principale, la salle de traite, les lieux de stockage et les champs.

La stabulation principale représente l'espace couvert dans lequel les vaches peuvent être abritées et nourries. Elle inclut la présence d'un grand couloir central ou latéral dans lequel un tracteur peut circuler et ainsi alimenter, au sol ou dans des auges, le lieu dans lequel les vaches sont placées. En fonction de l'exploitation, la grange dans laquelle se trouve la stabulation peut être plus ou moins ouverte vers l'extérieur, et est souvent totalement ouverte sur l'un de ses pans.

L'espace de la stabulation où sont hébergées les vaches est habituellement recouvert d'une litière, renouvelée plus ou moins régulièrement selon les exploitations. Elle a pour rôle d'améliorer le confort des vaches, d'absorber leurs excréments et de limiter, en particulier, la survenue de mammites (infection de pis des vaches) qui sont potentiellement très pénalisantes d'un point de vue économique. En effet, la présence de marqueurs de mammites lors d'un contrôle laitiers peut rendre tout un stock de lait impropre à sa vente.

La litière des vaches est le plus souvent constituée de paille, c'est-à-dire de la tige de la plante céréalière, généralement coproduite avec le grain qui servira à l'alimentation des vaches. La paille la plus communément utilisée est issue du blé, mais certains éleveurs préfèrent parfois la paille d'orge ou d'autres céréales, selon le choix de production effectué. La paille peut alors être utilisée sous deux formes :

- en brins d'une longueur approximative de 40 cm résultant de la phase de moissonnage-battage de la plante céréalière

- hachée très finement en brins de 1 à 5 cm. Cette forme n'est alors pas produite directement et achetée dans le commerce.

D'autres matériaux d'origine végétale peuvent être parfois utilisés pour constituer les litières, comme la sciure de bois ou des granulés déshydratés, également achetés dans le commerce. Dans certains cas assez rares, aucune litière n'est mise en place : les excréments sont alors évacués via un système de drainage sous la stabulation. Des tapis en caoutchouc sont parfois ajoutés afin d'améliorer le couchage des vaches.

La stabulation est constituée de deux zones distinctes : l'aire d'exercice et l'aire de repos. L'aire de repos est comme son nom l'indique la zone dans laquelle les vaches viennent se reposer et où la quantité la plus importante de litière est déversée. L'aire d'exercice est la zone où les vaches viennent s'alimenter ; elle constitue de ce fait est une zone adjacente au couloir d'alimentation. Les excréments y sont régulièrement évacués et la quantité de litière y est moins importante, voire parfois inexistante. Enfin, dans de nombreuses exploitations, l'aire d'exercice est équipée d'un système automatique d'évacuation du fumier.

On distingue deux modes d'organisation de l'aire de repos des stabulations (figure 4). Le premier mode, dit de « stabulation en aire paillée » consiste en un grand espace où les vaches peuvent se déplacer librement. Dans ce type d'organisation, le fumier s'accumule pendant plusieurs semaines jusqu'à former une couche d'une épaisseur d'environ 30 centimètres avant d'être évacuée en une seule fois. Les matériaux de litière sont alors appliqués directement sur les couches supérieures du fumier. Le second mode, dit de « stabulation en logette », consiste à aménager pour chacune des vaches un enclos individuel. Comparativement à la stabulation en aire paillée, cette seconde organisation améliore le confort et les conditions sanitaires des vaches mais requiert une durée d'entretien plus importante, puisque le fumier des logettes individuelles est complètement évacué plusieurs fois par semaine et parfois même quotidiennement.



Figure 4 : stabulation en aire paillée (à gauche) et stabulation en logettes (à droite)

Directement reliée au lieu de stabulation ou possiblement située dans un bâtiment indépendant, la salle de traite constitue généralement un milieu plus fermé que la stabulation, dont la surface au sol dépend du nombre de vaches traitées simultanément. Elle dispose d'un compartiment annexe dans lequel est effectué le stockage du lait dans un réservoir de grande capacité.

Pour permettre l'alimentation du cheptel, l'éleveur laitier est amené à produire, dans une certaine mesure, les fourrages nécessaires. Cette production individuelle est réalisée en plein champ et inclut alors des activités professionnelles comme la préparation des surfaces agricoles, l'épandage d'engrais ou de pesticides ou encore la participation à la réalisation des moissons. On observe une tendance à faire sous-traiter ces opérations par des entreprises spécialisées, notamment pour l'épandage de pesticides et la réalisation des moissons.

Enfin, les différents aliments cités précédemment nécessitent l'organisation de lieux de stockage, sous différentes formes : grange « entropôt » pour les bottes de pailles, silo à ensilage, silo à grains, sacs....

1.5 Organisation du travail et description des tâches principales

Les situations de travail au sein d'un élevage laitier sont relativement diversifiées et les modalités de réalisation du travail apparaissent sensiblement différentes en fonction de paramètres tels que : la taille et la vétusté de l'exploitation, la répartition des tâches au sein de l'exploitation, les conditions météorologiques, les activités annexes à la production laitière ou encore les habitudes et aspirations individuelles des agriculteurs.

Le travail réalisé par un éleveur dans une exploitation de type polyculture-élevage peut cependant être divisé en 2 grandes catégories :

- le travail d'astreinte correspondant aux activités récurrentes tout au long de l'année et nécessaires au bon fonctionnement de l'exploitation laitière. Il inclut notamment des tâches telles que la traite, l'alimentation ou encore l'entretien des litières des animaux.
- les travaux saisonniers, principalement liés aux cultures : préparation des sols, épandage, semis, moissons, entretien des parcelles. Néanmoins ces travaux sont de plus en plus sous-traités à des entreprises spécialisées comme indiqué ci-dessus.

Concernant les activités récurrentes, on peut préciser quelques éléments relatifs à quatre tâches spécifiques :

- la distribution des fourrages : les aliments sont distribués dans des auges situées de part et d'autre du couloir d'alimentation de la stabulation. Cette activité peut être automatisée via des rails mais demeure le plus souvent effectuée mécaniquement à l'aide d'un tracteur (par exemple chargement d'ensilage dans une remorque « désileuse », puis distribution en stabulation). Ponctuellement la tâche peut être effectuée manuellement à l'aide de seaux et de pelles.



Figure 5 : distribution d'ensilage mécanisé (à l'aide d'une désileuse)

- La distribution de compléments : cette tâche est majoritairement effectuée de façon manuelle : les compléments (grains, granulés déshydratés) sont d'abord déversés dans un seau depuis un silo puis distribués en stabulation à l'aide d'une pelle (figure 6). Dans quelques cas, cette tâche est mécanisée : les aliments sont d'abord chargés dans une remorque « mélangeuse » puis distribués en stabulation. Enfin dans des cas encore

rare à l'heure actuelle, cette tâche peut être automatisée grâce à un système de distribution automatique de concentrés.



Figure 6 : chargement de grains manuels (à l'aide d'une brouette + seau)

- L'étalage de matériaux utilisés pour les litières des stabulations : Il consiste en l'étalage de paille dans la stabulation afin de créer une litière pour les vaches (figure 7). Il peut être effectué lui aussi de façon manuelle ou mécanique (grâce à une pailleuse).



Figure 7 : déversement de litières mécanisé (à gauche) et manuel (à droite)

- Le curage complet du fumier de la stabulation. Cette tâche est spécifique à la stabulation organisée en aire paillée. Lorsque le fumier s'est accumulé dans la stabulation, il est ensuite récupéré pour être épandu dans les champs. Pour une exploitation d'une centaine de bovins, cela représente annuellement plus de cinq tonnes de matière. Cette activité est donc souvent effectuée avec l'aide d'autres éleveurs vivant à proximité car le travail demandé intègre plusieurs activités simultanées (nettoyage, transport,

épandage,...), alors que la réalisation par un seul exploitant serait étalée sur plusieurs jours. Une partie du fumier est raclée grâce à un tracteur dans les parties de la stabulation qui lui sont accessibles, l'autre partie étant récupérée manuellement par les fermiers.

- L'évacuation ponctuelle du fumier consiste à racler le volume de matière accumulée dans l'aire d'exercice (figure 8). Elle peut être effectuée de manière mécanique à l'aide d'un tracteur équipé d'un racleur, mais aussi manuellement à l'aide d'une pelle. Le fumier est poussé vers une zone de stockage, qui peut être contenue ou non dans le bâtiment de la stabulation.



Figure 8 : raclage ponctuel du fumier manuel (à gauche) ou mécanisé (à droite)

- La traite (figure 9) peut être effectuée de façon entièrement manuelle (rare), semi-automatique (à l'aide d'une trayeuse) ou entièrement automatisée grâce à des systèmes détectant automatiquement les pis de vaches. La trayeuse est désinfectée par le passage d'un produit antiseptique sur le matériel avant et après la traite. A l'issue de cette opération, la salle est nettoyée à l'eau, additionnée ou non de détergent. Généralement, deux traites sont effectuées par jour.



Figure 9 : illustration d'un éleveur effectuant la traite du matin

- Les environnements dans lesquels évoluent les éleveurs sont aussi conditionnés par la taille et la structure de l'exploitation : dans le cas des exploitations familiales de petite taille (moins de 50 bovins), toutes les tâches sont effectuées sur une base quotidienne et le temps passé pour chacune d'entre elles est susceptible de varier fortement d'un jour à l'autre. Lorsque la taille de l'exploitation devient plus importante, et bien que possédant une structure de base familiale, il est souvent fait appel à des salariés agricoles. La spécialisation des travailleurs y est alors plus grande, et les tâches qu'ils y effectuent sont moins susceptibles de varier.
- les conditions météorologiques : alors qu'en hiver les éleveurs travaillent quasi exclusivement en milieu intérieur (stabulation et salle de traite), une partie plus importante de l'activité estivale se déroule en milieu extérieur. L'automne et le printemps constituent évidemment des situations intermédiaires.

2 UNE EXPOSITION A DES AEROCONTAMINANTS EN LIEN AVEC DES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES

Le travail quotidien des éleveurs laitiers, quelle que soit la structure de leur exploitation, les contraint à inhaler de grandes quantités de contaminants présents dans leurs environnements de travail. Cette exposition régulière aux aéro-contaminants n'est sans doute pas sans conséquences pour la santé des éleveurs, et pourrait participer au développement de certaines pathologies respiratoires. La partie qui suit vise à présenter succinctement les pathologies respiratoires qui peuvent être observées chez les éleveurs bretons puis à décrire les contaminants auxquels sont exposés les éleveurs laitiers : leurs origines dans l'environnement de travail, leurs effets biologiques et les méthodes permettant de collecter et de mesurer ces contaminants sur le lieu de travail.

2.1 Les pathologies respiratoires des éleveurs laitiers

La santé respiratoire des travailleurs en milieu agricole est particulièrement surveillée du fait de leur exposition régulière à des bio-aérosols constitués de quantités élevées de poussières organiques et de moisissures (C. Paris, 2014; Laplante et al., 2007). Les pathologies respiratoires développées par ces agriculteurs sont notamment les pneumopathies d'hypersensibilité, la bronchite chronique et le syndrome toxique des poussières organiques. Ces pathologies ont été particulièrement identifiées dans les secteurs des céréales et de l'élevage intensif de porcs et de volailles (C. Paris, 2014; May et al., 2012). Différentes études ont mis en évidence un effet protecteur du milieu de production laitière sur les symptômes respiratoires (Douwes et al., 2007), ainsi que sur la prévalence et l'incidence de l'asthme et de l'allergie chez l'adulte ou l'enfant (Eduard et al., 2004; Hoppin et al., 2014; House et al., 2017). Quelques études indiquent cependant une augmentation du risque d'asthme non atopique dans la profession d'éleveurs laitiers (Omland et al., 2011; Rask-Andersen, 2011). De plus, la prévalence de la BPCO semble plus élevée chez les agriculteurs que dans la population générale. En effet, une étude multicentrique réalisée récemment en France a montré, à partir d'un échantillon d'environ 5000 individus que le risque de développer une BPCO était deux fois plus élevé chez les agriculteurs que chez des sujets n'ayant jamais eu d'exposition professionnelle, et ceci après ajustement sur le sexe, l'âge et le tabagisme (Guillien et al., 2016). Cette étude, qui concernait trois régions françaises (la Bretagne, la Franche-Comté et l'Aquitaine), a également montré que la prévalence de la BPCO chez les

éleveurs laitiers était variable selon la région d'exercice et qu'elle était deux fois et demie plus élevée en Franche-Comté qu'en Bretagne. Au sein de notre équipe de recherche, le Professeur Stéphane Jouneau a lancé en 2012 l'étude AIRBAg (Analyse, Incidence et facteur de Risque de la BPCO Agricole) qui avait pour objectif de caractériser les pathologies respiratoires au sein d'une population d'environ 1200 éleveurs laitiers bretons et d'en identifier les facteurs de risques. Cette étude s'est achevée récemment et les premiers résultats définitifs seront publiés prochainement.

La BPCO est une maladie grave, responsable d'environ 3% des décès en France. Son incidence est en constante augmentation et elle sera probablement la 4^{ème} cause de mortalité en 2030 (Vestbo et al., 2013). Cette pathologie respiratoire, qui demeure longtemps peu symptomatique, est généralement diagnostiquée tardivement. C'est une maladie complexe se traduisant par une inflammation chronique et un remodelage du tissu broncho-pulmonaire. L'inflammation des voies aériennes entraîne des modifications structurales et fonctionnelles des bronches (épaississement des parois, hyperréactivité du muscle lisse, hypersécrétion des glandes séromuqueuses, perte des structures élastiques) à l'origine du déclin accéléré de la fonction respiratoire (Aubier et al., 2010). Ces lésions tissulaires résultent notamment d'une activation exacerbée des cellules de l'immunité innée (cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tels que les macrophages et les cellules dendritiques) et adaptative (lymphocytes T et B) (Aubier et al., 2010; Freeman et Curtis, 2017). L'infiltration et l'accumulation de CPA d'origine myéloïde dans l'épithélium bronchique représentent une étape majeure contribuant à initier et perpétuer les lésions tissulaires. En effet, une fois activée, ces cellules secrètent non seulement des cytokines (IL-1 α) L' infiltration et l' accumulation de CPA d' origine myéloïde dans l'épithélium bronchique représentent une étape majeure contribuant à initier et perpétuer les lésions tissulaires. En effet, une fois activée, ces cellules secrètent non seulement des cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et des chimiokines (IL-8, CXCL10,) pro-inflammatoires, mais elles constituent surtout le lien entre l'immunité innée et adaptative. La maturation et l'activation des cellules dendritiques orientent le profil de différenciation des lymphocytes T CD4+ et favorisent notamment leur polarisation Th1 et Th17 au cours de la BPCO (Freeman et Curtis, 2017). Ces lymphocytes T contribuent secondairement à la chronicité de l'inflammation pulmonaire.

Différentes études épidémiologiques suggèrent que l'exposition répétée des éleveurs laitiers aux poussières organiques, lors d'activités régulières au sein des exploitations, constitue un facteur de risque pour les symptômes bronchiques associés à la BPCO (Eduard et

al., 2009; Gainet et al., 2007; Jouneau et al., 2012; May et al., 2012; Thaon et al., 2011). Ces tâches concernent en particulier la manipulation et la distribution mécanisée de foin (en Franche Comté) et de paille (en Bretagne) qui sont répétées quotidiennement par les éleveurs laitiers et qui sont connues plus généralement pour libérer des quantités importantes de poussières organiques inhalables (Basinas et al., 2014; Garcia et al., 2013). Cependant, la taille, la composition microbiologique et la réactivité immunologique de ces poussières restent très peu connues. Une bonne connaissance de ces différents paramètres serait importante pour mieux comprendre le rôle potentiel des poussières organiques dans le développement de la BPCO en milieu agricole.

2.2 Contaminants présents dans les exploitations laitières

2.2.1 Poussières organiques

Le terme « poussières organiques » se réfère à un aérosol (nuage de particules en suspension variant de 0 à 100 micromètres de diamètre) dont les particules sont d'origine « organique », c'est à dire végétale ou animale. Si la dangerosité de poussières minérales telle que la silice ou l'amiante est avérée depuis longtemps dans le cadre de l'apparition de pathologies respiratoires aiguës ou chroniques, de nombreux symptômes relatifs à l'exposition aux poussières organiques sont encore largement sous-diagnostiqués avec une épidémiologie souvent mal connue, notamment en agriculture.

Les poussières organiques peuvent être constituées d'un mélange en proportion variable de poussières végétales (notamment à base de paille, de cuticules des grains de céréales, de spores, de pollens, de farine, de cellulose du bois et de papier, ou de fibres textiles), de animales (à base de poils, de plumes, de fragments d'insectes, de fientes ou d'autres déjections et ou d'urines) et de micro-organismes (acariens, moisissures et bactéries) (Douwes et al., 2003; Kullman et al., 1998). Deux tâches importantes comme la distribution de foin ou de paille sont connues pour induire une forte exposition à de telles poussières organiques (Basinas et al., 2014; Garcia et al., 2013) et être associées à l'occurrence de symptômes respiratoires (Jouneau et al., 2012; Reynolds et al., 2013; Thaon et al., 2011).

Les poussières organiques en suspension dans l'air sont facilement inhalables, les plus grosses particules se logeant dans la muqueuse nasale alors que les plus fines peuvent être transportées jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les principes régissant le dépôt des poussières dans l'arbre respiratoire sont détaillés plus loin dans ce manuscrit. Les conséquences

physiopathologiques de l'exposition aux poussières organiques vont dépendre de deux paramètres :

- des caractéristiques physiques des particules, en particulier de leurs tailles qui va définir les zones de dépôt de l'aérosol dans l'arbre respiratoire,
- de la diversité des constituants microbiens composant ces poussières.

La suite de cette seconde partie a pour objectif de décrire les principaux effets biologiques, notamment au niveau pulmonaire, des agents microbiens présents dans les poussières organiques collectées dans les élevages laitiers.

2.2.2 Bactéries à Gram négatif et endotoxines

Parmi les composés microbiens constituant les bioaérosols d'élevages, on peut distinguer en premier lieu les bactéries à Gram négatif, dont la principale source d'émission serait le fumier (Wang et al., 1996; Zucker et al., 2000). Parmi les espèces de bactéries à Gram négatif les plus fréquemment rencontrées on peut citer *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* et *Acinetobacter lowffii* (Zucker et al., 2000). La famille des *Pseudomonadaceae* est également importante (Zucker et al., 2000).

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides constituant la majeure partie de la couche externe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. Elles sont très fréquemment utilisées comme biomarqueur d'exposition à ce type de bactéries (Douwes et al., 2003). Les endotoxines présentent un motif moléculaire très conservé dans l'évolution du règne bactérien qui est reconnu par différents récepteurs membranaires de la famille des Toll-like receptors (TLR), notamment le TLR4, exprimé par les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages (Akira et al., 2006). La liaison des endotoxines à ces récepteurs active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, notamment la voie NF- κ B. La liaison des endotoxines à ces récepteurs active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, notamment la voie NF- κ B, et stimule l'expression puis la sécrétion d'un ensemble de cytokines à l'origine de la réponse inflammatoire (May et al., 2012). Une étude expérimentale, menée sur des sujets adultes sains ayant inhalé volontairement des endotoxines, a ainsi montré que cette exposition aux endotoxines induit une inflammation des voies pulmonaires, une diminution des valeurs de spirométrie mesurant la fonction respiratoire et provoque des symptômes respiratoires et divers symptômes systémiques parfois proches de ceux observés lors d'une grippe (Thorn et Rylander, 1998). Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques menées sur des éleveurs ont montré une association significative

entre l'exposition aux endotoxines et divers symptômes respiratoires associés à la bronchite chronique et à la BPCO (B Burch et al., 2010; Eduard et al., 2009; Monso et al., 2004; Preller et al., 1995b)

2.2.3 Bactéries à Gram positif et peptidoglycanes

Les bactéries à Gram positif sont un autre constituant microbien des poussières organiques. Leurs parois sont composées, à près de 85%, de peptidoglycanes qui sont donc utilisés fréquemment comme un biomarqueur d'exposition à ces microorganismes. Les bactéries à Gram positif représentent plus de 90% des espèces de bactéries présentes dans l'atmosphère des élevages de porcs, et l'exposition des éleveurs proviendrait entre autres de la mise en suspension de particules de fumier (Nehme et al., 2008). Ces résultats nécessiteraient d'être confirmés dans le cadre de l'élevage de bovins laitiers. Les concentrations de peptidoglycanes mesurées dans des poussières sédimentées sur les sols d'exploitations laitières-bovins restent néanmoins significativement plus élevées que celles mesurées dans les mêmes conditions au sein d'exploitations céréalières (Poole et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc qu'il existe également des sources importantes de bactéries à Gram positif dans les élevages bovins laitiers.

L'exposition aux bactéries à Gram positif n'a été que rarement étudiée dans le cadre d'études épidémiologiques des maladies respiratoires, car l'identification de leur rôle dans l'inflammation produite par les poussières organiques est récente. A l'instar des endotoxines, les peptidoglycanes présentent un motif moléculaire très conservé dans l'évolution du règne bactérien et sont aussi reconnus par certains récepteurs TLR, notamment le TLR2 (Akira et al., 2006). L'activation des récepteurs TLR2 contrôle également l'expression de cytokines pro inflammatoires (Akira et al., 2006; May et al., 2012). Dans ce cadre, diverses études immunotoxicologiques menées *in vivo* et *in vitro* suggèrent un rôle important des bactéries à Gram positif et/ou des peptidoglycanes dans les processus inflammatoires résultant d'une exposition à des bioaérosols. Une première étude de (Larsson et al., 1999) a ainsi montré que l'exposition aux bactéries à Gram positif sur des sujets humains volontaires provoquait une réponse inflammatoire de cellules épithéliales alvéolaires. (Poole et al., 2009) ont démontré que l'inactivation des endotoxines dans les poussières organiques collectées dans des élevages porcins ne bloquait pas les effets pro-inflammatoires induits par ces particules qui contiennent également des peptidoglycanes. Poole et ses collègues ont aussi démontré que les peptidoglycanes peuvent induire une libération de cytokines pro-inflammatoires par les

macrophages humains et provoquer une inflammation des voies respiratoires chez les rongeurs (Poole et al., 2011).

Par ailleurs, des sérologies positives à *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*, deux espèces de bactéries à Gram positif pouvant être présentes dans le foin, sont fréquemment détectées chez les fermiers développant une pneumopathie d'hypersensibilité ou la maladie du Poumon du fermier (Pepys et al., 1990; Kumar et al., 1993; Zacharisen et Fink, 2011). (Eduard et al., 2009) ont également démontré une association significative entre une exposition aux Thermoactinomycètes et l'occurrence de bronchite chronique.

2.2.4 Moisissures et β -glucanes

Les moisissures désignent des champignons microscopiques, dont *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Absidia*, *Wallemia sebi* constituent des genres couramment rencontrés au sein des exploitations laitières (Hanhela et al., 1995; Reboux et al., 2001). On estime qu'elles sont probablement issues d'une mauvaise conservation du fourrage. Certaines espèces associées aux genres *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium* ont été impliquées dans le déclenchement d'asthme allergique dans des contextes d'expositions environnementales (Gabriel et al., 2016; Halonen et al., 1997; Ostro et al., 2001). L'étude prospective d'Eduard et al. (2009) a également démontré une association significative entre une exposition aux allergènes *d'aspergillus* et de *penicillium* et l'occurrence de bronchite chronique et le déclin de la capacité vitale forcée chez des éleveurs de bétails norvégiens (Eduard et al., 2009). Par ailleurs plusieurs études réalisées sur des populations d'éleveurs laitiers basés dans la région du Doubs ont montré que les espèces fongiques *Absidia corymbifera* *Wallemia sebi* et *Eurotium amstelodami* sont fréquemment impliquées dans des cas de Poumon du fermier (Bellanger et al., 2010; Reboux et al., 2001). Les β -glucanes sont des polymères de glucose présents dans les parois de certains champignons et levures et possédant des effets pro-inflammatoires après inhalation (Fogelmark et al., 1994). Dans ce contexte, (Bellanger et al., 2011) ont montré que les β -glucanes provenant des hyphes fongiques *d'Eurotius amstelodami*, induisent une réponse inflammatoire de cellules épithéliales alvéolaires humaines.

2.2.5 Ammoniac et Composés Organiques Volatils

L'ammoniac est un irritant des voies respiratoires, issu de la dégradation des composés azotés présents dans l'urine et les fumiers (Hristov et al., 2011). (Von Essen et Romberger,

2003) ont décrit un déclin significatif de la fonction respiratoire après une exposition à l'ammoniac supérieure à 7,5 ppm dans une population d'éleveurs de porcs. Par ailleurs, (Eduard et al., 2009) ont montré une forte association entre une exposition élevée à l'ammoniac et l'occurrence de BPCO chez les éleveurs de bétails norvégiens.

Les Composés Organiques Volatils (COVs), des molécules organiques se retrouvant facilement en phase gazeuse, sont des irritants des voies respiratoires (Pappas et al., 2000; Ware et al., 1993). L'exposition aux COVs a été associée à l'apparition d'asthme et à son exacerbation dans des contextes de pollution de l'air intérieur des logements (Weisel, 2002). Si leurs effets sur la santé respiratoire des éleveurs n'ont pas été étudiés, deux études ont néanmoins permis de caractériser la diversité des COVs présents dans l'air ambiant de fermes laitières (Beck et al., 2007; Sunesson et al., 2001): plus de 70 composés ont ainsi pu être quantifiés, dont des terpènes, cyclo-alcanes, hydrocarbures aromatiques, aldéhydes, cétones, alcools et des acides carboxyliques. Des études d'émission de COVs par de grandes exploitations laitières en Californie, dans un contexte de pollution environnementale (ces COVs sont suspectés de dégrader la couche d'ozone), indiquent que l'ensilage constitue une source majeure de COVs dans les exploitations laitières (Hafner et al., 2012, 2013).

2.3 Métrologies des contaminants

2.3.1 Introduction à la métrologie de l'exposition sur le lieu de travail

La norme EN 689 (CEN, 1996) définit les principales règles techniques à respecter dans le cadre du contrôle technique réglementaire de l'exposition à une substance par inhalation pour laquelle il existe une Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP). Dans la très grande majorité des cas, l'évaluation de l'exposition par des dispositifs par prélèvement individuel est recommandée. Par prélèvement individuel, on entend un dispositif dont l'arrivée d'air est placée au niveau du thorax du travailleur, afin de ne prélever qu'une quantité de substance proportionnelle à ce que le travailleur est susceptible d'inhaler. On notera qu'une majorité des études d'exposition publiées dans la littérature privilégie également les prélèvements individuels plutôt que des prélèvements en point fixe. En effet, il est généralement supposé que les modalités de réalisation des tâches effectuées par un travailleur, qui ont un impact fort sur son exposition, ne peuvent pas être analysées avec des mesures issues de prélèvements en point fixe.

La norme EN 689 recommande également que le prélèvement soit effectué sur une durée représentative du poste de travail, soit généralement entre 7 et 8h. Cependant, des durées plus

courtes peuvent être envisagées si la même suite d'activités est reproduite plusieurs fois durant le poste de travail. Par ailleurs, les mesures sur un travailleur doivent être répétées à plusieurs reprises, afin d'évaluer si les variations journalière de l'exposition sont importantes. Ces variations jouent un rôle important dans l'évaluation du risque de dépassement d'une valeur limite. Nous verrons par la suite que de fortes variations journalières peuvent également être problématiques pour évaluer l'exposition chronique de travailleurs. Enfin il est à noter que les mesures individuelles sont généralement réalisées à partir de dispositifs actifs, c'est-à-dire utilisant un système de pompage portatif relié à l'arrivée d'air du dispositif de prélèvement.

2.3.2 Métrologie et analyse des poussières organiques

La concentration en poussières organiques dans un environnement de travail est obtenue de façon classique par gravimétrie, processus consistant à analyser la différence de masse, postérieurement et préalablement au prélèvement actif des poussières à débit constant sur un support, généralement constitué d'un filtre. Le principal avantage de cette technique réside dans la possibilité d'analyses complémentaires, permettant de préciser la nature des poussières prélevées. Il est ainsi possible, par calcination du support, de distinguer la part minérale de la part organique des poussières, la quantité restante de poussières correspondant à la part minérale. Il est aussi envisageable d'extraire les poussières en solution aqueuse et d'en analyser les constituants microbiens présents. Il existe par ailleurs des dispositifs de mesures permettant de prélever sélectivement les poussières en fonction de leur zone de dépôt dans l'arbre respiratoire, comme indiqué préalablement.

La mesure des poussières en environnement de travail peut aussi être réalisée par comptage optique des particules, avec l'avantage principal de pouvoir identifier des épisodes particulièrement exposants durant l'activité de travail, comme l'exécution d'une tâche particulière ou l'entrée dans un local très contaminé. Selon le type de matériel choisi, différents paramètres de la distribution de taille des particules constituant l'aérosol peuvent être obtenus.

2.3.3 Les conventions d'échantillonnage des aérosols sur le lieu de travail

Pour faciliter la compréhension des choix techniques opérés dans ce travail de thèse, je décris ci-après les conventions établies pour la pénétration des aérosols dans l'arbre respiratoire. Les caractéristiques des dispositifs de prélèvement utilisés pour évaluer l'exposition à ces contaminants sont en adéquation avec ces conventions.

Le comité européen de normalisation a ainsi défini par convention les différentes probabilités de pénétration d'une particule dans des zones de l'arbre respiratoire, selon le principe général, que plus la taille d'une particule est faible, plus les chances pour celle-ci de pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire sont importantes (CEN, 1993).

- (1) La convention inhalable définit la probabilité moyenne de pénétration des particules pouvant se déposer dans tout l'arbre respiratoire à partir de la bouche ou du nez, en fonction de leur taille. La fraction inhalable correspond ainsi à la fraction de l'aérosol total capable de se déposer dans cette zone. La fraction inhalable est décrite par l'équation suivante :

$$I_{dae} = 0,5 * (1 + EXP (-0,06 * DAE))$$

où I_{dae} correspond au pourcentage de particules « inhalables » pour un diamètre aérodynamique (DAE) donné. Le DAE d'une particule correspond au diamètre d'une sphère ayant la même vitesse limite de chute que cette particule et une masse volumique de $1\ 000\ \text{kg.m}^{-3}$. Au-delà de $100\ \mu\text{m}$ on considère que les particules ont une taille trop élevée pour former un aérosol car elle sédimentent trop rapidement.

- (2) La convention thoracique définit la probabilité de pénétration des particules au-delà du larynx, en fonction de leur taille, c'est à dire la probabilité de dépôt des particules dans la zone trachéo-bronchique et le poumon profond. La fraction thoracique d'un aérosol correspond donc à la fraction d'un aérosol capable de se déposer dans une zone située en aval du larynx et allant jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Mathématiquement, cette fraction correspond à un pourcentage de la fraction inhalable suivant une fonction log normale cumulée de DAE médian de $11,64\ \mu\text{m}$ et d'un écart type géométrique de 1,5. Concrètement, il en résulte que le diamètre de coupure de la fraction thoracique (DAE d'une particule dont la probabilité de pénétration est de 50%) d'un aérosol total est de $10\ \mu\text{m}$. De même, les particules d'un $DAE > 27\ \mu\text{m}$ possèdent une probabilité inférieure à 1% de pénétrer au-delà du larynx. La fraction thoracique est ainsi très proche de la fraction PM_{10} couramment utilisée dans les études environnementales. En effet ces deux fractions d'aérosols possèdent le même diamètre de coupure ($10\ \mu\text{m}$). Mais la fraction PM_{10} concerne par contre un domaine de prélèvement plus étroit avec une probabilité d'échantillonnage presque nulle pour les particules d'un diamètre supérieur à $15\ \mu\text{m}$.
- (3) La convention alvéolaire correspond à la probabilité de pénétration des particules dans les bronchioles terminales et les alvéoles pulmonaires. La fraction alvéolaire d'un

aérosol est elle aussi définie par un pourcentage de la fraction inhalable de l'aérosol. Elle est décrite par une fonction log normale cumulée définie par un DAE médian de $4,25 \mu\text{m}$ et un écart type géométrique de 1,5. Il en résulte un diamètre de coupure à $4 \mu\text{m}$. Par ailleurs, cette définition indique aussi que les particules d'un DAE $> 10 \mu\text{m}$ ont une probabilité inférieure à 1% de pénétrer dans la zone alvéolaire. La fraction alvéolaire est ainsi relativement proche de la fraction $\text{PM}_{2,5}$, couramment étudiée dans le cadre de la pollution atmosphérique.

La figure 10 ci-après décrit la probabilité de pénétration des aérosols en fonction de leur DAE selon les zones de l'arbre respiratoire définies par les conventions inhalable, thoracique et alvéolaire.

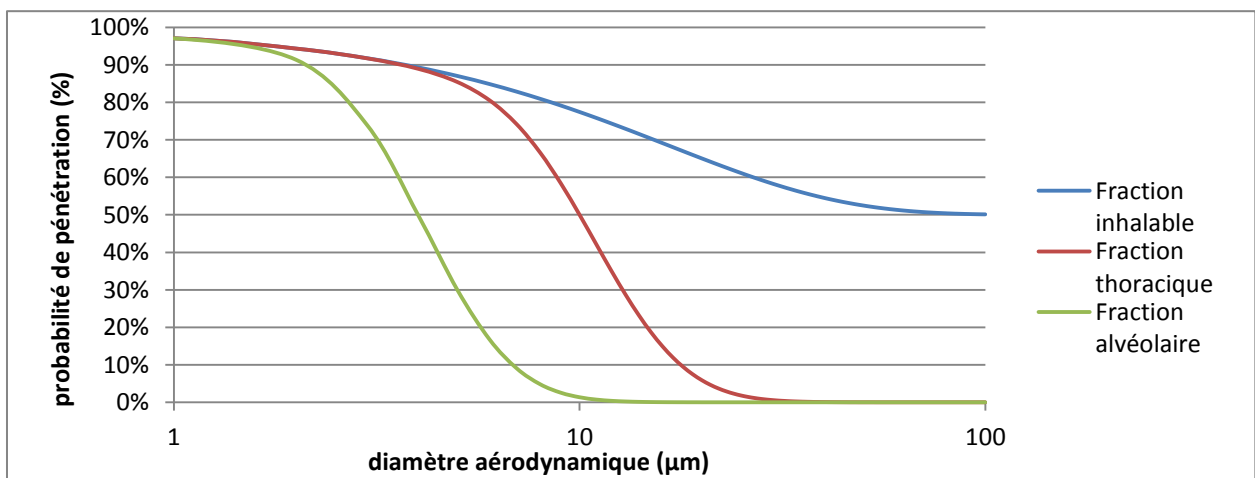


Figure 10: probabilités de pénétration des particules selon leur diamètre aérodynamique dans les zones de l'arbre respiratoire définies par les conventions inhalable, thoracique et alvéolaire.

En fonction des définitions précédentes, il est aussi possible de créer deux fractions intermédiaires :

- (1) La fraction « extra-thoracique » qui correspond à la fraction d'un aérosol se déposant au-dessus du larynx. Elle correspond à la différence entre la fraction inhalable d'un aérosol et la fraction thoracique du même aérosol.
- (2) La fraction « trachéo-bronchique » correspondant à la fraction d'un aérosol se déposant au-delà du larynx et dans les bronches. Elle correspond à la différence entre la fraction thoracique d'un aérosol et la fraction alvéolaire du même aérosol.

La figure 11 ci-après décrit la probabilité de pénétration des aérosols en fonction de leur DAE dans les zones intermédiaires. Elle correspond à la représentation graphique des probabilités décrites en annexe 1.

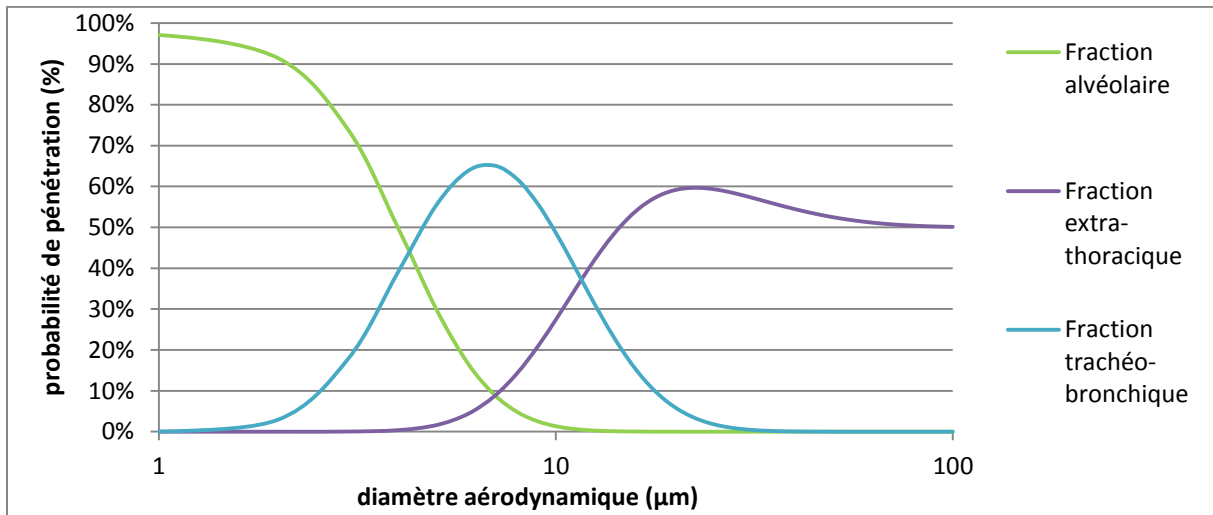


Figure 11 : probabilités de pénétrations des particules selon leur diamètre aérodynamique dans les zones intermédiaire de l'arbre respiratoire calculées à partir des conventions de la norme EN 481

Un point remarquable sur ce graphique se situe entre 7 et 8 µm, à une taille de particules pour laquelle le dépôt dans la zone trachéo-bronchique est maximal et les pourcentages de dépôts dans les zone extra-thoracique et alvéolaires sont équivalents et faibles.

Les tables décrivant les probabilités de pénétration des particules dans les différentes zones respiratoires et ayant servi à construire les 2 figures précédentes sont présentes en Annexe 1 (aérosol total) et Annexe 2 (répartition des particules inhalées).

2.3.4 Principe physique permettant la section des particules selon les conventions inhalable, thoracique et alvéolaire

Des dispositifs de prélèvement actifs ont été développés pour permettre une séparation et une sélection des particules visant à « mimer » les probabilités de pénétration définies dans la norme EN 481. La plupart de capteurs autorisant un échantillonnage sélectif des particules selon la norme EN 481 exploite le principe physique « d'impaction » qui permet une séparation des particules selon leurs diamètres.

Le principe d'impaction repose sur les propriétés d'inertie des particules elles-mêmes dépendantes du DAE des particules. La séparation des particules par un impacteur - capteur fonctionnant sur le principe d'impaction - repose sur le fait que les particules ayant une inertie

supérieure à une certaine limite ne vont pas suivre les lignes de courant de l'air échantillonné. Concrètement, un impacteur est constitué de 3 éléments :

- une arrivée d'air, dont le diamètre va définir la vitesse du jet d'air à un débit donné,
- un étage d'impaction formé d'une plaque placée perpendiculairement à la direction de l'air entrant,
- un filtre de collecte, placé sous la plaque d'impaction et également placé perpendiculairement à la direction de l'air entrant. C'est depuis cette zone que l'air est aspiré au moyen d'une pompe.

La figure 12 ci-après illustre la séparation des particules obtenue dans un impacteur. L'air échantillonné va d'abord entrer au niveau de l'arrivée d'air et y être accéléré en direction de la plaque d'impaction. En arrivant au niveau de la plaque d'impaction, la ligne de courant va contourner l'obstacle et continuer sa route vers le filtre de collecte à partir duquel l'air est pompé. C'est à ce niveau que se fait la séparation des particules. Les particules à forte inertie - de taille importante - ne vont pas suivre la ligne de courant et directement s'impacter sur la plaque. A l'inverse les particules de faible inertie - les plus fines -, vont suivre la ligne de courant et seront entraînées vers le filtre de collecte.

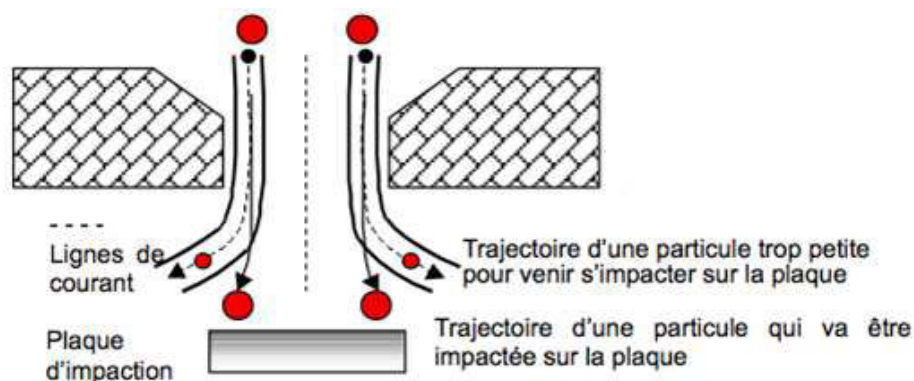


Figure 12 : représentation schématique de la séparation des particules par impaction (Renoux et Boulaud, 1998)

Au cours de mes travaux de recherche, nous avons utilisé un capteur fonctionnant sur le principe de l'impaction permettant la sélection de particules selon les probabilités définies par la convention thoracique. Il s'agit d'un « Parallel Particle Impactor », version Thoracique (PPI-T) produit par la société américaine SKC. Ce capteur est constitué de 4 impacteurs placés en parallèle qui permettent une reconstitution efficace des probabilités de pénétration définies par la convention thoracique.

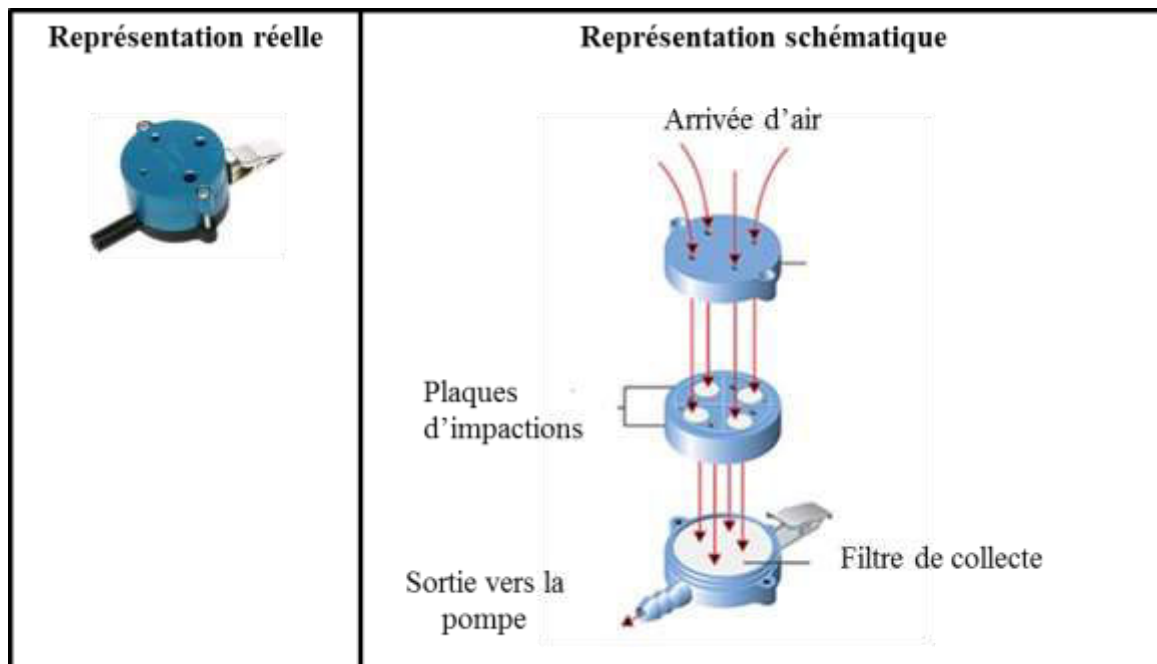


Figure 13 : représentation réelle et schématique d'un "Parallel Particle Impactor" version Thoracique

Les détails du fonctionnement du capteur sont précisés dans la publication de (Trakumas et Salter, 2009). Une étude récente montre que parmi les capteurs du marché conçus pour « mimer » les efficacités de prélèvement de la convention thoracique, les capteurs PPI-thoracique sont parmi les plus fiables (Görner et al., 2017).

2.3.5 Métrologie et analyse des contaminants biologiques

La quantification de bactéries à Gram positif ou négatif et des moisissures peut être réalisée avec des techniques de culture classiques. Toutefois, on distinguera deux méthodes de prélèvement actif : l'impaction directe sur milieu de culture et le prélèvement sur support avec extraction ultérieure en solution. Cette dernière méthode, moins décrite dans la littérature, présente cependant l'avantage de pouvoir analyser en parallèle d'autres contaminants microbiens de la solution d'extraction (poussières et endotoxines).

Les endotoxines se mesurent habituellement à partir d'un prélèvement actif de poussières sur un filtre en fibre de verre dont elles sont ensuite extraites en milieu liquide, comme indiqué au paragraphe précédent. La solution d'extraction est alors utilisée pour quantifier les endotoxines à partir d'une méthode dite « au Lysat d'Amebocytes de Limule (LAL) ». Cette technique fait intervenir une cascade d'enzymes du système immunitaire de limules qui, en présence d'endotoxines, aboutit à la formation d'un substrat mesurable par spectrophotométrie. Cette méthodologie pour la mesure des endotoxines est normalisée, ce qui a permis une harmonisation des pratiques de laboratoires (CEN, 2003). Les travaux de

Spaan et al. ont permis d'optimiser des aspects non décrits dans la norme dont notamment les conditions de transport des échantillons (Spaan et al., 2007). Notons qu'il existe une variante de la méthode (LAL) destinée au dosage spécifique des β -glucanes.

Pour les peptidoglycanes, et à l'inverse des endotoxines, il n'existe pas de méthode de mesure normalisée. (Fox et al., 1995) ont décrit une méthodologie permettant l'analyse de l'acide muramique - qui constitue la « brique » de base pour la synthèse des peptidoglycanes - par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique nécessite cependant un travail de préparation en laboratoire long et coûteux.

Enfin pour les moisissures, une méthode alternative aux techniques de culture consiste à doser l'ergostérol, un composé présent dans la membrane cellulaire des moisissures, par chromatographie liquide à hautes performances. L'ergostérol est en effet un bon marqueur de la charge fongique présente dans l'air (Buiarelli et al., 2013).

2.3.6 Métrologie et analyse des contaminants gazeux

Pour ce qui concerne l'ammoniac, la mesure de l'exposition en milieu de travail s'effectue par prélèvement actif sur filtre imprégné d'acide sulfurique (permettant de retenir l'ammoniac sous forme d'ammonium NH_4^+). L'analyse s'effectue ensuite par dosage des ions ammonium par chromatographie ionique, selon une méthode normalisée (CEN, 2010). Une méthode alternative consiste en l'utilisation directe d'un détecteur de gaz permettant de suivre l'évolution de la concentration d'ammoniac au cours du temps. Cette méthode n'est cependant pas assez sensible pour quantifier les niveaux d'ammoniac présents dans les élevages de bovins laitiers (Kaasik et Maasikmets, 2013).

La mesure de l'exposition aux COVs est plus problématique, du fait de l'absence de méthode dans la littérature visant à mesurer l'exposition d'éleveurs à ces composés. Les méthodes de screening utilisées pour décrire la diversité des composés présents dans les élevages de bovins ne sont pas utilisables pour mesurer l'exposition individuelle et sont relativement imprécises sur le plan quantitatif (Beck et al., 2007), (Sunesson et al., 2001). Une solution envisagée consiste à prélever des composés « traceurs » de l'exposition globale, pour lesquels il existe des dispositifs de mesure individuelle dont les performances sont reconnues. Ainsi, les aldéhydes, émis de façon importante par l'ensilage et source importante de COVs dans les élevages (Hafner et al., 2012, 2013), apparaissent comme des candidats potentiels. Il existe en effet une méthode particulièrement sensible et normalisée (AFNOR, 2011), consistant en un prélèvement des aldéhydes sur cartouche imprégnée de DiNitroPhenyl-

Hydrazine (DNPH), qui peut être réalisée de manière passive ou active. La DNPH, présentant une forte affinité pour les groupements carbonyles, va ainsi réagir au contact des aldéhydes pour former des dérivés d'hydrazone. La quantité d'adduit formée, mesurée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes, est alors proportionnelle à la quantité initiale d'aldéhydes présents dans l'air.

2.3.7 Les dispositifs de prélèvement utilisés durant la thèse :

Afin de récapituler cette partie axée sur la métrologie des contaminants, la figure suivante récapitule les dispositifs de prélèvement individuels que nous avons utilisés dans le cadre de cette thèse pour mesurer l'exposition d'éleveurs laitiers aux poussières thoraciques, endotoxines, bactéries, moisissures, ammoniac et acétaldéhyde.



Figure 14 : illustration des dispositifs de prélèvement utilisés durant cette thèse

3 ETAT DES CONNAISSANCES DES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES DES ELEVEURS LAITIERS

Si les études décrivant les symptômes respiratoires des éleveurs laitiers sont relativement nombreuses, il n'en est pas de même de la caractérisation de leurs expositions aux poussières organiques et aux substances chimiques. En effet, les études d'expositions s'intéressent peu aux éleveurs bovins laitiers mais ciblent davantage les professions agricoles (notamment les éleveurs de porcs) pour lesquelles les travailleurs semblent présenter un risque plus important de développer des maladies respiratoires.

D'autre part, dans les études considérées, les méthodes de mesure et de traitement statistique des données sont rarement comparables. D'ordinaire, la mesure de l'exposition sur le lieu de travail est réalisée à partir de dispositifs individuels, portés par le travailleur généralement pendant une journée de travail, et est censée représenter l'exposition « long terme » des travailleurs. Néanmoins ceci n'est pas systématique, en particulier lorsque l'exposition des travailleurs est très variable d'un jour sur l'autre.

Dans ce contexte, ce chapitre vise à :

- introduire les aspects techniques et méthodologiques nécessaires à la compréhension des études d'exposition réalisées en élevages laitiers.
- décrire ensuite les principaux résultats de ces études concernant les niveaux, la variabilité et les déterminants professionnels de l'exposition aux contaminants de l'air des éleveurs laitiers.
- identifier enfin les axes nécessaires de recherche, en lien avec les chapitres précédents.

3.1 Étude des déterminants de l'exposition professionnelle par construction de modèles empiriques à effets mixtes : intérêt et aspects méthodologiques

Parmi les travaux décrivant les expositions professionnelles agricoles, une partie seulement s'est spécifiquement portée sur les déterminants de l'exposition. Pourtant, la connaissance des déterminants professionnels de l'exposition présente au moins deux intérêts (Burstyn et Teschke, 1999; Preller et al., 1995a) :

- (1) permettre la reconstitution de l'exposition d'une cohorte de travailleurs dans le cadre d'études épidémiologiques selon des modèles d'exposition construits à partir de la connaissance des déterminants.
- (2) permettre l'identification de stratégies de réduction de l'exposition

L'identification des déterminants de l'exposition des éleveurs laitiers aux contaminants de l'air a constitué une part importante du travail réalisé pendant cette thèse, ce qui nécessite d'introduire ici quelques notions méthodologiques sur le sujet.

Il existe différentes techniques plus ou moins sophistiquées permettant l'étude des déterminants de l'exposition, mais l'une des plus fréquemment employées est la construction de modèles de l'exposition dit « empiriques » à partir d'une procédure statistique de régression linéaire à effets mixtes. L'avantage de cette méthodologie réside dans le fait qu'elle permette de tester simultanément l'effet d'un nombre important de déterminants potentiels et d'établir des équations prédictives de l'exposition à partir de ces déterminants (Burstyn et Teschke, 1999; Loomis et Kromhout, 2004; Peretz et al., 2002).

Afin de bien comprendre les choix effectués, rappelons que la distribution des données d'expositions suit habituellement une loi log-normale et que par conséquent l'analyse des données d'exposition est très souvent conduite sur les valeurs log transformées des mesures car les méthodes statistiques requièrent la normalité des observations.

D'une manière générale, les modèles empiriques sont construits à partir d'une base de données de mesures de l'exposition (= la variable « à expliquer ») qui inclut des informations sur les tâches et caractéristiques de sites de travail (= les variables potentiellement « explicatives »). A partir de différentes méthodes de sélection ascendantes ou descendantes, le modèle final ne retiendra que les déterminants qui ont un impact significatif sur l'exposition, tout en leur attribuant un coefficient linéaire proportionnel à leur effet. Ce type de modèle a été utilisé dans de nombreuses études visant à identifier les déterminants de l'exposition (Basinas et al., 2013, 2014; Garcia et al., 2013; Preller et al., 1995b, 1995b; Wameling et al., 2000). La terminologie « modèle à effets mixtes » se réfère à un modèle qui combine deux types d'effets : des effets dits « fixes », et des effets dits « aléatoires ». La suite du chapitre vise à décrire successivement les modèles n'incluant que des effets fixes, ceux incluant uniquement des effets aléatoires et enfin les modèles à effets mixte combinant les deux types d'effets.

3.1.1 Modèle de régression linéaire classique

Une modèle n'incluant que des effets fixes correspond à un modèle de régression linéaire classique. Son application à la modélisation de l'exposition est formulée dans l'équation suivante :

$$\ln(Y_j) = \bar{\mu} + \sum_{1 \rightarrow n} B_n * X_{n,j} + e$$

où :

$\ln(Y_j)$ = Logarithme de l'exposition d'un travailleur j

$\bar{\mu}$ = Moyenne long terme du logarithme de l'exposition de l'ensemble de la population de travailleurs étudiée

B_n = Coefficient de régression associé au déterminant X_n

$X_{n,j}$ = Valeur prise par le déterminant X_n pour un travailleur j. Par exemple, les valeurs prises peuvent être 1 ou 0 pour les caractéristiques respectivement présentes ou absentes ou encore une durée en minutes pour une tâche effectuée.

e = Terme d'erreur d'ajustement du modèle.

L'inconvénient de la régression linéaire classique est qu'elle requiert l'indépendance des observations Y_j . Or ceci n'est que rarement le cas dans un contexte professionnel car d'une part les mesures sont souvent répétées sur un même travailleur et d'autre part il est commun que plusieurs travailleurs appartenant aux mêmes sites de travail soient équipés de dispositif de mesures.

3.1.2 Modèle à effets aléatoires

Un modèle à effets aléatoires permet de prendre en compte cette « non indépendance » définie au paragraphe précédent. Par exemple dans un contexte où des mesures ont été réalisées à k jours différents sur j travailleurs repartis dans i sites de travail, un modèle à effets aléatoires prend la forme suivante :

$$\ln(Y_{i,j,k}) = \bar{\mu} + E_i + \alpha_{i,j} + \varepsilon_{i,j,k}$$

où :

$\ln(Y_{i,j,k})$ = Logarithme de l'exposition d'un travailleur j dans un site i, le jour k,

$\bar{\mu}$ = Moyenne du logarithme de l'exposition de l'ensemble de la population étudiée,

E_i = Écart aléatoire entre l'exposition moyenne $\bar{\mu}$ de la population et l'exposition moyenne μ_i du site i.

$\alpha_{i,j}$ = Écart aléatoire entre l'exposition moyenne μ_i du site i et l'exposition moyenne $\mu_{i,j}$ d'un travailleur j appartenant au site i.

$\varepsilon_{i,j,k}$ = Écart aléatoire entre l'exposition d'un travailleur mesurée un jour k et l'exposition moyenne $\mu_{i,j}$ d'un travailleur j sur un site i.

La figure ci-après illustre schématiquement l'équation générale d'un modèle à effets aléatoires. Cette figure permet en outre de visualiser l'imbrication des variations de l'exposition à 3 niveaux :

- niveau 1 : Variabilité intra-travailleur (aussi appelée variabilité temporelle)
- niveau 2 : Variabilité inter-travailleurs
- niveau 3 : Variabilité inter-sites

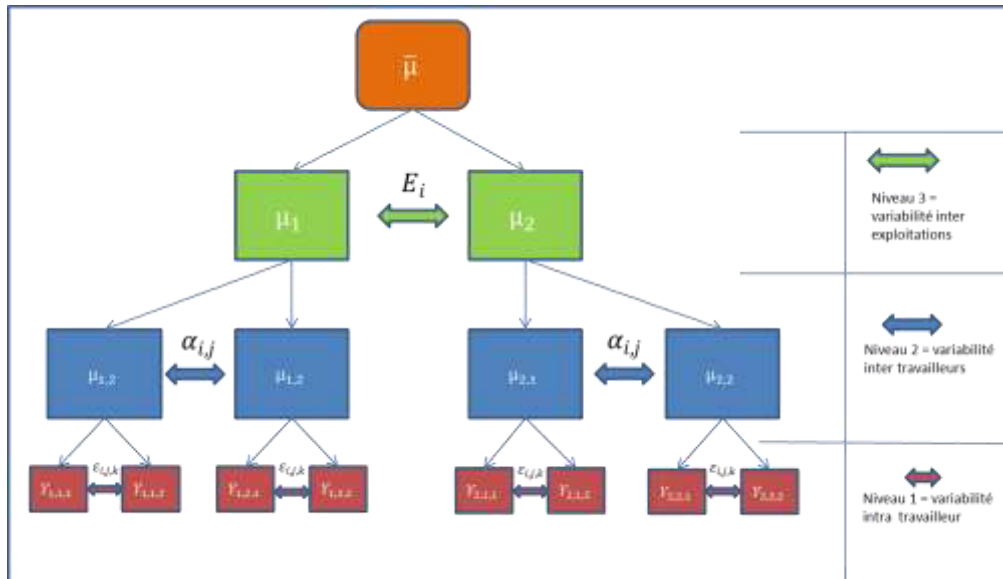


Figure 15 : illustration de la décomposition de la variabilité

Concrètement, le résultat donné par un modèle à effets aléatoires permet une décomposition quantitative de la variance totale de l'exposition en 3 sous composantes : la variabilité intra-travailleur, la variabilité inter-travailleurs et la variabilité inter-sites. Cette décomposition de la variance donne des informations très utiles sur le type de déterminants qui vont impacter l'exposition. Ainsi, si la variabilité inter-sites est plus élevée que les autres composantes, cela suggérera que l'exposition est principalement déterminée par des différences de caractéristiques entre les sites de travail. A l'inverse, si la variabilité intra-travailleur est prépondérante, cela pourra suggérer que l'exposition est principalement déterminée par l'exécution de tâches ponctuelles, qui ne seraient pas systématiquement effectuées lors de chaque journée de travail, ou encore que les modalités de réalisation d'une même tâche pourraient être différentes selon les jours.

3.1.3 Modèle à effets mixtes

Un modèle linéaire à effets mixtes résulte ainsi de la combinaison des 2 modèles décrits précédemment et prend donc la forme suivante :

$$\ln(Y_{i,j,k}) = \bar{\mu} + \sum_{1 \rightarrow n} B_n * X_{n,i,j,k} + E_i + \alpha_{i,j} + \varepsilon_{i,j,k}$$

$\ln(Y_{i,j,k})$ = Logarithme de l'exposition d'un travailleur j dans un site i, le jour k

$\bar{\mu}$ = Moyenne du logarithme de l'exposition de l'ensemble de la population étudiée.

B_n = Coefficient de régression associé au déterminant X_n

$X_{n,i,j,k}$ = Valeur prise par le déterminant X_n un jour k pour un travailleur j appartenant au site i. Par exemple, les valeurs prises peuvent être 1 ou 0 pour les caractéristiques respectivement présentes ou absentes, ou encore une durée en minutes pour une tâche effectuée.

Notons qu'à ce niveau, les termes E_i , $\alpha_{i,j}$ et $\varepsilon_{i,j,k}$ représentent les erreurs d'ajustement du modèle respectivement au niveau du site, du travailleur et du jour de mesure. Leur somme correspond à la variabilité dite « résiduelle » du modèle, autrement dit la part des variations de l'exposition qui n'est pas « expliquée » par le modèle.

Enfin, notons qu'il existe aussi des variantes probabilistes et non plus linéaires des modèles à effets mixtes. Il s'agit principalement de la régression logistique à effets mixtes. Dans ce dernier type de modèle, la relation des déterminants avec l'exposition n'est plus estimée à partir des valeurs quantitatives du logarithme de l'exposition, mais à partir de la probabilité que l'exposition dépasse un certain seuil prédéfini. Ce type de modèle est utilisé dans les cas où un nombre important de résultats inférieurs aux limites de quantification a été obtenu ou lorsque le logarithme ne permet pas de normaliser la distribution de l'exposition.

3.1.4 Exemple illustratif

Pour clore cette présentation méthodologique, nous proposons ci-après un exemple visant à illustrer les différentes notions abordées précédemment et à montrer comment les performances d'un modèle à effets mixtes sont évaluées.

Imaginons d'abord que nous ayons réalisé une campagne de mesures répétées de l'exposition aux poussières thoraciques sur un échantillon d'éleveurs repartis dans différentes exploitations. Nous avons ensuite utilisé un modèle aléatoire pour décomposer la variance de

l'exposition au niveau inter exploitations, inter travailleurs et intra travailleur. Les résultats (fictifs) sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : exemple de décomposition de la variation (modèles aléatoire).

Composantes	Variabilité du modèle aléatoire
inter exploitation	0,49
inter travailleurs	0,29
intra travailleur	1,16
total	1,94

Ils montrent une prépondérance de la variabilité intra-travailleur, et donc probablement une importance forte des tâches réalisées et de leurs modalités de réalisation sur l'exposition.

Nous avons ensuite construit, à partir d'une procédure ascendante, un modèle linéaire mixte décrivant l'exposition aux poussières thoraciques. Le modèle final (fictif) désigne une équation décrivant l'exposition Y en fonction de la durée en minutes de 3 tâches T_1 , T_2 et T_3 et d'une caractéristique d'exploitation C_1 dont la présence est signifiée par la valeur 1 et l'absence la valeur 0 :

$$\ln(Y) = -2,90 + 0,07 * T_1 + 0,04 * T_2 + 0,02 * T_3 - 0,29 * C_1$$

La variabilité résiduelle du modèle est alors la suivante :

Tableau 2 : exemple de variabilité résiduelle d'un modèle mixte.

Composantes	Variabilité résiduelle du modèle mixte
inter exploitations	0,15
inter travailleurs	0,22
intra travailleur	0,64
total	1,01

La mise en parallèle des résultats du modèle aléatoire et de la variabilité résiduelle du modèle mixte final permet d'évaluer les performances explicatives du modèle mixte en calculant la part de variance expliquée de ce dernier.

Tableau 3 : variabilité expliquée par un modèle mixte.

Composantes	Variabilité du modèle aléatoire (naïf)	Variabilité résiduelle du modèle mixte	Variabilité expliquée
inter exploitation	0,49	0,15	70%
inter travailleurs	0,29	0,22	23%
intra travailleur	1,16	0,64	45%
Total	1,94	1,01	48%

On constate à ce niveau que le modèle final explique 48% des variations de l'exposition par rapport au modèle aléatoire simple (aussi appelé modèle naïf dans ce contexte).

3.2 Niveaux, variabilité et déterminants de l'exposition individuelle des éleveurs laitiers

3.2.1 Niveaux d'expositions aux contaminants de l'air

Dans l'ensemble, les études décrivant l'exposition d'éleveurs laitiers et utilisant des dispositifs de mesures individuels, se sont principalement focalisées sur deux contaminants : les fractions inhalables des poussières organiques et des endotoxines. Cependant, dans quelques études, la fraction alvéolaire a aussi été mesurée.

On peut ainsi citer les travaux de Spaan et al. (2006) décrivant les niveaux moyens d'expositions à ces deux contaminants dans divers secteurs agricoles néerlandais, dont celui des éleveurs laitiers. La moyenne géométrique des concentrations dans ces élevages était de $1,3 \text{ mg.m}^{-3}$ de poussières organiques et de 560 UE.m^{-3} d'endotoxines. Au Danemark, une étude, similaire à celle de Spaan et ses collègues, a été réalisée sur un nombre conséquent d'éleveurs laitiers pour lesquels les auteurs ont montré une moyenne géométrique de $1,0 \text{ mg.m}^{-3}$ pour les poussières organiques et de 358 UE.m^{-3} pour les endotoxines (Basinas et al., 2012). Une autre étude menée sur une population d'éleveurs laitiers néerlandais décrit leurs niveaux d'expositions aux poussières inhalables, aux endotoxines et aux β -glucanes (Samadi et al., 2012) : les niveaux moyens d'exposition de la population (moyenne géométrique) étaient de $0,89 \text{ mg.m}^{-3}$ de poussières inhalables, 389 UE.m^{-3} d'endotoxines et $2,44 \text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$ de β -glucanes. Les auteurs ont également réalisé des mesures stationnaires de la flore bactérienne et fongique cultivable. Les moyennes géométriques des niveaux atteints en bactéries totales cultivables et flore fongique cultivable étaient respectivement de $1,13 \cdot 10^4$ et $2,37 \cdot 10^3 \text{ UFC.m}^{-3}$.

Kullman et ses collègues ont aussi mesuré l'exposition individuelle d'éleveurs du Wisconsin aux fractions inhalables et alvéolaires des poussières organiques et des endotoxines : les moyennes géométriques de l'exposition aux poussières inhalables et alvéolaires étaient respectivement de $1,78 \text{ mg.m}^{-3}$ et de $0,07 \text{ mg.m}^{-3}$ (Kullman et al., 1998). Les moyennes géométriques respectives des endotoxines inhalables et alvéolaires étaient quant à elles de 650 et 25 UE.m⁻³. Les auteurs ont aussi examiné la distribution de taille des particules organiques. Leurs résultats indiquent que le diamètre aérodynamique médian des particules collectées était d'environ 10 µm, ce qui suggère un dépôt majeur de ces poussières dans la zone trachéo-bronchique comme l'indique les tables décrites en Annexe 2.

Une étude de Nieuwenhuijsen et ses collaborateurs, décrivant les niveaux moyens d'exposition pendant différentes tâches agricoles (toutes professions confondues), incluait quelques mesures de l'exposition aux endotoxines et à la fraction inhalable et alvéolaire des poussières dans des élevages de bovins laitiers (Nieuwenhuijsen et al., 1999). Si cette étude ne permet pas de situer les niveaux moyens des expositions des éleveurs laitiers, étant donné le faible effectif (1 à 3 mesures par tâche), ses résultats indiquent des concentrations en poussières alvéolaires et en endotoxines environ 10 fois moins élevées que celles mesurées pour la fraction inhalable.

L'étude menée par (Garcia et al., 2013), plus conséquente et spécifique à l'élevage de bovins laitiers, décrit les niveaux d'exposition moyens aux fractions inhalables des poussières, aux PM_{2,5} (assimilables à la fraction alvéolaire) et aux endotoxines : les moyennes géométriques des concentrations de poussières de la fraction inhalable se situent entre $0,91 \text{ mg.m}^{-3}$ et $1,03 \text{ mg.m}^{-3}$ selon les tâches et entre 163 et 368 UE.m⁻³ pour les endotoxines. Les concentrations de poussières de la fraction alvéolaire ne dépassent pas les $0,06 \text{ mg.m}^{-3}$, soit des niveaux au moins 10 fois plus faibles que ceux mesurés pour les poussières inhalables.

Toutes ces études s'accordent donc pour situer l'exposition moyenne aux poussières inhalables entre $0,85 \text{ mg.m}^{-3}$ et $1,5 \text{ mg.m}^{-3}$. L'étendue des niveaux observés en endotoxines inhalables est légèrement plus large, allant de 163 à 560 UE.m⁻³. Les auteurs signalent de nombreux dépassements des concentrations en poussières inhalables et endotoxines par rapport aux valeurs guides fixées à $1,5 \text{ mg.m}^{-3}$ et 90 UE.m⁻³ par l'institut de santé publique néerlandais (DECOS, 2010). Par ailleurs les niveaux d'expositions à la fraction alvéolaire des poussières et des endotoxines sont entre 10 et 20 fois moins élevés que ceux de la fraction inhalable, suggérant un risque sanitaire relativement faible de cette fraction d'aérosols.

Etonnamment, seule une étude suisse de petite envergure s'est intéressée à l'exposition à des poussières de la fraction thoracique chez des éleveurs de vaches laitières installés dans les Alpes (Cathomas et al., 2002). Cette étude montre que la fraction thoracique représente environ 61% des poussières inhalables. Les concentrations moyennes s'élevaient respectivement à $1,6 \text{ mg.m}^{-3}$ et à 1 mg.m^{-3} pour les poussières inhalables et les poussières thoraciques.

3.2.2 Variabilité de l'exposition dans les professions d'élevages

Une forte variabilité intra-travailleur de l'exposition aux bio-aérosols dans les professions d'élevage a été observée dans plusieurs études mesurant l'exposition sur une journée de travail (Basinas et al., 2013, 2014, 2015; Preller et al., 1995a; Samadi et al., 2012). Cela pose un problème dans le contexte de maladies chroniques, car une mesure effectuée sur une journée de travail n'a alors que peu de chance de représenter l'exposition à long terme d'un travailleur. Une raison expliquant une telle variabilité intra-travailleur provient du fait que les tâches réalisées par les travailleurs peuvent varier d'un jour à l'autre. Pour s'affranchir en partie de cette problématique, une stratégie serait d'envisager une étape de caractérisation de l'impact des différentes tâches exposantes au travers de modèles prédictifs suivie d'une acquisition ultérieure des emplois du temps sur le long terme des travailleurs. Cette méthodologie permettrait ainsi une meilleure estimation de l'exposition chronique par rapport à de simples mesures journalières (Preller et al., 1995b; Wameling et al., 2000).

Notons que c'est cette problématique qui nous a incités à utiliser une méthodologie de caractérisation des déterminants de l'exposition par modélisation statistique, comme cela pourra être constaté dans les articles 1 et 2 des travaux réalisés.

Pour déterminer la période des mesures au cours de la journée, nous avons étudié l'activité des éleveurs sur une journée entière dans 5 exploitations. Nous avons constaté que ces activités étaient sensiblement identiques sur les deux demi-journées (traite => nourrissage => entretien de la stabulation). De ce fait, nous avons fait le choix de réaliser systématiquement toutes les mesures sur la matinée pour tous les éleveurs.

3.2.3 Déterminants professionnels de l'exposition

Parmi les études précédemment citées, certaines se sont attachées à identifier les déterminants professionnels de l'exposition des éleveurs laitiers.

Nieuwenhuijsen et ses collègues ont ainsi effectué des mesures individuelles de l'exposition aux fractions inhalable et alvéolaire des poussières organiques et aux endotoxines

associées durant chacune de trois tâches identifiées au sein d'exploitations laitières : la traite, le « nourrissage » et le déplacement d'animaux dans la ferme (Nieuwenhuijsen et al., 1999). Seule la tâche de nourrissage aboutissait à une exposition élevée aux poussières inhalables ($MG = 25.9 \text{ mg.m}^{-3}$) et aux endotoxines inhalables ($MG = 120,38 \text{ UE.m}^{-3}$). Les autres tâches étaient associées à des niveaux inférieurs à $0,69 \text{ mg.m}^{-3}$ de poussières inhalables et inférieurs à $28,39 \text{ UE.m}^{-3}$ d'endotoxines inhalables. Dans l'ensemble, l'exposition des éleveurs à la fraction alvéolaire des poussières organiques était faible : l'exposition aux poussières alvéolaires était inférieure à $0,25 \text{ mg.m}^{-3}$ avec au moins 50% des résultats inférieurs ou approchant la limite de quantification pour chacune des tâches mesurées. L'exposition aux endotoxines alvéolaires était systématiquement inférieure à 24 UE.m^{-3} .

Samadi et ses collègues ont quant à eux étudié les effets des matériaux utilisés pour la litière des vaches, dans le cadre d'une campagne de mesures incluant 130 mesures individuelles de l'exposition à la fraction inhalable des poussières, aux endotoxines, et aux β -glucanes (Samadi et al., 2012). Certaines fermes n'utilisaient pas de matériaux pour la litière des vaches, mais uniquement des tapis en caoutchouc. Les effets des différents types de litières ont été étudiés grâce à des modèles linéaires à effets mixtes. Les résultats montrent que l'exposition est plus élevée dans les fermes utilisant la litière de type compost. La litière constituée de tapis en caoutchouc aboutissait à l'exposition la plus faible. Cette tendance a aussi été observée pour les bactéries et moisissures.

Garcia et ses collaborateurs ont mené une étude dans 13 grandes exploitations laitières en Californie (Garcia et al., 2013). 220 mesures individuelles répétées de l'exposition journalière aux poussières et aux endotoxines des fractions inhalables et alvéolaires ont été réalisées. Les déterminants étudiés étaient exclusivement des tâches : le nourrissage de vaches, la traite, le renouvellement des litières des vaches, le déplacement des animaux, l'évacuation du fumier, les soins médicaux sur animaux et la maintenance des équipements ou des bâtiments. Une augmentation des durées de renouvellement des litières et de nourrissage étaient associées à une augmentation de l'exposition à tous les contaminants. Les autres tâches n'étaient associées à aucune augmentation ou réduction de l'exposition, quels que soient les contaminants considérés.

L'étude de Basinas et ses collègues est, de loin, celle qui a permis les avancées les plus importantes dans la compréhension des déterminants de l'exposition des éleveurs laitiers à la fraction inhalable des bio-aérosols (Basinas et al., 2014). Leur approche a permis d'étudier l'effet conjoint des caractéristiques d'exploitation et des tâches effectuées par les éleveurs, au

travers d'une campagne de 120 mesures individuelles de l'exposition aux poussières et aux endotoxines inhalables, grâce à l'utilisation de modèles linéaires à effets mixtes. Les durées des tâches associées positivement à l'exposition étaient le nourrissage, le renouvellement des litières, la manipulation de grain et la traite. Seules deux tâches étaient négativement corrélées à l'exposition aux poussières : l'entretien des appareils de l'exploitation et le nettoyage de la salle de traite. Les exploitations utilisant des systèmes de traite automatisés étaient associées à une exposition aux poussières inhalables supérieure de 86% à celle mesurée dans les exploitations équipées d'un système de traite classique (trayeuse fixée manuellement par les éleveurs sur les pis des vaches). La présence de racleurs sur rail automatique étaient associés à une réduction de l'exposition aux poussières d'environ 40%. Enfin, concernant la gestion du fumier, les systèmes impliquant une plus faible fréquence d'évacuation du fumier étaient associés à une augmentation de l'exposition aux endotoxines de plus de 100%. Les modèles multivariés obtenus par Basinas et al (2014) expliquent respectivement 36% et 41% de la variabilité de l'exposition aux poussières et aux endotoxines. Les auteurs concluent ainsi à une prédominance de l'impact des tâches, par rapport à celui des caractéristiques des fermes, sur la détermination des niveaux d'expositions. Les modèles multivariés intermédiaires n'incluant que les tâches permettaient d'expliquer à eux seuls 27% de la variabilité de l'exposition aux poussières et 31% de la variabilité de l'exposition aux endotoxines.

3.3 Synthèse : quels besoins de recherches en matière de caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers ?

Bien que les résultats décrits au paragraphe 3.2 aient permis des avancées dans la compréhension des expositions professionnelles des éleveurs, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats car les modalités d'organisation de l'élevage laitier présentent une forte disparité régionale et mondiale. Cette partie finale de cette large introduction vise donc à expliquer les besoins, en matière de caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers, qui ont justifié les travaux réalisés durant cette thèse.

3.3.1 Etude des déterminants de l'exposition aux bactéries à Gram positif, aux moisissures, à l'ammoniac et aux COV

Il n'existe à notre connaissance que des études décrivant les déterminants de l'exposition d'éleveurs laitiers aux poussières organiques et aux endotoxines inhalables. Dans ce contexte, des auteurs indiquent qu'une connaissance plus approfondie des déterminants et des niveaux d'exposition à d'autres constituants microbiens des bio-aérosols est nécessaire, pour mieux

comprendre l'étiologie des symptômes et/ou des pathologies respiratoires observées chez les éleveurs et mieux identifier les mesures de prévention pouvant être mises en place (May et al., 2012; Reynolds et al., 2013). Il s'agit notamment d'étudier les déterminants expliquant les expositions aux bactéries à Gram positif et/ou à leurs marqueurs (peptidoglycanes), aux moisissures et/ou à leurs marqueurs (l'ergostérol et les β -glucanes), et à l'ammoniac. Les composés organiques volatils qui présentent une large diversité (Beck et al., 2007a; Sunesson et al., 2001) et qui pourraient avoir des effets complémentaires à ceux des bio-aérosols, mériteraient d'être étudiés de manière prospective.

3.3.2 Etude de la fraction thoracique des bio-aérosols : déterminants et effets inflammatoires

La fraction d'aérosol étudiée dans les fermes laitières reste très majoritairement la fraction inhalable. La fraction alvéolaire a été étudiée de manière moins exhaustive, mais les études indiquent généralement des niveaux d'expositions faibles aux poussières alvéolaires. Par définition, ces études occultent une partie significative des aérosols (les particules trachéo-bronchiques de la fraction thoraciques) susceptibles de provoquer des effets délétères sur les voies aériennes comprises entre le larynx et les alvéoles pulmonaires. Seule une étude s'est intéressée à l'exposition à la fraction thoracique des éleveurs laitiers (Cathomas et al., 2002). Or, plusieurs arguments justifient une étude plus approfondie des expositions à aux poussières thoracique et à leurs déterminants professionnels.

Premièrement, la fraction thoracique est pertinente vis-à-vis des pathologies respiratoires des voies aériennes inférieures, car elle inclut plus spécifiquement les particules susceptibles de se déposer dans les zones respiratoires où se développent ces maladies, tout en excluant les particules se déposant dans les voies aériennes supérieures qui pourraient être la source de biais dans le cadre d'études épidémiologiques.

De plus, certains déterminants de la fraction inhalable des aérosols pourraient ne pas impacter la fraction thoracique s'ils n'induisent que l'émission d'aérosols grossiers, incapables de se déposer profondément dans les poumons. Ainsi, une étude récente indique notamment que les aérosols générés pendant la traite contiennent très majoritairement des particules de grande taille (Schaeffer et al., 2017). En conséquence, bien que cette tâche augmente l'exposition aux particules inhalables (Basinas et al., 2014), il est probable qu'elle n'accroisse pas celle aux particules thoraciques et qu'elle ne contribue donc pas au développement de symptômes respiratoires chez les éleveurs. Il semble donc nécessaire de clarifier la nature des déterminants spécifiques de l'exposition aux bio-aérosols thoraciques, car il est probable que la distribution de tailles de particules ainsi que la répartition des

contaminants microbiens diffèrent notamment d'une tâche à l'autre. L'intérêt principal est d'éviter de possibles biais de classement différentiel sur l'exposition dans de futures études étudiant l'incidence de maladies respiratoires tels que l'asthme et la BPCO.

Enfin, il est possible que les effets biologiques des poussières thoraciques ne soient pas comparables à ceux de particules grossières, notamment vis-à-vis des cellules épithéliales bronchiques ou des macrophages qui jouent un rôle essentiel dans le développement des pathologies respiratoires inflammatoires chroniques observées chez les éleveurs. De plus, les particules de la fraction inhalable, notamment les poussières extra-thoraciques, n'accèdent pas ou très peu à ces types cellulaires présents dans les zones trachéo-bronchiques. Il apparaît donc plus pertinent, au plan physiopathologique, d'étudier *in vitro* les réponses inflammatoires des cellules épithéliales bronchiques ou des macrophages exposés aux particules de la fraction thoracique.

3.3.3 L'impact des tâches selon leurs modalités de réalisation

Les études de Nieuwenhuijsen et al (1999, 1998) ont montré que les niveaux d'exposition des agriculteurs non laitiers aux bio-aérosols diffèrent fortement selon qu'une tâche est effectuée manuellement (seaux et pelles) ou mécaniquement (à l'aide d'un tracteur par exemple). Cette variabilité est aussi présente dans les modalités de réalisation de certaines tâches effectuées par les éleveurs laitiers. C'est le cas notamment de la distribution de l'alimentation aux vaches et du renouvellement de leur litière (manuellement et/ou mécaniquement). Mais l'impact de ces différents modes de réalisation des tâches, de même que la variabilité des activités selon les saisons n'ont pas encore été étudiés dans le cadre de l'élevage laitier.

4 OBJECTIFS DE LA THESE

Le sujet de ce travail de thèse a été initié par le Professeur Stéphane Jouneau qui coordonne également le déroulement de l'étude AIRBAg. L'objectif général de mes recherches consistait à évaluer quantitativement et qualitativement les expositions professionnelles aux aéro-contaminants d'éleveurs laitiers bretons, afin de reconstituer ultérieurement l'exposition des éleveurs issus de la cohorte AIRBAg et de permettre l'identification des facteurs de risques pouvant contribuer aux pathologies respiratoires diagnostiquées chez ces agriculteurs.

- Le premier objectif spécifique de cette thèse a été d'étudier l'exposition des éleveurs laitiers aux poussières organiques de la fraction thoracique, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde comme marqueur des COVs. Concernant les poussières organiques, nous avons caractérisé les expositions personnelles aux microorganismes de manière non sélective en mesurant les concentrations d'endotoxines, de bactéries cultivables et de moisissures dans les échantillons collectés. La justification de ces choix découle du contexte scientifique expliqué précédemment dans ce document de thèse.

- Le second objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier les déterminants des expositions des éleveurs aux poussières organiques, à l'ammoniac et à l'aldéhyde. La caractérisation quantitative de l'impact des déterminants professionnels sur l'exposition des éleveurs a été réalisée en utilisant des modèles statistiques multivariés à effet mixtes.

- Le dernier objectif a été de caractériser les effets biologiques des poussières organiques de la fraction thoracique collectées durant le paillage mécanisé par des mesures statiques ambiantes dans les exploitations d'élevage laitier. Cette tâche est connue pour être particulièrement exposante aux particules inhalables. Pour cela, nous avons analysé *in vitro* les réponses inflammatoires de macrophages humains en culture primaire exposés aux poussières organiques mises en suspension dans le milieu de culture.

Ces travaux de recherche devaient permettre de mieux connaître les expositions des éleveurs laitiers bretons en décrivant pour la première fois les déterminants de leurs expositions à la fraction thoracique des bio-aérosols et à des contaminants chimiques jusqu'ici peu étudiés. A terme, ces travaux de recherche pourraient permettre d'utiliser des modèles statistiques complexes pour la reconstitution quantitative de l'exposition des éleveurs laitiers ayant répondu à des questionnaires détaillant leurs activités professionnelles, et cela sans avoir recours à des mesures de terrain.

Les résultats de ces travaux de thèse sont présentés dans la seconde partie de ce document et font l'objet :

- d'un premier article décrivant les déterminants de l'exposition aux poussières organiques, aux endotoxines, aux bactéries à Gram positif et aux moisissures cultivables de la fraction thoracique. Ce travail sera soumis prochainement.
- d'un second article en cours de rédaction caractérisant les déterminants de l'exposition à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde.
- d'un troisième article, publié dans le journal « Environmental Research » démontrant les effets pro-inflammatoires *in vitro* des poussières organiques de la fraction thoracique émises lors du paillage mécanisé.

PARTIE 2 : TRAVAUX REALISES

5 TRAVAUX REALISES

ARTICLE 1

Déterminants de l'exposition aux poussières, aux endotoxines, aux bactéries Gram positif et aux moisissures de la fraction thoracique des particules inhalées par les éleveurs laitiers durant leurs activités professionnelles

Cette première partie des résultats est résumée ci-dessous. Elle est ensuite présentée en détail dans un article en anglais qui sera soumis prochainement.

Méthodes

Campagnes de mesures

Les niveaux et déterminants de l'exposition professionnelle aux bioaérosols des éleveurs laitiers bretons ont été étudiés lors d'une campagne de mesures individuelles répétées. 29 exploitations d'Ille et Vilaine et du Morbihan ont été sélectionnées pour participer à l'étude, incluant un total de 42 éleveurs différents. Des mesures ont été organisées pour chaque ferme à 3 périodes différentes de l'année afin de couvrir les variations saisonnières potentielles de l'activité des éleveurs. 112 mesures pour chacun des contaminants ont été acquises. Dans chaque ferme, au moins un éleveur a été équipé 3 fois (une mesure à chacune des périodes de l'année prédéfinies). Les autres travailleurs ont été équipés 2 à 3 fois. Les mesures ont eu lieu pendant la matinée de travail, avec l'hypothèse d'une activité d'élevage relativement identique entre la matinée et l'après-midi comme cela a été expliqué dans la partie "Contexte scientifique". Les éleveurs étaient équipés d'un dispositif de prélèvement actif « parallèle particule impactor - Thoracic » placé au niveau de leurs thorax. Ce dispositif permet de sélectionner la fraction thoracique des aérosols. Les contaminants ont été collectés sur des filtres en fibres de verre. En parallèle des mesures de l'exposition, les déterminants potentiels de ces expositions, c'est-à-dire les tâches et les caractéristiques d'exploitation, ont été répertoriés et consignés par observation directe du technicien réalisant la mesure.

Méthodes analytiques

La concentration en poussières a été mesurée par gravimétrie. Après une extraction des poussières en phase liquide, i) les endotoxines ont été quantifiées par la méthode au lysat

d'améboocyte de limule (LaL) et ii) les bactéries et les moisissures ont été dénombrées après leur culture sur les milieux sélectifs tryptone-soja (TSA) et Dichloran-Glycérol (DG 18) respectivement. Cependant, seules les bactéries à Gram positif ont pu être cultivées et ont donc pu être prises en compte dans les analyses statistiques.

Analyses statistiques

Les effets de déterminants potentiels de l'exposition ont ensuite été analysés en utilisant des modèles de régression à effets mixtes, linéaire pour les poussières thoraciques endotoxines et bactéries à Gram positif, ou logistique pour les moisissures. Des effets aléatoires hiérarchiques ont été spécifiés dans chacun des modèles sur l'identifiant des exploitations et sur l'identifiant des travailleurs. La première étape de l'analyse a consisté en une analyse bi-variée visant à sélectionner les déterminants retenus pour l'analyse multivariée. Seuls les déterminants présentant une p-value inférieure à 0,25 en analyse bi-variée ont été sélectionnés comme déterminants potentiels. La seconde étape de l'analyse statistique a consisté en la construction de modèles multivariés selon une procédure ascendante à partir des listes de déterminants potentiels obtenues pour chaque contaminant.

Résultats et discussion

Les résultats ont permis de mettre en évidence des déterminants significatifs de l'exposition à chaque contaminant. Les modèles sont constitués de 4 à 5 tâches ainsi que de 3 à 4 caractéristiques d'exploitation. La variabilité totale expliquée par les modèles linéaires est respectivement de 46%, 48% et 40% (R^2) pour l'exposition aux poussières thoraciques, aux endotoxines et aux bactéries à Gram positif. L'aire sous la courbe ROC du modèle logistique établi pour l'exposition aux moisissures est de 0,86, une valeur pouvant être considérée comme assez performante.

La variabilité expliquée par nos modèles est légèrement supérieure à celle décrite dans des études similaires concernant les expositions à la fraction inhalable des poussières organiques et des endotoxines (Basinas et al., 2014; Preller et al., 1995). Ces meilleures performances sont attribuables à la plus grande précision du recueil de la durée des tâches, effectué par observation directe dans notre étude, à l'inverse des études précédentes pour lesquelles le recueil était effectué par des questionnaires transmis aux éleveurs après les mesures.

La distribution de grain et le déversement de matériaux de litières, qui ont déjà identifiés précédemment comme des tâches contribuant fortement à l'augmentation de l'exposition à la fraction inhalables des poussières organiques et des endotoxines, impactent également très significativement les expositions à la fraction thoracique des différents contaminants étudiés.

En particulier, ces deux tâches augmentent significativement l'exposition aux bactéries Gram positif et aux moisissures, suggérant ainsi qu'elles puissent constituer des activités à risque pour la santé respiratoire des éleveurs. Les expositions sont également modulées selon les modalités de réalisation manuelle ou mécanique des tâches. C'est le cas notamment du paillage mécanisé, qui augmente fortement l'exposition à tous les contaminants, alors que le paillage manuel n'augmente que l'exposition aux poussières thoraciques et aux moisissures. Des différences ont également été constatées concernant le chargement et la distribution d'ensilage, la manipulation de foin et le raclage du fumier. On peut également noter que le chargement et la distribution manuels d'ensilage est une tâche augmentant spécifiquement l'exposition aux moisissures. L'ensilage pourrait donc constituer une source importante de moisissures. D'autres résultats importants de notre étude sont le fait que la durée de la traite et le déplacement d'animaux n'ont pas d'impact significatif sur l'exposition à la fraction thoracique des bioaérosols. C'est une différence notable avec une étude précédente où ces deux tâches augmentaient significativement l'exposition à la fraction inhalable des poussières et des endotoxines (Basinas et al., 2014).

Concernant les caractéristiques d'exploitation agricoles, les stabulations organisées en logettes permettent de réduire significativement les expositions aux moisissures et aux bactéries à Gram positif, comparativement à celles mesurées dans les stabulations en aire paillée. En effet, les stabulations en logette utilisent en général moins de matériaux dans les litières et sont plus régulièrement entretenues par les éleveurs. Cette organisation induit des conditions moins favorables à la croissance des micro-organismes et donc une exposition plus faible des éleveurs. Une augmentation de la surface des ouvertures des murs de la stabulation permet elle aussi de réduire significativement l'exposition aux moisissures. Cet effet est probablement attribuable à une baisse de l'hygrométrie à l'intérieur des stabulations, qui est alors moins favorable à la croissance de moisissures. Les affouragements composés d'herbe ou d'ensilages d'herbe permettent aussi de réduire l'exposition aux poussières thoraciques, aux endotoxines ainsi qu'aux bactéries à Gram positif. Néanmoins les fermes présentant ces caractéristiques d'affouragement sont relativement peu nombreuses dans notre échantillon, et ces résultats nécessitent d'être confirmés. En revanche, une alimentation basée sur un système d'affouragement constituée majoritairement d'ensilage de maïs augmente significativement l'exposition aux moisissures confirmant ainsi que ce produit est une source importante de moisissures.

Dans l'ensemble, les effets de ces caractéristiques d'exploitation sur l'exposition aux divers constituants des bioaérosols étaient inconnus. Ces nouvelles connaissances pourront être utiles pour la reconstitution de l'exposition des éleveurs inclus dans la cohorte AIRBAg .

Determinants of dairy farmers' exposure to thoracic organic dusts

Hugo Pfister^{a,b}, Laurent Madec^{b,c}, Pierre Le Cann^{b,c}, Nathalie Costet^b, Valérie Lecureur^b,
Martine Chouvet^a, Stéphane Jouneau^{b,d} and Laurent Vernhet^{b,*}

^aInstitut technique des gaz et de l'air, Saint-Grégoire, France

^bUMR Inserm 1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, Rennes, France

^cFrench School of Public Health, Department of Environmental and Occupational Health and Sanitary Engineering, Rennes, France

^dService de pneumologie, centre de compétences des maladies pulmonaires rares de Bretagne, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

***Corresponding author:** Laurent VERNHET, Inserm U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes.
Phone: 33-2-23-23-48-07; Fax: 33-2-23-23-47-94; E-mail : laurent.vernhet@univ-rennes1.fr

1. Introduction

Several studies have shown that the incidence of respiratory symptoms, associated with chronic bronchitis, non-atopic asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), is higher in dairy farmers than in general population (Dalphin et al., 1998; Gainet et al., 2007; Omland et al., 2011; Baur et al., 2012; Reynolds et al., 2013). This increased risk of pulmonary diseases may result from the repeated inhalation of organic dusts by dairy farmers (Eduard et al., 2009; Thaon et al., 2011; Jouneau et al., 2012; Marescaux et al., 2016)

Organic dusts, also called bio-aerosols, are constituted of particles originating from plants, animals and microbes (Douwes et al., 2003). The most investigated microbial agent, present in organic dusts collected from dairy farms, is probably endotoxin, a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria walls. Bacterial endotoxins, such as lipopolysaccharides, are known to induce potent inflammatory responses both *in vitro* and *in vivo* in experimental studies, and are considered as strong inducers of lower respiratory symptoms in cattle workers (Donham et al., 1995; Vogelzang et al., 1998). However, compounds from Gram-positive bacteria (peptidoglycans) and moulds (glucans) also constitute strong organic dust markers that likely contribute to chronic inflammatory responses (Larsson et al., 1999; Poole et al., 2009; May et al., 2012; Poole and Romberger, 2012).

When investigating the impacts of organic dust exposure on the development of lower respiratory symptoms, an important factor to consider is the ability of particles to reach low bronchial areas where COPD, asthma or chronic bronchitis are thought to develop. Interaction of organic dusts with the respiratory tract is mainly determined by the particle size distribution of bio-aerosols, and thus only a fraction of these particles can reach the bronchial tract. On this topic, the European EN481 norm (CEN, 1993) has defined three aerosol fractions linking particle size to how far a particle can move into the respiratory tract: (1) the inhalable fraction which refers to particles that are able to penetrate anywhere in the respiratory tract - including extra-thoracic particles that deposit up to the larynx, (2) the thoracic fraction describing particles that reach bronchial region and below, and (3) the respirable fraction defining the part of an aerosol which can enter the alveolar region. With regards to respiratory symptoms, the thoracic fraction appears to be very useful to adequately describe dairy farmer exposure to organic dusts.

Surprisingly, determinants of dairy farmers' exposure to bio-aerosols have mostly been assessed by collecting the inhalable fraction of organic dusts during occupational work (Spaan et al., 2006; Samadi et al., 2012; Basinas et al., 2012; Garcia et al., 2013; Basinas et al., 2014). These studies have clearly demonstrated that several operations repeatedly expose dairy farmers to inhalable dusts, but they could not highlight the tasks that more specifically produced thoracic dusts. However, Cathomas et al. (2002) have reported that the particulate matter (PM) 10 fraction, defined as particles having a 50 % cut-off aerodynamic diameter of 10 μm and being rather similar to thoracic dusts, account for the majority of total dusts collected in Swiss barns during working days in winter and summer. In addition, we have recently shown that thoracic dusts with a 3 to 10 μm size, constitute the main fraction of dusts emitted during mechanical straw spreading, a task known to strongly increase dairy farmer's exposure to inhalable dusts (Basinas et al., 2014; Garcia et al., 2013; Pfister et al., 2017). These studies thus suggest that dairy farming can expose workers to thoracic dusts, but farm characteristics and tasks that generate these particles remain to be further investigated.

A precise description of determinants inducing dust release is required to fully reconstitute daily worker's exposure and, at term, identify effective prevention strategies (Burstyn and Teschke, 1999). In this context, it may be hypothesized that tasks releasing inhalable and thoracic dusts may not be similar because some operations can mainly generate large particles unable to reach low bronchial areas whereas others can specifically emit smaller dusts. Moreover, the biological composition of thoracic dusts probably differs according to these working tasks. To answer these issues, the present study was designed to i) quantify farmers' exposure to thoracic dusts, ii) determine endotoxin, cultivable bacterial and mould concentrations in these thoracic dusts and iii) identify farm characteristics and occupational tasks that promote or reduce exposure to organic thoracic dusts. These researches have been carried out in 29 French dairy farms located in Brittany using repeated personal measurements, on-farm task recording and farm characteristic description. Associations between these parameters were analysed by linear and logistic mixed-effect models.

2. Materials and methods

2.1 Sampling design

Dairy farms ($n = 29$) were randomly selected from the Breton "Mutualité sociale agricole" (MSA) register. MSA is the French social security of farmers. All farms selected

were located in the department of Ille-et-Vilaine. When farmers accepted to be enrolled in the study, three visits of their farm were planned at different periods covering activities and climatic changes over the year. If farms were not run by a unique farmer, one or two other farmers were also asked to participate. The three periods of measurement were defined by the annual calendar of Brittany dairy activities published by MSA: i) the winter season from the 1st of November to 28th of February. During this period cows are permanently kept in stable in most farms, implying a relative high work in barns; ii) the spring season from 15th of March to 31th of May. The cows go pasturing and several field operations are carried out to prepare the cultures (sowing seeds, ploughing, fertiliser spreading...); iii) the summer season from 1st of July to 31th of October. Cows are mainly kept outdoor for pasturing, and less works are required in barns. Measurements in farms, at each period, were planed independently of their location or activity, and were only limited by the farmer's agreement.

2.2 Exposure monitoring

Three to seven personal measurements were performed in each farm during the measurement campaign. All measurements were performed during morning shift in all dairy farms as farmer's activities were generally similar during the morning and the afternoon. Overall, 37-38 measurements were recorded at each season and a total of 110-112 measurements were performed for thoracic dusts, endotoxins, cultivable Gram-positive bacteria and moulds. On average, samplings were performed for 227 min (SD = 71 min) in winter, 216 min (SD = 68 min) in spring season and for 247 min in summer (SD = 94 min). Thoracic dusts, endotoxins, cultivable bacteria and moulds were collected on a 37-mm glass fiber filter with a pore size of 0.8 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) using a thoracic Parallel Particle Impactor (PPI)-T (Tecora, Paris, France) connected to a personal sampling pump (Aircheck 2000, Tecora, Paris, France) operating at 2 L/min (Görner et al., 2017). Airflow was checked before and after sampling. Air inlet of the PPI was attached at shoulder level in the personal breathing zone. After sampling, filters were transferred from PPI to a classical 37-mm diameter cassette and kept at 4°C for transport to the laboratory. For each week of sampling, one field blank and one laboratory blank were carried out.

2.3 Gravimetric analysis and extraction of thoracic dusts

To measure dust masses, glass fiber filters were weighed pre and post sampling. Prior to each weighing, filters were conditioned one night in a controlled environment (hygrometry 35-50 %, temperature 18-22°C). Then, filters were weighed on an electronic micro-balance (model Precisa 2000, minimum resolution of 0.01 mg, Mettler Toledo, Columbus, Ohio,

USA) before and after dust sampling. The limit of quantification (LOQ) of the method was 0.08 mg per filter. Data below the LOQ (n=15) were assigned an imputed value following the EN 689 procedure (CEN 1996). Directly after weighing, filters were extracted in 10 mL pyrogen free water (Lonza, Walkersville, USA) supplemented with 5 % tween-20 buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), shaken at 2000 round/min four 1 hr at room temperature and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. Extracts were next used for microbial analyses.

2.4 Endotoxin measurements

Endotoxins present in extracts were quantified using the quantitative kinetic Limulus Amebocyte Lysate test from Lonza (Walkersville, USA). Samples were tested in duplicate using adequate dilutions to obtain data below the upper end of the standard curve. The LOQ of the method was 0.05 EU per filter.

2.5 Cultivable bacteria and moulds

Cultivable bacteria were grown on Trypton soy agar media (Biokar, Beauvais, France). 100 µl extracts, tested in duplicate, were plated on culture media at 1:10, 1:100, and 1:1000 dilutions and incubated for 48 hr at 36°C. To differentiate Gram-positive and Gram-negative bacteria, Gram coloration was performed using gentian violet, Lugol, 96 % alcohol (V/V) and carbol fuchsin reactants (Millipore, Radnor, Pennsylvania, USA). Cultivable moulds were grown on dichloran-glycerol agar (Biokar, Beauvais, France). 100 µl extracts, tested in duplicate, were plated on agar at 1:10, 1:100, 1:1000 dilutions and incubated for 3-7 days at 24°C. Quantification of colonies was performed on days 3, 5 and 7 after inoculation. The LOQ was 100 CFU per filter for both cultivable bacteria and moulds. Data below the LOQ (n = 29 for bacteria and n = 47 for moulds) were assigned an imputed value following the EN 689 procedure (CEN, 1996).

2.6 Farm description

Selected dairy farms were typical family-run farms present in Brittany. Nine farms were run by only one farmer and the others included 2 to 5 farmers. For the measurement campaign, a maximum of 3 farmers by farms were monitored in parallel. Farms typically comprised free stalls, a main stable to house lactating cows and one to five other compartments for calve housing or feed storage. The mean number of lactating cows was 78 (SD = 31). Main stables were generally ventilated through opening on walls. Ventilation was therefore investigated through two indicators: the surface of wall opening and the surface of wall opening normalised to stable surface. Main characteristics of the dairy farms are

summarized in the Table 1a. Straw was used as bedding materials for the main stable in 26 farms. Bedding materials were saw dust or shredded straw in the three other farms. Milking of cows was done manually in herringbone parlours in 25 farms. The other farms use automatic milking systems.

In most dairy farms, corn silage or a mix of corn silage and haylage, used as fodder, was distributed to the cows kept housed in stables. In two farms, workers possessed a fodder system constituted of only raw grassland or haylage. Generally, fodder was mechanically distributed using a tractor. Grains or dry compounds, either manually or mechanically mixed with silage in a feed mixer, were also frequently added to cow feeding. Most farmers kept their cows pasturing at meadows when favourable climatic conditions were present. However, cows were permanently housed in stable in farms equipped with an automatic milking system. Occurrences for these characteristics in the 29 farms participating to the study are presented in the Table 1b.

2.7 Collection of data on determinants

Exposure determinants were recorded on preformatted data sheets. These sheets were written according to the specific Breton dairy practises and to the results of previous studies describing farmers' exposures (Jouneau et al., 2012),(Basinas et al., 2014),(Samadi et al., 2012),(Garcia et al., 2013). The durations of working tasks performed by each farmer during sampling were directly recorded by the technician (Institut Technique des Gaz et de l'Air) conducting measurements. A particular attention was given to the tasks that can be made manually or mechanically using a tractor. Characteristics of feeding systems, stable features, slurry and manure management, and milking methods were also recorded by the technician. These data are described in Table 2.

2.8 Data analysis

Duration of morning shift was highly variable within dairy farms and between farmers; its mean value was 210 min. Therefore, farmers' exposures were expressed using the 210-min time-weighted average concentrations. Natural logarithms of the time-weighted average values were also calculated to normalize the distribution and perform statistical analysis. The geometric mean (GM) and geometric standard deviation were used to describe the exposure measurement.

2.9 Effects of tasks and farm characteristics on the contaminant exposure levels

All tasks and farm characteristics with less than 5 observations were excluded from the analysis. The effect of tasks and farm characteristics on the levels of exposure to thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria were investigated with mixed-effect linear models. As the number of potential exposure determinants was large, we used a 2 step procedure: (1) for each contaminant, a bivariate analysis was performed with each determinant. Farms and workers within the farms were considered as nested random effects. A naïve mixed effect model (including only random effects) was compared with another model including each determinant as a fixed effect, using likelihood ratio test. Determinants with a *p*-value below 0.25 were selected as candidates for multivariate analysis. (2) multivariate linear mixed-effect models were then implemented. The candidate variables selected from the bivariate analysis were introduced iteratively following a forward process based on the minimization of the Akaike Information Criterion (AIC), with a threshold of significance at 0.05. The tasks were treated as quantitative variables, using their duration. Most farms characteristics were treated as dichotomous variables (presence = 1, absence = 0) except for hygrometry, temperature, cows number, and surface of the wall opening that were treated as quantitative variables using their respective units (Table 2a). Surface of the wall opening normalized on stable surface was used as a quantitative variable or a dichotomous variable (using the 75th percentile value of 0.36m²/m² as cut-off). Variability explained by multivariate models was calculated to evaluate their quality.

Due to a large proportion of mould measurements below the LOQ (n=47, 41%) linear mixed effect modelling could not be applied and a mixed effect logistic model was used instead. Mould exposure was recoded as a dichotomous variable using 1000 CFU.m⁻³ value as cut-off to define exposed farmers (= 1) and unexposed farmers (= 0). This cut-off was derived from the Swiss guide value for occupational exposure to moulds (SUVA, 2013). The previous procedure was then applied, as described above (bivariate selection followed by iterative forward procedure), to investigate the potential impact of determinants on mould exposure. Area under the ROC curve was used to assess discriminating ability of the multivariate logistic model. All statistical analyses were performed using the R package lme4 (Bates et al., 2014) and ROCR (Sing et al., 2005).

3 Results

3.1 Farm characteristics and tasks performed by workers

The main farm characteristics and tasks performed by workers, with their relative frequency of occurrence, are summarized in the “materials and methods” section and listed in the Tables 1 and 2, respectively.

3.2 Mean levels of personal exposure to thoracic dusts, endotoxins and microbial agents.

Mean levels of thoracic dusts, endotoxins, cultivable Gram-positive bacteria and moulds collected in the 29 farms are presented in Table 3. Gram-negative bacteria could only be quantified in two samples and are not shown in this Table. Seasonal variations of exposure were observed for the three microbial contaminants. GM levels of inhaled endotoxins were the highest in winter, intermediate in spring and the lowest in summer, showing a decreasing trend when the temperature increased. In contrast, Gram-positive bacteria and mould exposure levels were increased in summer and the lowest in spring. Spring was also the season at which the highest numbers of values below the LOQ were measured.

3.3 Bivariate statistical analysis

Results of the bivariate statistical analysis assessing the effects of tasks and farm characteristics on farmers’ exposures are summarized in Table S1 and S2, respectively. Only results with *p*-values below 0.25 were next selected for multivariate analysis as explained in the Materials and Methods section.

3.4 Determinants of thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria

Results of the multivariate linear mixed-effect models describing the effects of performed tasks and farm characteristics on exposure to thoracic dusts, endotoxins and cultivable Gram-positive bacteria are shown in Table 4. Due to the hierarchical sampling design, three components of variance were calculated: the “Between-farms”, the “Between-workers” and the “Within-farmers” (day-to-day) variances. The “Within-farmers” variance was the dominant component variance of exposure to thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria that accounted for 69 %, 60 % and 76 % of their respective variability. The “Between-farms” and “Between-workers” variance components represented 5 %, 15 % and 24 %, and 26 %, 25 % and 0 % of the variability in thoracic dust, endotoxin and bacteria exposures, respectively.

As described in Table 4, the multivariate models for thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria comprised five tasks among which grain or feed handling and mechanical spreading of bedding materials are significant exposing tasks common for the three models.

Notably, the 10-min mechanical spreading of bedding materials increased by 60 %, 120 % and 46 % the exposure to thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria, respectively. It can be noted that ploughing and hay handling increased by more than 90 % the exposure to dusts and Gram-positive bacteria, respectively. More generally, handlings of grain, silage, bedding materials or slurry represent strong contributor to airborne contaminant exposure. The models are also constituted of three to four farm characteristics. Several characteristics decreased exposure to at least one contaminant. First, the systematic use of grass for cow feeding is the unique characteristic that reduced exposure to the three contaminants. The presence of cubicles in stables reduced by 70 % exposures to Gram-positive bacteria when compared to those measured in stables equipped with deep litter pens for cow housing. Having a large surface opening ($> 0.36 \text{ m}^2/\text{m}^2$) in the main stable reduced dust exposure. In contrast, working in farms equipped with an automated milking increased by more than 150 % the exposure to endotoxins and Gram-positive bacteria. In addition, manure storage in stable and using of an automatic scrapper in alleyways increased by 126 % and 149 % endotoxin and Gram-positive bacteria exposure, respectively. Increasing the number of cows housed in the stables also significantly enhanced farmers' exposure to Gram-positive bacteria. Finally, environmental parameters also impacted thoracic dust and endotoxin exposures. An increase of 15 % of the relative hygrometry (corresponding to the interquartile range value) was related to a 21 % reduction of thoracic dust exposure. In addition, a 10°C-increase (corresponding to the interquartile range value) also reduced by 45 % this exposure.

Altogether, the Table 4 demonstrates that 46 %, 48 % and 40 % of the total variability in thoracic dust, endotoxin and Gram-positive bacteria exposures could be explained by their respective multivariate models. "Between farms" variability was totally described for the three airborne contaminants. For the "Within farms" exposure variability, multivariate models explained 22 %, 45 % and 22 % of thoracic dust, endotoxin and gram positive bacteria exposures, respectively.

3.5 Determinants of mould exposure levels

Due to a large proportion of mould measurements below the LOQ, the potential determinants affecting mould exposure ($> 1000 \text{ CFU.m}^{-3}$) were assessed using a multivariate logistic mixed-effect model. Table 5 shows that many determinants increased the probability to be exposed to mould in dairy farms. As observed for the other contaminants, handling of grain, silage, bedding materials and slurry/manure likely promoted mould exposure. The strongest effect was induced by the 10-min mechanical spreading of bedding materials which

increased by 216 % mould exposure levels. Mechanical scrapping of manure and manual spreading of bedding materials also positively impacted mould exposure levels but these associations were only marginally significant.

Considering farms characteristics, workers who mainly fed cows with corn silage displayed a strongly increased probability to be exposed to mould (OR = 3.81) when compared to their counterparts using a fodder system (grass or mix grass + corn silage). In contrast, the probability to be exposed to moulds was significantly reduced in farm equipped with a cubicle in the main stable (OR = 0.25) when compared to that measured in farms possessing other housing systems. Lastly, an increase of 100 m² of wall opening is related to a strong reduction of mould exposure levels (OR= 0.24).

Finally, to determine the accuracy of the multivariate logistic mixed-effect model used in the present study, we measured the area under the ROC curve. Its value is 0.86 which indicates that the discriminating ability of the model is good.

4. Discussion

We demonstrate in the present study that Breton dairy farmers were exposed to thoracic dusts containing endotoxins, cultivable Gram-positive bacteria and moulds. The direct on-farm recordings of the types and durations of occupational activities allowed us to precisely describe the determinants of farmers' exposures. Using mixed-effect linear and logistic regression models, we show that exposure levels to the bio-aerosols were mainly controlled by specific occupational tasks and farm characteristics.

Our results indicate that the levels of thoracic dusts (GM = 250 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) to which Breton dairy farmers were exposed are three to four times lower than inhalable dust levels (GM = 812 to 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) measured in American or other European dairy farms using similar personal sampling devices (Basinas et al., 2014; Garcia et al., 2013; Samadi et al., 2012). Consequently, thoracic dusts might not account for the majority of particles inhaled by Breton dairy farmers during their occupational activities. However, their levels are substantially higher than respiratory dust (PM_{2.5}) levels (GM = 35.3 to 48 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) found in Californian dairies (Garcia et al., 2013). Thoracic dusts may thus essentially comprise particles that penetrate up to the tracheo-bronchial region. This hypothesis is supported by our recent study showing that the spreading of straw bedding materials in Breton dairy farms mainly released organic dusts with a 3 to 10 μm size, i.e. thoracic dusts that could only hardly enter the alveolar regions (Pfister et al., 2017). Endotoxins levels (GM = 128 EU $\cdot\text{m}^{-3}$) measured in thoracic dusts collected on Breton dairy farmers were also lower than those measured by

personal devices in Californian, Dutch or Danish barns ($GM = 329-453 \text{ EU}\cdot\text{m}^{-3}$) (Samadi et al., 2012; Garcia et al., 2013; Basinas et al., 2014). Nevertheless, the normalization of endotoxin levels per mg of dusts suggests that endotoxin content in thoracic dusts collected in Breton dairies was higher than that calculated for inhalable dusts from other dairy farms. Indeed, in our study, the mean content of endotoxins in thoracic dust was 512 EU/mg and was, for example, 360 EU/mg of inhalable dusts collected on Danish dairy farms (Basinas et al., 2014). Those results are indeed not surprising as Madsen and Nielsen (2010) previously reported that endotoxin concentrations measured in thoracic dust collected from straw storage halls at power plants were higher than those measured in inhalable dusts (Madsen and Nielsen, 2010). In addition, personal levels of cultivable Gram-positive bacteria and mould measured in thoracic dusts ($9.6\text{E}+02$ and $6.9\text{E}+02 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}$, respectively) are about one order of magnitude below those quantified in inhalable dusts collected in Dutch dairy barns ($1.11\text{E}+02$ and $2.37\text{E}+03 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}$) (Samadi et al., 2012). These differences may be related to the type of bedding materials and/or feed used by Breton and other workers (Samadi et al., 2012). We also observed large dispersions of both cultivable Gram-positive bacteria and mould levels which might be due to a low survivability of some microorganism species. It can be noted that Gram-negative bacteria could be detected in only two out of 110 dust samples. This result is however not surprising since cultivable Gram-negative bacteria, sampled in cow and calf stables, may have short survival periods and may only represent 6 % of the total airborne aerobic bacteria (Clark et al., 1983; Zucker et al., 2000; Zucker and Müller, 1998). However, by sequencing the ribosomal 16S-RNA, we recently reported that the two Gram-negative phyla *Proteobacteria* and *Bacteroides* comprised a majority in thoracic dusts released from straw bedding materials in four out of five Breton dairy farms (Pfister et al., 2017). Thus, Gram-negative bacteria were readily present in thoracic dusts collected in Breton dairy farms but could probably not be cultivated.

Our results show that the variability in exposure levels to thoracic dusts was mainly allocated on to the “within farmers” variance component (Table 4), as observed by Basinas et al. (2014) for inhalable dusts in Danish dairy farms. However, the “within farmers” variance component in our naïve models is higher, accounting for 69 % and 60 % of the total dust and endotoxin variability, respectively, while it accounted for 51 % and 45 % in the study reported by Basinas et al. (2014). This difference can be related to the poor specialisation of the Breton farmers’ activities that frequently changed from day to day while similar tasks may have been reproduced every day by Danish dairy farmers. It can be noted that that the variability in

exposure levels to Gram-positive bacteria is also mainly attributed to the “within farmers” variance component. Our mixed-effect linear model describes 40 % to 48 % of the overall variability in exposure to these three airborne contaminants. The accuracy of our predictor model is likely related to the methodology used in this study. Indeed, the nature and duration of the tasks performed by workers have been directly recorded by a technician during dust sampling. In contrast, in previous studies, data describing tasks have retrospectively been recorded during a post sampling interview. In our study, the direct on-farm observations likely improved the correctness of measurements for task durations and consequently increased the quality of exposure modelling. Nevertheless, a substantial part of the overall variability remains unexplained due to unrecorded parameters such as physicochemical characteristics of grain or straw, or weather conditions. Another factor might be the mathematical model misspecification inherent to the use of log concentrations which states that the effects of a determinant are multiplicative while their real effects are considered to be additive (Burstyn, 2009).

The results of our mixed-effect linear and logistic models suggest that different tasks and farm characteristics markedly promoted exposure to dusts and microorganisms. First, they confirm the marked effects of grain handling and tasks related to the renewing of bedding materials on the farmers’ exposure to thoracic dusts and endotoxins. These tasks were previously identified as the strongest contributors in exposures to inhalable dusts and endotoxins in dairy and swine farms (Garcia et al., 2013; Basinas et al., 2013; Basinas et al., 2014). Our results demonstrate that such tasks also mainly contributed to farmers’ exposure to Gram-positive bacteria and mould present in thoracic fraction of inhaled dusts. We notably show that silage handling was markedly associated with an increased probability to be exposed to mould, which suggests that silage might be an important source of fungal contaminants.

Our model indicates that an outdoor temperature increase was associated with a lower exposure to thoracic endotoxins. This is concordant with results reported for inhalable endotoxin exposure levels measured in dairy and swine farms (Preller et al., 1995b; Basinas et al., 2013, 2014, 2017). The effect is likely explained by the fact that thoracic dusts were more contaminated with endotoxins in colder periods (winter) than in warmer periods (summer). Indeed, GM concentrations for thoracic endotoxins were 714 UE/mg, 547 UE/mg and 393 UE/mg in winter, spring and summer, respectively (data not shown). In addition, we observed that an enhancement of the outdoor hygrometry was related to a significant decrease of dust

exposure levels. Higher levels of hygrometry are thought to limit the aerosolisation of particles released during works and thus to reduce farmers' exposure to thoracic dusts. A similar association was reported in a study carried out in Estonian dairy farms (Kaasik and Maasikmets, 2013). An increase in the surface of wall opening, which favours stable ventilation, was associated with a strong decrease of the probability to be exposed to moulds (OR = 0.24). Such ventilation likely lowered indoor humidity and induced less favourable conditions for mould growth. This result thus suggests that the control of airborne contaminant hydrodynamics can reduce mould concentrations in the main stable.

Our study shows a positive and very significant association between the presence of an automatic milking system in dairy farms and the endotoxin exposure levels (change factor = 3.50, $p < 0.007$). This relation has also been reported for inhalable endotoxins collected from Danish farms (Basinas et al., 2014). These authors suggested that working with milking robots can increase the number of cows per farm and consequently the times spent by the farmer to conduct more exposing tasks. In agreement with this hypothesis, we found a positive and significant correlation between the presence of an automatic milking system in farms and the times spent for manual straw spreading ($r = 0.63$, $p < 0.001$, data not shown). In addition, the presence of milking robots forced cows to be permanently kept in the main stable. This probably increased the volumes of manure or slurry and, when the cows moved, their re-suspension in the form of particles heavily contaminated with endotoxins.

The linear models indicate that the foddering with grass or haylage was associated with a marked reduction of the exposure to endotoxins and Gram-positive bacteria and to a lesser extent to thoracic dusts. In these farms, cows usually spent longer periods at pasturing, implying that farmers did not need to renew bedding materials as frequently as done by other farmers. Furthermore, the fact that grass fodder is enriched with nitrogenous compounds likely reduced the need to supplement food intake with grain or dry feed and consequently decreased the times spent by farmers to handle these products.

Our results show that the mechanical scrapping of slurry and manure in Breton dairy farms was a strong determinant for exposure to both endotoxins and Gram-positive bacteria. In addition, the use of manure storage pit in stable markedly and significantly enhanced endotoxin exposure. Endotoxins identified in manure are thought to mainly originate from anaerobic Gram-negative bacteria (Zucker et al., 2000). Therefore, the solid structure of manure and the absence of stirring in manure storage pit could have fostered the growth of anaerobic Gram-negative bacteria and consequently increased ambient endotoxin

concentrations in stables equipped with such pits. The presence of an automatic scrapper in alleyways was also related to an enhancement of Gram-positive bacteria exposure. It may be hypothesized that repetitive scrapping of alleyways could re-suspended small particles of fresh slurry contaminated with Gram-positive bacteria and enhanced their background levels in these farms. In contrast, the presence of cubicles in stall was associated with a strong reduction, by about 70-75 %, of Gram-positive bacteria and mould exposure levels. Cows housed in cubicles were usually cleaner. Animal movements in these cubicles were less expected to re-suspend particles contaminated with bacteria and mould than those in farms equipped with deep litter pens.

In the present study, the determinants found to significantly increase thoracic dust and endotoxin exposure levels are not systematically similar to those identified in previous studies having sampled inhalable dusts from dairy farms. Notably, Basinas et al. (2014) showed that milking was positively correlated with inhalable endotoxin exposure whereas this task was not selected by our multivariate linear mixed-effect model. Forcing the duration of milking in the model for thoracic endotoxins resulted in a very low and not significant correlation ($\beta = 0.0002$, $p = 0.91$), without substantially modifying the impacts of other determinants (data not shown). In addition, Basinas et al. (2014) reported that using an automatic scrapper in alleyway reduced by 40 % farmers' exposure to inhalable dusts. On the opposite, and as described above, our model shows that presence of this device in Breton dairy farms had no effect on thoracic dust exposure levels and increased those of Gram-positive bacteria. These discrepancies likely related to the different particle fractions (thoracic vs inhalable) sampled in the two studies. Indeed, inhalable dusts may comprise a majority of extra-thoracic particles that could not be collected by thoracic samplers. A recent study support this hypothesis as it shows that particles emitted during milking are largely constituted of extra thoracic particles (Schaeffer et al., 2017). Thus, tasks or farm characteristics that selectively increase extra-thoracic dust levels cannot be selected by multivariate models investigating the determinants of thoracic dust exposures. Moreover, extra-thoracic particles could hardly enter into tracheo-bronchial regions where COPD or asthma is expected to develop. Thus, if the respective parts of extra-thoracic and thoracic fractions of inhalable dusts are not determined after sampling, the results of studies investigating the risks factors for lower airways diseases such as COPD or asthma may be misinterpret, especially in the cases where inhalable dusts mainly comprised extra-thoracic dusts. In contrast, the use of the thoracic fraction may strengthen the specificity and the interest of determinants correlated with organic dust exposure.

5. Conclusion

Our study has reported for the first time the levels of dairy farmers' exposures to the thoracic fraction of inhalable organic dusts and has described their quantitative and qualitative determinants. Our results notably highlight that mechanical re-bedding and grain or dry feed handlings were the activities that significantly and markedly increased thoracic dust, endotoxin, Gram-positive bacteria and mould exposure levels. In contrast, they emphasize that different farm characteristics, such as the presence of cubicles in the main stable and large surfaces of wall opening in farm, could significantly reduce exposure to dusts, endotoxins or microorganisms. Interventional studies will be required to confirm the role of these determinants and suggest adequate strategies to prevent dairy farmers' exposure to organic dusts.

6. References

- Basinas, I., Cronin, G., Hogan, V., Sigsgaard, T., Hayes, J., Coggins, A.M., 2017. Exposure to Inhalable Dust, Endotoxin, and Total Volatile Organic Carbons on Dairy Farms Using Manual and Automated Feeding Systems. *Ann. Work Expo. Health* 61, 344–355. doi:10.1093/annweh/wxx023
- Basinas, I., Schlünssen, V., Takai, H., Heederik, D., Omland, Ø., Wouters, I.M., Sigsgaard, T., Kromhout, H., 2013. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish pig farmers affected by work tasks and stable characteristics. *Ann. Occup. Hyg.* 57, 1005–1019. doi:10.1093/annhyg/met029
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Erlandsen, M., Andersen, N.T., Takai, H., Heederik, D., Omland, Ø., Kromhout, H., Schlünssen, V., 2014. Exposure-affecting factors of dairy farmers' exposure to inhalable dust and endotoxin. *Ann. Occup. Hyg.* 58, 707–723. doi:10.1093/annhyg/meu024
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Heederik, D., Takai, H., Omland, Ø., Andersen, N.T., Wouters, I.M., Bønløkke, J.H., Kromhout, H., Schlünssen, V., 2012. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish livestock farmers: results from the SUS cohort study. *J. Env. Monit* 14, 604–614. doi:10.1039/C1EM10576K
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *ArXiv14065823 Stat.*
- Baur, X., Bakehe, P., Vellguth, H., 2012. Bronchial asthma and COPD due to irritants in the workplace-an evidence-based approach. *J. Occup. Med. Toxicol.* 7, 19.
- Burstyn, I., 2009. Measurement Error and Model Specification in Determining How Duration of Tasks Affects Level of Occupational Exposure. *Ann. Occup. Hyg.* 53, 265–270. doi:10.1093/annhyg/mep003
- Burstyn, I., Teschke, K., 1999. Studying the determinants of exposure: a review of methods. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 60, 57–72. doi:10.1080/00028899908984423

- CEN, 1996. EN 689: Workplace atmospheres — Guidance for the assessment of exposure by inhalation to chemical agents for comparison with limit values and measurement strategy.
- CEN, 1993. EN 481: Workplace atmospheres — Size fraction definitions for measurement of airborne particles.
- Clark, S., Rylander, R., Larsson, L., 1983. Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 44, 537–541. doi:10.1080/15298668391405265
- Dalphin, J.C., Dubiez, A., Monnet, E., Gora, D., Westeel, V., Pernet, D., Polio, J.C., Gibey, R., Laplante, J.J., Depierre, A., 1998. Prevalence of asthma and respiratory symptoms in dairy farmers in the French province of the Doubs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 1493–1498. doi:10.1164/ajrccm.158.5.9709108
- 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. Ind. Med.* 27, 405–418. doi:10.1002/ajim.4700270309
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47, 187–200.
- Eduard, W., Pearce, N., Douwes, J., 2009. Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. *Chest* 136, 716–725. doi:10.1378/chest.08-2192
- Gainet, M., Thaon, I., Westeel, V., Chaudemanche, H., Venier, A.G., Dubiez, A., Laplante, J.J., Dalphin, J.-C., 2007. Twelve-year longitudinal study of respiratory status in dairy farmers. *Eur. Respir. J.* 30, 97–103. doi:10.1183/09031936.00150405
- Garcia, J., Bennett, D.H., Tancredi, D., Schenker, M.B., Mitchell, D., Reynolds, S.J., Mitloehner, F.M., 2013. Occupational exposure to particulate matter and endotoxin for California dairy workers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 56–62. doi:10.1016/j.ijheh.2012.04.001
- Görner, P., Simon, X., Boivin, A., Bau, S., 2017. Sampling Efficiency and Performance of Selected Thoracic Aerosol Samplers. *Ann. Work Expo. Health* 61, 784–796. doi:10.1093/annweh/wxx057
- Jouneau, S., Boché, A., Brinchault, G., Fekete, K., Guillot, S., Bayat, S., Desrues, B., 2012. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85, 623–630. doi:10.1007/s00420-011-0708-6
- Jouneau, S., Pinault, M., Gouyet, T., Brinchault, G., Guillot, S., Viel, J.-F., Presle, J.-C., Desrues, B., 2015. Étude AIRBAg : résultats préliminaires après un an de dépistage de la BPCO agricole. *Rev. Mal. Respir.* 32, 240–248. doi:10.1016/j.rmr.2014.03.014
- Kaasik, A., Maasikmets, M., 2013. Concentrations of airborne particulate matter, ammonia and carbon dioxide in large scale uninsulated loose housing cowsheds in Estonia. *Biosyst. Eng.* 114, 223–231. doi:10.1016/j.biosystemseng.2013.01.002
- Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P., Palmberg, L., 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23, 217–230.
- Madsen, A.M., Nielsen, S.H., 2010. Airborne endotoxin associated with particles of different sizes and affected by water content in handled straw. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 278–284. doi:10.1016/j.ijheh.2010.03.001

- Marescaux, A., Degano, B., Soumagne, T., Thaon, I., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., 2016. Impact of farm modernity on the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in dairy farmers. *Occup. Environ. Med.* 73, 127–133. doi:10.1136/oemed-2014-102697
- May, S., Romberger, D.J., Poole, J.A., 2012. Respiratory Health Effects of Large Animal Farming Environments. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 524–541. doi:10.1080/10937404.2012.744288
- Omland, Ø., Hjort, C., Pedersen, O.F., Miller, M.R., Sigsgaard, T., 2011. New-onset asthma and the effect of environment and occupation among farming and nonfarming rural subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 761–765. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.006
- Pfister, H., Morzadec, C., Le Cann, P., Madec, L., Lecureur, V., Chouvet, M., Jouneau, S., Vernhet, L., 2017. Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms. *Environ. Res.* 158, 691–702. doi:10.1016/j.envres.2017.07.025
- Poole, J.A., Romberger, D.J., 2012. Immunological and Inflammatory Responses to Organic Dust in Agriculture. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12, 126–132. doi:10.1097/ACI.0b013e3283511d0e
- Poole, J.A., Thiele, G.M., Alexis, N.E., Burrell, A.M., Parks, C., Romberger, D.J., 2009. Organic dust exposure alters monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L767–L776. doi:10.1152/ajplung.00107.2009
- Preller, L., Kromhout, H., Heederik, D., Tielen, M.J., 1995. Modeling long-term average exposure in occupational exposure-response analysis. *Scand. J. Work. Environ. Health* 21, 504–512.
- Reynolds, S.J., Nonnenmann, M.W., Basinas, I., Davidson, M., Elfman, L., Gordon, J., Kirychuck, S., Reed, S., Schaeffer, J.W., Schenker, M.B., Schlünssen, V., Sigsgaard, T., 2013. Systematic Review of Respiratory Health Among Dairy Workers. *J. Agromedicine* 18, 219–243. doi:10.1080/1059924X.2013.797374
- Samadi, S., van Eerdenburg, F.J.C.M., Jamshidifard, A.-R., Otten, G.P., Droppert, M., Heederik, D.J.J., Wouters, I.M., 2012. The influence of bedding materials on bio-aerosol exposure in dairy barns. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 361–368. doi:10.1038/jes.2012.25
- Schaeffer, J.W., Reynolds, S., Magzamen, S., VanDyke, A., Gottel, N.R., Gilbert, J.A., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J.T., Volckens, J., 2017. Size, Composition, and Source Profiles of Inhalable Bioaerosols from Colorado Dairies. *Environ. Sci. Technol.* 51, 6430–6440. doi:10.1021/acs.est.7b00882
- Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., Lengauer, T., 2005. ROCRC: visualizing classifier performance in R. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 3940–3941. doi:10.1093/bioinformatics/bti623
- Spaan, S., Wouters, I.M., Oosting, I., Doekes, G., Heederik, D., 2006. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. *J. Environ. Monit. JEM* 8, 63–72. doi:10.1039/b509838f
- SUVA, 2013. (Schweizerische Unfallversicherungsanstalt). Valeurs limites d'exposition aux postes de travail (Occupational limit values at workstations).
- Thaon, I., Thiebaut, A., Jochault, L., Lefebvre, A., Laplante, J.J., Dalphin, J.C., 2011. Influence of hay and animal feed exposure on respiratory status: a longitudinal study. *Eur. Respir. J.* 37, 767–774. doi:10.1183/09031936.00122209

- Vogelzang, P.F.J., van der GULDEN, J.W.J., Folgering, H., Kolk, J.J., Heederik, D., Preller, L., Tielen, M.J.M., van SCHAYCK, C.P., 1998. Endotoxin Exposure as a Major Determinant of Lung Function Decline in Pig Farmers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 15–18. doi:10.1164/ajrccm.157.1.9703087
- Zucker, B.-A., Müller, W., 1998. Concentrations of airborne endotoxin in cow and calf stables. *J. Aerosol Sci.* 29, 217–221. doi:10.1016/S0021-8502(97)00461-8
- Zucker, B.-A., Trojan, S., Müller, W., 2000. Airborne Gram-Negative Bacterial Flora in Animal Houses. *Zoonoses Public Health* 47, 37–46.

7. Figures

Table 1a : Quantitative characteristics of the 29 diary farms

Stable characteristics	Mean	Median (min-max)
Dimension		
Length (m)	48.93	45.5
Width (m)	20.23	19.25
Surface (m ²)	935	870 (207 – 2554)
Number of cows	77.77	75 (20 – 160)
Surface area per cow (m ² /cow)	11.9	10.61 (6.5 – 23)
Ventilation estimate		
Surface of wall opening (m ²)	161	131 (15 – 340)
SWON (m ² /m ²) ^a	0.24	0.18 (0.02 – 1.2)
Environmental parameters		
Outdoor temperature (°C)	12.42	13 (-2.7 – 26)
Outdoor relative hygrometry (%)	76.65	77.3 (42.5 – 100)

^a SWON = Surface of wall opening normalized on stable surface

Table 1b : Occurrence of qualitative farm characteristics based on 112 measurements from workers of main stables

Stable characteristics	N
Feeding system	
Fodder = mainly corn silage	57
Fodder = mix of corn silage + haylage	47
Fodder = only haylage or grass	6
Presence of automatic rail dispenser	4
Automatic grain feeding	0
Grazing	
Cows going to pasture during measurement	65
Milking	
Milking parlor directly connected to stable	67
Automatic milking	11
Usage of high pressure washing	75
Floor	
Concrete + deep litter pens	52
Concrete + cubicle	60
Concrete + mattresses	24
Bedding	
Straw	97
No bedding material	5
Saw dust	5
Shredded straw	4
Ventilation	
Natural	112
Natural with control device	0
Mechanical without control device	0
Mechanical with control device	0
SWON > 0.36 m ² /m ² (75 th percentile value) ^a	31
Slurry/manure	
Automatic scrapper in alleyway	54
Solid manure pit in stable	48

^a SWON = Surface of wall opening normalized on stable surface

Table 2 : Occurrence and median duration of tasks performed by dairy workers

Tasks	Occurrence	Time (min) ^c
Milking (including gathering cows)	73	60
Milking parlor washing	57	15
Calf feeding with milk	25	13
Moving animals to meadow	13	10
Moving animals in stable	25	10
Calving	1	60
Ear marking/inseminating/cleaning cow feet/injecting	16	14
Displacing dead animals	0	-
Manual loading/unloading of hay ^a	18	4.5
Mechanical loading/unloading of hay ^b	0	-
Manual loading/unloading of silage ^a	29	5
Mechanical loading/unloading of silage ^b	44	14.5
Manual loading/unloading of grain ^a	57	5
Mechanical loading/unloading grain ^b	11	6
Grain grinding	4	5.5
Manual spreading of bedding materials ^a	38	10
Mechanical spreading of bedding materials ^b	33	10
Manual scrapping of slurry/manure ^a	19	10
Mechanical scrapping of slurry/manure ^b	18	14
Manual scrapping of stable corridor ^a	12	9
Truck maintenance	13	14
Harvesting	0	-
Spreading fertilizer or pesticide on field	6	110.5
Soil preparation	6	136.5
Outdoor displacement	80	25
Indoor displacement	75	20
Truck displacement	36	26

^a manual = using a shovel or a bucket or both. Do not include transport time

^b mechanical = using truck + adequate trailer. Do not include transport time

^c median time of positive values.

Table 3: Arithmetic Mean (AM), Geometric Mean (GM) and Geometric Standard Deviation (GSD) of exposure to thoracic fraction of dust, endotoxins, cultivable gram positive bacteria and cultivable mould.

Period	Thoracic dust (mg/m ³)				Endotoxins (EU/m ³)			
	n (n<LOQ)	AM	GM (GSD)	Range	n (n<LOQ)	AM	GM (GSD)	Range
Overall	112 (25)	0.42	0.24 (2.8)	LOQ - 5.13	110 (0)	318	128 (4.0)	2 - 8672
Winter	37 (4)	0.38	0.22 (2.9)	LOQ - 3.54	37 (0)	304	159 (3.7)	4 - 1136
Spring	38 (14)	0.37	0.23 (2.6)	LOQ - 2.24	37 (0)	239	125 (3.7)	2 - 1184
Summer	37 (7)	0.53	0.27 (3.0)	LOQ - 5.13	36 (0)	413	104 (4.6)	3 - 8672

Period	Gram positive bacteria (CFU/m ³)				Mould (CFU/m ³)			
	n (n<LOQ)	AM	GM (GSD)	Range	n (n<LOQ)	AM	GM (GSD)	Range
Overall	110 (29)	1.1E+04	9.6E+02 (6.3)	LOQ - 5.5E+05	110 (47)	6.1E+03	6.9E+02 (5.4)	LOQ - 1.9E+04
Winter	37 (11)	2.7E+03	8.7E+02 (4.9)	LOQ - 3.0E+04	37 (17)	4.8E+03	7.3E+02 (5.3)	LOQ - 6.4E+04
Spring	37 (12)	1.0E+04	7.6E+02 (6.8)	LOQ - 2.8E+05	37 (23)	5.2E+02	3.2E+02 (2.1)	LOQ - 4.9E+03
Summer	36 (6)	1.9E+04	1.3E+03 (7.4)	LOQ - 5.5E+05	36 (7)	1.3E+04	1.4E+03 (7.7)	LOQ - 1.9E+04

Table 4: Multivariate mixed-effect linear model analysing the effects of tasks and farm characteristics on the log-transformed personal exposure level to thoracic dusts, endotoxins and Gram-positive bacteria. Blank spaces indicate that the determinant was not retain in the model

Determinants	Dusts (n = 112)			Endotoxins (n = 110)			Gram positive bacteria (n = 110)		
	β (se)	Change factor ^a	P-value	β (se)	Change factor ^a	P-value	β (se)	Change factor ^a	P-value
Background level	-0.478(0.61)	0.62	0.435	4.314(0.234)	75	<0.001	5.14(0.489)	171	<0.001
Tasks (min)									
Hay handling									
Manual loading/unloading of grain or dry feed	0.068(0.010)	1.40 ^b	<0.001	0.042(0.032)	1.23 ^b	0.198	0.132(0.054)	1.93 ^b	0.016
Mechanical loading/unloading of silage	0.010(0.005)	1.16 ^b	0.030	0.075(0.013)	1.45 ^b	<0.001	0.085(0.022)	1.53 ^b	<0.001
Manual spreading of bedding materials	0.021(0.007)	1.37 ^b	0.004						
Mechanical spreading of bedding materials	0.047(0.011)	1.60 ^b	<0.001	0.079(0.015)	2.20 ^b	<0.001	0.038(0.021)	1.46 ^b	0.07
Mechanical scrapping of slurry/manure				0.024(0.012)	1.40 ^b	0.047	0.056(0.019)	2.32 ^b	0.005
Manual scrapping of slurry/manure				0.012(0.007)	1.13 ^b	0.068			
Soil preparation	0.005(0.003)	1.97 ^b	0.105				-0.009(0.006)	0.29 ^b	0.141
Farm characteristics (qualitative)									
fodder = only haylage or grass	-0.648(0.366)	0.523	0.079	-0.876(0.444)	0.42	0.052	-1.527(0.746)	0.22	0.043
SWON ^d >0.36m ² /m ²	-0.292(0.170)	0.747	0.089						
Cows going to pasture during measurement	-0.240(0.170)	0.787	0.161						
Automatic milking				1.148(0.408)	3.15	0.007	0.947(0.598)	2.58	0.118
Solid manure pit in stable				0.816(0.242)	2.26	0.001			
Floor = concrete + cubicle							-1.205(0.370)	0.30	0.002
Presence automatic scrapper in alleyway							0.912(0.373)	2.49	0.019
Farm characteristics (quantitative)									
Cows number (increment for one cow)							0.015(0.006)	2.02 ^c	0.017
Environmental parameters									
Temperature (°C)				-0.059(0.016)	0.55 ^c	<0.001			
Hygrometry (%)	-0.016(0.008)	0.79 ^c	0.036						

Table 4: continued

<u>Variance components of naive models ^e</u>		<u>Dusts</u>	<u>Endotoxins</u>	<u>Gram positive bacteria</u>
$bf\sigma^2$	0.05 (5%)	0.29 (15%)	0.99 (24%)	
$bw\sigma^2$	0.28 (26%)	0.49 (25%)	0 (0%)	
$ww\sigma^2$	0.73 (69%)	1.16 (60%)	3.10 (76%)	
$total\sigma^2$	1.05 (100%)	1.94 (100%)	4.09 (100%)	
<u>Variability explained by complete model ^f</u>				
Between farms	100%	100%	100%	100%
Between workers	100%	24%	-	-
Within worker	22%	45%	22%	22%
Overall	46%	48%	40%	

^a change factor in exposure calculated as $\exp(\beta)$ if not specified otherwise

^b change factor in exposure calculated as $\exp(\beta \times \text{median time of the task duration})$.

^c change factor in exposure for an increment of the interquartile value of the determinants calculated as $\exp(\beta \times \text{interquartile value})$. Interquartile values are 15%, 10°C and

45 cows for relative hygrometry, temperature and cow numbers, respectively

^dSWON = Surface of wall opening normalized on stable surface

^e models without fixed effects (bf : between farm, bw: between worker, ww: within worker)

^fvariability explained was calculated a $1 - [\text{variance component (complete model)}] / [\text{variance component (naive model)}]$

Table 5: Multivariate mixed-effect logistic model analysing the effects of performed tasks and farm characteristics on the probability of mould exposure > 1000 CFU/m³ with n = 112, 32 measurements > 1000 CFU/m³ (28.5%)

Determinants	β (se)	OR (CI 95%) ^a	P-value
Background level	-1.840 (0.717)		0.010
Tasks (min)			
Manual loading/unloading grain of dry feed	0.131 (0.053)	1.93 (1.31 - 3.24) ^b	0.014
Manual loading/unloading of silage	0.059 (0.029)	1.34 (1.02 - 3.18) ^b	0.040
Manual spreading of bedding materials	0.054 (0.029)	1.72 (0.97 - 3.03) ^b	0.065
Mechanical spreading of bedding materials	0.115 (0.038)	3.16 (1.50 - 6.65) ^b	0.003
Mechanical scrapping of slurry/manure	0.054 (0.03)	2.13 (0.94 - 4.85) ^b	0.073
Farm characteristics (presence of absence)			
Fodder = mainly corn silage	1.337 (0.651)	3.81 (1.84 - 13.64)	0.040
Floor = concrete + cubicle	-1.387 (0.667)	0.25 (0.07 - 0.92)	0.038
Farm characteristics (quantitative)			
Surface of wall opening (m ²)	-0.006 (0.003)	0.24 (0.3 - 0.99) ^c	0.036
Model evaluation			
Area under ROC curve	0.89		

^a Odd ratio calculated as $\exp(\beta)$ if not specified otherwise

^b Odd ratio calculated as $\exp(\beta \times \text{median time of task duration})$.

^c Odd ratio for an increment of 100 m² calculated as $\exp(\beta \times 100)$.

Table S1: bivariate effects of task duration on long-transformed personal exposure levels to thoracic dusts, endotoxins and gram-positive bacteria.

Determinants	Thoracic dust ^a		Endotoxins ^a		Gram-positive bacteria ^a		mould ^b	
	β	<i>P</i> -value ^c	β	<i>P</i> -value ^c	β	<i>P</i> -value ^c	β	<i>P</i> -value ^c
Tasks (min)								
Milking	-0.006	0.006	-0.005	0.087	-0.005	0.178		
Milking room washing	-0.014	0.212	-0.018	0.21				
Manual loading/unloading hay			0.065	0.119			0.102	0.163
Manual loading/unloading of grain or dry feed	0.057	<0.001	0.056	<0.001	0.077	<0.001	0.105	0.004
Manual loading/unloading of silage							0.072	0.021
Mechanical loading/unloading of silage	0.011	0.047					0.018	0.201
Manual spreading of bedding materials	0.017	0.061	0.034	0.005	0.036	0.056	0.049	0.070
Mechanical spreading of bedding materials	0.032	0.027	0.075	<0.001	0.043	0.080	0.093	<0.001
Manual scrapping of slurry/manure			0.019	0.036				
Mechanical scrapping of slurry/manure			0.025	0.119	0.048	0.023	0.058	0.077
Truck maintenance	-0.018	0.227					-0.086	0.207
Spreading fertilizer or pesticide							0.023	0.022
Soil preparation	0.006	0.082			-0.009	0.181		

^a effect assessed in mixed-effect linear model. *P*-values are associated to likelihood ratio test (naïve model vs bivariate model)

^b effect assessed in mixed effect logistic model. *P*-values are associated to likelihood ratio test (naïve model vs bivariate model)

^c only *P*-values > 0,25 are shown

Table S2 : bivariate effects of farm characteristics on log-transformed personal exposure levels of workers to thoracic dusts, endotoxins, Gram-positive bacteria and mould.

Farm characteristics	Thoracic dust ^a		Endotoxins ^a		Bacteria ^a		Mould ^b	
	β	P-value ^a	β	P-value ^a	β	P-value ^a	β	P-value ^a
Qualitative								
Floor = concrete + cubicle					-0.678	0.167	-0.852	0.085
Floor = concrete + mattresses					-0.737	0.234	-1.07	0.085
Automatic milking	0.80	0.032	0.998	0.059	2.34	<0.001	2.215	0.001
Milking parlor directly connected to stable	0.34	0.143					-0.671	0.134
Usage of high pressure washing								
Automatic scraper in alleyways					0.71	0.132		
Manure storage in stable			0.829	0.011				
Cows pasturing at least a part of the day	-0.297	0.114	-0.516	0.045			-0.665	0.04
Fodder = only haylage or grass	-0.814	0.069	-1.962	0.002	-1.671	0.035	-0.931	0.014
Fodder = mainly corn silage								
SWON > 0.36	-0.410	0.114						
Quantitative								
Cow number					0.012	0.129		
Surface of wall opening (per 10m ²)							-0.044	0.055
SWON > (m ² /m ²) ^d	-0.555	0.241						
Environmental parameters								
Hygrometry (%)	-0.007	0.243					0.195	0.006
Temperature (°C)			-0.044	0.014				

^a effect assessed in linear mixed effect model. P-value associated to likelihood ratio test (naïve model vs bivariate model)

^b effect assessed in logistic mixed effect model. P-value associated to likelihood ratio test (naïve model vs bivariate model)

^c only P-values > 0,25 are shown

^dSWON = Surface of wall opening normalized on stable surface

ARTICLE 2

Déterminants professionnels de l'exposition à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde

Introduction

Les éleveurs laitiers semblent présenter un risque accru de maladies respiratoires des voies aériennes inférieures telle que la BPCO, et plus généralement un déclin accéléré de la fonction respiratoire (Baur et al., 2012; Omland et al., 2011; Reynolds et al., 2013). Le principal facteur de risque suspecté est l'exposition des éleveurs aux poussières organiques. En effet l'inhalation répétée de constituants microbiens est susceptible d'induire des réactions inflammatoires chroniques pouvant contribuer au développement des symptômes respiratoires présentés par les éleveurs.

Les éleveurs laitiers sont également exposés à des contaminants chimiques volatils, tels que l'ammoniac et des composés organiques volatils (COVs) qui sont présents naturellement dans les exploitations ou émis lors des activités professionnelles. L'ammoniac est produit principalement par le fumier stocké dans les bâtiments d'élevage (Hristov et al., 2011). Plusieurs études documentent la présence d'une large diversité de COVs dans les bâtiments hébergeant des vaches laitières, notamment des alcools, des aldéhydes, des cétones et des acides carboxyliques (Beck et al., 2007b; Sunesson et al., 2001). Une source importante de COVs est l'ensilage utilisé pour nourrir les vaches (Hafner et al., 2013). Parmi les composés présents dans l'ensilage, les aldéhydes, et notamment l'acétaldéhyde, sont les COVs les plus facilement émis dans l'atmosphère du fait de leur faible pression de vapeur saturante. Les aldéhydes pourraient donc constituer un bon traceur de l'exposition aux COVs émis par l'ensilage (Hafner et al., 2013).

Contrairement aux poussières organiques, les niveaux et les déterminants des expositions à ces composés chimiques ont été peu étudiés chez les éleveurs laitiers. Pourtant, différentes études ont montré que l'exposition aux vapeurs d'ammoniac est associée à des symptômes ou à des pathologies respiratoires chez des ouvriers agricoles travaillant dans d'autres secteurs que celui de l'élevage laitier (Eduard et al., 2009; Von Essen et Romberger, 2003). L'exposition des éleveurs aux COVs pourrait également accroître les effets biologiques des poussières organiques (Mølhave, 1991). Dans ce contexte, cette seconde étude visait à décrire les expositions des éleveurs laitiers à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde lors d'une campagne de

mesures individuelles puis à déterminer les tâches et les caractéristiques des exploitations laitières pouvant impacter ces expositions.

Matériels et méthodes.

Plan d'échantillonnage et méthodes de prélèvements

Les détails du plan d'échantillonnage de la campagne de mesures ont été présentés dans l'article précédent. Brièvement, 42 éleveurs répartis dans 29 fermes ont été sélectionnées pour participer à l'étude. Pour chacune des fermes, un même éleveur a été équipé d'un dispositif de mesure individuel à 3 périodes différentes de l'année définies selon le calendrier de l'activité agricole de la MSA. Les autres agriculteurs ont été équipés deux à trois fois. Les mesures ont eu lieu durant la matinée de travail. L'ammoniac a été collecté sur un filtre en quartz imprégné d'acide sulfurique (retenant l'ammoniac sous forme d'ions ammoniums) placé dans une cassette fermée de 37 mm et connectée à une pompe au débit de 2 L.min⁻¹. L'acétaldéhyde a été collecté passivement sur cartouches absorbantes Radiello code 165 imprégné de Dinitro-Phényl-Hydrazine (DNPH), à un débit de diffusion de 0,89 mL.min⁻¹. Les arrivées d'air des dispositifs ont été placées de part et d'autre du thorax des éleveurs équipés de ces dispositifs. Un total 110 mesures pour chacun des contaminants a été obtenu en fin de campagne.

Quantification des concentrations d'ammoniac.

La cassette contenant le filtre de collecte est rincée dans 10 ml d'eau ultra pure puis placée dix minutes aux ultrasons. La quantification de l'ammonium généré en milieu sulfurique a été réalisée par chromatographie ionique en utilisant un éluant à base d'eau ultra pure et contenant 1,5 mM d'acide nitrique, 0,7 mM d'acide dipicolinique et 3% d'acétone. La limite de quantification était de 18,9 µg/filtre.

Quantification des concentrations en acétaldéhyde

L'acétaldéhyde a été quantifié indirectement à partir des adduits hydrazone formés lors du prélèvement. Les dérivés hydrazones sont d'abord désorbés chimiquement dans l'acétonitrile. L'analyse des dérivés hydrazones est réalisée par chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode. L'élution est réalisée dans un mélange 30:70 acétonitrile:eau. La limite de quantification était de 0,4 µg/cartouche.

Acquisition des données sur les tâches et les caractéristiques des fermes

Les modalités de recueil des données concernant les tâches et les caractéristiques d'exploitation ont été décrites dans l'article précédent. Etant donnée la nature volatile des

contaminants considérés dans cette étude, des indicateurs complémentaires ont été construits. Il s'agit en premier lieu d'un indicateur de présence « composite » : temps total passé en stabulation et temps passé en salle de traite. En effet, nous avons supposé que les bâtiments contaminés en ammoniac sont la salle de traite et la stabulation puisque la principale source d'ammoniac (le fumier) est surtout rencontrée dans ces deux lieux. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que l'exposition à l'ammoniac était d'autant plus grande que les temps de présence dans ces bâtiments étaient prolongées. Par ailleurs, nous avons aussi considéré deux interactions entre ces indicateurs de présence composite et différents paramètres pouvant a priori décrire les niveaux des contaminants présents dans ces deux lieux. La vache étant l'unité « productrice de fumier », les indicateurs de contamination considérés ont été les suivants : le nombre de vaches laitières présentes en stabulation et la « capacité » de la salle de traite, autrement dit le nombre de vaches pouvant être traitées simultanément. Enfin, un dernier indicateur de ventilation de la stabulation a été considéré. Il s'agit de la surface des ouvertures des murs rapportée au nombre de vaches (m^2 . vaches). Cet indicateur a été pris en compte à la fois comme une variable quantitative (m^2 .vaches) mais aussi en tant que variable dichotomisée en fonction de la valeur du 75^e percentile de la distribution de l'indicateur quantitatif, situé à $3,64m^2$ par vaches. Les modalités de calcul ainsi que les statistiques descriptives de ces nouveaux indicateurs peuvent être retrouvés dans le tableau 1.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées sur les jeux de données ont été décrites dans l'article précédent. Brièvement, les concentrations pondérées sur le temps moyen de mesure de la campagne (210 minutes) ont été prise en compte pour exprimer l'exposition des éleveurs. Les logarithmes naturels des valeurs d'exposition ont été utilisés pour normaliser les distributions et réaliser les analyses statistiques. La moyenne géométrique et l'écart type géométrique des distributions ont été calculés pour décrire les niveaux et la dispersion des expositions. La recherche des déterminants a ensuite été réalisée en deux étapes :

- (1) une première étape d'analyse bi-variée permettant de sélectionner les déterminants potentiels pour l'analyse multivariée, avec une valeur seuil de la p-value $<0,25$
- (2) la construction de modèles multivariés selon une procédure ascendante à partir de la liste des déterminants potentiels issus de l'analyse bi-variée

Concernant l'ammoniac, des modèles de régression linéaire à effets mixtes hiérarchiques (ferme et fermiers) ont été utilisés. Pour l'acétaldéhyde, le nombre important de résultats inférieurs à la limite de quantification n'a pas permis l'utilisation de modèle linéaire à effets

mixtes. Des modèles de régression logistique à effets mixtes ont donc été utilisés. Les données d'acétaldéhyde ont ainsi été recodées en une variable dichotomique selon la valeur du 75^e percentile de la distribution située à 50 µg.m⁻³. Les résultats supérieurs à ce seuil ont ainsi été considérés comme exposé (=1) et les résultats inférieurs comme non exposé (=0).

Résultats

Le tableau 2 décrit les expositions moyennes des éleveurs pour chaque saison. Concernant l'ammoniac, l'exposition est la plus élevée en été, intermédiaire au printemps et la plus basse en hiver, ce qui suggère une augmentation de l'exposition avec la température. Il ne semble pas y avoir de différences par saison concernant l'exposition à l'acétaldéhyde. La proportion de résultats inférieurs aux limites de quantification ne semble pas varier non plus selon la saison.

Les tableaux S1 et S2 décrivent les déterminants potentiels sélectionnés lors des analyses bi-variées et utilisés pour construire les modèles multivariés de régression à effets mixtes. Les composantes de la variance de l'exposition à l'ammoniac estimée grâce aux modèles linéaires à effet mixte dit « naïf » (n'incluant pas de déterminants de l'exposition) sont exposées dans le tableau 3. Les résultats montrent une prépondérance de la variance inter- exploitation (61% de la variance totale) et un effet moindre de la variance inter et intra travailleurs, représentant respectivement 14% et 25% de la variance totale.

Le tableau 3 décrit également le modèle final construit à partir des déterminants de l'exposition à l'ammoniac. Il inclut les 2 interactions spécifiquement créées pour les contaminants gazeux: la première étant le temps passé en stabulation ajusté sur le nombre de vaches laitières présentes dans les bâtiments et la seconde le temps passé en salle de traite ajusté sur la capacité de la salle de traite. Comme attendu, un accroissement de ces deux indicateurs induit une augmentation significative de l'exposition à l'ammoniac. On notera qu'aucune autre tâche n'a été retenue dans le modèle final. Par ailleurs, le modèle inclut deux caractéristiques supplémentaires. Il s'agit d'une part de la surface d'ouverture des murs rapportée aux nombres de vaches. Le tableau 3 montre qu'une surface supérieure à 3,64 m² par vaches (valeur du 75e percentile de la distribution de l'indicateur) entraîne une réduction forte et significative de l'exposition à l'ammoniac (53%). D'autre part, le dernier indicateur utilisé est la présence d'une zone de stockage du fumier en stabulation. Lorsque qu'une telle zone est effectivement présente en stabulation, on observe une augmentation importante de l'exposition à l'ammoniac. Bien que relativement simple, le modèle de régression linéaire multivarié décrivant l'exposition à l'ammoniac permet d'expliquer 52% de la variance de

totale de l'exposition. On peut également noter que la part de la variance inter-exploitations, qui est la composante prédominante dans le modèle naïf (61%), est expliquée à hauteur de 70%.

Concernant l'acétaldéhyde, les résultats du modèle logistique multivarié sont décrits dans le tableau 4. Le modèle est également relativement simple. Il inclut 2 tâches et 3 caractéristiques d'exploitation. Les tâches associées sont la distribution d'ensilage, manuelle et mécanique, qui augmentent significativement la probabilité d'une exposition $> 50 \mu\text{g.m}^{-3}$ d'acétaldéhyde. Toutefois, la tâche réalisée mécaniquement accroît beaucoup plus les niveaux d'exposition que lorsqu'elle est réalisée manuellement. Les deux interactions n'ont cela dit pas été sélectionnées dans le modèle final. Concernant les caractéristiques des exploitations, la surface de la stabulation exprimée en m^2 , est reliée positivement à probabilité d'exposition à l'acétaldéhyde. De même, lorsque l'affouragement des vaches est majoritairement constitué d'ensilage (versus un mélange herbe + maïs ou uniquement à base d'herbe), la probabilité d'une exposition à l'acétaldéhyde est fortement augmentée. La surface des ouvertures des murs rapportée à la surface de la stabulation est en revanche négativement associée à la probabilité d'une exposition à l'acétaldéhyde. Ce modèle permet une très bonne discrimination des résultats avec une aire sous la courbe de ROC d'une valeur de 0,928.

Discussion

Niveaux d'exposition

L'exposition moyenne à l'ammoniac est comparable (moyenne arithmétique = $0,628 \text{ mg.m}^{-3}$, soit environ 1 ppm) à celle mesurée en point fixe à l'intérieur des stabulations d'exploitations laitières estoniennes (moyenne arithmétique = $0,695 \text{ mg.m}^{-3}$, soit environ 1 ppm également) (Kaasik et Maasikmets, 2013). Ces niveaux semblent aussi inférieurs à ceux observés dans les élevage de porcs pour lesquels les niveaux moyens dépassent régulièrement les 3 ppm (Banhazi et al., 2008; Chang et al., 2001). Ces niveaux sont inférieurs à la valeur de 7.5 ppm au-dessus de laquelle un déclin significatif du VEMS a été observé chez des éleveurs de porcs (Von Essen et Romberger, 2003). Il est néanmoins possible que l'exposition à l'ammoniac renforce les effets biologiques des bio-aérosols auxquels sont co-exposés les éleveurs laitiers. Concernant l'exposition l'acétaldéhyde, la comparaison des résultats aux données des littératures est plus compliquée étant donné notre méthodologie d'évaluation de l'exposition qui est inédite dans le contexte de l'exposition professionnelle des éleveurs laitiers. Les études de Beck et al. (2007) et Sunesson et al. (2001) montrent respectivement des moyennes arithmétique de COVs totaux de $215 \mu\text{g.m}^{-3}$ et $484,7 \mu\text{g.m}^{-3}$ (Beck et al., 2007a;

Sunesson et al., 2001). Dans notre étude la moyenne arithmétique de l'exposition à l'acétaldéhyde est de $43,9 \mu\text{g.m}^{-3}$, soit entre 8 et 20% de la concentration totale en COVs décrite dans ces publications ce qui suggère que l'acétaldéhyde représente une part importante des COVs totaux. Théoriquement, des effets aigus d'irritation des yeux, de la gorge et de l'arbre respiratoire peuvent être observés pour des concentrations supérieures à 25mg.m^{-3} en COVs totaux, soit des concentrations bien supérieures aux niveaux mesurés dans les élevages laitiers (Pappas et al., 2000). Cependant, des effets délétères similaires pourraient être observés pour des concentrations inférieures à 3mg.m^{-3} en cas de co-exposition à d'autres contaminants (Mølhave, 1991), ce qui est le cas dans les élevages laitiers où les éleveurs sont exposés de manière importante aux poussières organiques. Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'exposition aux COVs en association à l'exposition aux bioaérosols sur la santé respiratoire des éleveurs laitiers dans le cadre d'études épidémiologiques, et notamment dans l'étude AIRBAg pour laquelle les modèles d'exposition ont été construits.

Déterminants de l'exposition à l'ammoniac

La structure de la variabilité de l'exposition à l'ammoniac, décrite dans le tableau 3 (voir composante de la variance du modèle naïf) est très différente de celle couramment observée pour l'exposition aux bioaérosols. En effet, concernant cette dernière, de nombreuses études documentent une forte prépondérance de la variabilité intra- travailleur, représentant systématiquement plus de 50% de la variance totale, (Basinas et al., 2013, 2013; Garcia et al., 2013; Samadi et al., 2012). C'est aussi ce que nous avons constaté dans notre article précédent. En revanche, concernant l'exposition à l'ammoniac, nos résultats démontrent une prépondérance de la variance inter-exploitations (61% de la variance totale). Ce résultat indique donc que le niveau d'exposition à l'ammoniac des éleveurs est majoritairement défini au niveau de l'exploitation dans laquelle ils travaillent, alors que les facteurs pouvant varier d'un jour à l'autre, c'est à dire les durées des tâches effectuées, ont une importance moindre. Les résultats du modèle linéaire multivarié décrivant les déterminants de l'exposition à l'ammoniac vont également dans ce sens : les deux interactions incluses dans le modèle sont définis en partie au niveau de l'exploitation (nombre de vaches en stabulation et capacité de la salle de traite), et les deux autres variables retenues sont également des caractéristiques des exploitations.

S'agissant de l'effet respectif des variables inclus dans le modèle, on note que les 2 interactions (temps de présence en stabulation ajusté sur la capacité de la salle de traite et temps de présence en stabulation ajusté sur le nombre de vaches en stabulation) ont toutes les

deux l'effet initialement imaginé : elles augmentent significativement les expositions à l'ammoniac. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les analyses bi-variées étaient significatives pour les variables brutes ayant permis de construire ces deux interactions (tableaux S1 et S2), mais que ces variables n'ont pas été sélectionnées lors la procédure ascendante utilisée dans les modèles multivariés, à l'inverse de ces interactions. Nos résultats confirment donc l'intérêt de ces 2 indicateurs créés a priori. Les effets des deux interactions sur l'exposition à l'ammoniac restent néanmoins modérés. Cependant, l'exposition à l'ammoniac étant proportionnelle au nombre de vaches, on peut s'attendre à ce que les niveaux d'exposition soient plus importants dans les grandes exploitations.

Les deux caractéristiques des exploitations du modèle ont des effets inverses et plus marqués sur l'exposition à l'ammoniac. L'indicateur de ventilation, représenté par une surface d'ouverture des murs rapportée au nombre de vaches, montre une réduction de l'exposition de 53% lorsque cette surface est supérieure à 3,64m² d'ouverture par vache. Cela confirme les résultats d'une étude de plus petite envergure indiquant qu'une meilleure ventilation permettaient de réduire la concentration en ammoniac des stabulations (Kaasik et Maasikmets, 2013). A l'inverse la présence d'une zone de stockage du fumier dans la stabulation augmente l'exposition à l'ammoniac de plus de 164% par rapport aux exploitations stockant leurs fumiers à l'extérieur. Ce résultat est également logique puisque le fumier est la principale source d'ammoniac dans les exploitations. Au total, bien que le modèle de régression linéaire à effets mixtes soit simple en n'incluant que 4 variables, il permet d'expliquer plus de 52% de la variance totale de l'exposition, ce qui peut être considéré comme légèrement supérieure aux résultats de la littérature concernant l'exposition aux bioaérosols (Basinas et al., 2013, 2014; Preller et al., 1995b; Samadi et al., 2012). De plus, le modèle explique également plus de 70% de la variance inter-exploitations, qui est la composante prépondérante dans le modèle naïf. Ce résultat est particulièrement intéressant car les modèles ont de meilleurs capacité à prédire correctement l'exposition chronique des éleveurs lorsqu'une telle structure de la variabilité est observée (Loomis et Kromhout, 2004; Peretz et al., 2002).

Déterminants de l'exposition à l'acétaldéhyde

Concernant l'acétaldéhyde, le modèle est lui aussi relativement simple. Les tâches relatives à la distribution d'ensilage contribuent de manière importante à l'exposition à l'acétaldéhyde. Néanmoins la tâche de chargement et distribution d'ensilage contribue bien plus fortement à la probabilité d'une exposition à l'acétaldéhyde > 50µg.m⁻³ lorsqu'elle est mécanisée et non

manuelle. Ce contraste s'explique probablement par une quantité d'ensilage distribuée bien supérieure lorsque la tâche est effectuée de manière mécanique et donc par une émission plus forte de COVs. Ce contraste montre par ailleurs l'importance de la prise en compte des modalités de réalisation des tâches. Nos résultats montrent également qu'une augmentation de la surface de la stabulation induit une augmentation de la probabilité d'exposition à l'acétaldéhyde. L'effet de ce déterminant est probablement lié au fait que plus la stabulation est grande, plus la quantité d'ensilage distribué sera importante, ce qui induira par conséquent une plus grande émission de COV. Dans une étude récente, Basinas et al. (2017) ont mis en évidence une relation similaire entre l'exposition aux poussières inhalables et la quantité de foin ou paille distribuée. Dans notre étude, nous observons que l'affouragement majoritairement constitué d'ensilage augmente aussi fortement la probabilité d'exposition à l'acétaldéhyde comparé aux autres possibilités d'affouragement, confirmant une nouvelle fois que l'ensilage de maïs est une source importante de COV.

Enfin, l'augmentation de la surface d'ouverture des murs rapportée à la surface de la stabulation permet de réduire significativement l'exposition à l'acétaldéhyde. Ce dernier résultat peut aussi être mis en parallèle avec l'étude récente de Basinas et al. (2017) où la ventilation permettait de réduire significativement l'exposition aux COVs totaux mesurés en points fixes dans des exploitations laitières irlandaises (Basinas et al., 2017). Pris dans son ensemble, la précision du modèle logistique pour expliquer l'exposition à l'acétaldéhyde peut être considérée comme excellente car l'aire sous la courbe ROC est de 0,928.

Conclusions:

Cette étude a été réalisée pour décrire les niveaux et les déterminants de l'exposition individuelle des éleveurs laitiers à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, utilisés en tant que traceurs des COVs émis par l'ensilage. Les principaux paramètres augmentant l'exposition des éleveurs à l'ammoniac sont le temps de présence en stabulation et en salle de traite, ainsi que la présence d'une zone de stockage du fumier en stabulation. Concernant l'acétaldéhyde, les durées de tâches relatives à la distribution d'ensilage contribuent de manière importante à l'exposition des éleveurs. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'exposition aux deux contaminants augmente de pair avec la taille de l'exploitation. Etant donnée la tendance à l'augmentation de la taille des exploitations agricoles, il est possible que les risques sanitaires associés à l'exposition à ces contaminants aillent également en s'accroissant. Enfin, notre étude montre que l'augmentation de la surface ouverte des murs de la stabulation constitue un

moyen efficace pour réduire l'exposition à la fois à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, ce qui laisse envisager des pistes de prévention de l'exposition des éleveurs laitiers.

Tableau 1 : Caractéristiques d'exploitation prises en compte spécifiquement pour l'ammoniac et l'acétaldéhyde.

Caractéristiques	Moyenne	Médiane (min-max)
Paramètre de ventilation		
SOMV ^a (m ² /vaches)	2,292	2,323 (0,168 – 9,714)
Interactions		
Traite (min) : capacité de la salle de traite ^b	59,35	39,47 (0 – 244,74)
Temps de présence en stabulation (min) : n vaches en stabulation ^c	74,42	45,49 (0 – 648,07)

^a SOMV = Surface Ouverte des Murs rapportée au nombre de Vaches en stabulation.

^b Interaction calculée comme suit : [Traite (min)]*[capacité de la salle de traite (n vaches) / 11,15]. 11,5 correspond à la capacité moyenne des salles de traite de l'échantillon.

^c Interaction calculée comme suit : [Temps de présence en stabulation (min)]* [n vaches en stabulation / 78], 78 correspond au nombre moyen de vaches en stabulation de l'échantillon.

Tableau 2: Moyennes arithmétiques (MA), moyennes géométriques (MG) et écart-types géométriques (ETG) de l'exposition à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde. LQ = limite de quantification.

Période	Ammoniac (mg.m ⁻³)			
	n (n<LQ)	MA	MG (ETG)	Min - Max
Ensemble	110 (0)	0,628	0,361 (3,3)	0,022 – 2,90
Hiver	36 (0)	0,559	0,283 (3,3)	0,023 – 1,84
Printemps	36 (0)	0,616	0,315 (3,6)	0,023 – 2,90
Été	38 (0)	0,710	0,424 (2,9)	0,023 – 2,61
Période	Acétaldéhyde (µg.m ⁻³)			
	n (n<LQ)	MA	MG (ETG)	Min - Max
Ensemble	110 (53)	43,9	22,0 (3,3)	2 - 292
Hiver	36 (17)	44,2	22,6 (3,3)	4 - 260
Printemps	36 (18)	34,3	20,2 (2,8)	2 - 199
Été	38 (18)	51,7	23,4 (3,8)	3 - 292

Tableau 3: modèle linéaire multivarié à effets mixtes décrivant l'effet des tâches et caractéristiques d'exploitation sur le l'exposition à l'ammoniac. N = 110.

Déterminants :	β (se)	Facteur de changement ^a	P-value
Niveau de fond	-1,700 (0,200)	0,200	<0,001
Interactions :			
Traite (min) : n vaches en salle de traite ^c	0,004 (0,001)	1,28 ^b	<0,001
Temps de présence en stabulation (min) : n vaches en stabulation ^d	0,003 (0,001)	1,17 ^b	0,002
Caractéristiques d'exploitation :			
SOMV ^e > 3,64m ² /vaches	-0,765 (0,277)	0,47	0,010
Zone de stockage du fumier en stabulation	0,970 (0,237)	2,64	<0,001
Composante de la variance (modèle naïf) ^f			
$bt\sigma^2$	0,77 (61%)		
$bw\sigma^2$	0,18 (14%)		
$ww\sigma^2$	0,32 (25%)		
$total\sigma^2$	1,24 (100%)		
Variance expliquée par le modèle complet ^g			
$bt\sigma^2$	70%		
$bw\sigma^2$	44%		
$ww\sigma^2$	10%		
$total\sigma^2$	52%		

$bt\sigma^2$ = variabilité inter exploitations, $bw\sigma^2$ = variabilité inter-travailleurs, $ww\sigma^2$ = Variabilité intra-travailleur, $total\sigma^2$ = variabilité totale.

^a Facteur de changement calculé par $\exp(\beta)$ si non spécifié par ailleurs.

^b Facteur de changement calculé par $(\beta * \text{étendue interquartile de l'indicateur})$.

^c Interaction calculée comme suit : [Traite (min)]*[capacité de la salle de traite (n vaches) / 11,15]. 11,5 correspond à la capacité moyenne des salles de traite de l'échantillon.

^d Interaction calculée comme suit : [Temps de présence en stabulation (min)]* [n vaches en stabulation / 78]. 78 correspond au nombre moyen de vaches en stabulation de l'échantillon.

^e SOMV = Surface Ouverte des Murs rapportée au nombre de Vaches en stabulation.

^f Estimé par un modèle aléatoire sans effet fixe

^g La variance expliquée a été calculée comme suit $1 - [\text{Composante de la variance (modèle complet)}] / [\text{Composante de la variance (modèle naïf)}]$.

**Tableau 4: modèle logistique multivarié à effets mixtes décrivant l'effet des tâches et caractéristiques d'exploitation sur la probabilité d'une exposition > 50 $\mu\text{g.m}^{-3}$.
28 mesures > 50 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (25%).**

Déterminants	β (et)	OR (IC 95%) ^a	P-value
Niveau de fond	-5,332 (1,365)	0,20	<0,001
Tâches (min)			
Chargement et distribution d'ensilage manuels	0,049 (0,024)	1,28 (1,01 - 1,62) ^b	0,042
Chargement et distribution d'ensilage mécanisés	0,143 (0,039)	8,54 (2,71 - 26,9) ^b	<0,001
Caractéristiques d'exploitation			
Fourrages : ensilage de maïs majoritaire	2,054 (0,771)	7,80 (1,72 - 35,3)	0,008
Surface de la stabulation (par 100 m ²)	0,273 (0,076)	3,92 (1,86 - 8,25) ^c	<0,001
SOMS ^d > 0.36m ² .m ⁻²	-0,966 (0,354)	0,38 (0,19 - 0,76)	0,006
Evaluation du modèle			
Aire sous la courbe ROC	0,928		

^a OR calculé par $\exp(\beta)$ si non spécifié par ailleurs.

^b Facteur de changement calculé par (β * durée médiane des valeurs positives),.

^c Facteur de changement calculé par (β * étendue interquartile de l'indicateur) (500m²).

^d SOMS = Surface Ouverte des Murs rapportée au a la surface de la stabulation.

Tableau S1 : Effet bi-varié des tâches et des interactions sur l'exposition à l'ammoniac et l'acétaldéhyde.

Déterminants	Ammoniac ^a		Acétaldéhyde ^b	
	β	P-value	β	P-value
Tâches (min)				
Traite	0,005	0,005	-0,012	0,083
Nettoyage de la salle de traite	0,019	0,028	-0,11	0,004
Allaitement des veaux	0,009	0,052	0,108	0,002
Chargement et distribution de grains manuels	0,019	0,092		
Raclage du fumier manuel	0,006	0,206		
Temps de présence en stabulation	0,003	0,114	0,009	0,079
Chargement et distribution de grains mécanisés	0,062	0,022	0,16	0,075
Chargement et distribution d'ensilage manuels			0,022	0,191
Chargement et distribution d'ensilage mécanisés			0,117	<0,001
Déversement de matériaux de litières mécanisé			0,088	0,051
Entretien d'appareil mécanique			0,059	0,185
Interaction				
Traite (min) : n vaches en salle de traite ^c	0,004	0,002	-0,010	0,094
Temps de présence en stabulation (min) : n vaches en stabulation ^d	0,003	0,019	0,008	0,030

^a Effets estimés par des modèles linéaires à effets mixtes, P-value associée au test de vraisemblance (modèle naïf vs modèle bi-varié)

^b Effets estimés par des modèles logistiques à effets mixtes, P-value associée au test de vraisemblance (modèle naïf vs modèle bi-varié)

^c Interaction calculée comme suit : [Traite (min)]* [capacité de la salle de traite (n vaches) / 11,15]. 11,5 correspond à la capacité moyenne des salles de traite de l'échantillon de ferme.

^d Interaction calculée comme suit : [Temps de présence en stabulation (min)]* [n vaches en stabulation / 78]. 78 correspond au nombre moyen de vaches en stabulation de l'échantillon

Tableau S2 : Effet bi-varié des caractéristiques d'exploitation sur l'exposition à l'ammoniac et l'acétaldéhyde.

Caractéristiques d'exploitation	Ammoniac ^a		Acétaldéhyde ^b	
	β	P-value	β	P-value
Variabes qualitatives				
Stabulation en logette			1,068	0,122
Racleur automatique			1,391	0,037
Traite automatisée			1,412	0,223
Zone de stockage fumier en stabulation	1,084	0,001		
SOMS ^c > 0,36 m ² .m ⁻²			-2,243	0,007
SOMV ^d > 3,64 m ² .vaches ⁻¹	-0,768	0,057	-2,076	0,019
Communication stabulation/salle de traite	0,616	0,09	1,345	0,068
Vaches allant pâturer durant la journée			-0,753	0,173
Fourrage : ensilage de maïs majoritaire			1,882	0,009
Fourrage : ensilage de maïs + ensilage d'herbe			16,549	0,101
Nettoyage à haute pression de la salle de traite	0,415	0,151		
Variabes quantitatives				
Surface de la stabulation (m ²)	0,001	0,021	0,002	<0,001
Surface d'ouverture des murs			-0,007	0,022
SOMS ^c (m ² .m ⁻²)	-1,05	0,13	-5,218	0,002
SOMV ^d (m ² .vaches ⁻¹)	-0,176	0,054	-0,748	0,001
Nombre de vaches en stabulation (n vaches)	0,016	0,001	0,033	0,002
Capacité de la salle de traite (n vaches)	0,045	0,13		
Paramètres environnementaux				
Température (°C)			-0,044	0,014

^a Effets par des modèles linéaires à effets mixtes, P-value du test rapport de vraisemblance (modèle naïf vs modèle bi variée)

^b Effets par des modèles logistiques à effets mixtes, P-value du test rapport de vraisemblance (modèle naïf vs modèle bi variée)

^c SOMS = Surface Ouverte des Murs rapportée à la Surface de la stabulation

^d SOMV = Surface Ouverte des Murs rapportée au nombre de Vaches en stabulation

ARTICLE 3

Caractérisation des poussières émises lors du paillage mécanisé : distribution de taille, diversité microbienne et effets pro inflammatoires.

Introduction

Nous avons démontré au cours des travaux précédents (article n°1) que le paillage mécanisé constitue une tâche à l'origine de concentrations importantes de poussières, d'endotoxines, de bactéries à Gram positif et de moisissures. Plusieurs études, dont celles de Basinas et al. (2014) et de Garcia et al. (2013), montrent également que la distribution de litière génère de fortes concentrations de poussières organiques inhalables. Cette tâche apparaît donc potentiellement critique pour l'exposition des éleveurs laitiers, et rend nécessaire une meilleure connaissance de la nature et des effets biologiques de ces poussières. Pourtant, les données scientifiques sur la taille, la composition microbienne et les propriétés pro-inflammatoires des particules émises lors de la manipulation des produits de litière restent très limitées.

L'objectif de cette dernière étude a donc été, dans un premier temps, de caractériser la distribution de la taille des particules émises lors du paillage mécanisé dans les exploitations d'élevage laitier breton. Nos résultats montrent que les poussières thoraciques constituent la fraction majoritaire des particules émises lors de la tâche. Dans un second temps, nous avons donc caractérisé la composition bactérienne et fongique et les effets pro-inflammatoires des poussières thoraciques prélevées lors du paillage mécanisé. Les poussières organiques ont été prélevées dans cinq élevages laitiers français incluses dans les deux études précédentes.

Matériels et Méthodes

Caractérisation de la taille des poussières

L'étude de la taille des poussières inhalables émises lors du paillage mécanisé a été réalisée grâce un compteur optique de particules Grimm 1.108. Le compteur Grimm a été paramétré pour prendre une mesure toutes les 6 secondes et caractériser les poussières selon 16 intervalles de tailles couvrant la gamme une gamme allant de 0,23 μm à $> 20 \mu\text{m}$.

Collecte et quantification des poussières thoraciques

Les poussières thoraciques ont été collectées activement sur filtre en téflon placé dans une tête de prélèvement Cathia thoracique, qui permet de prélever la fraction thoracique des aérosols selon les recommandations de la norme européenne EN481. Dans chaque ferme, 3

dispositifs de prélèvement ont été mis en fonctionnement en parallèle afin d'obtenir des quantités importantes de poussières collectées. Les capteurs étaient mis en fonctionnement 5 minutes avant le démarrage du déversement de paille, durant la tâche et pendant quelques minutes après la distribution. La durée moyenne du paillage mécanisé était de 36 +/- 5 minutes selon les éleveurs. Les dispositifs de prélèvement étaient placés de manière à former un triangle équilatéral d'un mètre de côté. Le compteur Grimm était placé au centre du triangle formé par les dispositifs Cathia et a été mis en fonctionnement durant la même durée que ceux-ci. Les poussières thoraciques prélevées ont ensuite été quantifiées par gravimétrie. Enfin pour chacune des 5 fermes visitées, les poussières collectées sur les 3 filtres en téflon ont été remises en suspension dans une même solution de PBS afin de procéder par la suite aux analyses microbiennes et aux études *in vitro* visant à analyser les effets pro-inflammatoires.

Caractérisation de la flore microbienne

L'analyse de la flore microbienne a été réalisée à partir d'un aliquote de la suspension de poussières par séquençage haut débit de l'ARNr 16s pour la flore bactérienne et de l'ARNr 18s pour la flore fongique.

Effets pro inflammatoires des poussières organiques sur les macrophages

Des macrophages humains, différenciés à partir de monocytes humains cultivés en présence de granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), ont été exposés *in vitro* pendant 4 h ou 24 h à des concentrations croissantes de poussière thoraciques : 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'expression des gènes codant pour les cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 a été analysée par RT-PCR quantitative pour déterminer les niveaux d'ARNm et par ELISA pour quantifier les niveaux de protéines secrétées dans les milieux de cultures.

Résultats

Le paillage mécanisé génère un nuage de poussières visible dans les cinq fermes étudiées. Les particules ayant un DAE de 3 à 7,5 μm constituent entre 58,9 et 68,3% de la masse des poussières inhalables émises lors de la tâche. Ces résultats indiquent que les poussières émises ont donc une capacité de dépôt majoritairement dans la région trachéo-bronchique. Les analyses des poussières thoraciques par séquençage haut débit ont montré que la composition microbienne des poussières varie sensiblement d'un élevage à l'autre. Néanmoins, les phylums *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* représentent plus de 97,5% des phylums bactériens détectés. L'étude de la répartition des phylums dans les 5 échantillons montre que 4 échantillons sur 5 sont principalement constitués de bactéries à

Gram négatif. Parmi les genres les plus exprimés, 7 le sont systématiquement dans les 5 échantillons de poussières : *Frigoribacterium*, *Hymenobacter*, *Massilia*, *Neorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Sphingomonas*. Les deux genres les plus exprimés sont *Sphingomonas* (17,3% to 26,1%) et *Frigoribacterium* (6% to 15,8%). Plusieurs genres bactériens comprenant des espèces pathogènes telles que *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Thermoactinomyces* ou *Saccharopolyspora* ont été identifiés dans différents échantillons de poussières. Concernant la flore fongique, parmi les 17 genres les plus exprimés, 4 genres le sont systématiquement dans les 5 échantillons : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phaeosphaeria* et *Sporobolomyces*. *Cladosporium* et *Alternaria*, qui sont des déterminants environnementaux puissants des symptômes respiratoires, représentent respectivement de 15,5 à 51,1% et de 9 à 24,7% de l'ensemble des séquences fongiques détectées dans chaque échantillon. Enfin, tous les échantillons de poussières ont significativement et fortement augmenté les niveaux d'ARNm et de protéines codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 dans les macrophages humains. Les effets étaient dose-dépendants et détectables à partir de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'intensité des réponses des macrophages a cependant fortement varié selon les échantillons.

Conclusions

Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les poussières organiques libérées lors de la distribution de paille sont principalement constituées de particules thoraciques assez petites pour se déposer dans la région bronchique où se développent la BPCO et l'asthme. Ces poussières thoraciques induisent *in vitro* une forte réponse inflammatoire des macrophages humains qui résulte probablement de leur composition microbiologique complexe. Le paillage mécanisé constitue donc une tâche exposant probablement les éleveurs laitiers bretons à des poussières organiques de petites tailles qui possèdent une activité biologique pouvant contribuer aux symptômes respiratoires de ces agriculteurs.



Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms



Hugo Pfister^{a,b}, Claudie Morzadec^b, Pierre Le Cann^{b,c}, Laurent Madec^{b,c}, Valérie Lecqueur^b, Martine Chouvet^d, Stéphane Jouneau^{b,d}, Laurent Vernhet^{b,*}

^a Institut technique des gaz et de l'air, Saint-Gregoire, France

^b UMR Inuerm 1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

^c French School of Public Health, Department of Environmental and Occupational Health and Sanitary Engineering, Rennes, France

^d Service de pneumologie, centre de compétences des maladies pulmonaires rares de Bretagne, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Respiratory diseases
Dusts
Bacteria
Macrophages
Cytokines

ABSTRACT

Background: Dairy working increases the prevalence of lower airway respiratory diseases, especially COPD and asthma. Epidemiological studies have reported that chronic inhalation of organic dusts released during specific daily tasks could represent a major risk factor for development of these pathologies in dairy workers. Knowledge on size, nature and biological activity of such organic dusts remain however limited.

Objective: To compare size distribution, microbial composition and cellular effects of dusts liberated by the spreading of straw bedding in five French dairy farms located in Brittany.

Results: Mechanized distribution of straw bedding generated a cloud of inhalable dusts in the five dairy farms' barns. Thoracic particles having a 3–7.5 µm size constituted 58.9–68.3% of these dusts. Analyses of thoracic dusts by next generation sequencing showed that the microbial dust composition differed between the five French farms, although Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria represent more than 97.5% of the bacterial phyla detected in each sample. Several bacteria genera comprising of human pathogenic species, such as *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Thermoactinomyces* or *Saccharopolyspora* were identified. *Cladosporium* and *Alternaria* fungal genera, which are potent environmental determinants of respiratory symptoms, were detected in dusts collected in the five farms and their levels reached 15.5–51.1% and 9–24.7% of assignable fungal sequences in each sample, respectively. Finally, all dust samples significantly and strongly increased the expression of the pro-inflammatory TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-8 cytokines at both mRNA and protein levels in human monocyte-derived macrophages. Their effects were dose-dependent and detectable from 1 µg/ml. The intensity of the macrophage responses however differed according to the samples.

Conclusions: Our results strengthen the hypothesis that organic dusts released during the distribution of straw bedding are mainly constituted of thoracic particles which are small enough to deposit on lower bronchial epithelium of dairy farmers and induce inflammation.

1. Introduction

The prevalence of respiratory symptoms related to chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma or chronic bronchitis is higher in livestock farmers than in unexposed control subjects (Eduard et al., 2009; May et al., Guillien et al., 2016). Swine and dairy farmers more frequently display chronic cough, dyspnea, and accelerated decline in pulmonary function than non-farming individuals (Eduard et al., 2009; Guillien et al., 2016). The development of lower airway

respiratory diseases in dairy farmers is likely influenced by specific working tasks (Marescaux et al., 2016; Thaon et al., 2011). Particularly, a major risk factor contributing to the development of COPD or asthma may be the repeated inhalation of organic dusts released during grain handling, foddering and distribution of bedding materials (Gainet et al., 2007; Jouneau et al., 2012; Garcia et al., 2013; Basinas et al., 2014).

Dusts collected in dairy farms may contain not only different bacteria species, endotoxins and peptidoglycans from Gram-negative and Gram-positive bacteria respectively, but also several fungal species

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary diseases; Toll-like receptors, OPC, optical particle counter; NGS, next generation sequencing; RA, relative abundance levels; PM, particle matter

* Corresponding author.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.025>

Received 11 April 2017; Received in revised form 7 July 2017; Accepted 8 July 2017

0013-9351/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

(Kullman et al., 1998; Lee et al., 2006). The various microbial membrane motifs of these organisms activate different pattern recognition signaling pathways, such as toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, and trigger chronic inflammation, as observed in murine models (May et al., 2012). *In vitro* experiments have shown that soluble extracts of farm-derived organic dusts activated bronchial epithelial cells and immune cells such as dendritic cells and macrophages (May et al., 2012).

However, according to their size, only a specific part of these organic dusts can really interact with the human bronchial tract where obstructive lung changes related to COPD are expected to occur. Indeed, among the particles inhaled through the nose and the mouth, only the thoracic fraction is able to penetrate beyond the larynx and spread into the thoracic region (CEN, 1993). The European standard EN481 defines the inhalable, thoracic and respirable fractions of an aerosol as decreasing functions of the particles forming this aerosol. The inhalable fraction corresponds to the part of an aerosol able to deposit anywhere in the respiratory tract, including nose and mouth, and is therefore constituted of extra-thoracic and thoracic particles. Penetration efficiency of inhalable particles down to the larynx (i.e. the extra-thoracic region) is 50% at 100 μm . For the thoracic fraction, the penetration efficiency of particles beyond the larynx is 99.7%, 50% and < 0.56% at 0.1 μm , 10 μm and at > 30 μm , respectively (CEN, 1993). The thoracic fraction of an aerosol also comprises of the respirable fraction defined as smaller particles that reach alveolar tissues (50% penetration efficiency at 4 μm). Regarding dairy farming, different studies have previously reported that American and European farmers are exposed inside the barns to inhalable particle matter (PM) during their daily working tasks and possibly to PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$ (Kullman et al., 1998; Cathomas et al., 2002; Garcia et al., 2013; Basinas et al., 2014). PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$ have a 50% cut-off aerodynamic diameter of 10 μm and 2.5 μm , respectively, and can diffuse in the tracheo-bronchial regions (CEN, 2014). Working tasks related to dairy farming thus likely release and expose farmers to thoracic dusts. Additional assessments of granulometry, microbial composition and biological activities of these thoracic dusts are however required to specify their potential role in lower respiratory diseases. First, it is needed to determine if thoracic dusts constitute the main fraction of the inhalable aerosols generated by dairy working tasks. Second, though it is well known that inhalable dusts contain endotoxins, different bacteria genera and additional microbial agents such as fungi can be present in thoracic dusts and mediate their biological effects. Third, the possibility that thoracic dusts activate immune cells, which contribute to COPD or asthma pathophysiology, remains to be investigated.

In the present study, to gain insights onto dairy farm dusts, we compared, in five different French dairy farms located in Brittany, the size distribution, the global microbial composition and the pro-inflammatory effects on human macrophages of dusts specifically collected during the spreading of straw bedding, a working task known to markedly expose dairy farmers to inhalable dusts (Basinas et al., 2014).

2. Materials and methods

2.1. Description of dairy farms

Dusts were collected from five typical dairy farms (Farms F1 to F5) located near Rennes, the capital of Brittany (France) where dairy farming is a main agricultural activity. These farms are family-run farms that develop an agricultural system combining crop and livestock farming. The farms have a mean area of $1405 \pm 365 \text{ m}^2$. They housed 60–130 milking cows in free stall barns, with (Farms F1 and F4) or without cubicles (Farm F2, F3 and F5), that were naturally ventilated through opening in walls and roofs (Table S1). In Brittany, dairy farmers classically use wheat straw for bedding and renew it daily. As generally observed in Breton dairy farms, straw was produced by the farmers and was mechanically distributed by a shredder in these five farms.

2.2. Dust size measurements

Dust sizes were determined using the optical particle counter (OPC) Grimm 1.108 (GRIMM Aerosol Technik Ainring GmbH & Co. KG, Germany). This optical laser light aerosol monitor measures the particle size distribution in 15 different channels ranging from 0.23 μm (its lower limit) to 20 μm and in a channel for particles with a size greater than 20 μm . The OPC Grimm was set to register a measure every 6 s. To simplify the readability of the results, we have aggregated the data recorded in some channels and created 8 bins: 0.23–1 μm , 1–3 μm , 3–5 μm , 5–7.5 μm , 7.5–10 μm , 10–15 μm , 15–20 μm and > 20 μm . Results were expressed as mean mass concentrations for size bins and for inhalable, thoracic and respirable fractions. The extra-thoracic and tracheobronchial fractions were also calculated as follow: extra-thoracic fraction = inhalable fraction - thoracic fraction and tracheobronchial fraction = thoracic fraction - respirable fraction. During distribution, dust sizes were measured by placing the OPC on a tripod in a vacant zone of the stall, located at 4–5 m from the stall corridor from which straw bedding is dispersed (Fig. S1).

2.3. Thoracic dust collection

In each farm, during the measurement of dust size by the OPC Grimm, dusts were simultaneously collected on three different Teflon filters (37 mm diameter, 0.7 μm porosity, Millipore, Billerica, MA, USA) placed in cassettes of three CATHIA sampling heads (Tecora, Paris, France) selecting the thoracic fraction of airborne particles. Each CATHIA head was connected to a sampling pump (model Bravo R/RP Tecora, France) operating at 7 L/min, as recommended by the manufacturer and in agreement with the thoracic convention EN 481. These devices were then placed on a tripod, 1.5 m high, to form a one-meter equilateral triangle around the OPC Grimm 1.108. Sampling was begun when the farmers started to project straw in the stable and it was stopped approximately 16 min after the end of the task in order to sample dusts remaining in the air. Dusts were collected in the five farms between December 2015 and February 2016. The mass of dusts collected on filter was determined by differential weighing. Prior to each weighing, Teflon filters were conditioned one night in a controlled environment (hygrometry 35–50% and temperature 20–22 °C). Then, filters were weighed on an electronic micro-balance (Precisa 2000, minimum resolution of 0.01 mg, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA) before and after dust sampling. The limit of quantification of the method is 0.08 mg per filter. The sum of the three net differences between pre- and post-sampling filter weighing was used to calculate the total dust mass sampled during the task. Just after weighing, the three Teflon filters were successively washed with the same sterile phosphate buffer saline solution, under a laminar flow hood, to re-suspend thoracic dusts into a unique stock suspension for each farm. The suspension was next aliquoted and frozen at -20 °C. A laboratory filter blank extract was also prepared by washing filters that were not exposed to organic dusts.

To determine the size distribution of dusts collected on Teflon filters, the masses of inhalable dusts measured by Grimm were multiplied by the "thoracic relative to inhalable" penetration efficiency derived from the European EN 481 convention for the following median bin sizes: 0.615 μm (0–1 μm), 2 μm (1–3 μm), 4 μm (3–5 μm), 6.25 μm (5–7.5 μm), 8.75 μm (7.5–10 μm), 12.5 μm (10–15 μm), 17.5 μm (15–20 μm) and 25 μm (> 20 μm). The corresponding penetration efficiencies for these 8 median bin sizes are: 100% (0.615 μm), 100% (2 μm), 99.58% (4 μm), 93.74% (6.25 μm), 75.92% (8.75 μm), 43.02% (12.5 μm), 15.73% (17.5 μm) and 2.97% (25 μm). To be expressed in percentage, the masses of thoracic dusts measured in each size bin were then divided by the total mass concentration of thoracic dusts measured by Grimm for the 8 size bins.

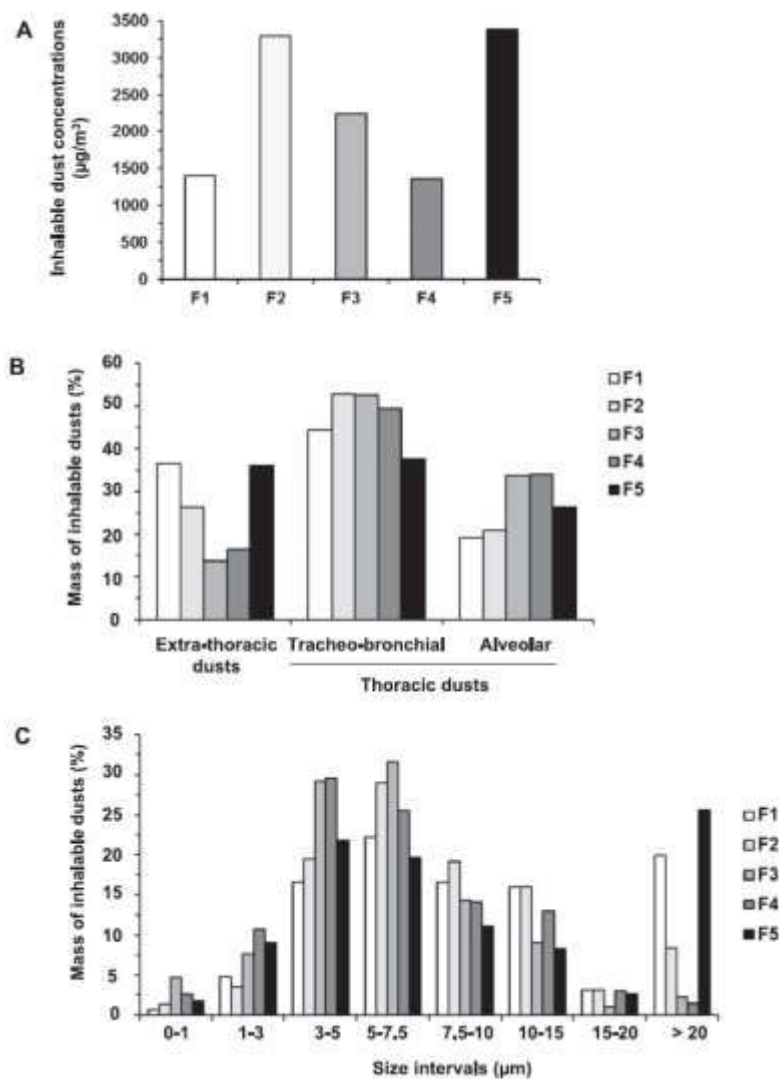


Fig. 1. Concentrations and size of inhalable dusts released during the distribution of straw bedding. Ambient dusts were analyzed in the stable of five different dairy farms (F1 to F5) during straw distribution, using a Grimm 1.108 OPC placed on a tripod in a vacant zone. The results are expressed as (A) inhalable dust concentrations, (B) mass percentages of inhalable dusts for extra-thoracic, tracheobronchial and alveolar fractions and (C) mass percentages of inhalable dusts by particle size intervals.

2.4. NGS

Total DNA was extracted from thoracic dust suspensions using the method developed by Godon et al. (1997). A portion of the 16S rRNA was amplified using the barcoded, universal primer set (515WF/918WR) (Wang et al., 2009). A portion of the 18S rRNA was amplified using universal 18S primer set (574WF/952WR) (Hadzlavdic et al., 2014). PCR reactions were performed using AccuStart II PCR ToughMix kit, cleaned (HighPrep PCR beads, Mokascience) and then submitted for sequencing on Illumina HiSeq, 2000 instrument at GeT-PlaGe (Auzerville, France). Negative controls for DNA extraction kits and PCR reagents were also performed to ensure that materials were not contaminated. Sequences were processed using Mothur (version 1.33.1) according to MiSeq SOP pipeline (Schloss et al., 2009). Barcodes, primers, and sequences showing homopolymers of more than 8 bp have been discarded. Sequences showing 100% homology were grouped in unique sequences, then in operational taxonomic unit (OTUs, based on 97% homology). Sequences were next assigned to match to a sequence in SILVA (version 123) and PR2 databases for prokaryotes and eukaryotes, respectively, to identify the genus level. We considered assigned sequences with relative abundance (RA) higher than 0.002% and we further analyzed those with a RA > 1%.

2.5. Cell cultures and treatments

Peripheral blood mononuclear cells were first isolated from bloody buffy coats of healthy donors through Ficoll gradient centrifugation. Human monocytes were then prepared by a 2-h adhesion step in 6-well microplates, which routinely obtained > 90% of adherent CD14-positive cells as assessed by immunostaining (Bourdonnay et al., 2009). These monocytic cells were next cultured for 6 days in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 20 UI/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin, in the presence of 800 UI/ml GM-CSF to get macrophages as previously reported (Bourdonnay et al., 2009). After 6 days, according to cell cultures, approximately 0.5 million of adherent macrophages were present in each well of the 6-well microplates. Cells were then washed and treated, in 2 ml of complete RPMI 1640 culture medium, with the indicated concentrations of each dust suspension, for 4 h and 24 h to quantify cytokine mRNA and protein levels, respectively. After treatments, cell viability was always > 90%. To verify the direct impact of Teflon filters on gene expression, cells were also exposed to the filter blank extract for 4 h.

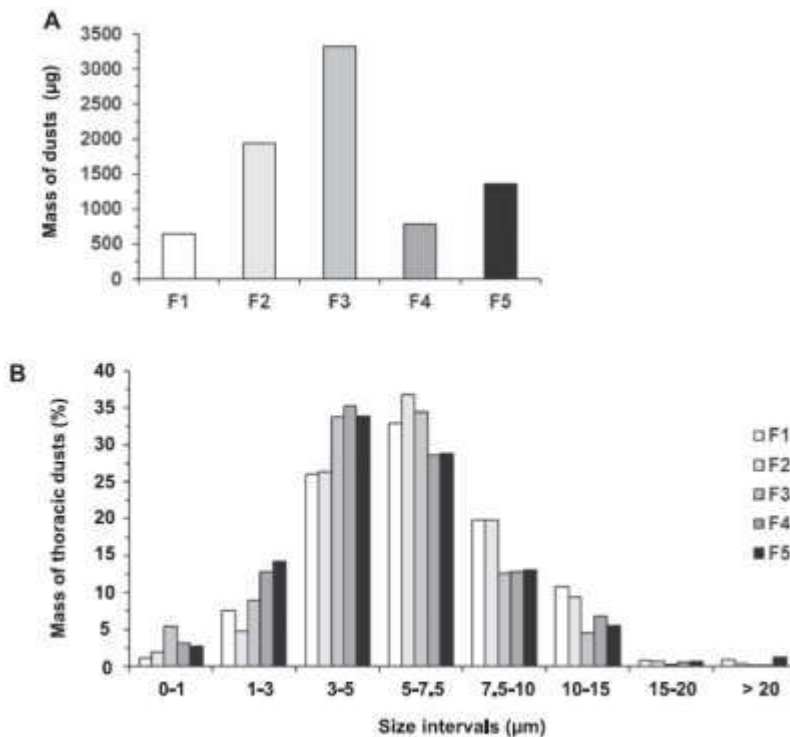


Fig. 2. Granulometric analysis of thoracic dusts collected by CATHIA samplers. (A) Total masses of thoracic dusts collected on filters of three CATHIA sampling heads that selected the thoracic fraction of airborne particles. These devices were positioned on a tripod to form a one-meter equilateral triangle around the Grimm 1.108 OPC during distribution of straw bedding in the five farms (F1 to F5). (B) Estimation of the percentages of dust masses present in each size interval of the thoracic fraction. For each farm, calculations were performed using both the size distribution by size interval of inhalable dusts determined by the OPC measurements (Fig. 1C) and the theoretical sampling efficiency of thoracic fraction defined by the thoracic convention EN 481 for midpoint of each size intervals.

2.6. RNA isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR) assays

At the end of the 4 h treatment with thoracic dusts, total RNAs were extracted by the TRIzol method and then analyzed by RT-PCR, in duplicate, using the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad). Human "QuantiTect Primer assay" sets from Qiagen were used to quantify TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 mRNA transcripts. Specificity of gene amplification was checked at the end of PCR through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analyzed by the comparative cycle threshold method, using the CFX Manager™ Software. For each well, this software automatically sets the fluorescence baseline individually and then computes the optimal quantification cycle (Cq) on a per fluorophore basis by applying a multivariable, nonlinear regression model. Then, mean Cq values were used to normalize expression of the steady-state target mRNA levels to those of the 18 S ribosomal protein, using the $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ method.

2.7. Quantification of cytokine levels

Levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 secreted in culture medium were quantified by ELISA, using specific Duoset ELISA development system kits (R & D Systems) following the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analysis

For studies on human cells, data are expressed as mean \pm SD of four independent experiments performed on four different primary cultures of macrophages. Differences between mRNA and cytokines levels were determined using the ordinary non-parametric Kruskal Wallis test. When variations among data column medians were significantly greater than expected by chance ($p < 0.05$), this analysis was followed by the Dunn's Multiple Comparison Test.

3. Results

3.1. Granulometric characterization of inhalable dusts produced during straw distribution

The present study was designed to characterize organic dusts produced during mechanized distribution of straw bedding in five different French dairy farms (F1 to F5). To this goal, we first analyzed size distribution of inhalable dusts using a Grimm OPC. The mean background dust concentration in the 5 farms was $63.1 \pm 40.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Table S2). The mean concentration of inhalable dusts released during straw dispersion ranged from 1354 (F4) to 3380 (F5) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Fig. 1A). The peak values were measured between 4797 to 32,250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Table S2). After this working task, which lasted approximately 20 min, dust concentrations rapidly decreased to their background levels in the five farms (data not shown). Among these inhalable dusts, the thoracic fraction was always predominant (64–86.4%) in samples collected from the five farms and it is mainly comprised of dusts that could deposit on the tracheobronchial area (Fig. 1B). However, it can be noted that the mass of dusts that could not penetrate below the larynx, (i.e. the extra-thoracic fraction), was variable according the farms (Fig. 1B). It accounted for 13.6% in the farm F3 to 36% in the farms F1 and F5. In addition, Fig. 1C demonstrates that, among inhalable dusts, the highest percentages of dust masses were measured in the 3–5 μm and 5–7.5 μm size intervals. These dusts ranging from 3 μm to 7.5 μm represented 39% (F1) to 60% (F3) of the total dust masses.

3.2. Size distribution of thoracic dusts collected by CATHIA devices

In each farm, simultaneously to Grimm measurements, thoracic dusts were also collected on filters by a CATHIA device during straw distribution. The highest amount of thoracic dusts collected on filters was measured in the F3 sample (Fig. 2A). This result is concordant with our previous observation showing that the extra-thoracic fraction represented only 10% of the inhalable dusts collected in the F3 sample

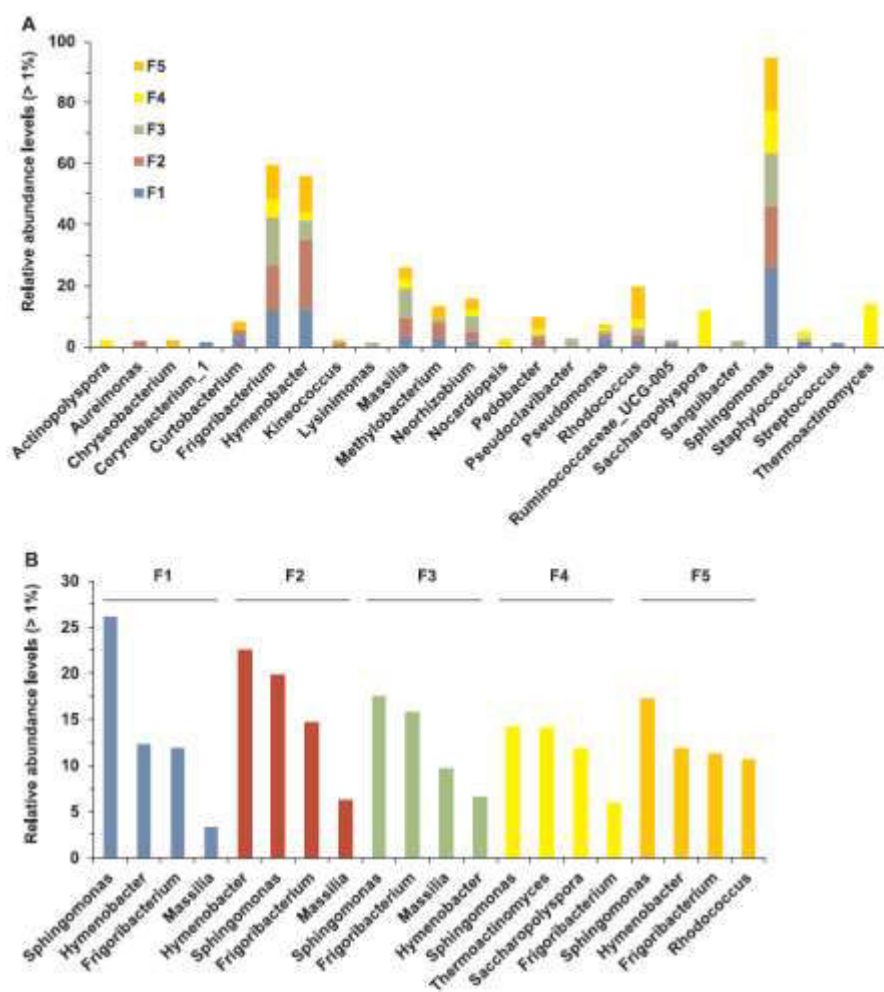


Fig. 3. Bacterial genera with relative abundance (RA) levels > 1% of in dust samples. RA values are expressed as percentages of the total number of genera sequences identified in dairy dusts by NGS. (A) All genera with RA > 1% present in dust samples. (B) Top four of the genera sequences in each dust sample.

(Fig. 1B). Taking into account the efficiency of dust penetration into the thoracic region defined by the European standard EN481, we then estimated the size distribution of thoracic dusts collected on filters using the Grimm measurements previously recorded for inhalable dusts. Fig. 2B shows that dusts with a 3–7.5 μm size formed the majority of thoracic dusts collected in the five farms. Indeed, these dusts represented 58.9% (F1) to 68.2% (F3) of thoracic dusts collected on filters. In contrast, and as expected, dusts having a size > 15 μm accounted for less than 2% in all dust samples.

3.3. Analysis of the microbial composition of thoracic dusts by NGS

Using the NGS technology, we next analyzed microbial and fungal composition of dusts collected in the five dairy farms during distribution of straw bedding. A total of 201,617 prokaryote sequences have been analyzed for the five samples, with 37,871 to 48,691 sequences per sample. Fig. S2 shows that, within the domain "Bacteria", the Gram-negative *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, and the Gram-positive *Actinobacteria* and *Firmicutes* are the four main phyla whose sequences represent more than 97% of the total bacterial DNA sequences. However, the RA levels of these phyla markedly differ within dust samples. Indeed, *Proteobacteria* is the most abundant phylum in samples F1 to F3 (41–43%) whereas *Actinobacteria* comprises of a majority in the samples F4 (35.4%) and F5 (38.4%). *Firmicutes* is less abundant in all samples, except in sample F4 (24.7%), and sequences assigned to *Bacteroidetes* represent 9.7% (F4) to 27.8% (F2) of the total sequences related to

these four phyla. Consequently, the samples F1, F2, F3 and F5 are mainly constituted of Gram-negative organisms (55% to 69%) whereas 60% of Gram-positive organisms are present in the F4 sample (Fig. S2).

On a genus point of view, all assignable sequences with RA > 0.002% are listed in the Table S3. The most abundant sequences in each dust sample, i.e. sequences with RA > 1%, account for 74.2%, 86%, 71%, 70.8% and 76% of all sequences detected in dust sample F1, F2, F3, F4 and F5 respectively. Fig. 3A shows that sequences with RA > 1% are assigned to 24 different genera of which seven are systematically detected in the five dust samples: *Frigoribacterium*, *Hymenobacter*, *Massilia*, *Neorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Sphingomonas*. The top four genera in each dust sample are shown in the Fig. 3B. Among these most abundant genera, *Sphingomonas* (17.3% to 26.1%) and *Frigoribacterium* (6% to 15.8%) are the two genera detected in the five dust samples. *Sphingomonas* is an environmental bacteria isolated from many different land and water habitats, as well as from plant root systems. *Frigoribacterium*, an *Actinobacteria*, was first isolated in cattle barn (Kämpfer et al., 2000). *Massilia* (3.3% to 9.6%), a root colonizing *Proteobacterium*, and *Hymenobacter* (2.8% to 22.5%), an environmental bacteria from the *Bacteroidetes* phylum, are also detected in the top four genera in three (F1 to F3) and four (F1-F3, F5) dust samples, respectively. *Thermoactinomyces* (*Firmicutes*), a bacteria commonly found in natural high-temperature habitats, and *Saccharopolyspora*, an *Actinobacteria* found in soil, are the two Gram-positive genera specifically present in the top four sequences of the F4 sample. As it was not possible to identify the bacteria at the Species level, pathogenic strains

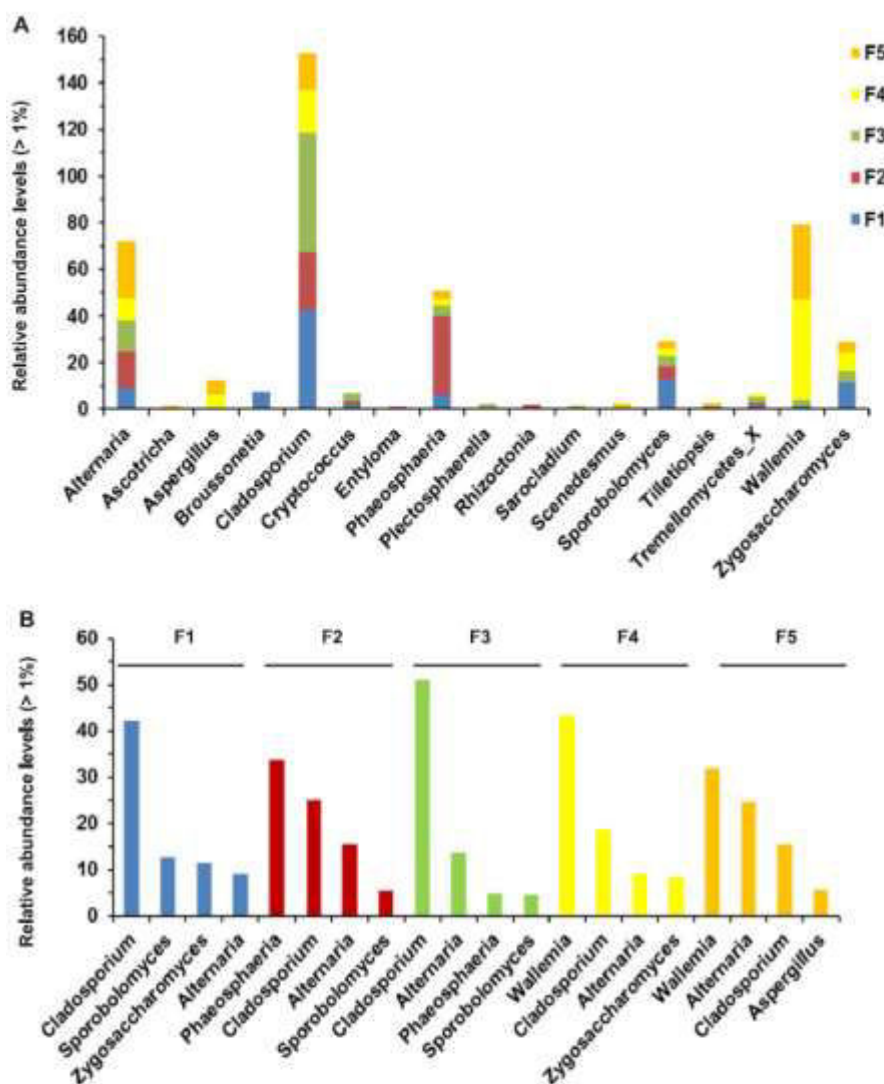


Fig. 4. Fungal genera with relative abundance (RA) levels > 1% of in dust samples. RA values are expressed as percentages of the total number of genera sequences identified in dairy dusts by NGS. (A) All genera with RA > 1% present in dust samples. (B) Top four of the genera sequences in each dust sample.

for humans could not be specified. However, among the genera with RA > 1% and displaying classical pathogenic species, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* were identified in three (F1, F2, F4) and five dust samples, respectively (Fig. 3A). In addition, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* and *Corynebacterium* were also detected with a lower frequency in different samples. Sequences with RA < 1% are comprised of 49%, 54%, 50%, 57% and 54% Gram-negative bacteria in the dust sample F1, F2, F3, F4 and F5 respectively (Table S3). It is noteworthy that sequences assigned to the *Legionella* genus are detected at RA < 1% in the sample F2 but not in any other samples.

3.4. Analysis of the fungal composition of thoracic dusts by NGS

A total of 261,904 eukaryote sequences have been analyzed for the five samples, with 40,852 to 53,235 eukaryote sequences per dust sample. All assignable sequences with RA > 0.002% are listed in the Table S4. The sequences with RA > 1% account for 93.7%, 91.6%, 93.8%, 94.1% and 94.9% of all sequences detected in dust sample F1, F2, F3, F4 and F5 respectively. Fig. 4A shows that sequences with RA > 1% are assigned to 17 different genera of which four are systematically detected in all dust samples: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phaeosphaeria* and *Sporobolomyces*. Among the top four genera,

Cladosporium (15.5% to 51.1%) and *Alternaria* (8.96% to 24.7%) are detected in the five dust samples (Fig. 4B). They constitute the most common outdoor genera detected in air samples. Other predominant genera include *Sporobolomyces* (a soil yeast), *Zygosaccharomyces* (a yeast contaminating food items), *Phaeosphaeria* (a wheat pathogen ascomycete) and *Wallemia* (a xerophilic fungus frequently found in agricultural dusts) present in the top four genera of different samples. In addition, *Cryptococcus* and *Aspergillus*, which contain well-known pathogenic species for humans, are also detected with RA > 1% in samples F1 (1.74%), F2 (1.9%), F3 (3.4%), and in samples F4 (6.6%), F5 (5.7%), respectively.

3.5. Pro-inflammatory responses induced by thoracic dusts in human macrophages

We finally determined the ability of thoracic dusts to trigger pro-inflammatory responses in human monocyte-derived macrophages. We exposed macrophages to 0.1–10 µg/ml (or approximately 0.026–2.6 µg/cm²) thoracic dusts, re-suspended in RPMI 1640 culture medium, for 4 h and 24 h to quantify expression of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-8 at mRNA and protein levels, respectively. Each dust sample was incubated with four different primary cultures of human

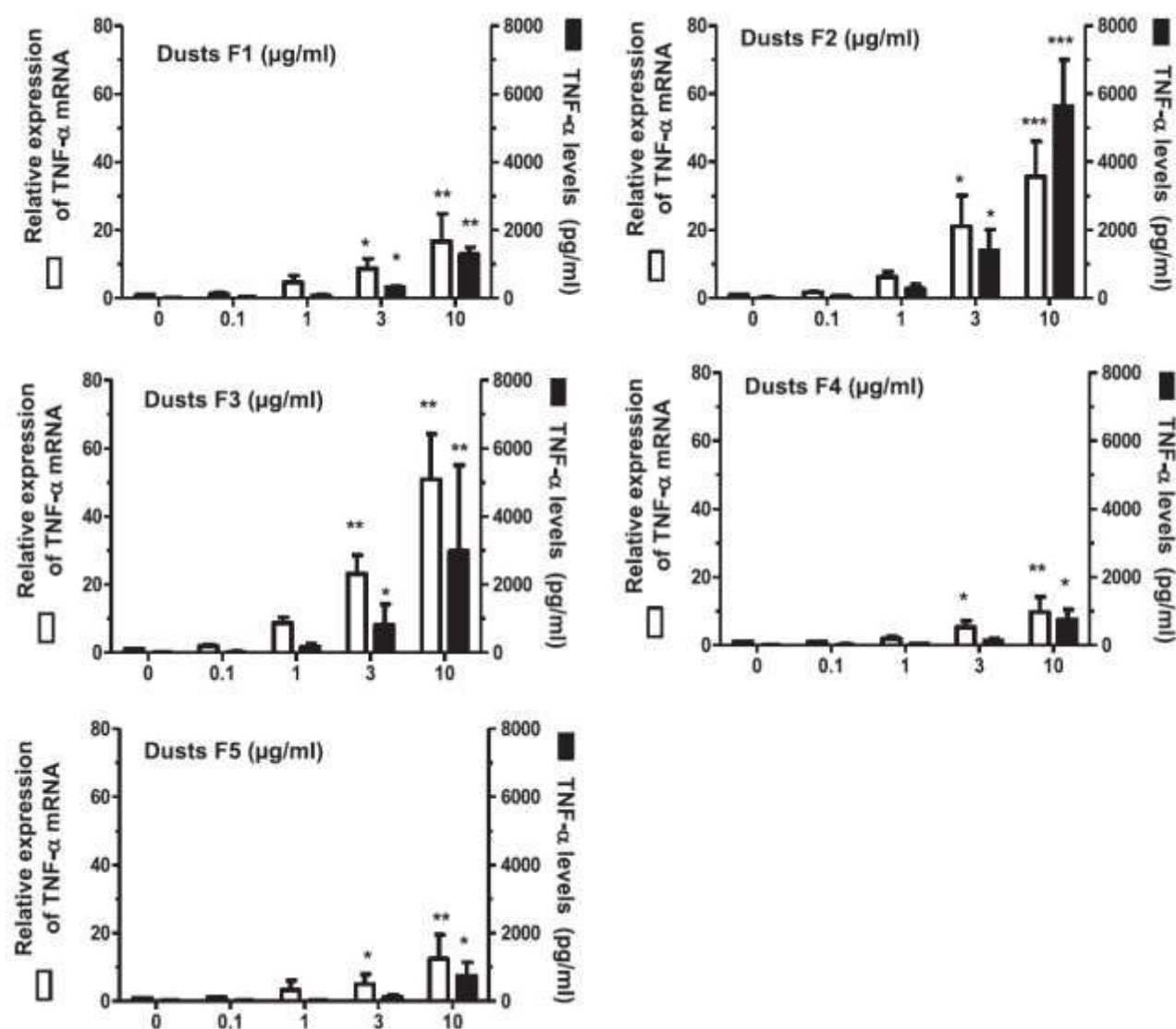


Fig. 5. Effects of dairy dusts on TNF- α expression in human macrophages. Human monocyte-derived macrophages were exposed for 4 h (mRNA levels) or 24 h (protein secretion) to increasing concentrations of dusts collected in dairy farms F1 to F5. mRNA levels of target genes were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relatively to mRNA levels found in "0" control cells not exposed to dusts, arbitrarily set at the value of 1. The levels of TNF- α secreted in culture medium were quantified by ELISA. All results are expressed as means \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus "0".

macrophages prepared from four different human donors. First, control experiments showed that the filter blank extract had no effect on gene expression in human macrophages (data not shown). In contrast, thoracic dusts collected in the five farms dose-dependently increased the levels of both TNF- α transcripts and TNF- α protein secretion (Fig. 5). Their effects were always maximal at 10 $\mu\text{g/ml}$, but the levels of gene stimulation and protein secretion were different according to the samples. The dusts from the F2 sample induced the highest release of TNF- α , at a level that was approximately 5- to 6-fold higher than those measured for the F1, F4 and F5 samples. Similar results were obtained for the three other cytokines. All thoracic dust samples markedly increased the levels of transcripts coding for IL-1 β , IL-6 and IL-8 proteins (Figs. 6–8). IL-1 β secretion was around 25–50 pg/ml for macrophages exposed to F1, F3, F4 and F5 samples but approximately 4-fold higher for cells treated with the F2 dust sample (Fig. 6). The secretions of IL-6 (Fig. 7) and IL-8 (Fig. 8) were also maximal for macrophages treated with the F2 dust sample.

4. Discussion

The present study demonstrates that mechanized distribution of straw bedding in these five French dairy farms generates high concentrations of thoracic dusts that contain several different bacterial and fungal DNA sequences, and induce pro-inflammatory responses in macrophages.

First, measurements of inhalable dust concentrations by static samplings show that mechanical distribution of straw bedding produced a dense dust cloud that lasted approximately 15–20 min in each farm. Dust concentrations (from 21 to 3380 $\mu\text{g/m}^3$) are in the range of those measured by other static samplings in Californian (74–1690 $\mu\text{g/m}^3$) and Swiss (154–4747 $\mu\text{g/m}^3$) dairy farms during a working day inside the cattle building (Cathomas et al., 2002; Garcia et al., 2013a). Using personal samplers placed at breathing zone, Garcia et al. (2013b) compared dust exposure of Californian dairy workers engaged in seven different tasks and concluded that farmers performing re-bedding had

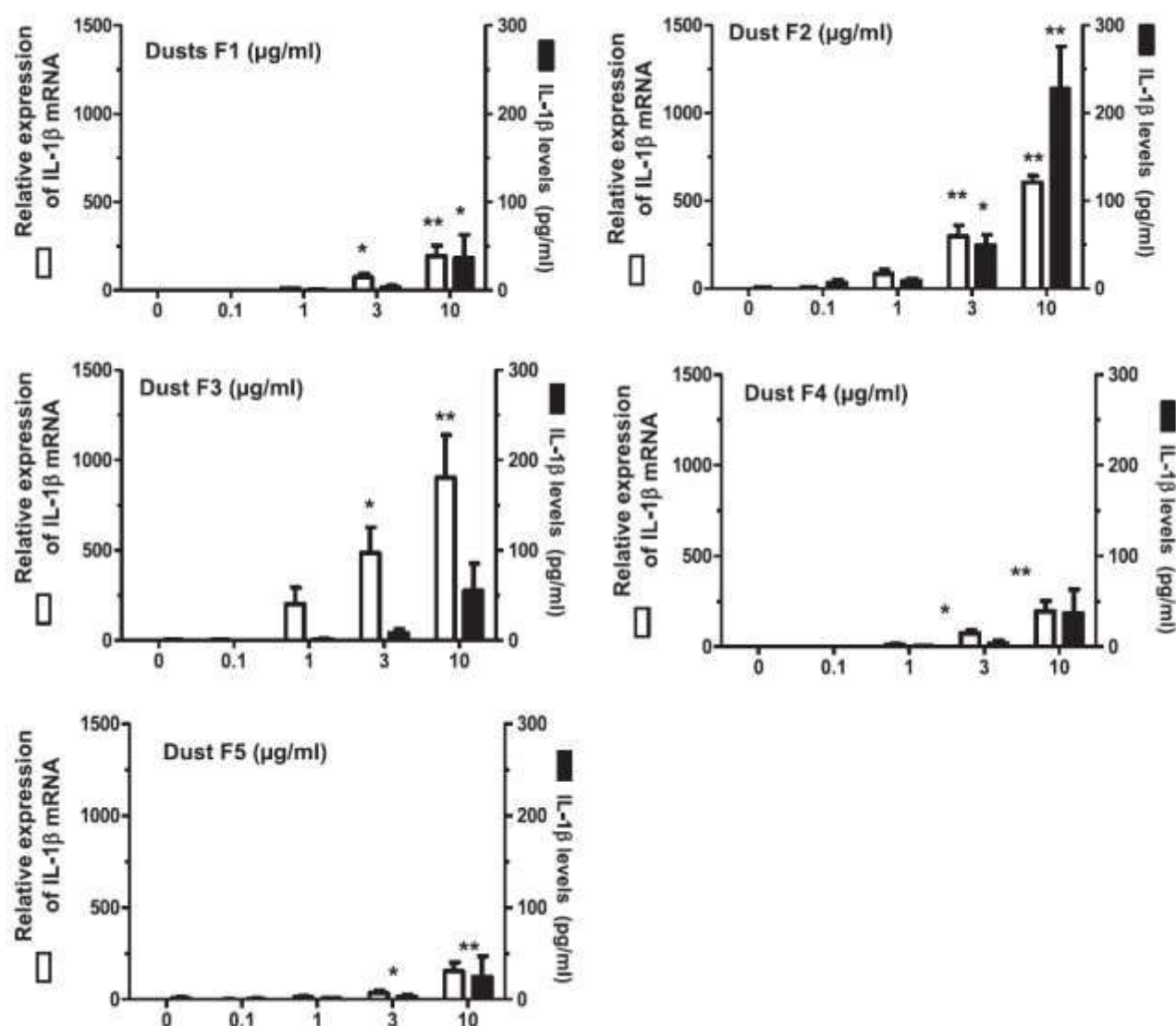


Fig. 6. Effects of dairy dusts on IL-1 β expression in human macrophages. Human monocyte-derived macrophages were exposed for 4 h (mRNA levels) or 24 h (protein secretion) to increasing concentrations of dusts collected in dairy farms F1 to F5. mRNA levels of target genes were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relatively to mRNA levels found in "0" control cells not exposed to dusts, arbitrarily set at the value of 1. The levels of IL-1 β secreted in culture medium were quantified by ELISA. All results are expressed as means \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus "0".

the highest sample mean concentration for inhalable dusts. Similarly, in the Basinas's study, multivariate models indicated that task with the strongest influence on both inhalable dust and endotoxin exposure in Danish cattle barns was the preparation and handling of bedding (Basinas et al., 2014). Altogether these results strengthen the hypothesis that distribution of bedding materials, including straw spreading, is one of the main tasks exposing dairy farmers to inhalable dusts. In addition, we show in the present study i) that thoracic particles steadily constitute the main fraction of inhalable dusts liberated during straw bedding distribution and ii) that dusts are small enough to efficiently penetrate into the tracheobronchial regions, as their masses are mostly grouped in the 3–7.5 μm size intervals. Cathomas et al. (2002) previously reported that the PM_{10} fraction constituted approximately 63% of the total suspended particles collected during a working day in Swiss cattle barns. However, in this report, the task(s) that specifically produced PM_{10} could not be determined since dusts were collected on the same filters during the whole activities including milking, feeding, barn

cleaning, manure removal or bedding distribution. Moreover, the specific size distribution of the collected dusts was not assessed. It can be noted that the mass percentages of extra-thoracic particles measured in the five Breton dairy farms are highly variable, although they never exceed those of thoracic dusts. Differences in concentrations of these largest particles may result from the type of shredders used for straw distribution, from adjustments of these machines and/or storage conditions of straw before measurements. Collectively, our results thus demonstrate that the dispersion of straw bedding in the five Breton dairy farms constitutes a critical task that mainly releases small thoracic dusts.

Secondly, using NGS analysis of the bacterial 16S RNAs, we show that thoracic dusts collected during straw spreading are mainly composed of Gram-negative bacteria, especially *Proteobacteria*, in 4 out of 5 samples. The *Proteobacteria Sphingomonas* was one of the two most abundant bacteria genera detected in the five dust samples. *Sphingomonas* species are frequently identified in the environment,

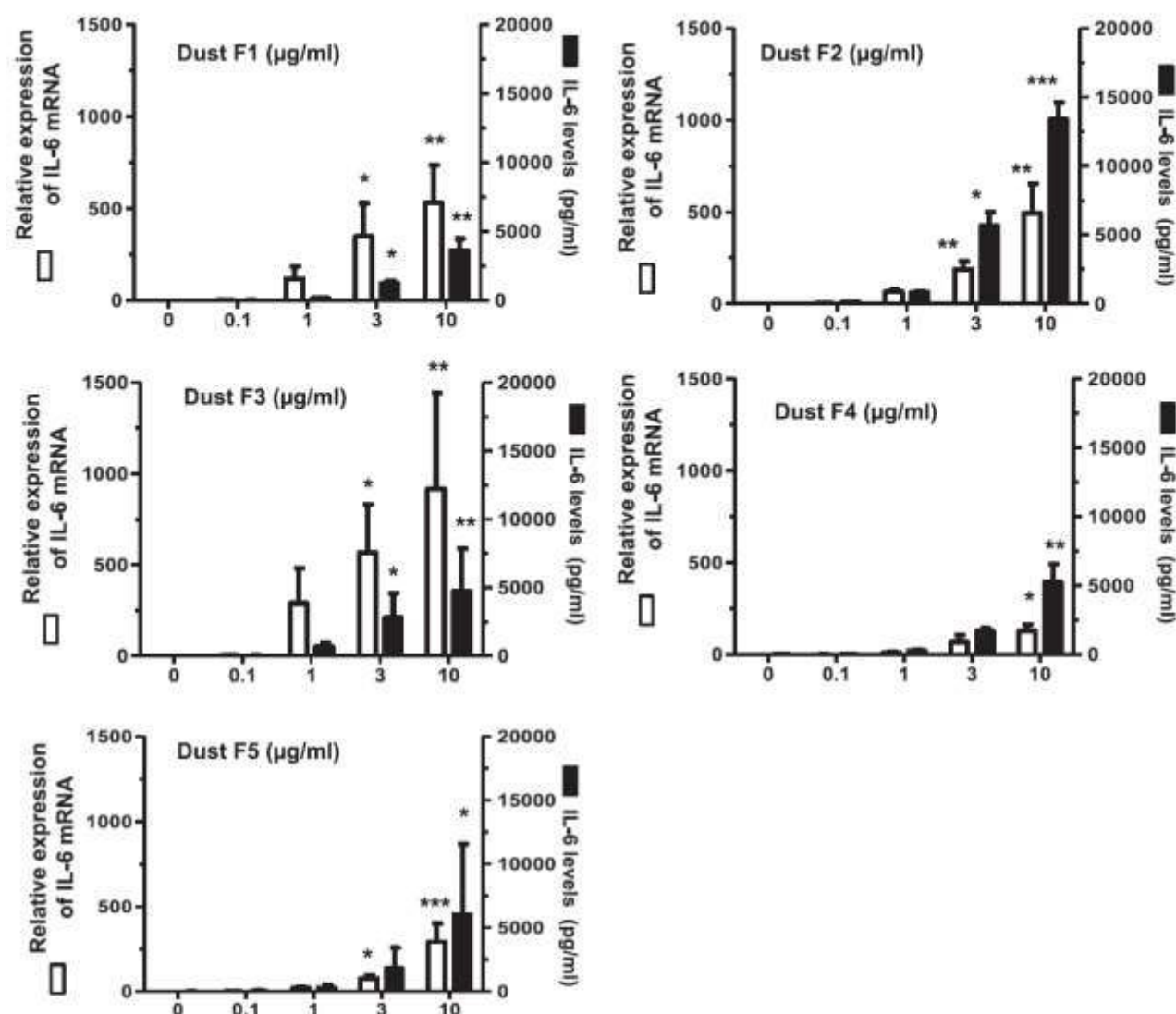


Fig. 7. Effects of dairy dusts on IL-6 expression in human macrophages. Human monocyte-derived macrophages were exposed for 4 h (mRNA levels) or 24 h (protein secretion) to increasing concentrations of dusts collected in dairy farms F1 to F5. mRNA levels of target genes were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relatively to mRNA levels found in “0” control cells not exposed to dusts, arbitrarily set at the value of 1. The levels of IL-6 secreted in culture medium were quantified by ELISA. All results are expressed as means \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus “0”.

especially in soil and water. They are not considered as major infectious agents for humans, although *Sphingomonas paucimobilis* could be an opportunistic pathogen in immunocompromised individuals (Ryan and Adley, 2010). Besides *Proteobacteria*, Gram-positive bacteria still represent 30–40% of all genera identified in inhalable dusts and they largely predominate in the F4 dust sample (60%). *Thermoactinomyces* (Firmicutes) and *Saccharopolyspora* (Actinobacteria) were specifically detected in the top four sequences with RA > 1% in this last sample. The species *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoactinomyces candidus* and *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*) are frequently detected in dairy farms, notably in those performing straw spreading (Kotimaa et al., 1984, 1991). These bacterial species are known as classical agents causing the hypersensitivity pneumonitis called the Farmer’s lung disease, a pathology observed in dairy farming regions (Kotimaa et al., 1984; Cormier et al., 1985; Roussel et al., 2005). Moreover, it was not surprising to identify *Frigoribacterium* as the most abundant Gram-positive genera in all dusts sample since this Actinobacteria was first isolated from airborne dusts during the distribution

and handling of feed and bedding in Finnish cattle barns (Kämpfer et al., 2000). As expected, the bacterial patterns found in our dust samples markedly differ from those described in American swine farms which do not use straw bedding. These patterns are dominated by the Gram-positive genera *Actinobacteria* and *Firmicutes* (Boissy et al., 2014). Notably, *Clostridium* and *Lactobacillus* (Firmicutes), the two most abundant genera found in swine dust samples (Boissy et al., 2014), were only detected at very low levels in the dairy dust samples (see Table S3). Although pathogenic species cannot be identified by the NGS methodology, classic pathogenic genera with RA > 1% have been found, such as *Staphylococcus* and *Streptococcus* which are potentially associated with the presence of animals in farms. *Pseudomonas* was also detected in the five dust samples. Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* is known to increase the risk of exacerbation in patients with COPD (Murphy et al., 2008). In addition, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* and *Corynebacterium*, measured in low proportions, have been associated with nosocomial respiratory infections and can represent health risk to immunocompromised individuals (Savini et al.,

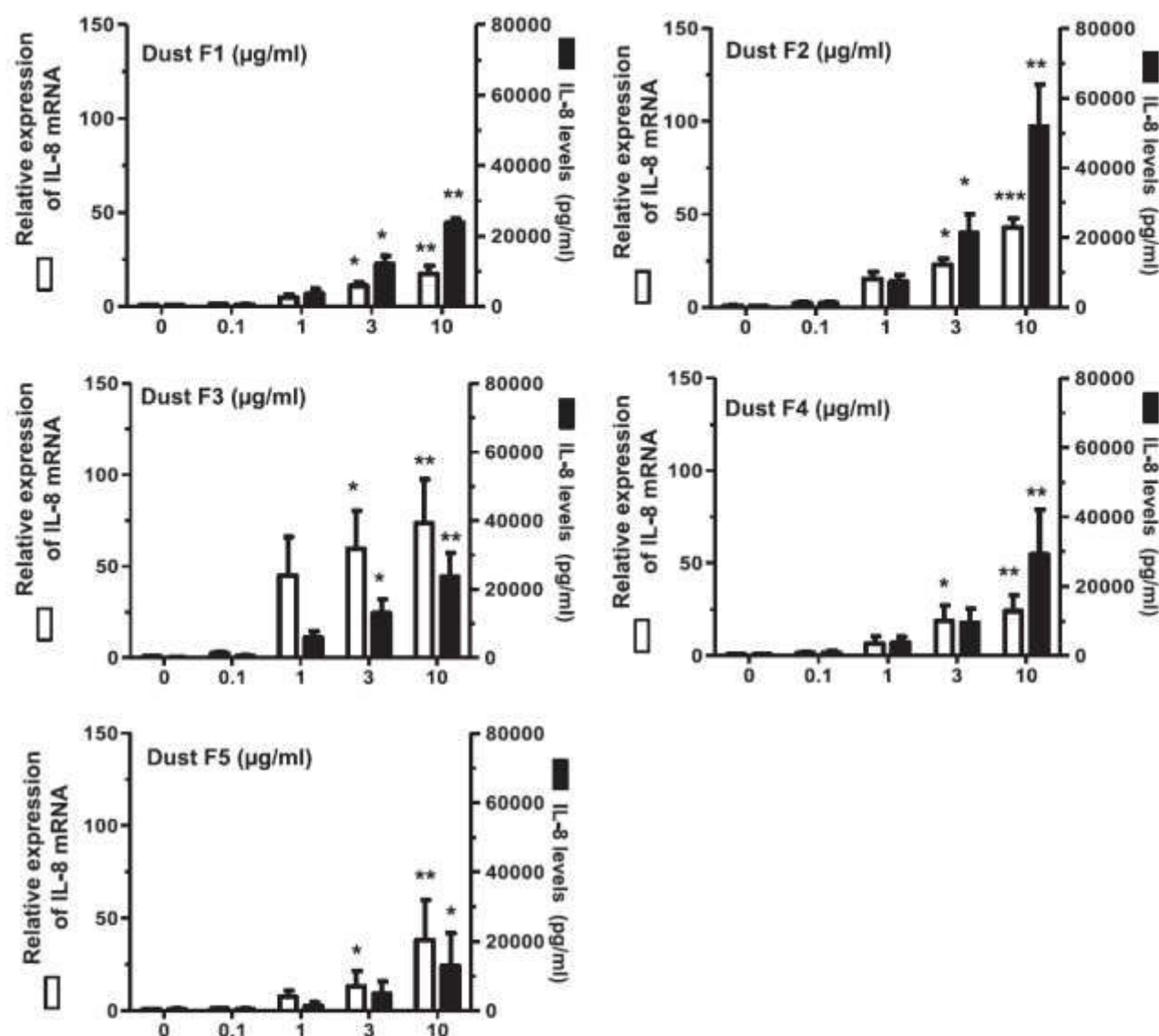


Fig. 8. Effects of dairy dusts on IL-8 expression in human macrophages. Human monocyte-derived macrophages were exposed for 4 h (mRNA levels) or 24 h (protein secretion) to increasing concentrations of dusts collected in dairy farms F1 to F5. mRNA levels of target genes were determined by quantitative RT-PCR and normalized to endogenous ribosomal 18S RNA levels. Data are expressed relatively to mRNA levels found in "0" control cells not exposed to dusts, arbitrarily set at the value of 1. The levels of IL-8 secreted in culture medium were quantified by ELISA. All results are expressed as means \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus "0".

2012; Baranzelli et al., 2013).

NGS analysis of 18S RNA shows that the fungal genera *Alternaria* and *Cladosporium* predominate in all dust samples. These species have been associated with an increased risk of airway allergic diseases (Sharpe et al., 2015). Especially, sensitization to *Alternaria alternata* spores, a very common outdoor aeroallergen, constitutes a major risk factor for asthma (Gabriel et al., 2016). *Cladosporium*, but not *Alternaria*, species have also been commonly detected in bedding materials in Finnish dairy farms (Kotimaa et al., 1991; Hanhela et al., 1995).

Other potentially pathogenic genera have been found in some samples. *Wallemia* is notably the most frequently mold detected in samples F4 and F5. In addition to bacterial species, *Wallemia sebi* is a well-known fungal agent classically reported to cause Farmer's lung disease (Reboux et al., 2001). In eastern France, *Eurotium amstelodami*, the teleomorph of *Aspergillus vitis*, and *Absidia corymbifera* are two other molds mainly involved in this hypersensitivity pneumonitis (Reboux

et al., 2001). *Aspergillus* sequences have been detected in the five samples and predominantly in F4 and F5 samples (Table S2). However, sequences related to *Absidia* were not found, even at low levels, in the five dust samples collected in the Breton dairy farms (western France). It is noteworthy that the F4 dust sample is particularly enriched with sequences of *Thermoactinomyces*, *Saccharopolyspora* and *Wallemia*, three microbial agents promoting the Farmer's lung disease.

Cryptococcus, which has been detected in different samples at RA > 1%, has been associated with pneumonia (Brezendine et al., 2011). *Sporobolomyces* species, present at high levels in 3 out of 5 five dust samples, have been exceptionally associated with infection in immunocompetent or immunocompromised patients (McNicholas et al., 2012).

Collectively, the results of NGS analysis show that global bacterial and fungal composition is different for the five dust samples and thus suggest that a specific microbial pattern of dusts released during the

distribution of straw bedding cannot be generalized for Breton dairy farms. Further studies are required to characterize the specific species present in these samples.

In the last part of this study, we investigated the pro-inflammatory responses of human macrophages exposed to the five dust samples. Our results demonstrate that dusts released during straw spreading dose-dependently induced TNF- α , IL-6 and IL-8 expressions at both mRNA and protein levels in primary cultures of human monocyte-derived macrophages. The levels of gene inductions were nevertheless variable probably due to the specific microbial composition of each sample. Particularly, gene expressions always achieved the highest levels in the F2 dust sample in which sequences related to *Hymenobacter* and *Phaeosphaeria* are the most abundant. Although these two genera have never been reported to promote inflammation, their association in the F2 sample, in addition to other microbial agents, may have triggered these marked responses of human macrophages. Previous studies have reported that dusts collected in American dairy farms, or their soluble extracts, also stimulated expression of these three pro-inflammatory genes in human U937 macrophages and monocytes (Poole et al., 2010; Vogel et al., 2012). These dust effects appear to be controlled in part by the transcription factor NF- κ B through endotoxin-dependent activation of TLR4 since endotoxin depletion or TLR4 blocking significantly reduced cytokine expressions (Poole et al., 2010; Vogel et al., 2012). In addition, bacterial peptidoglycan, a major component of Gram-positive bacteria detected in settled dust samples from swine and dairy farms, can contribute to pro-inflammatory gene expression by stimulating TLR2 and nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathways (Poole and Romberger, 2012).

Our results show that the five dust samples also induced IL-1 β secretion. Activation of the NALP3 inflammasome allows the caspase-1-dependent processing of pro-IL-1 β and the release of active IL-1 β from macrophages (Martinon et al., 2004). In contrast to the lipopolysaccharide endotoxin, peptidoglycans and its derivative muramyl dipeptide can trigger the inflammasome-dependent secretion of IL-1 β , which secondary promotes induction of TNF- α , IL-6 and IL-8 gene expression in macrophages (Martinon et al., 2004; Hedl and Abraham, 2011). These results thus suggest that both endotoxins and peptidoglycans can mediate pro-inflammatory responses of human macrophages exposed to the thoracic dusts collected in Breton dairy farms.

It should be noted that fungal spores, notably those from *Aspergillus* and *Cladosporium*, *Aspergillus fumigatus* antigens and alternariol, a metabolite produced by *Alternaria*, can induce pro-inflammatory gene expression in monocytes/macrophages (Shahan et al., 1998; Jouneau et al., 2011; Solhaug et al., 2015). Moreover, Bellanger et al. (2011) showed that β -glucans from fungal hyphae of *Eurotium amstelodami* are able to trigger a marked inflammatory response in airway human cells. Consequently, fungal species contained in thoracic dusts may also contribute to pro-inflammatory responses of dust-exposed macrophages.

Finally, as shown in Figs. 5–8, dust effects were detectable in cells treated from 1 μ g/ml or 0.26 μ g/cm². This level of settled dusts was previously reached *in vitro*, using an aerosol-to-cell exposure system, when the mass concentration of dairy parlor PM₁₀ inside the gravity settling chamber was 2.6–3 mg/m³ (Hawley et al., 2015). These aerosol concentrations coincide with those measured in French dairy farms during straw spreading. These observations thus suggest that thoracic dust concentrations used in the present study maybe associated with environmentally-relevant atmospheric dust levels.

5. Conclusions

In summary, our results demonstrate that mechanized distribution of straw bedding releases a cloud of organic thoracic dusts that are small enough to reach the bronchial tract where inflammation and chronic obstruction related to COPD or asthma are expected to occur. These dusts can trigger at least *in vitro*, marked pro-inflammatory

responses of macrophages, probably due to their complex organic composition. Distribution of straw bedding can thus constitute a sensitive working task that exposes dairy farmers to biologically active particles. Further investigations are nevertheless required to determine if chronic exposure to these organic particles can stably impair lung functions.

Funding

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U108517N), University of Rennes-I, Institut Technique des Gaz et de l'Air (ITGA), Association pour l'Aide aux Insuffisants Respiratoires (AIR) de Bretagne and by the French Agency of Technological Research (ANRT) for the PhD grant for H. Pfister (Cifre no. 2014/0488).

Acknowledgements

We thank Pr Olivier Fardel for helpful comments and critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.025>.

References

- Baranzelli, A., Wallyn, F., Nseir, S., 2013. [Lower respiratory tract infections related to *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*]. *Rev. Pneumol. Clin.* 69, 250–259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneumo.2013.02.005>.
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Erlandsen, M., Andersen, N.T., Takai, H., Heederik, D., Omland, Ø., Kromhout, H., Schliessen, V., 2014. Exposure-affecting factors of dairy farmers' exposure to inhalable dust and endotoxin. *Ann. Occup. Hyg.* 58, 707–723. <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/meu024>.
- Bellanger, A.P., Million, L., Rognon, B., Roussel, S., Botterid, F., Bretagne, S., Rebooux, G., 2011. Variable beta-glucanase production by different states of *Eurotium amstelodami* explains differences in inflammatory responses in airway cells. *APMIS* 119, 605–610. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02775.x>.
- Botssy, R.J., Romberger, D.J., Roughhead, W.A., Weissenburger-Moser, L., Poole, J.A., LeVan, T.D., 2014. Shotgun pyrosequencing metagenomic analyses of dusts from swine confinement and grain facilities. *PLoS One* 9, e95578. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095578>.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Sparfeld, L., Galibert, M.-D., Jouneau, S., Martin-Chouly, C., Fardel, O., Verhuet, L., 2009. Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages. *Mol. Immunol.* 46, 649–656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.268>.
- Briandine, K.D., Baddley, J.W., Pappas, P.G., 2011. Pulmonary cryptococcosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 727–734. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1295720>.
- Cathomas, R.L., Brüesch, H., Fehr, R., Reinhart, W.H., Kuhn, M., 2002. Organic dust exposure in dairy farmers in an alpine region. *Swiss Med. Wkly.* 132, 174–179.
- CEN, 1993. EN 481. Workplace Atmospheres – Size Fraction Definition for Measurements of Airborne Particles. European committee for standardization, Brussels.
- CEN, 2014. EN 12341. Ambient air. Standard Gravimetric Measurement Method for the Determination of the PM10 or PM2.5 Mass Concentration of Suspended Particulate Matter.
- Cornier, Y., Bellanger, J., Durand, P., 1985. Factors influencing the development of serum precipitins to farmer's lung antigen in Quebec dairy farmers. *Thorax* 40, 138–142.
- Eduard, W., Pearce, N., Douwes, J., 2009. Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. *Chest* 136, 716–725. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.08.2192>.
- Gabriel, M.F., Poetigo, I., Tomaz, C.T., Martinez, J., 2016. *Alternaria alternata* allergens: markers of exposure, phylogeny and risk of lung-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 89–90, 71–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003>.
- Gaiet, M., Thon, I., Westeel, V., Chaudemanche, H., Venier, A.G., Dubiez, A., Laplanche, J.J., Dalphin, J.-C., 2007. Twelve-year longitudinal study of respiratory status in dairy farmers. *Eur. Respir. J.* 30, 97–103. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00150405>.
- Garcia, J., Bennett, D.H., Tancredi, D., Schenker, M.B., Mitchell, D., Mitloehner, F.M., 2013a. A survey of particulate matter on California dairy farms. *J. Environ. Qual.* 42, 40–47. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq.2012.0169>.
- Garcia, J., Bennett, D.H., Tancredi, D., Schenker, M.B., Mitchell, D., Reynolds, S.J., Mitloehner, F.M., 2013b. Occupational exposure to particulate matter and endotoxin for California dairy workers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 56–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.04.001>.
- Godos, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habsouet, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence

- analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), 2802–2813.
- Gullien, A., Puyraveau, M., Soumagne, T., Guillot, S., Rannou, F., Marquette, D., Berger, P., Jousseau, S., Monnet, E., Mauny, F., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., Degano, B., 2016. Prevalence and risk factors for COPD in farmers: a cross-sectional controlled study. *Eur. Respir. J.* 47, 95–103. <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00153-2015>.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C., 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One* 9, e87624. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>.
- Hanhela, R., Louhelainen, K., Pasanen, A.L., 1995. Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of *Wallenia sebi* and *Fusaria*. *Scand. J. Work Environ. Health* 21, 223–228.
- Hawley, B., Schaeffer, J., Poole, J.A., Dooley, G.P., Reynolds, S., Volckers, J., 2015. Differential response of human nasal and bronchial epithelial cells upon exposure to size-fractionated dairy dust. *J. Toxicol. Environ. Health A* 78, 583–594. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1015699>.
- Hedl, M., Abraham, C., 2011. Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 286, 26440–26449. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.237495>.
- Jousseau, S., Boché, A., Brinchault, G., Fekete, K., Guillot, S., Bayat, S., Desruets, B., 2012. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85, 623–630. <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-011-0708-6>.
- Jousseau, S., Bonizec, M., Belleguic, C., Desruets, B., Brinchault, G., Galainé, J., Gangneux, J.-P., Martin-Chouly, C., 2011. Anti-inflammatory effect of fluvastatin on B-8 production induced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* antigens in cystic fibrosis. *PLoS One* 6, e22655. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022655>.
- Kämpfer, P., Rainey, F.A., Andersson, M.A., Nurmiaho Lassila, E.L., Ulyrich, U., Busse, H.J., Weiss, N., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M., 2000. *Frigoribacterium faeni* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic genus of the family Microbacteriaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (Pt 1), 355–363. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-1-355>.
- Kotimaa, M.H., Husman, K.H., Terho, E.O., Mustonen, M.H., 1984. Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland. *Scand. J. Work Environ. Health* 10, 115–119.
- Kotimaa, 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, 117–122.
- Kullman, G.J., Thorne, P.S., Waldron, P.F., Marx, J.J., Ault, B., Lewis, D.M., Siegel, P.D., Olenchok, S.A., Merchant, J.A., 1998. Organic dust exposures from work in dairy barns. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59, 403–413. <http://dx.doi.org/10.1080/15428119891010668>.
- Marescaux, A., Degano, B., Soumagne, T., Thon, L., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., 2016. Impact of farm modernity on the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in dairy farmers. *Occup. Environ. Med.* 73, 127–133. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2014-102697>.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., Tschopp, J., 2004. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.* 14, 1929–1934. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.027>.
- May, S., Romberger, D.J., Poole, J.A., 2012. Respiratory health effects of large animal farming environments. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 524–541. <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2012.744288>.
- McNicholas, S., McDermott, H., Power, L., Johnson, E.M., Moroney, J., Humphreys, H., Smyth, E.G., 2012. *Sporobolomyces roseus* in the cerebrospinal fluid of an immunocompetent patient—to treat or not to treat? *J. Med. Microbiol.* 61, 295–296. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.036293-0>.
- Murphy, T.F., Brauer, A.L., Eschberger, K., Lobbins, P., Grove, L., Cai, X., Sethi, S., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 853–860. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200709-1413OC>.
- Poole, J.A., Dooley, G.P., Saito, R., Burrell, A.M., Bailey, K.L., Romberger, D.J., Mehaffy, J., Reynolds, S.J., 2010. Muramic acid, endotoxin, 3-hydroxy fatty acids, and ergosterol content explain monocyte and epithelial cell inflammatory responses to agricultural dusts. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73, 684–700. <http://dx.doi.org/10.1080/15287390903578539>.
- Poole, J.A., Romberger, D.J., 2012. Immunological and inflammatory responses to organic dust in agriculture. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12 (2), 126–132.
- Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnet, K., Dalphin, J.-C., 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1534–1539. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006077>.
- Rousselet, S., Reboux, G., Dalphin, J.-C., Laplante, J.-J., Piarroux, R., 2005. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12, 217–221.
- Ryan, M.P., Adley, C.C., 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J. Hosp. Infect.* 75, 153–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.007>.
- Savini, V., Fazi, P., Favaro, M., Astolfi, D., Polilli, E., Pompilio, A., Vannucci, M., D'Amario, C., Di Bonaventura, G., Fontana, C., D'Antonio, D., 2012. Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Traukamurella* and *Gordonia*. *Microbes Infect.* 14, 401–410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.11.014>.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thillinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Shahan, T.A., Sorenson, W.G., Paulauskis, J.D., Morey, R., Lewis, D.M., 1998. Concentration- and time-dependent upregulation and release of the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar macrophages by fungal spores implicated in airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18, 435–440. <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb.18.3.2856>.
- Sharpe, R.A., Beamman, N., Thornton, C.R., Husk, K., Osborne, N.J., 2015. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 110–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.002>.
- Solhaug, A., Wisbeck, C., Christoffersen, T.E., Hult, L.O., Lea, T., Eriksen, G.S., Holme, J.A., 2015. The mycotoxin alternariol induces DNA damage and modify macrophage phenotype and inflammatory responses. *Toxicol. Lett.* 239, 9–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.1107>.
- Thon, L., Thiebaut, A., Jochault, L., Lefeltvre, A., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., 2011. Influence of hay and animal feed exposure on respiratory status: a longitudinal study. *Eur. Respir. J.* 37, 767–774. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00122209>.
- Vogel, C.F.A., Garcia, J., Wu, D., Mitchell, D.C., Zhang, Y., Kado, N.Y., Wong, P., Trujillo, D.A., Lollies, A., Bennett, D., Schenker, M.B., Mitrochauer, F.M., 2012. Activation of inflammatory responses in human U937 macrophages by particulate matter collected from dairy farms: an in vitro expression analysis of pro-inflammatory markers. *Environ. Health* 11, 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-11-17>.
- Wang, Z., Tollervey, J., Briese, M., Turner, D., Uke, J., 2009. CLIP: construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins in vivo. *Methods* 48, 287–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.021>.

Farms	Stable type	milking cow	length (m)	width (m)	surface (m2)
F1	cubicle	85	40	30	1200
F2	free stall	85	70	20	1400
F3	free stall	130	65	30	1950
F4	cubicle	60	65	15	975
F5	free stall	100	75	20	1500
Mean		92	63	23	1405
SD		25,6	13,5	6,7	365,0

Farms	Sampling time (minutes)	Mean inhalable dust concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Background level ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Peak concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
F1	37	1410,5	44,6	6081,3
F2	37	3299,8	54,1	23550,3
F3	42	2242,1	65,5	26467,2
F4	37	1536,9	129,9	4797,3
F5	27	3380	21,28	32250,8
Mean	36,0	2373,9	63,1	18629,4
SD	5,5	937,5	40,7	12449,6

Table S4. Relative abundance levels (> 0,002 %) of assignable fungal sequences detected by NGS

Table S4. Relative abundance levels (> 0,002 %) of assignable fungal sequences detected by NGS									
Dust F1		Dust F2		Dust F3		Dust F4		Dust F5	
Genera	RA (%)	Genera	RA (%)	Genera	RA (%)	Genera	RA (%)	Genera	RA (%)
Cladosporium	42,336%	Phaeosphaeria	33,718%	Cladosporium	51,133%	Walleimia	43,394%	Walleimia	31,959%
Sporobolomyces	12,759%	Cladosporium	25,032%	Alternaria	13,761%	Cladosporium	18,723%	Alternaria	24,652%
Zygosaccharomyces	11,459%	Alternaria	15,512%	Phaeosphaeria	4,801%	Alternaria	8,962%	Cladosporium	15,456%
Alternaria	9,101%	Sporobolomyces	5,431%	Sporobolomyces	4,553%	Zygosaccharomyces	8,399%	Aspergillus	5,694%
Broussonetia	7,443%	Ascotricha	3,845%	Zygosaccharomyces	4,497%	Aspergillus	6,571%	Zygosaccharomyces	4,577%
Phaeosphaeria	6,030%	Cryptococcus	1,880%	Cryptococcus	3,375%	Sporobolomyces	3,224%	Phaeosphaeria	3,792%
Cryptococcus	1,742%	Rhizoctonia	1,803%	unclassified	3,105%	Phaeosphaeria	2,707%	Sporobolomyces	3,366%
Walleimia	1,413%	Tremellomyces_X	1,191%	Tremellomyces_X	2,792%	unclassified	1,042%	Scenedesmus	2,328%
Tremellomyces_X	1,409%	unclassified	1,155%	Walleimia	2,409%	Tremellomyces_X	1,040%	Ascotricha	1,579%
Ascotricha	0,870%	Entyloma	1,014%	Plectosphaerella	2,060%	Cryptococcus	0,674%	Tilletiopsis	1,452%
Hyphodontia	0,635%	Tilletiopsis	1,003%	Sarocladium	1,305%	Plectosphaerella	0,670%	Entyloma	0,791%
Holtermannia	0,347%	Colpodidae_X	0,832%	Triticum	0,746%	Broussonetia	0,621%	Cryptococcus	0,666%
Colpodidae_X	0,343%	Zygosaccharomyces	0,768%	Entyloma	0,529%	Triticum	0,600%	unclassified	0,472%
Entyloma	0,288%	Sporisorium	0,738%	Broussonetia	0,393%	Sarocladium	0,267%	Broussonetia	0,433%
Pichia	0,270%	Walleimia	0,680%	Holtermannia	0,393%	Entyloma	0,246%	Colpodidae_X	0,370%
Sporisorium	0,257%	Asterotremella	0,556%	Sporisorium	0,383%	Capra	0,236%	Tremellomyces_X	0,308%
Debaryomyces	0,213%	Bensingtonia	0,488%	Ascotricha	0,377%	Ascotricha	0,218%	Sarocladium	0,296%
Bensingtonia	0,209%	Hausmanniella	0,468%	Colpodidae_X	0,301%	Holtermannia	0,163%	Triticum	0,213%
Ipomoea	0,189%	Sarocladium	0,449%	Asterotremella	0,252%	Colpodidae_X	0,159%	Bensingtonia	0,147%
Sistotrema	0,180%	Pichia	0,269%	Oxytrichidae_X	0,252%	Sporisorium	0,136%	Asterotremella	0,142%
Dioszegia	0,166%	Dioszegia	0,216%	Cystofilobasidium	0,226%	Hausmanniella	0,134%	Stichococcus	0,103%
Asterotremella	0,134%	Triticum	0,214%	Dioszegia	0,202%	Itersonilia	0,114%	Plectosphaerella	0,098%
Cystobasidiomycete	0,126%	Oxytrichidae_X	0,210%	Aspergillus	0,188%	Juniperus	0,114%	Bullera	0,064%
Salmo	0,122%	Leucosporidium	0,199%	Bensingtonia	0,178%	Pinus	0,112%	Salmo	0,051%
Athelia	0,116%	Leptosphaeria	0,177%	Platyophryides	0,161%	Asterotremella	0,098%	Malassezia	0,047%
unclassified	0,112%	Enchelys	0,171%	Capra	0,113%	Wickerhamomyces	0,092%	Cirsium	0,047%
Sterigmatomyces	0,107%	Chloroidium	0,163%	Hausmanniella	0,097%	Bensingtonia	0,069%	Dioszegia	0,044%
Aspergillus	0,103%	Platyophryides	0,143%	Bullera	0,097%	Glycyphagus	0,067%	Holtermannia	0,042%
Capra	0,103%	Itersonilia	0,115%	Candida	0,097%	Tyrophagus	0,067%	Ipomoea	0,037%
Platyophryides	0,089%	Cystobasidiomycete	0,098%	Cystobasidiomycete	0,095%	Microascus	0,063%	Sporisorium	0,034%
Deconica	0,089%	Holtermannia	0,088%	Salmo	0,087%	Malassezia	0,059%	Cryptomeria	0,034%
Hausmanniella	0,085%	Babjeviella	0,077%	Colpoda	0,065%	Tilletiopsis	0,053%	Colpoda	0,034%
Leptosphaeria	0,079%	Corticarina	0,070%	Pichia	0,063%	Acarus	0,051%	Leucosporidium	0,032%
Leucosporidium	0,065%	Rhodotorula	0,064%	Enchelys	0,058%	Pichia	0,051%	Juniperus	0,032%
Trechispora	0,065%	Broussonetia	0,062%	Leptosphaeria	0,052%	Candida	0,049%	Araneoidea	0,032%
Triticum	0,059%	Aspergillus	0,049%	Stilbus	0,050%	Rhizoctonia	0,047%	Limonomyces	0,032%
Itersonilia	0,057%	Enoplognatha	0,047%	Tilletiopsis	0,044%	Dioszegia	0,039%	Leptosphaeria	0,029%
Rhizoctonia	0,051%	Protostelium	0,047%	Pinus	0,044%	Leucosporidium	0,039%	Suctoria_XX	0,029%
Candida	0,049%	fungal	0,045%	Stichococcus	0,042%	Oxytricha	0,035%	Puccinia	0,027%
Agaricomycetes_X	0,049%	Sminthurus	0,043%	Juniperus	0,038%	Lichtheimia	0,035%	Microascus	0,024%
Acrospermum	0,043%	Colpoda	0,038%	Rhizoctonia	0,034%	Willowsia	0,035%	fungal	0,024%
Malassezia	0,039%	Bullera	0,028%	Acremonium	0,032%	Metarhizium	0,033%	Gregarina	0,024%
Platyophryida_XX	0,036%	Agaricostilbomycete	0,028%	Corticarina	0,028%	Pileolaria	0,033%	Deconica	0,022%
Taphrina	0,032%	Bresslauides	0,026%	Itersonilia	0,026%	Leptosphaeria	0,029%	Wickerhamomyces	0,022%
Tilletiopsis	0,030%	Stichococcus	0,024%	Mayetiola	0,026%	Melanthrips	0,029%	Homo	0,022%
Mayetiola	0,022%	Oudemansicheyla	0,021%	Argiope	0,024%	Chytridiomycetes_X	0,024%	Capra	0,017%
Issatchenkia	0,020%	Platyophryida_XX	0,019%	Araneus	0,022%	Cystofilobasidium	0,020%	Candida	0,017%
Sarocladium	0,018%	Stilbus	0,017%	Spinacia	0,022%	Telotrochidium	0,020%	Tyrophagus	0,017%
Bullera	0,016%	Oryza	0,017%	Erythrobasidium	0,022%	Nigosabulum	0,018%	Emericellopsis	0,017%
Linopodes	0,014%	Diclidophora	0,017%	Acrospermum	0,018%	Salmo	0,016%	Acarus	0,015%
Stilbus	0,010%	Pinus	0,015%	Emericellopsis	0,018%	Macrocheles	0,012%	Calochortus	0,015%
Physcia	0,004%	Araneoidea	0,015%	Sterigmatomyces	0,016%	Bullera	0,010%	Cryptosporidium	0,015%
		Kregervanrija	0,015%	Enoplognatha	0,016%	Agaricus	0,010%	Itersonilia	0,012%
		Gregarina	0,013%	Protostelium	0,012%	Arachnomyces	0,008%	Oxytricha	0,012%
		Phlebia	0,013%	Oudemansicheyla	0,012%	Vorticella	0,004%	Cystofilobasidium	0,010%
		Acremonium	0,011%	Debaryomyces	0,010%	Epistylis	0,004%	Coleotichus	0,010%
		Limonomyces	0,011%	Scenedesmus	0,008%	Protostelium	0,002%	Corticaria	0,010%
		Calochortus	0,011%	Oryza	0,008%			Naiadacarus	0,010%
		Demetrias	0,011%	Trichopsocus	0,006%			Sepedophilus	0,010%
		Phytomyza	0,011%	Mortierella	0,004%			Vorticella	0,007%
		Tytthaspis	0,011%	Ottowphyra	0,004%			Pachygnatha	0,007%
		Capra	0,009%	Hyphodontia	0,002%			Epistylis	0,005%
		Sistotrema	0,009%	Agaricomycetes_X	0,002%			Paraplectana	0,005%
		Mayetiola	0,009%					Vidia	0,005%
		Amylocarpus	0,009%					Acremonium	0,002%
		Brassica	0,009%						
		Caecomycetes	0,009%						
		Coccomyxa	0,009%						
		Hydropisphaera	0,009%						
		Salmo	0,008%						
		Cystofilobasidium	0,008%						
		Malassezia	0,008%						

	Araneus	0,008%					
	Adelina	0,008%					
	Classicula	0,008%					
	Cirsium	0,006%					
	Taphrina	0,006%					
	Alticini	0,006%					
	Ambohima	0,006%					
	Apatococcus	0,006%					
	Ceratitis	0,006%					
	Colpodella	0,006%					
	Corydalis	0,006%					
	Kuehneola	0,006%					
	Naohidea	0,006%					
	Platyophrya	0,006%					
	Protomyces	0,006%					
	Sorogena	0,006%					
	Debaryomyces	0,004%					
	Candida	0,004%					
	Deconica	0,004%					
	Spinacia	0,004%					
	Coleotichus	0,004%					
	Paraplectana	0,004%					
	Acinetidae_X	0,004%					
	Brachyalara	0,004%					
	Castanopsis	0,004%					
	Cenchrus	0,004%					
	Crangon	0,004%					
	Cyphellophora	0,004%					
	Festuca	0,004%					
	Fungi	0,004%					
	Heveochlorella	0,004%					
	Iodophanus	0,004%					
	Phaeosphaeriopsis	0,004%					
	Plutella	0,004%					
	Sandonidae_X	0,004%					
	Ipomoea	0,002%					
	Glycyphagus	0,002%					
	Acrospermum	0,002%					

PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

6 DISCUSSION GENERALE

6.1 Rappel des principaux résultats

Les objectifs des travaux réalisés durant cette thèse étaient de contribuer à la caractérisation des expositions professionnelles potentiellement impliquées dans le développement de pathologies broncho-pulmonaires chez les éleveurs laitiers bretons.

La première partie des travaux s'est attachée à décrire les déterminants de l'exposition à quatre constituants de la fraction thoracique des bio-aérosols : les poussières organiques, les endotoxines, les bactéries à Gram positif et les moisissures cultivables. Dans une seconde partie, nous avons caractérisé les déterminants de l'exposition à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde. Les principaux résultats de ces deux premières parties sont récapitulés dans le tableau 6 présenté à la page suivante. Nous montrons ainsi que l'exposition aux bio-aérosols est fortement augmentée lors des tâches liées à la distribution d'aliments aux vaches (foin, ensilage, paille, grains et granulés déshydratés). Les autres paramètres ayant un fort impact sur l'exposition aux bio-aérosols sont l'organisation de la stabulation en logettes (bactéries à Gram positif, moisissures), la taille de l'exploitation en nombre de vaches (bactéries à Gram positif) et l'affouragement à base d'ensilage (moisissures). L'exposition à l'acétaldéhyde est fortement augmentée lors des tâches liées à la distribution d'ensilage. Enfin, l'augmentation de la ventilation de la stabulation permet de réduire significativement les niveaux d'exposition à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, mais aussi ceux de l'exposition aux moisissures. La dernière partie des travaux a permis d'analyser la distribution de taille des particules, la composition microbienne et les effets pro-inflammatoires des poussières organiques émises lors du paillage mécanisé. Cette étude a montré que les poussières libérées lors de cette tâche ont i) une taille leur permettant de se déposer majoritairement dans les régions trachéo-bronchiques, ii) une composition bactériologique et fongique complexe incluant divers genres contenant des espèces pathogènes pour l'homme et iii) des effets pro-inflammatoires induisant l'expression de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8 dans les macrophages humains

Tableau 4 : carte de chaleur décrivant les effets des déterminants sur les expositions.

Déterminants	Poussières	Endotoxines	Bactéries	Moisissures	Ammoniac	COVs		
Tâches								
Traite	=	=	=	=	++	=	+++	> + 50%
Temps passé à l'intérieur de la stabulation principale	=	=	=	=	+	=	++	+ [25% ; 50%]
Chargement et distribution de foin manuels	=	+	+++	=	=	=	+	+ [0 % ; 25%]
Chargement et distribution grain manuels	++	++	+++	+++	=	=	=	+ 0 %
Chargement et distribution d'ensilage manuels	=	=	=	++	=	++	-	- [0 % ; 25%]
Chargement et distribution d'ensilage mécanisés	+	=	=	=	=	+++	--	- [25% ; 50%]
Raclage du fumier manuel	=	+	=	=	=	=	---	< - 50%
Raclage du fumier mécanisé	=	++	+++	+++	=	=		
Déversement de matériaux de litières manuel	++	=	=	+++	=	=		
Déversement de matériaux de litières mécanisé	+++	+++	++	+++	=	=		
Travail du sol des cultures	+++	=	---	=	=	=		
Caractéristiques d'exploitation								
Taille de l'exploitation	=	=	+++	=	++	+++		
Stabulation équipée d'un racleur automatique du fumier	=	=	+++	=	=	=		
Stabulation équipée d'une zone de stockage du fumier	=	+++	=	=	+++	=		
Exploitation équipée d'un système de traite automatique	=	+++	+++	=	=	=		
Fourrage majoritairement constitué d'ensilage de maïs	=	=	=	+++	=	+++		
Fourrage uniquement constitué d'herbe ou dérivé	--	---	---	=	=	=		
Organisation de la stabulation en logettes	=	=	---	---	=	=		
Ventilation, toutes variables indicatrices confondues	--	=	=	---	---	---		

6.2 Des hypothèses renforcées

Deux hypothèses importantes ont justifié la réalisation de ces travaux de thèse: (1) des déterminants de la fraction thoracique des bio-aérosols générés durant les activités professionnelles des éleveurs laitiers pourraient être différents de ceux de la fraction inhalables, et (2) les modalités de réalisation de ces tâches pourraient contribuer à réguler le niveau d'exposition des éleveurs. Les résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse renforcent ces deux hypothèses.

Concernant la première hypothèse, nos résultats montrent que la traite et plus généralement les tâches impliquant un contact rapproché avec les animaux n'ont pas d'impact sur l'exposition à la fraction thoracique des bio-aérosols, alors que ces activités professionnelles impactent fortement l'exposition à la fraction inhalable des poussières organiques et des endotoxines (Basinas et al., 2014). L'absence d'effet de ces tâches sur la fraction thoracique montre qu'elles induisent probablement des aérosols composés majoritairement de particules de grandes tailles se déposant principalement dans les régions extra-thoraciques. Ce résultat est important car il montre que ces tâches ne devraient pas être prises en compte dans les études épidémiologiques futures, étudiant l'impact des expositions aux bio-aérosols sur le développement de maladies respiratoires des voies aériennes inférieures, afin de limiter les biais de classement sur l'exposition. Pour le cas spécifique de la traite, nos résultats sont confortés par une étude récente, montrant que les aérosols générés par cette tâche sont très majoritairement constitués de particules de taille $> 30 \mu\text{m}$ (Schaeffer et al., 2017).

Concernant la seconde hypothèse, nous avons montré que seules certaines modalités de réalisation de tâches sont associées à l'augmentation de l'exposition à un contaminant donné. Par exemple, pour le « chargement et la distribution d'ensilage », seule la modalité de réalisation manuelle est associée à une augmentation de l'exposition aux moisissures alors que la modalité mécanisée ne semble avoir qu'un impact modéré sur l'exposition aux poussières thoraciques. Inversement, concernant le « déversement de litières » en stabulation, la modalité de réalisation « mécanisée » induit une forte exposition à l'ensemble des constituants de bio-aérosols pris en compte, alors que la modalité de réalisation manuelle n'impacte que l'exposition aux moisissures et aux poussières organiques. Dans l'ensemble, ces connaissances plus fines des effets des modalités de réalisation de tâches sur l'exposition devraient permettre de préciser le design des études épidémiologiques utilisant un assignement de l'exposition par les déterminants professionnels, et également d'envisager à plus long terme des stratégies de prévention de l'exposition spécifiquement axées sur ces

modalités de réalisation. Nous pouvons ajouter une remarque importante sur les modalités de réalisation de la tâche de « déversement de litières » mécanisé qui n'a pas été formulée dans la partie « Résultats ». Il s'agit de l'impact de l'ouverture/fermeture de la cabine du tracteur utilisé par l'éleveur pour réaliser cette tâche. Afin de tester l'effet de cette modalité de réalisation, nous avons créé une variable d'interaction entre la variable «Durée de déversement de litières mécanisé» et la variable «ouverture cabine : oui ou non». Nous avons ensuite substitué la variable initiale « durée de déversement de litières mécanisé » par cette interaction dans les modèles multivariés décrivant l'exposition aux bio-aérosols. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 5 : effet de la fermeture de la cabine du tracteur sur l'exposition induite par le déversement de litières

	Poussières thoraciques			Endotoxines		
	β	P value	FC ^a	β	P value	FC ^a
Interaction :						
Déversement de litières (min) : cabine fermée	0,02	0,31	1,22	0,036	0,139	1,43
Déversement de litières (min) : cabine ouverte	0,057	<0,001	1,77	0,102	<0,001	2,77
Réduction de l'exposition ^b			31%			48%
	Bactéries à gram positives			Moisissures		
	β	P value	FC ^a	β	P value	FC ^a
Interaction :						
Déversement de litières (min) : cabine fermée	-0,025	0,55	0,78	0,029	0,39	1,34
Déversement de litières (min) : cabine ouverte	0,056	0,048	1,75	0,151	<0,001	4,53
Réduction de l'exposition ^b			55%			70%

La fermeture de la cabine rend l'effet du « déversement litières » non significatif quel que soit le contaminant. Par ailleurs l'effet de déversement de litières mécanisé avec une cabine ouverte est augmenté par rapport à celui estimé à partir de la variable brute (voir partie 3.1. tableaux 4 et 5). La significativité de l'effet est également augmentée (P value réduites).

Bien que l'impact de cette modalité puisse paraître assez intuitif, nos résultats démontrent très clairement que la fermeture de la cabine est un moyen de prévention simple pour diminuer considérablement l'effet de la tâche de « déversement mécanisé de litières » qui contribue de façon majeure à l'exposition des éleveurs aux poussières thoraciques et aux agents microbiens. Il sera également important de prendre en compte cette modalité de réalisation lors de la reconstitution de l'exposition chronique des éleveurs afin de ne pas surestimer l'exposition des éleveurs prenant soin de fermer leurs cabines lorsqu'ils renouvellent la litière des stabulations. Toutefois, les observations réalisées durant les

campagnes de mesures indiquent que les éleveurs ferment peu souvent la fenêtre du tracteur durant la réalisation de cette tâche.

6.3 Des résultats originaux

Différents résultats originaux ont été en mis évidence au cours de ces travaux de thèse, dont notamment l'identification des déterminants de l'exposition aux bactéries à Gram positif, aux moisissures, à l'ammoniac et aux COVs, et qui étaient très peu connus jusqu'à présent. Nos résultats montrent une association positive entre la durée de la tâche « chargement et distribution manuels du foin » et l'exposition aux bactéries à Gram positif. Cette corrélation est cohérente avec les différentes études ayant démontré la présence fréquente des bactéries à Gram positif *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris* dans le foin mal conservé (Roussel et al., 2005). Ces bactéries sont connues pour jouer un rôle prépondérant dans le développement de la maladie du Poumon du fermier (Zacharisen et Fink, 2011). Si l'utilisation de foin tend à se réduire dans les élevages de plaines - les éleveurs préférant se tourner vers un affouragement à base d'ensilage de maïs - l'affouragement à base de foin reste très utilisé dans les élevages de montagnes, en particulier en hiver. Nous pouvons remarquer que la seule autre étude ayant décrit succinctement l'exposition des éleveurs laitiers aux poussières thoraciques (Cathomas et al., 2002) a été menée dans des élevages de montagne. Cette étude montre une concentration moyenne en poussières thoraciques de 1 mg.m^{-3} , soit une concentration quatre fois plus élevée que celle que nous avons mesurée dans nos travaux. Dans l'ensemble, ces résultats pourraient indiquer qu'il existe un risque plus élevé d'exposition aux poussières organiques dans certains élevages de montagne, qui serait probablement lié à l'utilisation intensive du foin. Les poussières émises pendant cette tâche spécifique mériteraient d'être étudiées selon la même méthodologie que celle que nous avons mise en œuvre pour caractériser les poussières générées lors du paillage mécanisé en Bretagne. Dans le cadre d'une étude préliminaire, nous avons réalisé deux mesures pilotes en point fixe de la concentration en poussières inhalables, thoraciques et alvéolaires pendant la tâche de distribution mécanisé de foin dans deux élevages de montagne situés dans le département du Doubs. Concernant la fraction thoracique, les mesures obtenues grâce à un compteur optique de particules montrent que les concentrations moyennes pendant cette tâche étaient supérieures à 7 mg.m^{-3} , soit des taux bien supérieurs à ceux que nous avons mesurés pendant le paillage mécanisé. Ce résultat préliminaire suggère donc que la manipulation du foin pourrait impacter fortement l'exposition des éleveurs laitiers aux poussières thoraciques et aux agents microbiens qu'elles contiennent.

Un autre déterminant important identifié est la ventilation « naturelle », exprimée par la surface des ouvertures dans les murs. L'augmentation de cette surface entraîne une réduction effective de l'exposition aux moisissures, à l'ammoniac, à l'acétaldéhyde et dans une moindre mesure aux poussières. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux d'une étude de plus petite envergure ayant démontré une réduction de la concentration ambiante en poussières inhalables et en ammoniac lorsque la concentration en CO₂ baisse (cette concentration est un indicateur du taux de renouvellement d'air courant) (Kaasik et Maasikmets, 2013). En revanche et de manière assez étonnante, on peut noter que les études de Basinas et al (2013 & 2014) réalisées dans des exploitations d'élevages porcins et laitiers n'ont pas mis en évidence d'effet significatif de la ventilation bien que leurs études aient testées 4 modalités de ventilation de la stabulation possibles : naturelle, naturelle avec un système de contrôle, mécanique, et enfin mécanique avec un système de contrôle. Une force de nos indicateurs de ventilation est qu'ils peuvent être aisément renseignés dans les réponses aux questionnaires transmis aux éleveurs car ils sont issus d'une simple observation ne nécessitant aucune mesure précise. Nos résultats mettent donc en évidence des pistes potentielles pour réduire l'exposition par l'amélioration de la ventilation naturelle. Cependant, des efforts de recherche seront nécessaires pour mieux préciser l'impact réel de l'accroissement de la ventilation sur les niveaux d'exposition aux moisissures, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde.

Concernant les autres paramètres réduisant les niveaux d'exposition aux contaminants, on peut également citer l'effet d'une stabulation organisée en logettes qui minore fortement l'exposition aux bactéries à Gram positif et aux moisissures, comparé à celle mesurée dans les stabulations en aire paillée. Il semble néanmoins complexe de préconiser un changement de l'organisation d'une stabulation en aire paillée vers une stabulation en logettes puisque cette évolution implique un investissement conséquent pour les éleveurs et modifie substantiellement leur organisation du travail (entretien de la stabulation en logettes plus régulier).

A l'inverse, nous avons également identifié un certain nombre de paramètres de l'activité professionnelle induisant une forte augmentation de l'exposition aux différents contaminants. Nous avons ainsi confirmé les effets importants des tâches de manipulation de fourrage (foin, ensilage), et de compléments (grain et granulés déshydratés), ainsi que ceux des tâches de renouvellement de la litière, sur les niveaux d'exposition aux poussières organiques et aux endotoxines. Nos résultats montrent que ces tâches ont des effets comparables sur les expositions aux bactéries à Gram positif et aux moisissures de la fraction thoracique.

Concernant les caractéristiques d'exploitation, il semblerait qu'une augmentation de la taille de l'exploitation puisse induire une augmentation de l'exposition aux bactéries à Gram positif, à l'ammoniac et aux COVs. Par ailleurs, nos résultats concordent avec ceux récemment publiés par Basinas et al (2017) qui montrent également une augmentation de l'exposition aux poussières et aux endotoxines lorsque la quantité de fourrage distribuée augmente (cette quantité étant elle-même proportionnelle à la taille de l'élevage). Ce résultat est important car les tendances actuelles montrent que la taille des exploitations est en augmentation en France. Nos travaux pourraient donc suggérer qu'une augmentation générale de l'exposition des éleveurs serait possible dans les années à venir si des stratégies de prévention adéquates ne sont pas mises en place.

6.4 Force des travaux

Le point fort principal de notre étude est la méthodologie de recueil des durées des tâches par des observations directes sur le terrain. Cette méthodologie est en effet plus précise que le recueil rétrospectif de questionnaires renseignés par les éleveurs, et mené indépendamment des mesures. Cette méthodologie de recueil rétrospectif a été utilisée dans plusieurs études réalisées dans des contextes d'élevage porcins et laitiers (Basinas et al., 2013, 2014; Preller et al., 1995b). Dans ces études, les questionnaires étaient constitués d'un emploi du temps découpé par intervalles exclusifs de 30 minutes dans lesquels les éleveurs devaient reporter les différentes tâches qui ont été effectuées pendant la durée des mesures. Cette méthodologie peut aisément induire des erreurs de plus au moins dix minutes par rapport à la durée réelle d'une tâche, comme cela a été discuté par (Burstyn, 2009). Dans cette même publication, l'auteur montre, à partir de simulation, que de telles erreurs peuvent induire un biais fort dans l'estimation de l'effet de la durée d'une tâche sur l'exposition. Ainsi, l'effet d'une tâche courte associée à une forte exposition estimée dans un modèle linéaire (correspondant aux coefficients β) sera fortement amoindri. A l'inverse, les effets des tâches de longues durées mais associées à une exposition modérée seront fortement surestimés. La principale conséquence de ces erreurs est d'induire une mauvaise hiérarchisation des tâches exposantes, et donc une mauvaise priorisation des stratégies de réduction de l'exposition (Burstyn, 2009).

A ce propos, il est intéressant de remarquer que les durées médianes des tâches exposantes que nous avons identifiées telles que « le déversement de litières » et « le chargement et distribution de grains » sont inférieures ou égales à 10 minutes, et peuvent être considérées comme très courtes. Ces durées sont notablement différentes de celles reportées par (Basinas et al., 2014). Selon cette étude, la durée médiane du « déversement de litières » était de 30

minutes et celle de la manipulation de grain de 22 minutes. Il est possible que les valeurs indiquées dans cette étude surestiment les durées réelles des tâches effectuées par les éleveurs et donc que les effets décrits pour ces deux activités soient biaisés. En ce sens, nous pouvons constater que les coefficients associés à ces deux tâches, mesurées par Basinas et al. (2014) sont inférieurs à ceux calculés dans notre étude. Ainsi, dans l'étude de Basinas et al. (2014), les coefficients β associés à une minute de « chargement et distribution de grains » et du « déversement de litières » sont respectivement de 0,026 et 0,019 pour l'exposition aux endotoxines, alors que dans nos travaux, ces coefficients sont de 0,075 et 0,079. Remarquons toutefois que les résultats de Basinas et al. (2014) aboutissent, malgré ces imprécisions, à une hiérarchisation des tâches exposantes identique à la nôtre.

L'autre point fort de notre étude est la prise en compte des modalités de réalisation de tâches, qui permet ainsi une meilleure description des conditions de travail et de leur relation avec l'exposition, et par conséquent de meilleures performances explicatives de nos modèles. En effet, nos modèles expliquent respectivement 46% et 48% de la variabilité totale de l'exposition aux poussières thoraciques et aux endotoxines thoraciques, alors que les études précédentes permettaient d'expliquer entre 36 à 41% de la variabilité de l'exposition aux poussières inhalables et 38 à 41% de l'exposition aux endotoxines inhalables (Basinas et al., 2013, 2014, 2017; Preller et al., 1995b). Les modèles logistiques que nous avons construits peuvent également être considérés comme performants puisque les aires sous la courbe ROC sont respectivement de 0,86 et 0,92 pour les expositions aux moisissures et à l'acétaldéhyde.

6.5 Limites des travaux

Bien que nos modèles linéaires soient relativement performants, une part importante de la variabilité reste « inexpliquée » : entre 50 et 60% selon les cas. Les raisons pouvant expliquer la part de la variance non expliquée sont diverses. Premièrement, un ou plusieurs paramètres ayant un effet important ont pu ne pas être pris en compte pendant l'analyse. Un autre effet pouvant jouer un rôle, mais qui est peu décrit par les auteurs, est l'inadéquation mathématique des modèles. Il est admis que l'effet des déterminants, en particulier celui des tâches, est additif (Burstyn, 2009). Or le fait que nos modèles aient été construits sur le logarithme de l'exposition implique un effet multiplicatif des déterminants sur l'exposition réelle (la démonstration est présentée en Annexe 3). Cette inadéquation mathématique peut être une source d'erreur et ainsi contribuer à la variabilité non expliquée. Toutefois, cette méthode

mathématique construite sur le logarithme de l'exposition permet de hiérarchiser correctement les effets des déterminants (Burstyn, 2009).

Deux autres paramètres ont dû probablement réduire la puissance statistique de nos modèles et par conséquent limiter notre capacité à identifier les déterminants dont l'impact était modéré. Il s'agit du faible nombre d'échantillons prélevés au cours de notre campagne de mesures et de la prise en compte d'un nombre important de modalités de réalisation des tâches qui a réduit le nombre d'observations par déterminant. Dans ce contexte, nous pensions que la tâche de distribution de foin serait un contributeur fort de l'exposition à l'ensemble des bio-aérosols, et principalement de celle aux moisissures. Cette hypothèse était fondée sur le fait que de nombreuses études ont démontré que le foin, utilisé comme fourrage dans les élevages laitiers, est une source majeure de moisissures (Kotimaa et al., 1991; Roussel et al., 2005) De plus, *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* et *Wallemia sebi* qui sont trois espèces fongiques régulièrement présentes dans les poussières de foin manipulés par les éleveurs laitiers travaillant dans l'Est de la France, jouent un rôle essentiel dans le développement de la maladie du Poumon du fermier chez ces agriculteurs (Bellanger et al., 2010; Reboux et al., 2001). Or, comme nous l'avons expliqué précédemment, nous n'avons trouvé qu'une association significative entre la durée de la tâche « distribution de foin » et l'exposition aux bactéries à Gram positif. L'absence de corrélation de cette activité spécifique avec l'exposition aux moisissures pourrait résulter d'un nombre insuffisant de mesures limitant la sensibilité du modèle mathématique.

Ces limites posent également la question de savoir si les modèles construits lors de cette thèse peuvent être utilisés pour d'autres types d'élevages laitiers, notamment ceux localisés en milieu montagnard (notamment dans les Alpes et en Franche Comté). En effet, les caractéristiques de ces élevages, la nature des tâches exécutées et l'organisation du travail des éleveurs diffèrent sensiblement de celles observées dans les élevages laitiers bretons. Il serait donc intéressant de tester l'adéquation de nos modèles avec ce type d'élevage, et si nécessaire, de procéder aux ajustements les plus pertinents.

Une autre limite de nos travaux concerne le nombre important de résultats inférieurs aux limites de quantification que nous avons obtenus pour l'exposition aux moisissures et à l'acétaldéhyde, ce qui nous a contraints à substituer la méthodologie de modélisation logistique à celle de modélisation linéaire. Les résultats que nous avons obtenus sur le plan statistique sont néanmoins corrects et cohérents avec ceux décrits dans la littérature. Il serait toutefois intéressant de confirmer nos résultats en utilisant des méthodes de mesures plus

sensibles. Pour les moisissures, des mesures de concentrations en ergostérol, utilisé comme marqueur d'exposition, permettraient d'éviter la culture de ces microorganismes et par conséquent de s'affranchir de la difficulté liée au maintien de leur viabilité. Concernant l'acétaldéhyde, il pourrait s'agir de remplacer les prélèvements passifs par des prélèvements actifs, ce qui permettrait probablement de diviser la limite de quantification par 4 d'après la procédure interne en vigueur à l'ITGA. Enfin, il est nécessaire de rappeler que nous n'avons pu quantifier des bactéries à Gram négatif que dans deux échantillons sur 112. Ces résultats sont décevants mais auraient pu être anticipés puisque les bactéries à Gram négatif présentes dans l'air des élevages animaux sont connues pour être difficiles à cultiver sur les milieux de culture classique et pour avoir une faible survie dans l'air ambiant (Wang et al., 1996; Zucker et al., 2000). Néanmoins cette limite a été en grande partie compensée par les mesures de concentrations d'endotoxines qui constituent un bon marqueur de la contamination aérienne en bactéries à Gram négatif (Douwes et al., 2003).

6.6 Perspectives

Les résultats de cette thèse permettront dans un premier temps l'utilisation de modèles statistiques fiables pour reconstituer quantitativement et/ou qualitativement l'exposition des éleveurs laitiers ayant répondu à des questionnaires détaillant leur activité professionnelle, et cela sans avoir recours à des mesures de terrain supplémentaires. Cependant, une étape préalable à l'utilisation de ces modèles consistera à valider leur caractère prédictif. Dans ce contexte, nous envisageons dans un premier temps d'évaluer les qualités prédictives des modèles via une technique de validation interne par ré-échantillonnages « bootstrap ». Dans un second temps, nous envisageons la réalisation de mesures sur un échantillon restreint de nouvelles exploitations pour valider les capacités prédictives des modèles *in situ* dans des exploitations bretonnes non incluses dans les études menées au cours de cette thèse. A plus long terme il pourrait être intéressant de tester nos modèles dans d'autres contextes agricoles.

Il pourrait être intéressant de comparer la distribution de tailles, la composition microbiologique et l'activité biologique des poussières émises par la manipulation de fourrage dans les exploitations franc-comtoises (utilisant plus spécifiquement le foin) et les élevages laitiers bretons (utilisant plus spécifiquement la paille). En effet, il a été démontré que la prévalence de la BPCO chez les producteurs laitiers était variable selon la région d'exercice et qu'elle était deux fois et demie plus élevée en Franche-Comté qu'en Bretagne (Guillien et al., 2016). La différence de prévalence entre ces deux régions pourrait résulter au moins en partie

de variations dans la composition et l'activité biologique des poussières organiques inhalées chroniquement par les éleveurs de ces deux régions durant ces deux activités professionnelles particulièrement exposantes. Ce projet pourrait contribuer à mieux comprendre la physiopathologie et les caractéristiques de la BPCO de type « agricole ».

Enfin, une perspective à plus long terme de ce travail consistera à discuter des principaux résultats de nos travaux avec la Mutualité Sociale Agricole afin de proposer des actions de prévention auprès des éleveurs. Des actions de prévention et de sensibilisation seraient d'autant plus importantes à mettre en place que, comme le suggère nos résultats, l'exposition des éleveurs aux bio-aérosols pourrait croître avec l'augmentation de la taille des exploitations dans les années à venir. A plus long terme, il sera nécessaire d'estimer l'effet des campagnes de prévention par des études interventionnelles selon des méthodologies déjà décrites dans la littérature (Basinas et al., 2016; Preller et al., 1995a).

7 CONCLUSION

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse contribuent à mieux comprendre l'exposition professionnelle des éleveurs laitiers bretons aux bio-aérosols. D'une part, nos résultats ont permis de démontrer que les éleveurs laitiers bretons sont exposés à des concentrations significatives de la fraction thoracique des bio-aérosols produits lors de différentes tâches répétées très régulièrement. Nos résultats indiquent que les éleveurs laitiers sont exposés aux endotoxines, aux bactéries à Gram positif et aux moisissures lors de leurs activités professionnelles. D'autre part, nos travaux ont permis d'identifier de nombreux déterminants de ces expositions correspondant soit à des tâches réalisées par les éleveurs soit à des caractéristiques des exploitations agricoles. Enfin, nous avons démontré que les poussières organiques produites par le paillage mécanisé induisent in vitro de fortes réponses pro-inflammatoires dans les macrophages humains. Au total, ces travaux de thèse suggèrent donc que différentes activités professionnelles exposent les éleveurs laitiers à des poussières organiques de nature complexe et de taille suffisante pour diffuser jusqu'aux territoires bronchiques où sont censées se développer les mécanismes physiopathologiques associés à la BPCO. La seconde partie des travaux s'est attachée à caractériser les poussières émises lors paillage mécanisé sur le plan granulométrique, de la composition microbiologique et des pro inflammatoire produite par ces poussières sur le macrophage. Cette étude a pu montrer que les poussières une taille leur permettant de se déposer majoritairement dans les régions trachéobronchique, ii) une composition bactériologique et fongique incluant des espèces

pathogènes pour l'homme et iii) des effets pro-inflammatoires puissants induisant l'expression de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8 dans les macrophages humains, soutenant ainsi le rôle important de cette tâche dans l'étiologie des pathologies respiratoires des éleveurs laitiers.

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 2011. NF X43-264 - Qualité de l'air - Air des lieux de travail - Prélèvement et dosage d'aldéhydes par pompage sur supports imprégnés de DNPH et dosage par chromatographie en phase liquide CLPH.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Aubier, M., Marthan, R., Berger, P., Chambellan, A., Chanez, P., Aguilaniu, B., Brillet, P.-Y., Burgel, P.-R., Chaouat, A., Devillier, P., Escamilla, R., Louis, R., Mal, H., Muir, J.-F., Pérez, T., Similowski, T., Wallaert, B., Roche, N., 2010. [COPD and inflammation: statement from a French expert group: inflammation and remodelling mechanisms]. *Rev. Mal. Respir.* 27, 1254–1266. doi:10.1016/j.rmr.2010.10.004
- B Burch, J., Svendsen, E., D Siegel, P., E Wagner, S., Von Essen, S., Keefe, T., Mehaffy, J., Serrano Martinez, A., Bradford, M., Baker, L., Cranmer, B., Saito, R., Tessari, J., Prinz, L., Andersen, C., Christensen, O., Koehncke, N., Reynolds, S., 2010. Endotoxin Exposure and Inflammation Markers Among Agricultural Workers in Colorado and Nebraska. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73, 5–22. doi:10.1080/15287390903248604
- Banhazi, T.M., Seedorf, J., Rutley, D.L., Pitchford, W.S., 2008. Identification of risk factors for sub-optimal housing conditions in Australian piggeries: Part 2. Airborne pollutants. *J. Agric. Saf. Health* 14, 21–39.
- Basinas, I., Cronin, G., Hogan, V., Sigsgaard, T., Hayes, J., Coggins, A.M., 2017. Exposure to Inhalable Dust, Endotoxin, and Total Volatile Organic Carbons on Dairy Farms Using Manual and Automated Feeding Systems. *Ann. Work Expo. Health* 61, 344–355. doi:10.1093/annweh/wxw023
- Basinas, I., Schlünssen, V., Takai, H., Heederik, D., Omland, Ø., Wouters, I.M., Sigsgaard, T., Kromhout, H., 2013. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish pig farmers affected by work tasks and stable characteristics. *Ann. Occup. Hyg.* 57, 1005–1019. doi:10.1093/annhyg/met029
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Bønløkke, J.H., Andersen, N.T., Omland, Ø., Kromhout, H., Schlünssen, V., 2016. Feedback on Measured Dust Concentrations Reduces Exposure Levels Among Farmers. *Ann. Occup. Hyg.* 60, 812–824. doi:10.1093/annhyg/mew032
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Erlandsen, M., Andersen, N.T., Takai, H., Heederik, D., Omland, Ø., Kromhout, H., Schlünssen, V., 2014. Exposure-affecting factors of dairy farmers' exposure to inhalable dust and endotoxin. *Ann. Occup. Hyg.* 58, 707–723. doi:10.1093/annhyg/meu024
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Heederik, D., Takai, H., Omland, Ø., Andersen, N.T., Wouters, I.M., Bønløkke, J.H., Kromhout, H., Schlünssen, V., 2012. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish livestock farmers: results from the SUS cohort study. *J. Env. Monit* 14, 604–614. doi:10.1039/C1EM10576K
- Basinas, I., Sigsgaard, T., Kromhout, H., Heederik, D., Wouters, I.M., Schlünssen, V., 2015. A comprehensive review of levels and determinants of personal exposure to dust and endotoxin in livestock farming. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 25, 123–137. doi:10.1038/jes.2013.83
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. ArXiv14065823 Stat.
- Baur, X., Bakehe, P., Vellguth, H., 2012. Bronchial asthma and COPD due to irritants in the workplace-an evidence-based approach. *J. Occup. Med. Toxicol.* 7, 19.

- Beck, J., Heutelbeck, A., Dunkelberg, H., 2007a. Volatile organic compounds in dwelling houses and stables of dairy and cattle farms in Northern Germany. *Sci. Total Environ.* 372, 440–454. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.009
- Beck, J., Heutelbeck, A., Dunkelberg, H., 2007b. Volatile organic compounds in dwelling houses and stables of dairy and cattle farms in Northern Germany. *Sci. Total Environ.* 372, 440–454. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.009
- Bellanger, A.-P., Millon, L., Rognon, B., Roussel, S., Botterel, F., Bretagne, S., Reboux, G., 2011. Variable beta-glucans production by different states of *Eurotium amstelodami* explains differences in inflammatory responses in airway cells. *APMIS* 119, 605–610. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02775.x
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Botterel, F., Candido, C., Roussel, S., Rognon, B., Dalphin, J.-C., Bretagne, S., Millon, L., 2010. New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. *Med. Mycol.* 48, 981–987. doi:10.3109/13693781003713711
- Buiarelli, F., Canepari, S., Di Filippo, P., Perrino, C., Pomata, D., Riccardi, C., Speziale, R., 2013. Extraction and analysis of fungal spore biomarkers in atmospheric bioaerosol by HPLC-MS-MS and GC-MS. *Talanta* 105, 142–151. doi:10.1016/j.talanta.2012.11.006
- Burstyn, I., 2009. Measurement Error and Model Specification in Determining How Duration of Tasks Affects Level of Occupational Exposure. *Ann. Occup. Hyg.* 53, 265–270. doi:10.1093/annhyg/mep003
- Burstyn, I., Teschke, K., 1999. Studying the determinants of exposure: a review of methods. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 60, 57–72. doi:10.1080/00028899908984423
- C. Paris, 2014. Le syndrome toxique des poussières organiques. *Références en santé au travail* 109–124.
- Cathomas, R.L., Brüesch, H., Fehr, R., Reinhart, W.H., Kuhn, M., 2002. Organic dust exposure in dairy farmers in an alpine region. *Swiss Med. Wkly.* 132, 174–178. doi:2002/13/smw-09892
- CEN, 2010. NF EN 1076 - Exposition sur les lieux de travail - Procédures pour le mesurage des gaz et vapeurs à l'aide de dispositifs de prélèvement par pompage - Exigences et méthodes d'essai.
- CEN, 2003. NF EN 14031 - Atmosphères des lieux de travail - Détermination des endotoxines en suspension dans l'air.
- CEN, 1996. EN 689: Workplace atmospheres — Guidance for the assessment of exposure by inhalation to chemical agents for comparison with limit values and measurement strategy.
- CEN, 1993. EN 481: Workplace atmospheres — Size fraction definitions for measurement of airborne particles.
- Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, 2016. L'économie laitière en chiffres.
- Chang, C.W., Chung, H., Huang, C.F., Su, H.J.J., 2001. Exposure assessment to airborne endotoxin, dust, ammonia, hydrogen sulfide and carbon dioxide in open style swine houses. *Ann. Occup. Hyg.* 45, 457–465. doi:10.1093/annhyg/45.6.457
- Clark, S., Rylander, R., Larsson, L., 1983. Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 44, 537–541. doi:10.1080/15298668391405265

- Dalphin, J.C., Dubiez, A., Monnet, E., Gora, D., Westeel, V., Pernet, D., Polio, J.C., Gibey, R., Laplante, J.J., Depierre, A., 1998. Prevalence of asthma and respiratory symptoms in dairy farmers in the French province of the Doubs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 1493–1498. doi:10.1164/ajrccm.158.5.9709108
- DECOS, 2010. Endotoxins: Health based Recommended Exposure Limit. a Report of the Health Council of The Netherlands, Publication.
- Donham, K.J., Reynolds, S.J., Whitten, P., Merchant, J.A., Burmeister, L., Pependorf, W.J., 1995. Respiratory dysfunction in swine production facility workers: Dose-response relationships of environmental exposures and pulmonary function. *Am. J. Ind. Med.* 27, 405–418. doi:10.1002/ajim.4700270309
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47, 187–200.
- Douwes, J., Travier, N., Huang, K., Cheng, S., McKenzie, J., Le Gros, G., von Mutius, E., Pearce, N., 2007. Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 62, 1158–1165. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01490.x
- Eduard, W., Douwes, J., Omenaas, E., Heederik, D., 2004. Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax* 59, 381–386.
- Eduard, W., Pearce, N., Douwes, J., 2009. Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. *Chest* 136, 716–725. doi:10.1378/chest.08-2192
- Fogelmark, B., Sjöstrand, M., Rylander, R., 1994. Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of beta(1,3)-D-glucan and endotoxin. *Int. J. Exp. Pathol.* 75, 85–90.
- Fox, A., Wright, L., Fox, K., 1995. Gas chromatography-tandem mass spectrometry for trace detection of muramic acid, a peptidoglycan chemical marker, in organic dust. *J. Microbiol. Methods* 22, 11–26.
- Freeman, C.M., Curtis, J.L., 2017. Lung Dendritic Cells: Shaping Immune Responses throughout Chronic Obstructive Pulmonary Disease Progression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 56, 152–159. doi:10.1165/rcmb.2016-0272TR
- Gabriel, M.F., Postigo, I., Tomaz, C.T., Martínez, J., 2016. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 89–90, 71–80. doi:10.1016/j.envint.2016.01.003
- Gainet, M., Thaon, I., Westeel, V., Chaudemanche, H., Venier, A.G., Dubiez, A., Laplante, J.J., Dalphin, J.-C., 2007. Twelve-year longitudinal study of respiratory status in dairy farmers. *Eur. Respir. J.* 30, 97–103. doi:10.1183/09031936.00150405
- Garcia, J., Bennett, D.H., Tancredi, D., Schenker, M.B., Mitchell, D., Reynolds, S.J., Mitloehner, F.M., 2013. Occupational exposure to particulate matter and endotoxin for California dairy workers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 56–62. doi:10.1016/j.ijheh.2012.04.001
- Görner, P., Simon, X., Boivin, A., Bau, S., 2017. Sampling Efficiency and Performance of Selected Thoracic Aerosol Samplers. *Ann. Work Expo. Health* 61, 784–796. doi:10.1093/annweh/wxx057
- Guillien, A., Puyraveau, M., Soumagne, T., Guillot, S., Rannou, F., Marquette, D., Berger, P., Jouneau, S., Monnet, E., Mauny, F., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., Degano, B., 2016. Prevalence and risk factors for COPD in farmers: a cross-sectional controlled study. *Eur. Respir. J.* 47, 95–103. doi:10.1183/13993003.00153-2015

- Hafner, S.D., Howard, C., Muck, R.E., Franco, R.B., Montes, F., Green, P.G., Mitloehner, F., Trabue, S.L., Rotz, C.A., 2013. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications. *Atmos. Environ.* 77, 827–839. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.04.076
- Hafner, S.D., Montes, F., Rotz, C.A., 2012. A mass transfer model for VOC emission from silage. *Atmos. Environ.* 54, 134–140. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.03.005
- Halonen, M., Stern, D.A., Wright, A.L., Taussig, L.M., Martinez, F.D., 1997. Alternaria as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1356–1361. doi:10.1164/ajrccm.155.4.9105079
- Hanhela, R., Louhelainen, K., Pasanen, A.L., 1995. Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of *Wallemia sebi* and *Fusaria*. *Scand. J. Work. Environ. Health* 21, 223–228.
- Hoppin, J.A., Umbach, D.M., Long, S., Rinsky, J.L., Henneberger, P.K., Salo, P.M., Zeldin, D.C., London, S.J., Alavanja, M.C.R., Blair, A., Beane Freeman, L.E., Sandler, D.P., 2014. Respiratory disease in United States farmers. *Occup. Environ. Med.* 71, 484–491. doi:10.1136/oemed-2013-101983
- House, J.S., Wyss, A.B., Hoppin, J.A., Richards, M., Long, S., Umbach, D.M., Henneberger, P.K., Beane Freeman, L.E., Sandler, D.P., Long O'Connell, E., Barker-Cummings, C., London, S.J., 2017. Early-life farm exposures and adult asthma and atopy in the Agricultural Lung Health Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 249–256.e14. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.036
- Hristov, A.N., Hanigan, M., Cole, A., Todd, R., McAllister, T.A., Ndegwa, P.M., Rotz, A., 2011. Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. *Can. J. Anim. Sci.* 91, 1–35. doi:10.1139/CJAS10034
- Jouneau, S., Boché, A., Brinchault, G., Fekete, K., Guillot, S., Bayat, S., Desrues, B., 2012. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85, 623–630. doi:10.1007/s00420-011-0708-6
- Jouneau, S., Pinault, M., Gouyet, T., Brinchault, G., Guillot, S., Viel, J.-F., Presle, J.-C., Desrues, B., 2015. Étude AIRBAG : résultats préliminaires après un an de dépistage de la BPCO agricole. *Rev. Mal. Respir.* 32, 240–248. doi:10.1016/j.rmr.2014.03.014
- Kaasik, A., Maasikmets, M., 2013. Concentrations of airborne particulate matter, ammonia and carbon dioxide in large scale uninsulated loose housing cowsheds in Estonia. *Biosyst. Eng.* 114, 223–231. doi:10.1016/j.biosystemseng.2013.01.002
- Kotimaa, 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, 117–122.
- Kullman, G.J., Thorne, P.S., Waldron, P.F., Marx, J.J., Ault, B., Lewis, D.M., Siegel, P.D., Olenchock, S.A., Merchant, J.A., 1998. Organic Dust Exposures from Work in Dairy Barns. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59, 403–413. doi:10.1080/15428119891010668
- Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., Piarroux, R., Reboux, G., Roussel, S., 2007. [Lung diseases in farmers]. *Rev. Prat.* 57, 56–59.
- Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P., Palmberg, L., 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23, 217–230.
- Loomis, D., Kromhout, H., 2004. Exposure variability: Concepts and applications in occupational epidemiology. *Am. J. Ind. Med.* 45, 113–122. doi:10.1002/ajim.10324

- Madsen, A.M., Nielsen, S.H., 2010. Airborne endotoxin associated with particles of different sizes and affected by water content in handled straw. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 278–284. doi:10.1016/j.ijheh.2010.03.001
- Marescaux, A., Degano, B., Soumagne, T., Thaon, I., Laplante, J.-J., Dalphin, J.-C., 2016. Impact of farm modernity on the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in dairy farmers. *Occup. Environ. Med.* 73, 127–133. doi:10.1136/oemed-2014-102697
- May, S., Romberger, D.J., Poole, J.A., 2012. Respiratory Health Effects of Large Animal Farming Environments. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 524–541. doi:10.1080/10937404.2012.744288
- Mølhave, L., 1991. Volatile Organic Compounds, Indoor Air Quality and Health. *Indoor Air* 1, 357–376. doi:10.1111/j.1600-0668.1991.00001.x
- Monso, E., Riu, E., Radon, K., Magarolas, R., Danuser, B., Iversen, M., Morera, J., Nowak, D., 2004. Chronic obstructive pulmonary disease in never-smoking animal farmers working inside confinement buildings. *Am. J. Ind. Med.* 46, 357–362. doi:10.1002/ajim.20077
- Nehme, B., Létourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Duchaine, C., 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, 665–675. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01489.x
- Nieuwenhuijsen, M.J., Kruize, H., Schenker, M.B., 1998. Exposure to Dust and its Particle Size Distribution in California Agriculture. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 59, 34–38. doi:10.1080/15428119891010316
- Nieuwenhuijsen, M.J., Noderer, K.S., Schenker, M.B., Vallyathan, V., Olenchock, S., 1999. Personal Exposure to Dust, Endotoxin and Crystalline Silica in California Agriculture. *Ann. Occup. Hyg.* 43, 35–42. doi:10.1093/annhyg/43.1.35
- Omland, Ø., Hjort, C., Pedersen, O.F., Miller, M.R., Sigsgaard, T., 2011. New-onset asthma and the effect of environment and occupation among farming and nonfarming rural subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 761–765. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.006
- OMS, 2017a. WHO | Asthma [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/> (accessed 10.14.17).
- OMS, 2017b. WHO | Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/respiratory/copd/en/> (accessed 10.14.17).
- OMS, 2017c. WHO | Chronic respiratory disease [WWW Document]. URL http://www.who.int/gard/news_events/1-3.GARD-06-07-K1.pdf (accessed 10.14.17).
- Ostro, B., Lipsett, M., Mann, J., Braxton-Owens, H., White, M., 2001. Air pollution and exacerbation of asthma in African-American children in Los Angeles. *Epidemiol. Camb. Mass* 12, 200–208.
- Pappas, G.P., Herbert, R.J., Henderson, W., Koenig, J., Stover, B., Barnhart, S., 2000. The respiratory effects of volatile organic compounds. *Int. J. Occup. Environ. Health* 6, 1–8. doi:10.1179/oeh.2000.6.1.1
- Pepys, J., Jenkins, P.A., Festenstein, G.N., Gregory, P.H., Lacey, M.E., Skinner, F.A., 1990. Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. 1963. *Allergy Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc.* 11, 101–102, discussion 97–99.
- Peretz, C., Goren, A., Smid, T., Kromhout, H., 2002. Application of mixed-effects models for exposure assessment. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 69–77.

- Pfister, H., Morzadec, C., Le Cann, P., Madec, L., Lecureur, V., Chouvet, M., Jouneau, S., Vernhet, L., 2017. Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms. *Environ. Res.* 158, 691–702. doi:10.1016/j.envres.2017.07.025
- Poole, J.A., Dooley, G.P., Saito, R., Burrell, A.M., Bailey, K.L., Romberger, D.J., Mehaffy, J., Reynolds, S.J., 2010. Muramic acid, endotoxin, 3-hydroxy fatty acids, and ergosterol content explain monocyte and epithelial cell inflammatory responses to agricultural dusts. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73, 684–700. doi:10.1080/15287390903578539
- Poole, J.A., Romberger, D.J., 2012. Immunological and Inflammatory Responses to Organic Dust in Agriculture. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12, 126–132. doi:10.1097/ACI.0b013e3283511d0e
- Poole, J.A., Thiele, G.M., Alexis, N.E., Burrell, A.M., Parks, C., Romberger, D.J., 2009. Organic dust exposure alters monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L767–L776. doi:10.1152/ajplung.00107.2009
- Poole, J.A., Wyatt, T.A., Kielian, T., Oldenburg, P., Gleason, A.M., Bauer, A., Golden, G., West, W.W., Sisson, J.H., Romberger, D.J., 2011. Toll-like receptor 2 regulates organic dust-induced airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 711–719. doi:10.1165/rcmb.2010-0427OC
- Preller, L., Heederik, D., Kromhout, H., Boleij, J.S., Tielen, M.J., 1995a. Determinants of dust and endotoxin exposure of pig farmers: development of a control strategy using empirical modelling. *Ann. Occup. Hyg.* 39, 545–557.
- Preller, L., Kromhout, H., Heederik, D., Tielen, M.J., 1995b. Modeling long-term average exposure in occupational exposure-response analysis. *Scand. J. Work. Environ. Health* 21, 504–512.
- Rask-Andersen, A., 2011. Asthma increase among farmers: a 12-year follow-up. *Ups. J. Med. Sci.* 116, 60–71. doi:10.3109/03009734.2010.503287
- Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnet, K., Dalphin, J.-C., 2001. Role of Molds in Farmer's Lung Disease in Eastern France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1534–1539. doi:10.1164/ajrccm.163.7.2006077
- Reynolds, S.J., Nonnenmann, M.W., Basinas, I., Davidson, M., Elfman, L., Gordon, J., Kirychuck, S., Reed, S., Schaeffer, J.W., Schenker, M.B., Schlünssen, V., Sigsgaard, T., 2013. Systematic Review of Respiratory Health Among Dairy Workers. *J. Agromedicine* 18, 219–243. doi:10.1080/1059924X.2013.797374
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.-C., Laplante, J.-J., Piarroux, R., 2005. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 12, 217–221.
- Samadi, S., van Eerdenburg, F.J.C.M., Jamshidifard, A.-R., Otten, G.P., Droppert, M., Heederik, D.J.J., Wouters, I.M., 2012. The influence of bedding materials on bio-aerosol exposure in dairy barns. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 361–368. doi:10.1038/jes.2012.25
- Schaeffer, J.W., Reynolds, S., Magzamen, S., VanDyke, A., Gottel, N.R., Gilbert, J.A., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J.T., Volckens, J., 2017. Size, Composition, and Source Profiles of Inhalable Bioaerosols from Colorado Dairies. *Environ. Sci. Technol.* 51, 6430–6440. doi:10.1021/acs.est.7b00882

- Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., Lengauer, T., 2005. ROCR: visualizing classifier performance in R. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 3940–3941. doi:10.1093/bioinformatics/bti623
- Spaan, S., Heederik, D.J.J., Thorne, P.S., Wouters, I.M., 2007. Optimization of Airborne Endotoxin Exposure Assessment: Effects of Filter Type, Transport Conditions, Extraction Solutions, and Storage of Samples and Extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6134–6143. doi:10.1128/AEM.00851-07
- Spaan, S., Wouters, I.M., Oosting, I., Doekes, G., Heederik, D., 2006. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. *J. Environ. Monit. JEM* 8, 63–72. doi:10.1039/b509838f
- Sunesson, A.-L., Gullberg, J., Blomquist, G., 2001. Airborne chemical compounds on dairy farms. *J. Environ. Monit.* 3, 210–216. doi:10.1039/b008873k
- SUVA, 2013. Valeurs limites d'exposition aux postes de travail (Occupational limit values at workstations).
- Thaon, I., Thiebaut, A., Jochault, L., Lefebvre, A., Laplante, J.J., Dalphin, J.C., 2011. Influence of hay and animal feed exposure on respiratory status: a longitudinal study. *Eur. Respir. J.* 37, 767–774. doi:10.1183/09031936.00122209
- Thorn, J., Rylander, R., 1998. Inflammatory response after inhalation of bacterial endotoxin assessed by the induced sputum technique. *Thorax* 53, 1047–1052.
- Trakumas, S., Salter, E., 2009. Parallel particle impactor – novel size-selective particle sampler for accurate fractioning of inhalable particles. *J. Phys. Conf. Ser.* 151, 012060. doi:10.1088/1742-6596/151/1/012060
- Vestbo, J., Hurd, S.S., Agustí, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martinez, F.J., Nishimura, M., Stockley, R.A., Sin, D.D., Rodriguez-Roisin, R., 2013. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 347–365. doi:10.1164/rccm.201204-0596PP
- Vogelzang, P.F.J., van der GULDEN, J.W.J., Folgering, H., Kolk, J.J., Heederik, D., Preller, L., Tielen, M.J.M., van SCHAYCK, C.P., 1998. Endotoxin Exposure as a Major Determinant of Lung Function Decline in Pig Farmers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 15–18. doi:10.1164/ajrccm.157.1.9703087
- Von Essen, S., Romberger, D., 2003. The respiratory inflammatory response to the swine confinement building environment: the adaptation to respiratory exposures in the chronically exposed worker. *J. Agric. Saf. Health* 9, 185–196.
- Wameling, A., Schäper, M., Kunert, J., Blaszkewicz, M., van Thriel, C., Zupanic, M., Seeber, A., 2000. Individual toluene exposure in rotary printing: increasing accuracy of estimation by linear models based on protocols of daily activity and other measures. *Biometrics* 56, 1218–1221.
- Wang, R.-F., Cao, W.-W., Cerniglia, C.E., 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1242–1247.
- Ware, J.H., Spengler, J.D., Neas, L.M., Samet, J.M., Wagner, G.R., Coultas, D., Ozkaynak, H., Schwab, M., 1993. Respiratory and irritant health effects of ambient volatile organic compounds. The Kanawha County Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 137, 1287–1301.
- Weisel, C.P., 2002. Assessing exposure to air toxics relative to asthma. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 4, 527–537.

- Zacharisen, M.C., Fink, J.N., 2011. Hypersensitivity pneumonitis and related conditions in the work environment. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 31, 769–786, vii. doi:10.1016/j.iac.2011.07.004
- Zucker, B.-A., Müller, W., 1998. Concentrations of airborne endotoxin in cow and calf stables. *J. Aerosol Sci.* 29, 217–221. doi:10.1016/S0021-8502(97)00461-8
- Zucker, B.-A., Trojan, S., Müller, W., 2000. Airborne Gram-Negative Bacterial Flora in Animal Houses. *Zoonoses Public Health* 47, 37–46.

9 ANNEXES

Annexe 1 : probabilité de pénétration des particules d'un aérosol dans l'arbre respiratoires

DAE	Fraction inhalable	Fraction thoracique	Fraction alvéolaire	Fraction extra-thoracique	Fraction trachéo-bronchique
0,01	99,97%	99,97%	99,97%	0,00%	0,00%
0,1	99,70%	99,70%	99,70%	0,00%	0,00%
1	97,09%	97,09%	97,07%	0,00%	0,02%
2	94,35%	94,35%	91,37%	0,00%	2,97%
3	91,76%	91,72%	73,86%	0,04%	17,87%
4	89,33%	88,96%	49,97%	0,38%	38,98%
5	87,04%	85,42%	29,97%	1,62%	55,46%
6	84,88%	80,55%	16,77%	4,34%	63,78%
7	82,85%	74,16%	9,05%	8,69%	65,11%
8	80,94%	66,57%	4,81%	14,37%	61,77%
9	79,14%	58,33%	2,54%	20,81%	55,79%
10	77,44%	50,03%	1,35%	27,41%	48,68%
11	75,84%	42,13%	0,72%	33,71%	41,41%
12	74,34%	34,94%	0,39%	39,40%	34,55%
13	72,92%	28,63%	0,21%	44,29%	28,42%
14	71,59%	23,23%	0,12%	48,36%	23,11%
15	70,33%	18,70%	0,07%	51,63%	18,63%
16	69,14%	14,96%	0,04%	54,19%	14,92%
17	68,03%	11,91%	0,02%	56,12%	11,89%
18	66,98%	9,45%	0,01%	57,53%	9,44%
19	65,99%	7,49%	0,01%	58,51%	7,48%
20	65,06%	5,92%	0,00%	59,14%	5,91%
21	64,18%	4,67%	0,00%	59,51%	4,67%
22	63,36%	3,69%	0,00%	59,67%	3,69%
23	62,58%	2,91%	0,00%	59,67%	2,91%

24	61,85%	2,30%	0,00%	59,55%	2,30%
25	61,16%	1,82%	0,00%	59,34%	1,82%
26	60,51%	1,44%	0,00%	59,07%	1,44%
27	59,89%	1,14%	0,00%	58,76%	1,14%
28	59,32%	0,90%	0,00%	58,42%	0,90%
29	58,78%	0,72%	0,00%	58,06%	0,72%
30	58,26%	0,57%	0,00%	57,70%	0,57%

Annexe 2 : repartitions de particules inhalées dans l'arbre respiratoire en fonction de leur diamètre aérodynamique.

DAE	Zone thoracique	Zone Alvéolaire	Zone Thoracique	Extra-	Zone Trachéobronchique
0,01	100,00%	100,00%	0,00%		0,00%
0,1	100,00%	100,00%	0,00%		0,00%
1	100,00%	99,98%	0,00%		0,02%
2	100,00%	96,85%	0,00%		3,15%
3	99,96%	80,48%	0,04%		19,47%
4	99,58%	55,94%	0,42%		43,64%
5	98,14%	34,43%	1,86%		63,71%
6	94,89%	19,75%	5,11%		75,14%
7	89,51%	10,92%	10,49%		78,59%
8	82,25%	5,94%	17,75%		76,31%
9	73,71%	3,21%	26,29%		70,50%
10	64,60%	1,74%	35,40%		62,86%
11	55,55%	0,95%	44,45%		54,60%
12	47,01%	0,52%	52,99%		46,48%
13	39,26%	0,29%	60,74%		38,97%
14	32,45%	0,16%	67,55%		32,28%
15	26,58%	0,09%	73,42%		26,49%
16	21,63%	0,05%	78,37%		21,58%
17	17,51%	0,03%	82,49%		17,48%
18	14,12%	0,02%	85,88%		14,10%
19	11,34%	0,01%	88,66%		11,33%
20	9,09%	0,01%	90,91%		9,09%
21	7,28%	0,00%	92,72%		7,28%
22	5,82%	0,00%	94,18%		5,82%
23	4,65%	0,00%	95,35%		4,65%

24	3,72%	0,00%	96,28%	3,72%
25	2,97%	0,00%	97,03%	2,97%
26	2,37%	0,00%	97,63%	2,37%
27	1,90%	0,00%	98,10%	1,90%
28	1,52%	0,00%	98,48%	1,52%
29	1,22%	0,00%	98,78%	1,22%
30	0,98%	0,00%	99,02%	0,98%

Annexe 3 : démonstration de l'effet multiplicatif des déterminants de l'exposition dans le cadre d'un modèle construit à partir du logarithme naturel de l'exposition.

Les modèles empiriques de l'exposition ont pour équation générale :

$$\ln(E) = B_0 + B_1 * X_1 + \dots + B_n * X_n = \mathbf{B_0} + \sum_{1 \rightarrow n} \mathbf{B_n} * \mathbf{X_n}$$

Avec :

E = Exposition

B_0 = Niveau de fond (ordonnée à l' origine)

$B_{1 \rightarrow n}$ = Coefficients linéaires associés aux déterminants 1 à n.

$X_{1 \rightarrow n}$ = Valeurs pouvant être prise par les déterminants 1 à n.

Pour remonter à l'exposition il faut calculer l'exponentielle, soit :

$$E = \exp(B_0 + B_1 * X_1 + \dots + B_n * X_n) = \mathbf{\exp(B_0} + \sum_{1 \rightarrow n} \mathbf{B_n} * \mathbf{X_n})}$$

Or, de par la propriété de l'exponentielle on a également

$$E = \exp(B_0) * \exp(B_1 * X_1) * \dots * \exp(B_n * X_n)$$

Soit :

$$\mathbf{E} = \mathbf{\exp(B_0)} * \prod_{1 \rightarrow n} [\mathbf{\exp(B_n * X_n)}]$$

Sous cette dernière forme, on constate que l'effet des déterminant est exprimé sous forme d'un produit.

Résumé

Les éleveurs laitiers-bovins présentent une incidence plus élevée de symptômes respiratoires et de maladies broncho-pulmonaires que la population générale. Un facteur de risque important serait l'exposition professionnelle à divers aéro-contaminants d'origine biologique et chimique. Les déterminants professionnels de ces expositions et les effets biologiques des contaminants inhalés de manière répétée restent cependant mal connus. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour objectifs i) de rechercher les déterminants professionnels de l'exposition aux bio-aérosols thoraciques (poussières organiques, endotoxines, bactéries et moisissures), à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, et ii) de caractériser les effets pro-inflammatoires des poussières thoraciques émises lors de la tâche de paillage mécanisé qui est connue pour induire une forte exposition aux bio-aérosols.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons réalisé une campagne de 112 mesures individuelles répétées dans 29 exploitations laitières d'élevage bovin localisées en Bretagne. Par l'utilisation de modèles multivariés à effets mixtes, nous montrons que l'exposition aux bio-aérosols est majoritairement induite par l'exécution de tâches liées à la distribution de litières et d'aliments (paille, foin, ensilage). L'exposition à l'ammoniac est fortement dépendante du nombre de vaches présentes dans l'exploitation et des temps passés en stabulation et en salle de traite. L'exposition à l'acétaldéhyde est dépendante de la taille de l'exploitation et des tâches liées à la distribution d'ensilage. Nos travaux soulignent également qu'une augmentation de la surface des ouvertures de la stabulation est associée à une réduction significative de l'exposition aux moisissures, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde. Enfin, notre étude montre que les poussières émises lors du paillage mécanisé ont (1) une taille leur permettant de se déposer majoritairement dans les régions trachéo-bronchiques, (2) une composition bactériologique et fongique complexe et (3) *in vitro* des effets pro-inflammatoires puissants induisant l'expression de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8 dans des macrophages humains.

Au total, ces travaux de thèse ont permis d'identifier des activités professionnelles et des caractéristiques d'exploitations augmentant significativement les niveaux d'expositions des éleveurs laitiers-bovins à des contaminants chimiques et à des poussières organiques pouvant théoriquement se déposer dans les tissus bronchiques où sont censées se développer différentes maladies broncho-pulmonaires. Les modèles statistiques développés au cours de la thèse permettent dès à présent la reconstitution des expositions des éleveurs et pourront être utilisés dans de futures études épidémiologiques et dans l'élaboration de programmes de prévention

Abstract

Dairy farmers have an increased risk of lower airway diseases that is likely related to occupational exposures to airborne contaminants. Nevertheless, occupational determinants of dairy farmers' exposures remain poorly documented and the biological effects of the contaminants chronically inhaled by farmers need to be fully characterized.

In this context, the objectives of this PhD thesis were i) to identify the occupational determinants of exposure to thoracic bio-aerosols (organic dusts, endotoxins, bacteria and moulds), ammonia and acetaldehyde, and ii) to characterize the pro-inflammatory effects of thoracic dusts emitted during the mechanical spreading of straw bedding, a task well-known to generate inhalable dusts. To achieve these goals, we carried out a 112-repeated exposure measurement campaign on 29 dairy farms located in Brittany. Using multivariate mixed-effect regression models, we have demonstrated that farmers' exposures to bio-aerosols were mainly induced by tasks related to bedding material distribution and cow feeding (straw, hay, silage). Exposure levels to ammonia were highly dependent on cow numbers and times spent by the farmers in stable and milking parlour. Acetaldehyde exposure was modulated according to the farm size and times spent to distribute silage. Our work also highlighted that an increase of the area of wall opening significantly reduced exposure to mould, acetaldehyde and ammonia. Finally, our study showed that dusts emitted during mechanical straw spreading have (1) a size small enough to allow them to deposit in the tracheobronchial regions, (2) a complex bacterial and fungal composition, and (3) strong *in vitro* pro-inflammatory effects that induced TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 expression in human macrophages.

In conclusion, these results have identified different dairy farm characteristics and occupational tasks that significantly increased the exposure levels to chemical contaminants and thoracic organic dusts. Statistical models built during this research project already allow reconstitution of dairy farmers' exposure that may of use in future epidemiological studies and to develop new preventive measures.